

# **Acylierung und physikochemische Charakterisierung von Ackerbohnen-Legumin**

Vom Fachbereich 15 der Technischen Universität Berlin  
- Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie -  
genehmigte Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Diplom-Lebensmittelchemikerin  
Constanze Knopfe

Gutachter: Prof. Dr. habil. Herbert Kunzek

Gutachter: Prof. Dr. habil. Klaus Dieter Schwenke

Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Jörg-Thomas Mörsel

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 14. Juni 2000

Berlin 2000

D 83

# Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand nach einer Themenstellung von Herrn Prof. Dr. K. D. Schwenke in dreijähriger Forschungsarbeit (Januar 1995 bis Dezember 1996 und November 1997 bis Oktober 1998) und basiert auf den DFG-Projekten Schw 462/4-1 und Schw 462/4-2.

Die Arbeiten wurden, sofern nicht anders vermerkt, in der Forschungsgruppe Pflanzenproteinchemie am Institut für Angewandte Proteinchemie e.V., Kleinmachnow durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. D. Schwenke für die Bereitstellung des Themas, die vielen konstruktiven Diskussionen sowie die freundliche Betreuung.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Pflanzenproteinchemie, insbesondere Frau Dr. Steffi Dudek, Herrn Dr. Ralf Mothes, Herrn Dr. Peter Krause, Frau Angelika Krajewski, Frau Helga Beyer und Frau Bettina Junker, danke ich für ihre hilfreiche Unterstützung, anregende Diskussionen und vor allem für die angenehme Laboratmosphäre.

Mein Dank gilt allen nationalen und internationalen Kooperationspartnern für die freundliche Unterstützung und erfolgreiche Zusammenarbeit, insbesondere

- Frau Dr. Larissa Mikheeva am Institut für Biochemische Physik der Russischen Akademie der Wissenschaften, Moskau, für die Betreuung bei den DSC-Messungen
- Herrn Dr. Eckhard Görnitz am Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung, Teltow-Seehof, für die Ermöglichung zahlreicher Dichte- und Ultrazentrifugationsmessungen
- Herrn Dr. Dietrich Zirwer und Herrn Dr. Klaus Gast am Max-Delbrück-Centrum, Berlin-Buch, für die Einarbeitung in die CD-Spektroskopie
- Herrn Dr. Herbert Dautzenberg am Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Teltow-Seehof, für die gemeinsame Durchführung der Messungen zur Lichtstreuung

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG</b> .....	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>THEORETISCHE GRUNDLAGEN</b> .....	<b>7</b>
2.1	Pflanzliche Speicherproteine .....	7
2.1.1	Struktur pflanzlicher Speicherproteine .....	7
2.1.2	11 S-Globuline.....	9
2.1.3	Die Ackerbohne und ihr Hauptspeicherprotein (Legumin) .....	10
2.2	Proteinmodifizierung.....	12
2.2.1	Chemische Modifizierung der Aminogruppen .....	13
2.2.1.1	Die Acylierung.....	13
2.2.1.2	Acetylierung von Ackerbohnen-Legumin.....	14
2.2.1.3	Succinylierung von Ackerbohnen-Legumin.....	16
2.2.1.4	Die Guanidinierung .....	17
2.2.1.5	Amidinierung und Alkylierung.....	17
2.2.2	Chemische Modifizierung der Carboxylgruppen.....	17
2.2.2.1	Die Veresterung .....	18
2.2.2.2	Amidierung.....	18
2.2.3	Reduktion bzw. Oxidation von Disulfid- bzw. Sulfhydrylgruppen.....	18
2.2.4	Hydrolyse und Desamidierung.....	19
2.2.5	Die Glycosylierung.....	20
2.2.6	Die Phosphorylierung.....	20
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>22</b>
3.1	Proteindarstellung.....	22
3.1.1	Verfahren zur Isolierung des Ackerbohnen-Legumins .....	22
3.1.2	Chemische Modifizierung der Leguminproben .....	23
3.1.2.1	Acetylierung .....	23
3.1.2.2	Succinylierung.....	24
3.2	Charakterisierung des Untersuchungsmaterials .....	24
3.2.1	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	24
3.2.1.1	Mikro-Biuret-Methode.....	24
3.2.1.2	Proteingehalt nach KJELDAHL.....	25
3.2.2	Methoden zur Bestimmung des Modifizierungsgrades .....	25
3.2.2.1	Bestimmung des <i>N</i> -Acylierungsgrades .....	25
3.2.2.2	Bestimmung des <i>O</i> -Acylierungsgrades .....	26
3.2.3	Größenausschluß-Chromatographie (SE-HPLC).....	27
3.2.4	Gelelektrophorese.....	27
3.2.4.1	Denaturierende Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	27
3.2.4.2	Native Gelelektrophorese (BN-PAGE).....	27
3.2.5	Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS).....	28
3.2.6	Methoden zur Untersuchung der Hydrophobizität.....	28

3.2.6.1	Fluoreszenzsondentechnik.....	28
3.2.6.2	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (RP-HPLC).....	30
3.2.6.3	Verteilung im Polymer-Zweiphasensystem.....	30
3.3	Methoden zur Aufklärung von Konformationsänderungen.....	31
3.3.1	Hydrodynamische Methoden.....	31
3.3.1.1	Kapillarviskosimetrie.....	31
3.3.1.2	Präzisionsdichtemessung.....	32
3.3.1.3	Analytische Ultrazentrifugation.....	33
3.3.1.4	Dynamische Lichtstreuung.....	36
3.3.2	Spektroskopische Methoden.....	38
3.3.2.1	UV-Absorptionsspektroskopie.....	38
3.3.2.2	Fluoreszenzemissionsspektroskopie.....	39
3.3.2.3	Circulardichroitische Spektrometrie.....	40
3.3.3	Methoden zur Untersuchung der Konformationsstabilität.....	42
3.3.3.1	Differential Scanning-Kalorimetrie zur Untersuchung der Thermostabilität.....	42
3.3.3.2	Fluoreszenzspektroskopie zur Untersuchung der Denaturansstabilität.....	44
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>48</b>
4.1	Acylierung funktioneller Gruppen des Legumins.....	48
4.2	Untersuchungen zur Struktur acylierter Leguminproben.....	55
4.2.1	Veränderung der Hydrophobizität infolge Acylierung.....	55
4.2.1.1	Oberflächenhydrophobizität acylierter Leguminproben.....	55
4.2.1.2	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie acylierter Legumine.....	57
4.2.1.3	Verteilung von Leguminproben in einem Polymer-Zweiphasensystem.....	59
4.2.2	Dissoziation und Assoziation acylierter Leguminproben.....	59
4.2.2.1	Größenausschluß-Chromatographie acylierter Leguminproben.....	60
4.2.2.2	Analytische Ultrazentrifugation acylierter Leguminproben.....	61
4.2.2.3	Native Gelelektrophorese acylierter Leguminproben.....	63
4.2.2.4	Isolierung und Charakterisierung der aggregierten Fraktion in hochacetyliertem Legumin.....	65
4.2.3	Bestimmung hydrodynamischer Größen.....	68
4.2.3.1	Viskosität acylierter Leguminproben.....	68
4.2.3.2	Partielles spezifisches Volumen und Dichte acylierter Leguminproben.....	73
4.2.3.3	Sedimentationskoeffizienten von hochsuccinyliertem Legumin.....	75
4.2.3.4	Diffusionskonstanten von hochsuccinyliertem Legumin.....	77
4.2.4	Spektroskopische Untersuchungen.....	79
4.2.4.1	Fluoreszenzemissionsspektroskopie acylierter Leguminproben.....	79
4.2.4.2	UV-Absorptionsspektroskopie acylierter Leguminproben.....	85
4.2.4.3	Circulardichroitische Spektrometrie acylierter Leguminproben.....	92
4.2.5	Thermostabilität acylierter Leguminproben.....	98
4.2.6	Denaturansstabilität acylierter Leguminproben.....	103
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>106</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>125</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>130</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ac	(... % <i>N</i> -)acetyliert
AKF	(Zeit-)Autokorrelationsfunktion
ANS	8-Anilino-1-naphtalinsulfat
AS	Aminosäure
AUZ	analytische Ultrazentrifugation
BN-PAGE	Blaue Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese
CD	Circulardichroismus
CPS	Complexpuffer mit 0,5 M NaCl
DLS	dynamische Lichtstreuung
DTE	Dithioerythritol
GuHCl	Guanidinium-Hydrochlorid
<i>I</i>	Ionenstärke
ID	Innendurchmesser der HPLC-Säule
IP	isoelektrischer Punkt
Kap.	Kapitel
MALDI-TOF MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Ionisations-Flugzeit Massenspektrometrie
MRW	mittleres molares Restgewicht
MWG	Massenwirkungsgesetz
PB	Phosphatpuffer
Phe	Phenylalanin
Pkt.	Punkt
Prot.	Protein
RF	Relative Fluoreszenz
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie
RSA	Rinderserumalbumin
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat
SE-HPLC	Größenausschluß-Hochleistungsflüssigchromatographie
suc	(... % <i>N</i> -)succinyliert
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
var.	Varietät
VF	Verdünnungsfaktor

*N*-Blockierung, *N*-Acylierung = Modifizierung der Protein-Aminogruppen

*O*-Blockierung, *O*-Acylierung = Modifizierung der Protein-Hydroxylgruppen

# 1 Einleitung und Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit wird über die chemische Modifizierung und physikochemische Untersuchungen am nativen und acylierten Hauptspeicherprotein der Ackerbohne (*Vicia faba* L.), einem 11 S-Globulin („Legumin“) berichtet.

Die Ackerbohne gehört zu den Leguminosen. Körnerleguminosen werden in Europa auf etwa 3 % des Ackerlandes angebaut, in Afrika dagegen auf 8 %, in Asien auf 9 % des Ackerlandes [1]. Nur 30 % des in Europa konsumierten Proteins werden in der EU produziert und nur 5 % stammen von in der EU produzierten Hülsenfrüchten [2]. Ackerbohnen werden vor allem aus China nach Europa importiert [3].

Körnerleguminosen sind eine anerkannte Proteinquelle für die Human- und Tierernährung. Sie enthalten aber auch etliche für die Ernährung nachteilige Faktoren (Proteaseinhibitoren, Lectine, kondensierte Tannine, Vicine), die jedoch mittels unterschiedlichster Behandlungsmethoden inaktiviert oder entfernt werden können bzw. müssen [3]. In europäischen Ländern wurden 1996 durchschnittlich 2,5 kg Hülsenfrüchte pro Jahr und Einwohner (vgl. Brasilien 16 kg) verzehrt [4] und von 1996-1997 457 000 t Ackerbohnen als Viehfutter produziert [5]. In Deutschland wurden 1997 auf 81 000 ha Fläche 236 000 t Hülsenfrüchte produziert; 91 % fanden Anwendung als Futtermittel, nur 4 % als Nahrungsmittel [6].

Die große Aufmerksamkeit, die Proteinen allgemein zuteil wird, hängt mit ihrer Schlüsselrolle als Bestandteil vieler Lebensmittel zusammen. Ihre funktionellen Eigenschaften und deren gezielte Beeinflussung befähigen sie zur Bildung und Stabilisierung von Gelen, Schäumen und Emulsionen in Lebensmittelsystemen [7].

Pflanzenproteine haben neben der ernährungsphysiologischen auch eine funktionelle Bedeutung. Die physikochemischen und funktionellen Eigenschaften von den aus Pflanzenteilen oder den Samen isolierten Komponenten, wie Proteine, Stärke, Rohfasern sprechen für eine zunehmende Anwendung nicht nur im Bereich der Ernährung sondern vor allem auch im technischen Bereich („Non-Food-Use“). Eine Hauptursache dafür ist das Anfallen gewaltiger Mengen Protein als Nebenprodukt z. B. bei der Stärke- (im Abwasser bei der Kartoffelstärkeproduktion) und Ölerzeugung (in den Preß- und Extraktionsrückständen der Ölsamen). Die rasche Entwicklung neuer Technologien für pflanzliche Speicherproteine als nachwachsende und biologisch abbaubare Rohstoffe für nützliche und wichtige industrielle Produkte mit breit gefächelter Anwendung insbesondere im „Non-Food“-Sektor ist bereits abzusehen [6].

Die Samenproteine bzw. Proteine im allgemeinen, weisen im nativen Zustand allerdings nur selten ein Optimum an funktionellen Eigenschaften auf. Diese lassen sich z. B. durch chemische Modifizierung beeinflussen. Dabei können die reaktiven Seitengruppen und die Raumstruktur des Proteins verändert werden [68].

Von den vielfältigen Möglichkeiten chemischer Modifizierung werden in der vorliegenden Arbeit die Untersuchungen zu den Veränderungen am Ackerbohnen-Legumin durch Acylierung (Acetylierung und Succinylierung) beschrieben.

In der Literatur findet man ein breites Spektrum an Arbeiten, die sich mit der Acylierung tierischer Proteine (z. B. Casein [8, 9], Rinderserumalbumin [10]) und der Acylierung von 11 S-Globuline enthaltenden Proteinisolaten, -konzentraten oder -fraktionen verschiedener Ölpflanzen und Leguminosen (z. B. aus Sojabohne/Glycinin [11, 12], Raps/Cruciferin [13, 14, 15], Sonnenblume/Heliantinin [15, 16, 141], Erdnuß/Arachin [17, 18]) befassen.

In der Arbeitsgruppe von Prof. K. D. SCHWENKE wurden umfassende Untersuchungen an acylierten Ackerbohnen-Proteinisolaten, die zu etwa 65 % aus Legumin bestehen, durchgeführt [19, 20, 21]. Informationen über chemische und funktionelle Eigenschaften von Ackerbohnen-Proteinisolaten und deren Modifikaten wurden von SCHMANDKE zusammengefaßt [44].

Für die gezielte Veränderung der Funktionalität eines Proteins ist es notwendig, Beziehungen zwischen Struktur und Funktionalität aufzuklären. Das Verhalten während der chemischen Modifizierung und die Auswirkungen durch die Acylierung sind jedoch nicht ohne weiteres vom Proteinisolat auf das „reine“ Ackerbohnen-Legumin übertragbar, was durch den Vergleich der nach Acetylierung von Ackerbohnen-Proteinisolat [22] und „reinem“ Ackerbohnen-Legumin [75] resultierenden Grenzflächeneigenschaften deutlich wird. Erst die Untersuchungen an „reinen“ 11 S-Globulinen geben definierte Auskünfte über deren Strukturveränderungen, da in den häufig untersuchten Proteinisolaten die reichlich vorhandenen Minorkomponenten und diversen Beimengungen stören. Zusammenhänge zwischen Struktur und Grenzflächenverhalten von acetylierten Proteinisolaten und einigen acetylierten Ackerbohnen-Leguminderivaten wurden von KRAUSE untersucht [23, 75].

Die grundlegende Aufgabe im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestand darin, das Hauptspeicherprotein der Ackerbohne („Legumin“) möglichst rein zu isolieren und chemisch modifizierte Präparate herzustellen. Aus dem isolierten nativen Legumin wurden acetylierte und succinylierte Proben mit unterschiedlichen Modifizierungsgraden präpariert.

Anschließend wurden diese Derivate chemisch charakterisiert, und es erfolgten umfassende, über bisherige Untersuchungen hinausgehende Studien über deren physikochemische Eigenschaften. Die physikochemischen Eigenschaften der unterschiedlich acylierten Leguminderivate wurden mit denen des nativen Legumins verglichen.

Weiteres Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung eintretender Struktur- bzw. Konformationsänderungen des Legumins in Abhängigkeit von der Art (Acetylierung, Succinylierung) und dem Grad der Modifizierung der funktionellen Gruppen. Im Hinblick auf die Manipulation der funktionellen Eigenschaften des Legumins waren Untersuchungen zur Konformationsstabilität und der Oberflächenhydrophobizität von besonderer Bedeutung.

Neben den Kenntnissen über den Zusammenhang zwischen funktionellen Eigenschaften und Proteinstruktur, sind für die Herstellung von mittels chemischer Modifikation „maßgeschneiderten“ Proteinen für die industrielle Anwendung auch Kenntnisse über den Einfluß technologisch relevanter Faktoren wie pH-Wert, Ionenstärke und Temperatur auf die Proteinstruktur notwendig. Aus diesem Grund wurde der Frage nach dem Einfluß der Ionenstärke des Lösungsmittels auf die Konformation und die physikochemischen Eigenschaften ausgewählter Proben nachgegangen.

Die Aussagen der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe chromatographischer, elektrophoretischer, hydrodynamischer (Kapillarviskosimetrie, Präzisionsdichtemessung, analytische Ultrazentrifugation, dynamische Lichtstreuung), spektroskopischer (Fluoreszenz-, UV-, CD-Spektroskopie) und thermodynamischer (Entfaltung durch Erhitzen und in Gegenwart von Denaturans) Untersuchungsmethoden getroffen.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Pflanzliche Speicherproteine

Es gibt keine einheitliche systematische Klassifizierung der Proteine. Gebräuchlich ist entweder die Einteilung nach ihrer biologischen Funktion, z. B. in Speicherproteine, Transportproteine, Strukturproteine, Enzyme oder nach ihrem Vorkommen in pflanzliche und tierische Proteine bzw. Muskelproteine, Plasmaproteine, Milchproteine u. s. w. Proteine werden auch häufig entsprechend ihrer Struktur klassifiziert. Danach unterscheidet man globuläre und fibrilläre Proteine.

Eine Klassifizierung der Pflanzenproteine wurde schon 1924 von OSBORNE [24] eingeführt. Das Osborne-Schema unterscheidet die Pflanzenproteine nach ihrer Löslichkeit entweder in Wasser (Albumine), in Salzlösungen (Globuline), in wäßrigem Alkohol (Prolamine) oder in sauren oder alkalischen Lösungen (Gluteline).

Samenspeicherproteine dienen als Stickstofflieferanten für die Keimung. Im Prinzip können alle Proteine, soweit sie bei der Keimung abgebaut werden und zur Versorgung des Keimlings dienen, als Reserve- oder Speicherproteine bezeichnet werden. Nach DERBYSHIRE *et al.* [25] sollte jedes aus reifen Samen extrahierte Protein als potentiell Speicherprotein betrachtet werden, wenn dessen Anteil am Gesamtprotein mehr als 5% beträgt. Im allgemeinen wird die Bezeichnung Speicherprotein auf die in den Aleuronkörnern der Speichergewebe vorkommenden Globuline angewendet, allerdings unter dem Vorbehalt, daß eine enzymatische Funktion dieser Proteine nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann [47].

#### 2.1.1 Struktur pflanzlicher Speicherproteine

Die typischen Speicherproteine der Cerealien sind Prolamine und Gluteline, die Samen von Leguminosen enthalten überwiegend Globuline und Albumine.

Unter den Samenalbuminen kommen auch zwei Gruppen wasserlöslicher Proteine mit besonderen biologischen Aktivitäten vor: Proteinaseinhibitoren, welche die Aktivität proteolytischer Enzyme hemmen (z. B. Trypsin- und Chymotrypsininhibitoren) und Phytohämagglutinine, die Erythrozyten agglutinieren können (z. B. Lectine).

Die meisten Speicherproteine weisen nur wenig Cystein und Methionin auf, wodurch ihre biologische Wertigkeit limitiert wird [31].

Bei den anteilig überwiegenden, in den Aleuronkörnern der Kotyledonen lokalisierten Globulinen werden zwei Hauptfraktionen unterschieden: die vicilinartigen Globuline mit Sedimentationskoeffizienten von ungefähr 7 S (z. B. Vicilin in Ackerbohne und Erbse,  $\beta$ -Conglutin in Lupine, Phaseolin in Buschbohnen) und die leguminartigen Globuline mit Sedimentationskoeffizienten von ungefähr 11-13 S [25] (z. B. Legumin in Ackerbohne, Glycinin in Soja, Arachin in Erdnüssen,  $\alpha$ -Conglutin in Lupine, Cruciferin in Raps). Die Trennung von Leguminen und Vicilinen kann durch die Ausnutzung der verschiedenen isoelektrischen Punkte erfolgen ( $IP_{Leg} = 4,7$  und  $IP_{Vic} = 5,5$ ). Neben den „11 S“- und den „7 S“-Globulinen sind niedermolekulare 2 S-Globuline nachweisbar, die im Fall von Raps (Napin) sogar das Hauptspeicherprotein darstellen.

Globuläre Proteine bestehen aus Polypeptidketten, die sich nach oder während der Synthese, entsprechend dem energetisch günstigsten Zustand, spontan zu ihrer Raumstruktur falten. Ihre Raumstruktur ist bereits durch die Sequenz der Aminosäuren festgelegt. Sie sind typischerweise recht kompakt, annähernd kugelig und enthalten hydrophobe, sehr dicht gepackte „Kerne“ vorrangig unpolarer Aminosäurereste [26]. Dagegen befinden sich die polaren hydrophilen Aminosäurereste überwiegend an der Oberfläche des Proteinmoleküls [26, 27].

Globuläre Proteine haben ein spezifisches Volumen von ungefähr  $0,75 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{g}$ . Ihr Radius kann annähernd durch die Gleichung  $R = 6,7 \cdot 10^{-11} \cdot [M_r]^{1/3}$  bestimmt werden [27], und ihre Dichte beträgt ungefähr  $1,33 \cdot 10^{-3} \text{ g/cm}^3$  [28].

Vor allem große globuläre Proteine (> 150 Aminosäuren) sind oft in kleineren strukturierten Domänen organisiert [26, 27]. Komplexe Proteine bestehen häufig aus Untereinheiten, die über nicht kovalente Wechselwirkungen verbunden sind.

Von FREITAS *et al.* [29] wurde die Untereinheitenstruktur der Hauptspeicherproteine verschiedener Leguminosensamen, wie z. B. Lupine, Soja, Erbse, Ackerbohne, Buschbohne, Linse mittels Gelelektrophorese verglichen. Die Untereinheiten der 7 S-Globuline (Vicilline) aus Polypeptiden mit Molekularmassen um 50 und 70 kDa enthalten kein Cystein und bilden über nichtkovalente Wechselwirkungen eine Quartärstruktur. Sie liegen häufig zu Trimeren mit Molekularmassen zwischen 150 und 210 kDa assoziiert vor und enthalten keine Disulfidbrücken [25, 30, 36]. Die 11 S-Globuline (Legumine) bestehen aus einer begrenzten Anzahl von Polypeptiden. Man unterscheidet eine Gruppe leichter basischer Polypeptide mit 20-25 kDa und eine mit schwereren sauren Polypeptiden (35-50 kDa). Im Unterschied zu den Vicilinen enthalten die Untereinheiten der 11 S-Globuline in der Regel mindestens eine Disulfidbrücke (s. Kap. 2.1.2).

### 2.1.2 11 S-Globuline

Legumine (11 S-Globuline) und Viciline (7 S-Globuline) sind die Hauptspeicherproteine in Leguminosen; ihre Anteile variieren jedoch in Abhängigkeit vom Genotyp stark. In der Ackerbohne ist das Legumin zu deutlich größeren Anteilen als Vicilin vorhanden [31, 47]. Da allen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ein 11 S-Globulin als Ausgangsmaterial zugrunde liegt, wird nur auf diese Globulinspezies näher eingegangen.

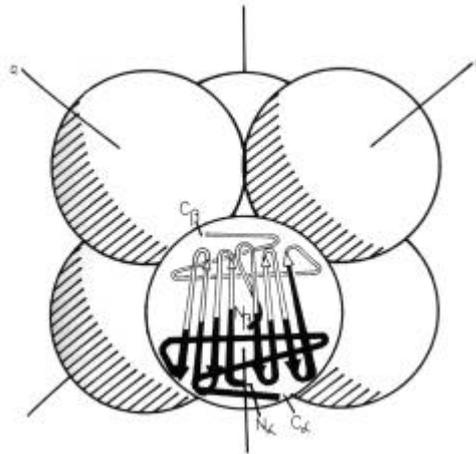
Die 11 S-Globuline sind aus sechs Untereinheiten zusammengesetzt, die eine geordnete Raumstruktur bilden. Die 11 S-Globuline sind dissoziierende und assoziierende Proteine [32]. Jede Untereinheit besteht aus zwei Polypeptidketten: der sauren  $\alpha$ -Kette und der basischen  $\beta$ -Kette, die über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind [49].

Die Sekundärstruktur einiger 11 S-Globuline wurde von ZIRWER *et al.* [33] mittels CD-Spektroskopie untersucht und nach der Methode von PROVENCHER & GLÖCKNER [34] ausgewertet. Demnach weisen sie 40-50 %  $\beta$ -Faltblattstrukturen und nur ungefähr 10 % helikale Strukturen auf und gehören somit zur Klasse der  $\beta$ -Proteine.

Die Aminosäuresequenzen der 11 S-Globuline verschiedener Leguminosen-Samen (z. B. *Pisum sativum* L., *Vicia faba* L. und *Lens culinaris* L.), ebenso die der 7 S-Globuline, sind sich jeweils ähnlich [35, 31]. Ihre Homologie ist besonders im N-Terminus ausgeprägt [51].

Nachfolgend sind einige Eigenschaften ausgewählt, welche die Homologie der 11 S-Globuline unterstreichen. Die 11 S-Globuline haben Molmassen zwischen 300 000 und 360 000 g/mol und Moleküldurchmesser zwischen 10 und 18 nm [36, 37]. Die Sedimentationskoeffizienten  $S_{20,w}^0$  schwanken zwischen 11 S und 13 S, ihre Diffusionskoeffizienten  $D_{20,w}^0$  werden mit  $3,26 - 3,83 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  angegeben [36, 37]. Die Stokeschen Radien der 11 S-Globuline aus Ackerbohne, Erbse und Sonnenblume betragen 5,5 - 6,45 nm [36]. Die 11 S-Globuline denaturieren (in Abhängigkeit vom Lösungsmittel) bei Temperaturen zwischen 85 und 95 ° C [38, 39, 149].

Auf diesen Kenntnissen basierend entwickelten PLIETZ *et al.* [40, 49, 51] für die Quartärstruktur des 11 S-Globulins folgendes Modell (**Abbildung 1**). Jeweils sechs Untereinheiten (aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette bestehend) bilden ein trigonales Antiprisma. Die konservativen N-terminalen Sequenzbereiche von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette ( $N_\alpha$  und  $N_\beta$ ) bilden strukturbestimmende Domänen im Inneren der Untereinheit. Der hydrophile C-terminale Bereich der  $\alpha$ -Kette ( $C_\alpha$ ) liegt an der Oberfläche. Die C-terminalen Bereiche der  $\beta$ -Ketten ( $C_\beta$ ) befinden sich im Zentrum des trigonalen Antiprismas und stabilisieren es durch hydrophobe Wechselwirkungen.



**Abbildung 1:** Modell des hexameren Moleküls der 11 S-Globuline nach PLIETZ *et al.* [40, 51]

### 2.1.3 Die Ackerbohne und ihr Hauptspeicherprotein (Legumin)

Ackerbohnen gehören zu den ältesten Kulturpflanzen [41]. Archäologische Hinweise führten zu der Einschätzung, daß sie bereits 4000-3000 v. u. Z. in der Landwirtschaft angebaut wurde [42]. Die Ackerbohne (*Vicia faba* L.) gehört zur Klasse der Dicotyledonen (Zweikeimblättrige) und der Ordnung Fabales (Leguminosen). Die Ordnung Fabales hat nur einkeimblättrige Früchte, die sich zu den charakteristischen Hülsenfrüchten entwickeln. Ackerbohnen werden neben Erbsen, Linsen, Lupine der Familie Fabaceae (Schmetterlingsblütler) und der Gattung Viciaeae (Wicken) zugeordnet. Durch die Möglichkeit der Luftstickstoffbindung mit Hilfe symbiotischer Knöllchenbakterien in Wurzelknöllchen sind einige Vertreter der Fabaceae auch auf stickstoffarmen Böden wichtige Eiweißlieferanten [43].

Reife Ackerbohnen-Samen enthalten 44-46 % Kohlenhydrate, 20-31 % Proteine, 10-15 % Wasser und ca. 2 % Lipide [44]. Das Mehl geschälter Ackerbohnen besteht zu ungefähr 31 % der Trockenmasse aus Proteinen [45]. Die Globulinfraction besteht aus vier Proteinkomponenten mit den Sedimentationskoeffizienten 2 S, 7 S, 11 S und 15 S [46]. Ihre Mengenanteile variieren in Abhängigkeit von der Sorte, aber Legumin und Vicilin sind die Hauptkomponenten [44]. Die Globulinfraction der Ackerbohnen besteht zu etwa 70 % aus Legumin und zu etwa 30 % aus Vicilin [47].

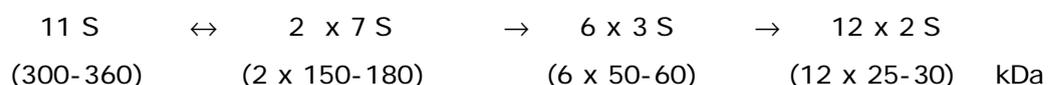
Die Quartärstruktur des Ackerbohnen-Legumins kann mit dem Modell nach PLIETZ *et al.* [40, 49, 51] (s. Kap. 2.1.2) beschrieben werden. Die Angaben über die Molmasse des hexameren Gesamtmoleküls schwanken in einem Bereich von  $350\,000 \pm 30\,000$  g/mol [48, 49, 50]. Für die schwerere saure Polypeptidkette wurden 32 000 - 37 000 g/mol und für die basische  $\beta$ -Kette etwa 20 000 g/mol ermittelt [48, 51, 52]. Das ellipsoide Molekül

mit Dimensionen von 12,6 x 12,6 x 8,8 nm besteht aus sechs polymorphen Untereinheiten ( $\alpha\beta$ -Monomere) mit Molmassen von etwa je 60 000 g/mol. Man unterscheidet zwei homologe Untereinheitentypen mit ca. 50 %iger Sequenzidentität. Der sogenannte Typ A enthält Methionin, die Untereinheit vom Typ B dagegen ist methioninfrei [53, 54, 56]. Beide Untereinheiten-Typen bilden zu etwa gleichen Teilen die Quartärstruktur des *Vicia faba*-Legumins [54, 55].

Die erste vollständige Sequenz für ein eine Untereinheit codierendes Gen (LeB4) wurde von BÄUMLEIN *et al.* [56] veröffentlicht. Dabei handelt es sich um eine Untereinheit des B-Typs. Die entsprechende saure, sehr hydrophile  $\alpha$ -Kette besteht aus 281 Aminosäuren und weist als *N*-terminale Aminosäure Threonin auf. Die basische, mäßig hydrophobe  $\beta$ -Kette aus 181 Aminosäuren enthält Glycin als *N*-Terminus. Sie sind über eine Disulfidbrücke zwischen der Aminosäure Cys87 der  $\alpha$ -Kette und Aminosäure Cys7 der  $\beta$ -Kette miteinander verknüpft. Die Aminosäurezusammensetzung zeigt einen für pflanzliche Globuline charakteristischen hohen Arginingehalt. Desweiteren sind viel Asparagin- und Glutaminsäure enthalten, die zu etwa 50 % amidiert vorliegen. Die Glutaminsäurereste sind besonders in der sauren Polypeptidkette konzentriert, die außerdem deutlich geringere Gehalte an Alanin-, Valin- und Leucinresten als die basische  $\beta$ -Kette aufweist [57].

Später wurde von SCHLESIER *et al.* [128] ein, eine Typ A-Untereinheit des Ackerbohnen-Legumins codierendes Gen sequenziert. Die  $\alpha$ -Kette der Untereinheit von Typ A besteht aus 294 Aminosäuren mit Leucin als *N*-Terminus, die  $\beta$ -Kette aus 189 Aminosäuren mit - genau wie bei Typ B - Glycin als *N*-terminale Aminosäure. Das Molekül besitzt eine Disulfidbrücke zwischen den Aminosäuren Cys86 der  $\alpha$ - und Cys7 der  $\beta$ -Kette.

Das aus Untereinheiten zusammengesetzte Ackerbohnen-Leguminmolekül kann dissoziieren und assoziieren. Von SCHWENKE [32] wurde anhand von Literaturdaten verschiedener Samenglobuline das folgende allgemeine Dissoziationsschema der 11 S-Globuline aufgestellt:



Neben Dissoziation und Aggregation durch Hitzeeinwirkung und alkali- bzw. säureinduzierter Dissoziation ist die Ionenstärke des Lösungsmittels für das Dissoziations- und Assoziationsverhalten von immenser Bedeutung. Damit die Untereinheiten in ihre disulfidverbrückten konstituierenden Ketten dissoziieren, sind reduzierende Bedingungen und Detergentien wie SDS oder andere denaturierende Agentien notwendig.

## 2.2 Proteinmodifizierung

Proteine und Proteinisolate können modifiziert werden, um sie mit wünschenswerten funktionellen und ernährungsphysiologischen Eigenschaften für Nahrungszwecke oder im „Non-Food“-Bereich zu versehen [6, 58, 59, 60, 61, 62]. Die gezielte Modifizierung von Proteinen wird auch als Werkzeug für die Ableitung allgemeiner Struktur-Funktions-Beziehungen eingesetzt [58, 59].

Um neue Anwendungsmöglichkeiten von Pflanzenproteinen zu finden, werden immer wieder neue Methoden und Verfahren entwickelt. So werden die pflanzlichen Speicherproteine chemisch und enzymatisch, physikalisch oder gentechnisch modifiziert, um ihre physikochemischen Eigenschaften und ihre Funktionalität gezielt zu verändern.

Die *chemische Modifizierung* schließt die Derivatisierung der Aminosäure-Seitenketten von Proteinen und die Hydrolyse von Peptidbindungen ein. Die typischen chemischen Reaktionen werden oft entsprechend dem zu benutzenden Reagenstyp klassifiziert und sind in etlichen Übersichtsarbeiten zusammengestellt worden [59-62]. Die „klassische“ chemische Modifizierung (nicht enzymatische) ist in der Regel einfach und preiswert auszuführen [63]. Viele der chemischen Modifizierungsmethoden sind jedoch für die Anwendung im Nahrungsmittelbereich nicht geeignet [58]. Für die Derivatisierung sind verschiedene reaktive Aminosäure-Seitenketten verfügbar, z. B. Amino-, Carboxyl-, Sulfhydryl- und Phenolgruppen. Die chemische Modifizierung richtet sich im allgemeinen gezielt auf einen bestimmten Seitenketten-Typ; sie verläuft aber häufig nicht spezifisch sondern kann mehrere funktionelle Gruppen betreffen [59]. Im Gegensatz zur chemischen ist die *enzymatische Modifizierung* in der Regel von hoher Spezifität und kann oftmals unter milderen Bedingungen erfolgen. Von besonderer Bedeutung auf enzymatischem Gebiet sind die Hydrolyse der Peptidbindung durch Proteasen, Addition bzw. Entfernung von Substituenten an bzw. aus reaktiven Gruppen der Seitenketten von Aminosäureresten (Phosphatase/Phosphorylase-Kinase, Glycosyl-Transferase, Transamidase) und die Vernetzung (Transglutaminase). Chemische und enzymatische Modifizierung bewirken mit unterschiedlichen Mechanismen ähnliche Veränderungen in der Chemie von Proteinen (Phosphorylierung, Desamidierung, Vernetzung).

Die *physikalische Modifizierung* beruht vor allem auf Hochdruck- und Temperatureinwirkung. Die Hitzedenaturation globulärer Proteine kann zur Aggregation führen, die Proteine werden unlöslich. Die Stabilität der nativen Proteinkonformation gegenüber entfaltenden Prozessen kann durch die Bildung von Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten der Peptidkette erhöht werden. Je niedriger die Temperatur ist, bei der die Entfaltung stattfindet, um so geringer ist die Wahrscheinlichkeit, daß irreversible Reaktionen, wie

das Aufbrechen von Disulfidbrücken, auftreten. Diese Art der physikalischen Modifizierung ist z. B. für die zunehmende Anwendung von Proteinen als Adhesiva, Überzüge und Filme von Bedeutung [6, 64]. Druckeinwirkung führt zur vollständigen Entfaltung oder zur partiellen Entfaltung der Proteine, die in verdünnten Lösungen oftmals reversibel ist. Da die Proteine bei diesem Prozeß oft eine andere als die native Konformation einnehmen, kann auch auf diesem Wege die Funktionalität modifiziert werden.

In der *Biotechnologie* angewendete *gentechnische Verfahren zur Modifizierung* basieren auf Mutation. Eine kodierende Gensequenz wird kloniert und in einem geeigneten System zur Expression gebracht, um genügend mutiertes Protein zu erzeugen. In der Hauptsache werden ortsgerichtete oder gezielte Mutation (site-directed) und zufällige Mutation (random) unterschieden. Den Samenproteinen der Leguminosen mangelt es an Methionin und Cystein. Von den verschiedenen Strategien, die erarbeitet wurden, um die limitierte Aminosäurezusammensetzung der Leguminosen-Samenproteine aufzuwerten, kann die Modifizierung der die Proteine kodierenden Gene die ideale Lösung sein [65]. Ein Beispiel dafür ist die Einführung heterologer Sequenzen von Brasilnuß und Sonnenblumensamen-Albuminen, die besonders viel schwefelhaltige Aminosäuren enthalten, in Legumin- und Vicilin-Gene [31, 66]. Die Möglichkeiten zur Verbesserung der funktionellen und ernährungsphysiologischen Eigenschaften auf der Grundlage gentechnischer Methoden am Beispiel der Sojabohne wurden von UTSUMI & KITO [67] zusammengestellt und mit chemischer und physikalischer Modifizierung verglichen.

Verschiedene Methoden der chemischen Modifizierung ermöglichen eine zielgerichtete Verbesserung der funktionellen Eigenschaften von Proteinen durch die Veränderung der Oberflächenladung und der nativen Konformation ohne Spaltung der Primärstruktur [68]. Die chemischen Modifizierungsmethoden beruhen auf der Modifizierung der Aminogruppen (Acylierung, Alkylierung) und Carboxylgruppen (Veresterung, Amidierung), der kovalenten Bindung von Aminosäuren, Phosphaten und Kohlenhydraten sowie der Oxidation/Reduktion von Sulfhydrylgruppen/Disulfidbrücken [58]. Die wichtigsten Strategien der chemischen Modifizierung werden in Kapitel 2.2.1 bis 2.2.6 kurz beschrieben.

## **2.2.1 Chemische Modifizierung der Aminogruppen**

### *2.2.1.1 Die Acylierung*

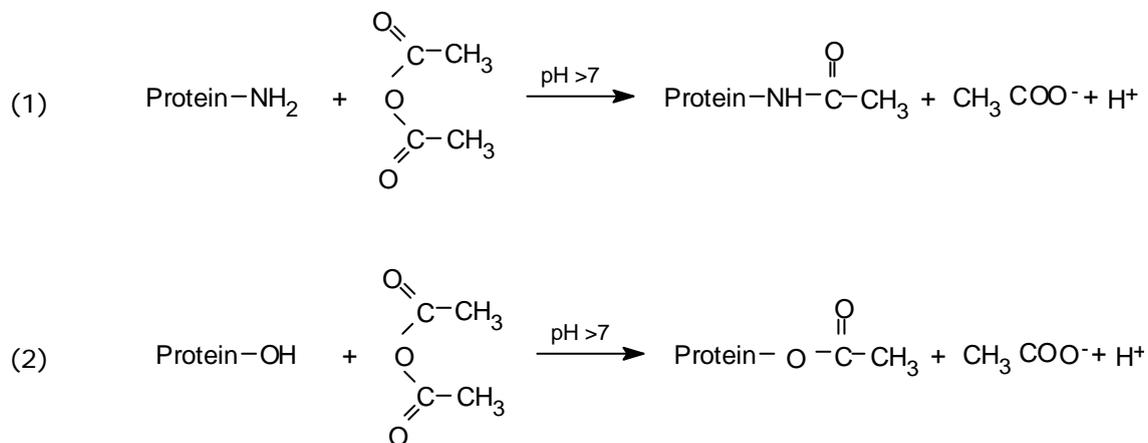
Die Acylierung (Acetylierung, Succinylierung, Maleinylierung, Citraconylierung) ist eine häufig angewendete Methode zur chemischen Modifizierung von Proteinen (s. z. B. [12, 69]). Als acylierende Reagenzien werden Säureanhydride wie Essigsäure-, Bernsteinsäure-, Maleinsäure- und Citraconsäureanhydrid eingesetzt. Sie können prinzipiell mit allen

nucleophilen Gruppen reagieren [59], d. h. mit Aminogruppen (*N*-terminale  $\alpha$ - und  $\varepsilon$ -Aminogruppen der Lysine), phenolischen (Tyrosin) und aliphatischen (Serin, Threonin) Hydroxylgruppen, Sulfhydryl- (Cystein) und Imidazolgruppen der Histidinreste (s. Kap. 2.2.1.2, **Abbildung 2**). Die entsprechenden Acylderivate sind jedoch von sehr unterschiedlicher Stabilität.

Im Gegensatz zum Essigsäureanhydrid, dessen Anwendung die Einführung neutraler Acetylgruppen zur Folge hat, führt die Reaktion mit Bernsteinsäureanhydrid anionische Succinylgruppen an den  $\alpha$ - und  $\varepsilon$ -Aminogruppen sowie den Hydroxylgruppen ein (s. Kap. 2.2.1.3, **Abbildung 3**). Die Nettoladung des Proteins wird negativer. Das führt zu Konformationsänderungen, und diese bedingen z. B. die Erhöhung der Löslichkeit [59]. Maleinsäureanhydrid reagiert mit Proteinen ähnlich wie Bernsteinsäureanhydrid, führt aber zu Hydrolyse-labilen Produkten [59, 70] und wird daher für die reversible Modifizierung der Aminogruppen genutzt [71]. Die bei der Citraconylierung entstehenden Produkte sind noch labiler als die maleinylierten Derivate [72].

#### 2.2.1.2 Acetylierung von Ackerbohnen-Legumin

Bei der Acetylierung des Legumins sind Reaktionen an den *N*-terminalen Aminogruppen und den  $\varepsilon$ -Aminogruppen der Lysinreste sowie an den Hydroxylgruppen der Tyrosin-, Serin- und Threoninreste entsprechend **Abbildung 2** zu erwarten [59].



**Abbildung 2:** Acetylierung von Aminogruppen (1) und Hydroxylgruppen (2) in Proteinen

Die Acylierung von Histidin- und Cysteinresten führt in der Regel zu instabilen *N*- bzw. *S*-Acylderivaten [59] und wurde daher in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt. Die nucleophile  $\varepsilon$ -Aminogruppe des Lysins läßt sich aufgrund ihres  $\text{pK}$ -Wertes und der (zumindest überwiegend) exponierten Lage an der Moleküloberfläche besonders leicht acylieren. In wäßriger Lösung ist bei einem  $\text{pH}$  zwischen 7 und 8 mit Essigsäureanhydrid

eine nahezu vollständige Blockierung der  $\epsilon$ -Aminogruppen des Lysins im Proteinisolat aus Ackerbohnen möglich [73].

Mit zunehmendem *N*-Acetylierungsgrad nimmt der Anteil der Blockierung positiv geladener  $\epsilon$ -Aminogruppen durch neutrale Acetylgruppen zu und damit die potentielle positive Ladung der Proteine ab. Die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen benachbarten kationischen Aminogruppen und anionischen Carboxylgruppen werden verringert. Der Anstieg der negativen Nettoladung führt zur Auffaltung der Proteinstruktur und zu Dissoziationsprozessen. Die funktionellen Eigenschaften derart modifizierter Ackerbohnen-Proteine sind erwartungsgemäß verändert [44].

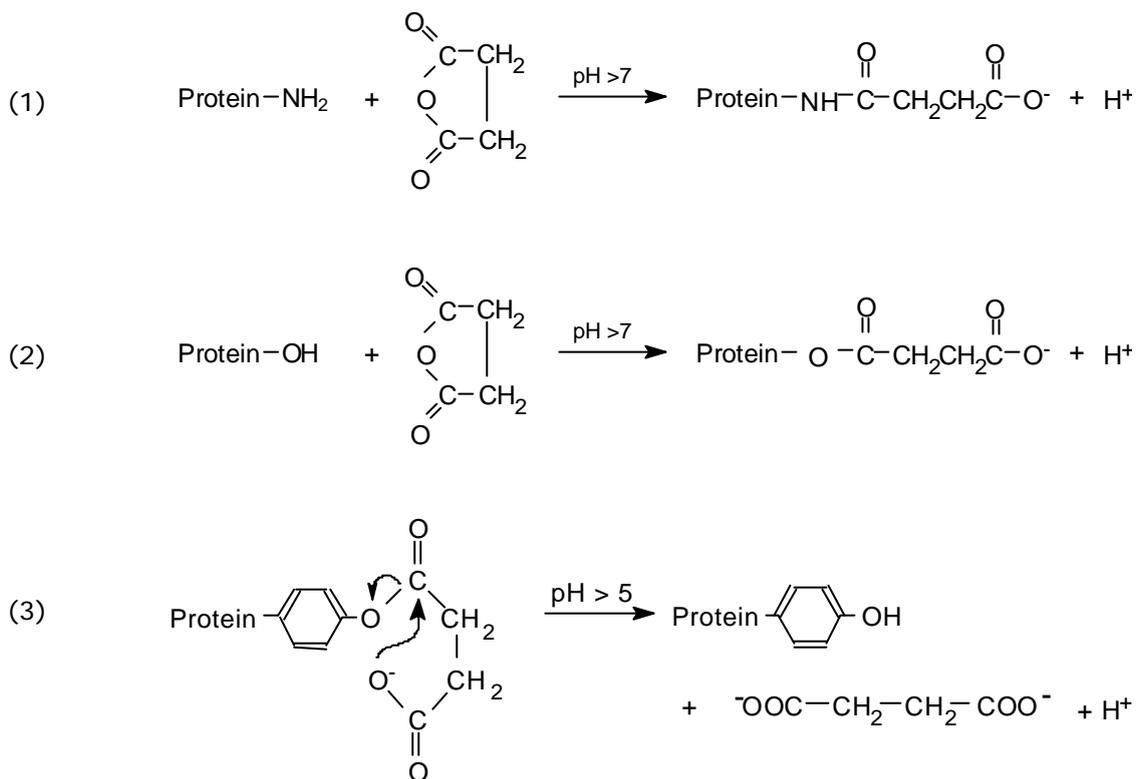
Umfangreiche Untersuchungen an acetyliertem Legumin in Form von Ackerbohnen-Proteinisolaten mit einem Legumin-Anteil von etwa 65 % erfolgten von SCHWENKE *et al.* [z. B. 19, 20]. Demnach erfolgt die Acetylierung dieses Isolates vorrangig an den  $\epsilon$ -Aminogruppen des Lysins. Bis etwa 40 % *N*-Acetylierung werden nur weniger als 5 % der Hydroxylgruppen modifiziert, ab 60 % wird der Anteil der veresterten Hydroxylgruppen signifikant. Der *O*-Acetylierungsgrad übersteigt jedoch auch bei hoher (89 %) *N*-Acetylierung nicht 28 %. Mittels nativer Gelelektrophorese wurde festgestellt, daß im Isolat das Legumin als Hauptbande erscheint, die bis 80 % *N*-Acetylierung erhalten bleibt und erst bei erschöpfend acetylierten Isolaten verschwindet. Ab 60 % Acetylierung der Aminogruppen erscheinen sowohl langsamer laufende Aggregationsprodukte als auch eine schmale Bande aus schneller laufenden Dissoziationsprodukten, die mit zunehmender Modifizierung zur Hauptbande werden. Mittels analytischer Ultrazentrifugation wurde mit steigender Acetylierung der Isolate ebenfalls eine deutliche Abnahme des Leguminanteils sowie auch der höhermolekularen 15 S-Aggregate zugunsten des 2 S-Dissoziationsproduktes gefunden. Die Oberflächenhydrophobizität veränderte sich bis zu einem *N*-Acetylierungsgrad von 60 % nur geringfügig, bei fortschreitender Modifizierung jedoch drastisch.

Von SCHMANDKE [44] sind die Auswirkungen der Acetylierung auf die funktionellen Eigenschaften, z. B. die Emulgieraktivität, von Ackerbohnen-Proteinisolaten zusammengefaßt worden. Die Acetylierung der Proteinisolate führt zu verbesserter Emulsionsstabilisierung und zur Ausbildung eines festen Grenzflächenfilmes, der als mechanische Barriere die Destabilisierung von Emulsionen verhindert [74].

Der Einfluß der Legumin-Acetylierung auf die Adsorptionskinetik, Filmdruckverhalten und Emulsionseigenschaften in *n*-Decan/Wasser-Emulsionen ist von KRAUSE [75] untersucht worden. Dabei wurde anhand von SE-HPLC-Untersuchungen gezeigt, daß hochacetyliertes Ackerbohnen-Legumin zur Aggregation neigt.

### 2.2.1.3 Succinylierung von Ackerbohnen-Legumin

Die Succinylierung ist prinzipiell an allen nucleophilen Gruppen der Aminosäurereste möglich [59, 76]. Ebenso wie bei der Acetylierung sind bei der Succinylierung des Legumins Reaktionen an den *N*-terminalen Aminogruppen und den  $\epsilon$ -Aminogruppen der Lysinreste sowie an den Hydroxylgruppen der Tyrosin-, Serin- und Threoninreste zu erwarten (**Abbildung 3**) [59]. Im Falle der Succinylierung von Tyrosinresten muß jedoch der Instabilität der *O*-Succinylreste aufgrund spontaner intramolekular katalysierter Hydrolyse bei  $\text{pH} > 5$  [59] Beachtung geschenkt werden.



**Abbildung 3:** Succinylierung von Amino- (1) und Hydroxylgruppen (2) sowie Desuccinylierung von *O*-Succinyltyrosin (3) in Proteinen

Die Succinylierung eines Proteins bewirkt die Erhöhung der negativen Nettoladung des Moleküls, was grundsätzlich die verstärkte Neigung zum Zerfall des Proteins in seine Untereinheiten und Entfaltung der Polypeptidketten bedingt [12, 32].

Vielfältige Untersuchungen zur Auswirkung der Succinylierung auf die Chemie und die Funktionalität von Ackerbohnen-Proteinisolaten sind vorgenommen worden [z. B. 77, 78]. Demnach werden bei  $\text{pH} 8$  mit einem etwa vierfachen molaren Überschuß an Bernsteinsäureanhydrid maximal 93 % der Aminogruppen durch Succinylgruppen blockiert. Wie bei der Acetylierung erfolgt auch durch Succinylierung die Dissoziation der

Globuline. Es wird beschrieben, daß die Ackerbohnen-Proteinisolate bei 93 % *N*-Succinylierung in vollständig, in ihre Untereinheiten mit Sedimentationskoeffizienten von  $S_{20,W}^0 = 2,8$ , dissoziierter Form vorliegen. Die Dissoziation des hexameren Moleküls in seine 50-60 kDa schweren Untereinheiten erfolgt über das 7 S-Halbmolekül [79].

Die Succinylierung der Ackerbohnen-Proteinisolate führt aufgrund weitgehender struktureller Veränderungen zu wesentlichen Änderungen der funktionellen Eigenschaften, wie z. B. zur Verbesserung der Gelbildungseigenschaften, der Emulgierereigenschaften bei pH 7 und der Erhöhung der Schaumbildungskapazität ohne Hitzebehandlung [78, 80].

Der Einfluß der Succinylierung auf Ackerbohnen-Legumin ist ebenfalls hinsichtlich der Bildung von Grenzflächenfilmen untersucht worden [81].

#### 2.2.1.4 Die Guanidinierung

Stabile Proteine können bei pH > 9,5 mit *S*-Methylisoharnstoff oder dem stärker reaktiven *O*-Methylisoharnstoff behandelt werden, um die  $\epsilon$ -Aminogruppen durch die sehr basischen Guanidinogruppen zu ersetzen [59]. Die Guanidinierung von über 70 % der Lysinogruppen des Rinderserumalbumins führte jedoch nur zu geringen Änderungen der Hydrophobizität, der Schaum-, Emulsions- und Geleigenschaften [58].

#### 2.2.1.5 Amidinierung und Alkylierung

Unter leicht alkalischen Bedingungen reagieren Imidoester mit Aminen zu Amidinen (Amidinierung). Sowohl  $\alpha$ - als auch  $\epsilon$ -Aminogruppen werden modifiziert [59]. Die Amidinierung bewirkt keine starke Änderung der physikochemischen Eigenschaften von Proteinen. Nach extremer Amidinierung von RSA konnten jedoch veränderte spektroskopische und elektrophoretische Eigenschaften sowie eine Änderung der optischen Rotation beobachtet werden [82].

Die Alkylierung der Aminogruppen kann z. B. durch Maleimide, Acrylonitrile oder Ethylenimine erzielt werden, obgleich die Reaktion im allgemeinen nur als Nebenreaktion bei der Sulfhydrylgruppen-Modifizierung betrachtet wird [59].

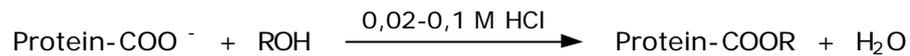
### 2.2.2 Chemische Modifizierung der Carboxylgruppen

Die Acylierung ist zwar die am genauesten untersuchte Methode der chemischen Modifizierung von Nahrungsproteinen - der Nährwert acylierter Proteine ist im Vergleich zum nativen Protein, einzelnen Studien zufolge (z. B. [83]), jedoch gemindert. Die Modifizierung der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Carboxylgruppen der nicht essentiellen sauren Aminosäuren (Asparagin- und

Glutaminsäure) stellt daher eine Alternative zur Acylierung dar. Sowohl die Veresterung als auch die Amidierung der Carboxylgruppen führen zur Erhöhung der positiven Nettoladung des Proteins.

#### 2.2.2.1 Die Veresterung

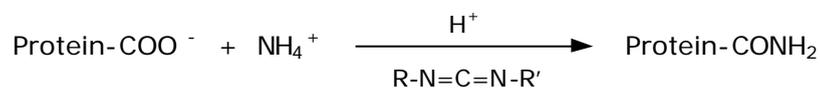
Die Carboxylgruppen der Proteine können durch die Behandlung mit Methanol oder Ethanol unter Säurekatalyse verestert werden.



Aus der Blockierung der negativ geladenen Carboxylgruppen resultiert die Zunahme der positiven Nettoladung und die Erhöhung des isoelektrischen Punktes (IP). Die Veresterung von Proteinen führt zu Konformationsänderungen, die sich in der Änderung ihrer funktionellen Eigenschaften widerspiegelt [84].

#### 2.2.2.2 Amidierung

Carboxylgruppen von Aspartat und Glutamat können durch die Reaktion mit nucleophilen Reagenzien (z. B. Aminen) und wasserlöslichem Carbodiimid in Asparagin und Glutamin umgewandelt werden [85]. Die Amidierung erfordert relativ milde wäßrige Bedingungen.



#### 2.2.3 Reduktion bzw. Oxidation von Disulfid- bzw. Sulfhydrylgruppen

Disulfid-Bindungen werden durch milde Reduktionsmittel zu Sulfhydrylgruppen reduziert. Für analytische Zwecke werden Thiole mit niedriger Molmasse wie  $\beta$ -Mercaptoethanol und Dithioerythritol eingesetzt. Die Reaktion ist spezifisch und in Abhängigkeit von Denaturans, pH und Proteinstruktur vollständig. Die Reoxidation der entstandenen Sulfhydrylgruppen kann durch die Alkylierung mit Iodoacetamid oder Acrylnitril verhindert werden [86].

Im Lebensmittel-Sektor werden Sulfit-Ionen, Wasserstoffperoxid und Ascorbinsäure als Reagenzien zur Verbesserung der funktionellen Eigenschaften eingesetzt. So führt der Einsatz von Ascorbinsäure z. B. zur Verringerung der Oberflächenspannung von Proteinen [87]. Die Zugabe von Ascorbinsäure verbessert Teigbildung, Laibvolumen und Krumenstruktur durch Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen. Der Einsatz von Ascorbinsäure zeigt

positive Effekte auf die Schaum- und Geleigenschaften verschiedener globulärer Proteine [88].

#### 2.2.4 Hydrolyse und Desamidierung

Der Einsatz von Säuren oder alkalischen Reagenzien dient häufig der Erhöhung der Löslichkeit oder der Verringerung der Viskosität von Proteinen. Die saure oder basische Hydrolyse der Peptidbindungen führt zu Produkten niedrigerer Molmasse mit erhöhter Anzahl ionisierbarer Gruppen und erhöhter Löslichkeit. Die Hydrolyse kann in Abhängigkeit von den Produkthanforderungen gut gesteuert werden. So dient die milde Hydrolyse der Herstellung höhermolekularer Abbauprodukte mit erhöhter Funktionalität.

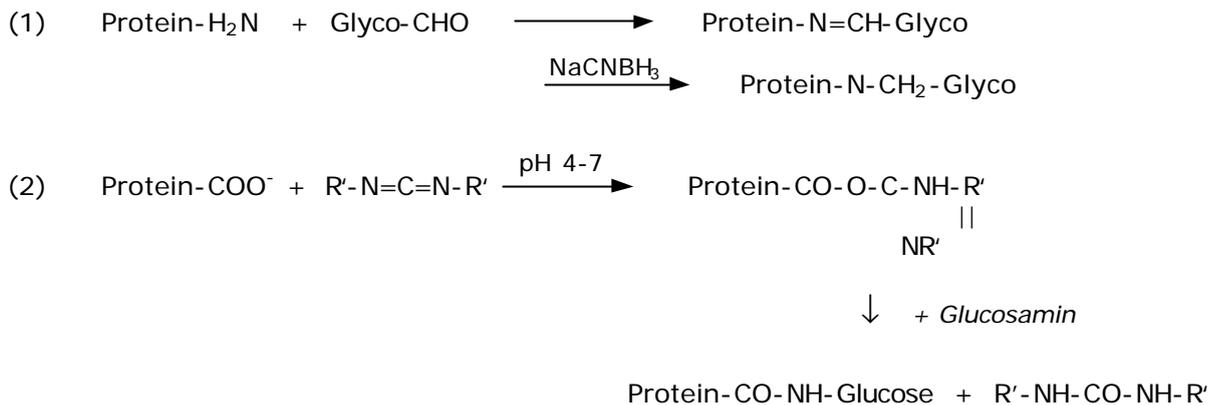
Bei der milden sauren Hydrolyse wird die Peptidbindung an der Seite von Asparaginsäureresten 100fach schneller gespalten als andere Peptidbindungen [89]. Die saure Hydrolyse unter milden Bedingungen wird von (nicht-enzymatischer) Desamidierung begleitet.

Die *Desamidierung* von Glutamin- und Asparaginsäureresten ist besonders im Falle der pflanzlichen Speicherproteine von Bedeutung, weil diese sehr hohe Anteile an amidierten Glutaminsäure- und Asparaginsäureresten haben. Das Freiwerden von Carboxylgruppen infolge der Modifizierung bedingt die Zunahme der negativen Nettoladung und der Hydratation des Proteins. Die Desamidierung von Asparagin findet schneller statt als die von Glutamin. Sie folgt bei der sauren Hydrolyse von Asparagin zu Asparaginsäure einem einstufigen (two-state) Mechanismus. Die Desamidierung von Soja-Proteinen führt zu verbesserter Löslichkeit, Wasserbindung, Schaumvolumen, Emulgiervermögen und Viskosität [90].

Desamidierung und Hydrolyse von Peptidbindungen durch Alkali-Behandlung erfolgen schneller als die saure Hydrolyse. Der Einsatz von Basen erfolgt zur Isolierung von Pflanzenproteinen unter Ausschluß toxischer Faktoren [91], zur Produktion von Soja-Proteinen als Fleischäquivalent und bei der Herstellung von Gelatine aus Collagen. Stark alkalische Behandlung von Proteinen kann zur Zerstörung von Lysin, Cystin und Serin und zur Bildung unverdaulicher Produkte führen. Die alkalische Hydrolyse von Asparagin zu Asparaginsäure führt zunächst zu einem cyclischen intramolekularen Imid als Zwischenprodukt. Das Imid kann dann entweder zu einem Asparaginsäurerest hydrolysiert werden oder aber mit einer Aminogruppe unter Ausbildung eines Isopeptids reagieren. Bei hohem pH-Wert und hoher Temperatur kann z. B. aus  $\beta$ -substituiertem Cystin Dehydroalanin entstehen, welches mit Lysin zu Lysinoalanin reagiert, was wiederum einen Verlust an essentiellen Aminosäuren bedeutet.

### 2.2.5 Die Glycosylierung

Proteine können durch die kovalente Bindung von Kohlenhydratresten unterschiedlicher Größe modifiziert werden. Die Glycosylierung erfolgt primär an den Aminogruppen (s. Reaktion 1), teilweise aber auch an den Hydroxyl- und Sulfhydrylgruppen. Die Glycosylierung kann auch die Carboxylgruppen betreffen, z. B. wenn  $\beta$ -Lactoglobulin (nach Aktivierung mit Carbodiimid) mit Glucosamin umgesetzt wird (s. Reaktion 2).



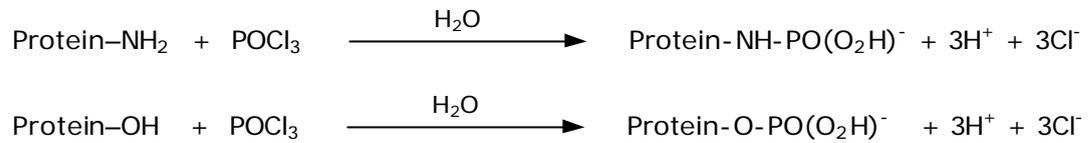
Aus praktischer Sicht ist der einfachste Weg der Glycosylierung die Bindung von Zuckern an Proteine über die Maillard-Reaktion [92].

Die Einführung von Mono- oder Oligosacchariden erhöht die Hydrophilie eines Proteins. Glycosyliertes  $\beta$ -Lactoglobulin weist erhöhte Löslichkeit und Hitzestabilität im Vergleich zum nativen Protein auf [93]. Ebenso lassen sich die Oberflächeneigenschaften von Casein durch erhöhte Flexibilität, zunehmende Entfaltung und stärkere Hydratisierung infolge Glycosylierung verbessern. Durch die Glycosylierung werden bei Reaktion mit neutralen Zuckern das Schaumbildungsvermögen und die Schaumstabilität, im Falle der Modifizierung mit geladenen Kohlenhydraten die Emulsionsstabilität verbessert [94].

### 2.2.6 Die Phosphorylierung

Die kovalente Bindung von Phosphatgruppen an Proteine führt zur Erhöhung ihrer negativen Ladung. In Abhängigkeit von der Natur des Proteins werden nur *O*- (z. B. bei Casein [95]) oder nur *N*-Phosphat-Esterbindungen (z. B. bei  $\beta$ -Lactoglobulin [97]) oder beide (z. B. bei der Phosphorylierung von Lysozym [95, 96]) gebildet. Bei der Bildung von „C-O-P“-Bindungsderivaten reagiert anorganischer Phosphor mit den Hydroxylgruppen von Serin, Threonin, Tyrosin. Bei der Bildung von „C-N-P“-Bindungsderivaten reagiert der Phosphor mit der Aminogruppe in Lysin, der Imidazolgruppe in Histidin und der Guanidgruppe in Arginin. Die sauerstoffgebundenen Phosphatderivate sind säurestabiler als

die stickstoffgebundenen phosphorylierten Proteine. Die am häufigsten angewendete Methode der chemischen Phosphorylierung ist die Reaktion mit Phosphoroxchlorid:



Bei dieser Art der chemischen Modifizierung kann es über Phosphatbrücken oder Isopeptid-Bindungen zu Quervernetzungen („cross-links“) innerhalb der Proteinstruktur kommen, was als Ursache für die verringerte Löslichkeit in Wasser angenommen wird [96]. Die Phosphorylierung erhöht die Viskosität, Wasserabsorption, Gel- und Emulsionsbildung von  $\beta$ -Lactoglobulin und anderen Proteinen [97]. Phosphorylierte Proteine sind sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gut verdaulich.

## 3 Material und Methoden

Als Lösungsmittel für Legumin und seine acylierten Derivate dient, unabhängig von der Methode und wenn nicht anders beschrieben, 0,05 M Natrium-/Kalium-Phosphatpuffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) nach SÖRENSEN [98], pH 8,0, mit einer mit Natriumchlorid (NaCl) auf  $I=0,5$  eingestellten Ionenstärke. Er wird nachfolgend auch als „Standardpuffer“ bezeichnet.

Für die Untersuchungen zur Ionenstärkeabhängigkeit werden neben dem Standardphosphatpuffer der Ionenstärke  $I=0,5$  ein 0,025 M Natrium-/Kalium-Phosphatpuffer mit NaCl und einer Ionenstärke von  $I=0,1$  („niedrige Ionenstärke“) und 0,05 M SÖRENSEN-Puffer mit einer durch entsprechend hohe NaCl-Zugabe auf  $I=1,0$  eingestellten Ionenstärke („hohe Ionenstärke“) verwendet.

Zur Vermeidung bakteriellen Befalls enthalten sämtliche Puffer 0,02 % Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ). Alle Puffersubstanzen und alle übrigen, an dieser Stelle nicht extra aufgeführten Reagenzien sind von „p.A.“-Reinheitsgrad und stammen von MERCK, Darmstadt.

Reagenzien: Essigsäureanhydrid von FLUKA, Buchs; Bernsteinsäureanhydrid von Laborchemie Apolda; 2,4,6-Trinitrobenzonsulfonsäure und 8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure von SERVA, Heidelberg; Dithioerythritol und Leucin von REANAL, Budapest; Sepharose CL 4B sowie Proteine zur Kalibrierung (Thyroglobulin, Ferritin, Katalase, Ovalbumin und Aldolase) von PHARMACIA, Uppsala;  $\beta$ -Amylase, Alkohol-Dehydrogenase, RSA, Carboanhydrase, Cytochrom C, Aprotinin sowie DL-Tyrosinmethylester-Hydrochlorid von SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen.

### 3.1 Proteindarstellung

#### 3.1.1 Verfahren zur Isolierung des Ackerbohnen-Legumins

Geschälte Ackerbohnen lassen sich problemlos zu Mehlen (100  $\mu\text{m}$ ) vermahlen, nachdem die getrockneten Bohnen zuvor zerkleinert und die Schalen durch Windsichtung entfernt worden sind. Das Ackerbohnenmehl der Sorte „Fribo“ enthält etwa 46 % Stärke, etwa 31 % Proteine ( $F_{\text{N} \rightarrow \text{Prot}} = 5,8$ ), ca. 2 % Lipide und 1 % Rohfaser in der Trockenmasse [45]. Etwa 14 % der Trockenmasse des Mehles entfallen auf die Leguminfraktion, 7 % der Trockenmasse sind Viciline [99]. Das zur Proteinextraktion verwendete Mehl stammt von den Samen der Ackerbohne *Vicia faba* L., var. Fribo und var. Scirocco.

Die Isolierung des Legumins erfolgt durch kombinierte Salzfractionierung und wiederholte isoelektrische Fällung. Dabei wird die Löslichkeit des Globulins in schwach alkalischer Lösung und in Salzlösungen ausgenutzt und das begleitende Vicilin weitgehend abge-

trennt ( $IP_{Leg} = 4,7$  und  $IP_{Vic} = 5,5$ ). Dieses Verfahren zur Leguminisolierung nach POPELLO *et al.* [100] ergibt ein lipidfreies Proteinpräparat mit einem geringen Vicilingehalt von 3-5 % [132].

**Durchführung** [100, 132]. Die wäßrige Extraktion des Proteins erfolgt 1 h bei 50 ° C und pH 8,0 (Mehl:Wasser = 1:10). Nach langsamer Abkühlung wird die Suspension zentrifugiert (30 min, 3000 x g) und der Überstand auf eine Salzkonzentration von 0,5 M NaCl und pH 4,8 eingestellt. Nach erneuter Zentrifugation (30 min, 3000 x g) wird im Überstand die Salzkonzentration durch Zugabe von kaltem Wasser auf 0,3 M herabgesetzt, wodurch die Globulinfraction ausfällt (12 h, 4 ° C). Nach Zentrifugation (10 min, 2000 x g) wird das Präzipitat (Feuchtprotein) in Lösung hoher Ionenstärke (0,6 M NaCl, pH 7-8) redispergiert und anschließend erneut durch das Herabsetzen der Salzkonzentration in der Lösung (Zugabe von kaltem Wasser) gefällt (pH 4,8; 0,3 M NaCl; 4 ° C; 12 h). Nach Zentrifugation (20 min, 3000 x g) wird der Feuchtprotein-Niederschlag in Wasser aufgenommen, mehrere Stunden bei pH 7,0 gelöst und erneut zentrifugiert (10 min, 12 000 x g). Der Überstand wird gegen Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert. Die Ausbeute beträgt etwa 5 % bezogen auf eingesetztes Mehl.

### 3.1.2 Chemische Modifizierung der Leguminproben

#### 3.1.2.1 Acetylierung

Bei der Acetylierung wird das Protein mit Essigsäureanhydrid bei pH 7-8 umgesetzt. Die Acetylierung der Aminogruppen bzw. der Hydroxylgruppen verläuft entsprechend der in **Abbildung 2** beschriebenen Reaktionen.

**Durchführung.** Für die Herstellung acetylierter Leguminpräparate wird eine Lösung von 1-5 % Legumin in Standardphosphatpuffer hergestellt. Die Modifizierung erfolgt unter ständigem Rühren in einem auf 20 ° C temperierten Reaktionsgefäß durch tropfenweise Zugabe von Essigsäureanhydrid mit einer Mikroliterspritze. Der pH-Wert wird mit 0,1 N NaOH am METROHM<sup>®</sup>-Autotitrator auf 7,7 eingestellt und während der Acetylierungsreaktion konstant gehalten (pH-stat-Bedingungen). Die Zugabe der je nach gewünschtem Acetylierungsgrad gewählten Menge Essigsäureanhydrid (entsprechend der Umsatzkurve, s. **Abbildung 13**) muß derart langsam erfolgen, daß der pH-Bereich von 7-8 nicht unter- bzw. überschritten wird. Um die Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes und damit eine gewisse Reproduzierbarkeit der Acetylierungsgrade zu erreichen, wird nach beendeter Reagenszugabe mindestens 1h, bei hohen Modifizierungsgraden 3h weiter gerührt. Anschließend wird die Lösung je nach Verwendungszweck entweder gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert oder über ein AMICON<sup>®</sup>-Ultrafiltrationssystem unter Verwendung einer DIAFLO-Ultrafiltrationsmembran (PM 10) mittels Stickstoffstrom auf etwa 5 ml eingengt

und gelchromatographiert (Sephacrose CL 4B), um die 11 S-Fraktion von Aggregaten zu trennen.

### 3.1.2.2 Succinylierung

Bei der Succinylierung wird das Protein mit Bernsteinsäureanhydrid bei pH 7-8 umgesetzt. Die Succinylierung der funktionellen Gruppen verläuft entsprechend der in **Abbildung 3** beschriebenen Reaktionen.

**Durchführung.** Für die Herstellung succinylierter Leguminpräparate wird eine Lösung von 1 % Legumin in Standardphosphatpuffer hergestellt. Die Modifizierung erfolgt unter ständigem Rühren in einem auf 20 ° C temperierten Reaktionsgefäß durch schrittweise Zugabe von getrocknetem Bernsteinsäureanhydrid. Die weitere Durchführung der Succinylierung erfolgt analog der Acetylierung (s. Pkt. 3.1.2.1). Abschließend wird die Lösung nach 1-3 Stunden Reaktion gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert.

## 3.2 Charakterisierung des Untersuchungsmaterials

### 3.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

#### 3.2.1.1 Mikro-Biuret-Methode

Die Proteinkonzentrationen wurden in der Regel nach der Mikro-Biuret-Methode von ITZHAKI & GILL [101] bestimmt. Sie beruht darauf, daß Substanzen, die zwei oder mehr Peptidbindungen enthalten, mit Kupfer(II)-Ionen unter stark alkalischen Bedingungen einen blauen Farbkomplex bilden. Die UV-Absorption dieses Komplexes wird bei 310 nm gemessen. Die Methode zeichnet sich durch einfache und schnelle Handhabung sowie ausreichend große Empfindlichkeit (0,05 mg Protein/ml) aus. Von Vorteil ist auch die geringe Spezifität bezüglich unterschiedlicher Proteintypen. Die Nachweisreaktion wird bis zu einer NaCl-Salzkonzentration von 1,5 M nicht beeinflusst. Lediglich Ammoniumsalze und kolloidale Trübungen wirken störend.

Bevor die Mikro-Biuret-Methode eingesetzt werden kann, muß für das jeweilige Protein eine Eichkurve mittels KJELDAHL-Proteinbestimmung (s. Pkt. 3.2.1.2) erstellt werden.

Desweiteren wird für die Bestimmung der Proteinkonzentration ein Faktor zur Umrechnung von Gesamtstickstoff in Gesamtprotein benötigt. Der in der Literatur unabhängig vom Proteintyp meist zugrunde gelegte Faktor von  $F_{N \rightarrow \text{Prot}} = 6,25$  entspricht jedoch nicht der Aminosäurezusammensetzung des Ackerbohnen-Legumins. Für die dieser Arbeit zugrundeliegenden Umrechnungen von Gesamtstickstoff in Protein wurden, ausgehend von der experimentell bestimmten Aminosäurezusammensetzung [50] und dem Massenzu-

zuwachs durch die Einführung von Acetyl- bzw. Succinylgruppen während der Acylierung, die folgenden Faktoren zugrunde gelegt:

nativ	< 40 % ac	< 60 % ac	≥ 60 % ac	< 50 % suc	< 90 % suc	≥ 90 % suc
5,55	5,60	5,65	5,70	5,60	5,70	5,90

### 3.2.1.2 Proteingehalt nach KJELDAHL

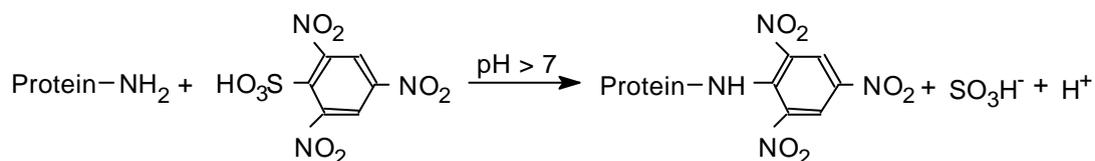
Zur Ermittlung des Proteingehaltes wird der Stickstoffgehalt nach schwefelsaurem, katalytischen Aufschluß bestimmt [102]. Der im Protein gebundene Stickstoff wird durch konzentrierte Schwefelsäure, Katalysator und Erhitzen zu Amidosulfonsäure umgesetzt, welche durch Zersetzung in Ammoniumsulfat übergeht. Der daraus entstehende Ammoniak wird nach Wasserdampfdestillation photometrisch bestimmt.

Die Bestimmung wurde nach KJELDAHL, modifiziert nach LANGE [103], durchgeführt. Zur Berechnung des Proteingehaltes aus dem Stickstoffgehalt siehe Pkt. 3.2.1.1.

## 3.2.2 Methoden zur Bestimmung des Modifizierungsgrades

### 3.2.2.1 Bestimmung des N-Acylierungsgrades

Die Blockierung der Aminogruppen durch Acetyl- oder Succinylreste (*N*-Acylierung) wurde durch die Bestimmung der freien Aminogruppen mit Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS) [104], modifiziert nach [75], verfolgt. 2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure setzt sich in schwach alkalischer Lösung mit den freien Aminogruppen von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen, wie in **Abbildung 4** dargestellt, um.



**Abbildung 4:** Reaktion von Protein-Aminogruppen mit 2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure

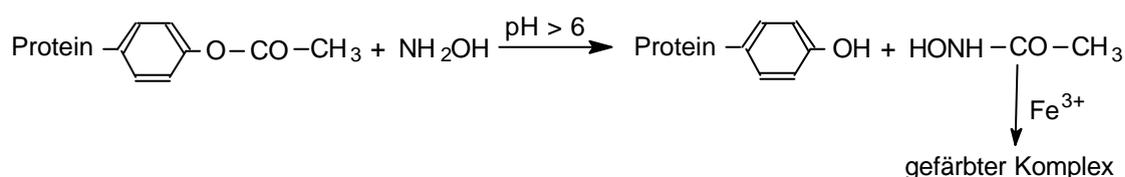
Das bei dieser Substitutionsreaktion gebildete trinitrophenylierte Reaktionsprodukt wird spektralphotometrisch gemessen. Durch die Bestimmung der freien Aminogruppen vor und nach Acylierung des Proteins, kann der prozentuale Anteil acylierter Aminogruppen (*N*-Blockierungsgrad) berechnet werden. Die Kalibrierung erfolgt mit Leucin.

**Durchführung** [75]. Die Lösung von etwa 1 % Protein (Konzentrationsbestimmung erfolgt nach BIURET) wird mit dem gleichem Volumenanteil einer wäßrigen Lösung von 1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) in 0,2 M Borsäure-Natriumboratpuffer pH 9 versetzt und 5 min im siedenden Wasserbad denaturiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung mit 1% SDS enthaltendem Boratpuffer auf eine Endkonzentration von etwa 0,05 % Protein verdünnt. Anschließend werden jeweils 0,5 ml dieser Proteinlösung mit 0,5 ml des 1% SDS enthaltendem Boratpuffer und mit 0,5 ml einer frisch hergestellten wäßrigen Lösung von 0,1 % TNBS versetzt. Die Reaktion erfolgt genau 1 h bei 50 ° C. Nach raschem Abkühlen werden nacheinander 0,5 ml 8 % SDS-Lösung und 0,5 ml 1 N HCl zugegeben. Die Absorption wird nach 20 min bei 340 nm gemessen.

### 3.2.2.2 Bestimmung des O-Acylierungsgrades

Die Blockierung der Hydroxylgruppen durch Acetyl- oder Succinylgruppen (O-Acylierung) wird nach Deacylierung mit Hydroxylamin und Umsetzung der gebildeten Hydroxamsäure mit Eisen(III)chlorid ( $\text{FeCl}_3$ ) durch spektrokolorimetrische Messung des entstehenden  $\text{Fe}^{3+}$ -Hydroxamsäure-Komplexes [105] nach der Methode von HABEED & ATASSI [106], in modifizierter Form [107] bestimmt (**Abbildung 5**). Die Anzahl der Estergruppen wird aus der Kalibrierung mit DL-Tyrosinmethylester-Hydrochlorid ermittelt.

Die Bestimmung von O-Acetyl-Tyrosinresten erfolgt analog nach Spaltung mit Hydroxylamin unter milden Bedingungen bei pH 8 in gepufferter Lösung und Absorptionsmessung bei 278 nm.



**Abbildung 5:** Deacetylierung von O-Acetyltyrosinresten im Protein mit Hydroxylamin-Hydrochlorid

Im Falle der O-Succinylierung von Tyrosinresten muß der Instabilität der O-Succinylreste (intramolekulare Hydrolyse, s. **Abbildung 2**) Rechnung getragen werden. Die Bestimmung der O-Succinylierung am Tyrosin erfolgt dementsprechend durch Verfolgung der Absorptionsveränderung bei 278 nm während einer mehrstündigen Inkubation der Reaktionslösung bei RT.

**Durchführung** [106, 107]. 10 mg Protein werden in 2 ml 0,2 M Borsäure-Natriumboratpuffer pH 9 gelöst, mit 2 ml einer 2M Hydroxylamin-Hydrochloridlösung pH 10 versetzt und 2h bei 40 ° C inkubiert. Nach rascher Abkühlung werden mit 0,8 ml 6 N HCl ein pH-Wert von 1 eingestellt und 0,8 ml einer Lösung von 5 %  $\text{FeCl}_3$  in 0,1 N HCl zuge-

geben. Das Protein präzipitiert, und nach Zentrifugation wird die Absorption des Farbkomplexes im Überstand bei 540 nm gemessen. Aus der Absorptionsdifferenz von modifizierter und deblockierter Probe läßt sich mittels Kalibriergerade der prozentuale Anteil modifizierter Hydroxylgruppen (*O*-Blockierungsgrad) berechnen.

### 3.2.3 Größenausschluß-Chromatographie (SE-HPLC)

Die Auftrennung der Proteine bzw. ihrer Bestandteile (Assoziate, Dissoziate) nach ihrer Größe, d. h. nach ihrem Stokeschen Radius erfolgt mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (SE-HPLC). Zur Kalibrierung werden folgende Proteine verwendet: Thyroglobulin, Ferritin, Katalase, Ovalbumin, Aldolase,  $\beta$ -Amylase, RSA und Cytochrom C.

---

Gerät:	SCHIMADZU LC-6A
Trennsäule:	BioSep 4000 (PHENOMENEX): 600 mm; ID 7,8 mm; 5 $\mu$ m; 125 Å
Detektion:	UV-Absorption (280 nm)
Fluß:	1 ml/min
Eluent:	0,1 M Tris-HCl mit 0,3 M NaCl; pH 7,2

---

### 3.2.4 Gelelektrophorese

#### 3.2.4.1 Denaturierende Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS-PAGE) wird mit 12 %igen Gelen in Vertikalkammern (Mini-Protean-II, Bio-Rad) mit und ohne Dithioerythritol (DTE) als Reduktionsmittel durchgeführt. Dazu wird ein kombiniertes WEBER/OSBORN-LAEMMLI-System benutzt. Trenn- und Sammelgel werden nach [108], Elektroden- und Probenpuffer nach [109] hergestellt. Aufgetragen werden jeweils 10  $\mu$ g Protein. Die Zuordnung der Banden erfolgt anhand der Molmassenbestimmung über die Proteinstandards der Standard-Mischung IV von MERCK.

#### 3.2.4.2 Native Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Die „Blaue Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese“ (BN-PAGE) wird unter nicht denaturierenden Bedingungen im Polyacrylamid-Gradientengel (Vertikalelektrophoresekammer Typ 2001 von LKB), wie von SCHÄGGER *et al.* [110] beschrieben, durchgeführt. Sie eignet sich zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen (20-800 kDa) mit einem isoelektrischen Punkt von  $IP \leq 5,4$  bzw. Proteinen, die Coomassie binden ( $IP \leq 8,6$ ). Als Puffer dient Bistris/Tricin pH 7. Es werden jeweils 20  $\mu$ g Protein aufgetragen.

### 3.2.5 Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS)

**Prinzip.** Bei der Matrix-unterstützten Laser-Desorptions-Ionisations-Flugzeit Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) wird die zu untersuchende Probe mit einer Matrix-Lösung versetzt und im Vakuum verdampft. Die Analyt-Moleküle sind in den Matrix-Molekülen (aromatische Carbonsäuren, die Energie aufnehmen können) quasi eingebettet. Diese Mischkristalle werden mit Laserimpulsen beschossen, die Matrix absorbiert die Laserenergie und ionisiert den Analyten.

**Durchführung.** Die lyophilisierte Proteinprobe wird in DHBs (9:1-Gemisch von 2,5-Dihydroxybenzoesäure und 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure) gelöst (5-10 mg/ml) und zentrifugiert.

Die Messungen erfolgen in linearem Modus im MALDI-TOF-Massenspektrometer Reflex 2 (BRUKER-DALTONIK, Bremen).

Bei dieser Methode dissoziiert das oligomere Leguminmolekül in seine konstituierenden Untereinheiten.

### 3.2.6 Methoden zur Untersuchung der Hydrophobizität

#### 3.2.6.1 Fluoreszenzsondentechnik

Es werden zwei Methoden angewendet, um die durch Acylierung von Legumin hervorgerufenen Veränderungen der Hydrophobizität festzustellen: erstens die Bestimmung der Proteinoberflächenhydrophobizität als sogenannter  $S_0$ -Wert und zweitens die Abschätzung der Anzahl hydrophober Bindungsstellen eines Liganden am Protein (COGAN-Plot). Dabei dient 8-Anilino-1-naphtalinsulfat (ANS) als Fluoreszenzsonde, welche hydrophobe Wechselwirkungen mit den hydrophoben aromatischen Seitengruppen des Legumins eingeht. Die Messung erfolgt nach der Methode von KATO & NAKAI [129] in modifizierter Form.

**Durchführung.** Zur Messung der Oberflächenhydrophobizität werden Verdünnungsreihen des jeweiligen Proteins (maximale Proteinkonzentration  $c_{Prot} = 0,1$  g/l) in Standardpuffer bei einer ANS-Konzentration von  $c_{ANS} = 0,05$  g/l hergestellt. Da festgestellt wurde, daß die in der Literatur mit 15-20 min beschriebene Zeit zur Gleichgewichtseinstellung nicht ausreicht, wird nach einer Reaktionszeit von 2 h bei 296 K (in Dunkelheit) die Fluoreszenz gemessen. Die Fluoreszenzintensität wird gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Der Anstieg der linearen Regression entspricht dem  $S_0$ -Wert des jeweiligen Proteins bei entsprechender ANS-Konzentration.

Zur Abschätzung der Anzahl von ANS-Bindungsstellen und zur Berechnung der Bindungskonstanten wird der COGAN-Plot [111] angewendet. Die Fluoreszenz von ANS-

Verdünnungsreihen ( $c_{ANS} = 1-10 \text{ mg/l}$ ) ohne Protein sowie mit konstanter Proteinkonzentration von  $c_{Prot} = 0,1 \text{ g/l}$  wird gemessen:

---

Anregungswellenlänge:	385 nm
Emissionswellenlänge:	475 nm
Bandbreite:	8 nm
Photomultiplierspannung:	700 V

---

Für die Erstellung des COGAN-Plots wird zunächst für jeden Meßpunkt der Wert  $\mathbf{a}$  ermittelt, der den Anteil der freien Bindungsstellen für die ANS-Moleküle am Protein beschreibt, wobei  $RF_{max}$  die gemessene maximale relative Fluoreszenz ist, die durch Absättigung des Proteins mit ANS erreicht wird und  $RF$  die an jedem anderen Meßpunkt gemessene relative Fluoreszenz.  $RF_0$  ist die relative Fluoreszenz der proteinhaltigen Probe bei Abwesenheit von ANS.

$$\mathbf{a} = \frac{RF_{max} - RF}{RF_{max} - RF_0} \quad \text{Gleichung 1}$$

Die freie Ligandenkonzentration  $L$  ergibt sich aus der Differenz der Gesamt-Ligandenkonzentration  $L_0$  und der Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes  $PL$  ( $L = L_0 - PL$ ), wobei die Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes, mit einer Gesamt-Proteinkonzentration  $P_0$  und der Anzahl  $n$  von ANS-Bindungsstellen am Protein,  $PL = n P_0 - \mathbf{a} n P_0$  entspricht. Man erhält Gleichung 2:

$$L = L_0 - n P_0 (1 - \mathbf{a}) \quad \text{Gleichung 2}$$

Entsprechend dem MWG für die Dissoziation der Protein-Ligand-Bindung,  $K_d = \frac{n \cdot P \cdot L}{PL}$ ,

folgt für die Dissoziationskonstante des ANS-Protein-Komplexes:

$$K_d = \frac{\mathbf{a}}{1 - \mathbf{a}} [L_0 - n P_0 (1 - \mathbf{a})] \quad \text{Gleichung 3}$$

Die Gleichung wird nach  $P_0 \mathbf{a} = \frac{1}{n} \frac{R_0 \mathbf{a}}{1 - \mathbf{a}} - \frac{K_d}{n}$  umgestellt, und bei der Auftragung des

COGAN-Plots  $\left( P_0 \mathbf{a} \text{ vs. } \frac{1}{n} \frac{R_0 \mathbf{a}}{1 - \mathbf{a}} \right)$  erhält man eine Gerade mit dem Anstieg  $\frac{1}{n}$  und dem

Ordinatenabschnitt  $-\frac{K_d}{n}$ .

### 3.2.6.2 Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (RP-HPLC)

Die Auftrennung der Proteine bzw. ihrer Bestandteile nach ihrer Hydrophobizität erfolgt mittels Hochleistungsflüssigchromatographie an einer Umkehrphase (RP-4).

---

Gerät:	SCHIMADZU LC-10A
Trennsäule:	Nucleosil C4 MPN (MACHEREY-NAGEL): 250 mm; ID 4,6 mm; 5 µm; 300 Å
Detektion:	UV-Absorption (280 nm)
Fluß:	1 ml/min
Eluent A:	0,05 % Trifluoressigsäure in Wasser
Eluent B:	0,05 % Trifluoressigsäure in Acetonitril
Gradient:	5 min isokratisch auf 5 % B, mit Gradientenanstieg 2 %/min auf 95 % B

---

### 3.2.6.3 Verteilung im Polymer-Zweiphasensystem

Die Verteilung von Protein in Polymer-Zweiphasensystemen ist von ALBERTSSON [112] beschrieben worden. Für das Zweiphasensystem werden Ficoll 400 und Dextran T 70 in Borat/Citrat/ Phosphatpuffer pH 8,0 nach THEORELL & STENHAGEN [113] mit NaCl eingesetzt. Die hydrophobere Oberphase enthält angereichert Ficoll, die hydrophilere Unterphase angereichert Dextran.

**Durchführung.** Die Proberöhrchen werden mit einer Lösung von 20 % Dichlorsilan in Chloroform silanyliert. In den silanylierten Röhrchen wird ein 4g-Verteilungssystem bestehend aus Ficoll- und Dextranlösung, CP-S<sub>stock</sub>-Puffer und Wasser so hergestellt, daß nach Zugabe der Proteinlösung im Verteilungssystem eine Ficollkonzentration von 13,9 % und eine Dextrankonzentration von 10,9 % vorliegt. Anschließend werden 0,8 ml Proteinlösung (mit einer der Verdünnungsreihe entsprechenden Konzentration) darin verteilt.

Polymerlösung 1: Ficoll 400 (Lot GK 23144) PHARMACIA, Uppsala Schweden ( $\bar{M}_w = 400\,000$  g/mol)  
Für eine etwa 45 %ige Lösung werden 40 g Ficoll in 48 ml Wasser gelöst. Die exakte Polymerkonzentration wird nach der Gefriertrocknung kleiner Äquivalente mittels Wägung bestimmt.

Polymerlösung 2: Dextran T 70 (Lot FC 16108) PHARMACIA, Uppsala Schweden ( $\bar{M}_w = 57\,200$  g/mol)  
Für eine etwa 40 %ige Lösung werden 100 g Dextran in 130 ml Wasser gelöst und die exakte Polymerkonzentration nach Gefriertrocknung kleiner Äquivalente mittels Wägung bestimmt.

Puffer: 0,2 M Complex-Puffer nach THEORELL & STENHAGEN [113], pH 8,0 mit 0,2 M NaCl (CP-S<sub>stock</sub>) wird für die Herstellung des Zweiphasensystems benötigt. Für die Herstellung der Protein-Verdünnungsreihe wird dieser 1:4 verdünnt; man erhält 0,05 M Complexpuffer mit 0,5 M NaCl (CPS)

Proteinlösung: Aus der Protein-Stammlösung mit 15 mg/ml CPS werden nach Zentrifugation (30 min, 17 000 x g) Verdünnungen mit 1,5-15 mg Protein/ml CPS hergestellt, was einer Proteinkonzentration von 0,3-3,0 mg/ml im Zweiphasensystem entspricht.

Die Phasentrennung erfolgt über Nacht bei 296 K. Nachfolgend werden die obere und die untere Phase voneinander getrennt, auf eine jeweils meßbare Konzentration verdünnt (Verdünnungsfaktor  $VF$ ) und bei 280 nm in 1 cm-Küvetten UV-spektroskopisch gemessen.

Die Proteinkonzentrationen der Oberphasen werden gegen die der Unterphasen aufgetragen und der Verteilungskoeffizient  $K$  aus dem Anstieg ermittelt.

$$K' = \frac{c_{Oberphase}}{c_{Unterphase}} = \frac{E_{Oberphase}^{280} \cdot VF_{Oberphase}}{E_{Unterphase}^{280} \cdot VF_{Unterphase}} \quad \text{Gleichung 4}$$

Die Verteilungskoeffizienten von nativem Legumin und ausgewählten succinylierten Derivaten in diesem Zweiphasensystem wurden bei 296 K bestimmt. Aus den Verteilungskoeffizienten wird die freie Energie des Übergangs der Proteine von einer Phase in die andere ( $\Delta G^0_{transfer}$ ) nach folgender Gleichung berechnet:

$$\Delta G^0_{transfer} = -R T \ln K \quad \text{Gleichung 5}$$

Die Berechnung der freien Energie des Phasenüberganges der modifizierten Proben erfolgt dementsprechend nach Gleichung 6:

$$\Delta G^0_{transfer} = -R T (\ln K_{modifiziert} - \ln K_{nativ}) \quad \text{Gleichung 6}$$

### 3.3 Methoden zur Aufklärung von Konformationsänderungen

#### 3.3.1 Hydrodynamische Methoden

##### 3.3.1.1 Kapillarviskosimetrie

Die dynamische Viskosität  $\mathbf{h}$  gibt den Widerstand eines Stoffes an, den dieser einer gegenseitigen Verschiebung zweier benachbarter Schichten entgegensetzt. Die Durchflußzeit  $t$  durch eine Kapillare ergibt durch Multiplikation mit der jeweiligen Kapillarenkonstante  $K$  unmittelbar die kinematische Viskosität  $\mathbf{n}$  in Centistokes ( $\text{mm}^2/\text{s}$ ).

$$\mathbf{n} = K \cdot t \quad \text{Gleichung 7}$$

Für die relative (kinematische) Viskosität des Proteins im Lösungsmittel  $\mathbf{n}_{rel}$  gilt dementsprechend bei Viskositätsmessung des Lösungsmittels (Index 0) in gleicher Kapillare, also  $K = \text{const.}$ :

$$\mathbf{n}_{rel} = \mathbf{n} / \mathbf{n}_0 = t / t_0 \quad \text{Gleichung 8}$$

Daraus lassen sich die spezifische  $\mathbf{n}_{sp}$  und die reduzierte (kinematische) Viskosität  $\mathbf{n}_{red}$  des Proteins berechnen:

$$\mathbf{n}_{sp} = \mathbf{n}_{rel} - 1 \quad \text{Gleichung 9}$$

$$\mathbf{n}_{red} = \mathbf{n}_{sp} / c_{Prot} \quad \text{Gleichung 10}$$

Die reduzierte Viskosität jeder Meßlösung wird gegen die mit der Mikro-Biuret-Methode ermittelte Proteinkonzentration aufgetragen und die kinematische Grenzviskosität  $[\mathbf{n}]$  aus der Extrapolation auf  $c_{Prot} = 0$  ermittelt.

Die kinematische Viskosität ist das Verhältnis der dynamischen Viskosität zur Dichte  $\mathbf{r}$ . Mit der Korrektur nach TANFORD [114] wird aus der kinematischen Grenzviskosität, die er als  $[\mathbf{h}]'$  bezeichnet, unter Einbeziehung der Dichte  $\mathbf{r}$  der Lösung (als Lösungsmittel-Dichte  $\mathbf{r}_0$  und partielles spezifisches Volumen  $\bar{v}$  des Proteins, s. Kap. 3.3.1.2 Gleichung 12) die dynamische Grenzviskosität  $[\mathbf{h}]$  nach Gleichung 11 berechnet.

$$[\mathbf{h}] = [\mathbf{h}]' + [(1 - \bar{v} \mathbf{r}_0) / \mathbf{r}_0] \quad \text{Gleichung 11}$$

Die Messungen erfolgen im LAUDA VISKOSIMETER S (LAUDA, Königshofen), unter Verwendung von 1,5 ml-Ubbelode-Mikrokapillaren bei 20 ° C. Um mehrere Meßpunkte zu erhalten, wird die dialysierte, anschließend durch 0,2 µm membranfiltrierte, 1-1,5 %ige Protein-Stammlösung schrittweise verdünnt.

### 3.3.1.2 Präzisionsdichtemessung

Die Bestimmung der Dichte von Legumin und seinen acylierten Derivaten in Phosphatpuffern unterschiedlicher Ionenstärke erfolgt mit einem Dichtemeßgerät DMA 60 (ANTON PAAR, Graz) nach der Biegeschwingermethode. Dabei wird die zu untersuchende Substanz in ein an den offenen Enden eingespanntes U-förmiges Rohr eingefüllt, welches elektronisch zu Eigenschwingungen angeregt wird. Die Schwingungsdauer wird sehr exakt gemessen. Das Quadrat der Schwingungsdauer ist direkt proportional der Dichte der Meßlösung im U-Rohr. Trägt man die Dichten von 10 Verdünnungen gegen die jeweilige Konzentration der Proteinlösungen (1–10 g/l) auf, so erhält man als Geradengleichung ( $y=a+bx$ )

$$\mathbf{r} = \mathbf{r}_0 + (1 - \bar{v} \mathbf{r}_0) c \quad \text{Gleichung 12}$$

Dementsprechend kann man das partielle spezifische Volumen  $\bar{v}$  des Proteins nach Gleichung 13 berechnen:

$$\bar{v} = (1-b) / a$$

Gleichung 13

Die Messungen wurden bei  $20 \pm 0,004$  ° C durchgeführt.

### 3.3.1.3 Analytische Ultrazentrifugation

Es gibt zwei grundlegende Arten der Untersuchung mittels analytischer Ultrazentrifuge (AUZ): die Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse und die Sedimentationsgleichgewichtsanalyse.

Die Sedimentation von Teilchen in einer Flüssigkeit beruht auf dem Einfluß der Erdgravitation einerseits und dem Einfluß des durch Rotation erzeugten Zentrifugalfeldes andererseits. Auf ein Teilchen mit der Masse  $m$  wirken im Gravitationsfeld drei Kräfte:

- |   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| 1. Sedimentations- oder Gravitationskraft | $F_s = \omega^2 r m$                 |
| 2. Auftriebskraft                         | $F_a = -\omega^2 r m \bar{v} \rho_0$ |
| 3. Reibungskraft                          | $F_r = f (dr/dt)$                    |

Aus Gravitation und Auftrieb ergibt sich die Zentrifugalkraft mit  $F_z = m \omega^2 r (1 - \bar{v} \rho_0)$ , wobei  $m$  die Masse und  $\bar{v}$  das partielle spezifische Volumen des Makromoleküls sind,  $\rho_0$  die Dichte des Lösungsmittels und  $\omega$  die Winkelgeschwindigkeit, mit der die Partikel im Abstand  $r$  von der Rotationsachse rotieren. Die Reibung wirkt der Zentrifugalkraft entgegen, und innerhalb sehr kurzer Zeit kommen die drei Kräfte ins Gleichgewicht:

$$F_s + F_a + F_r = 0.$$

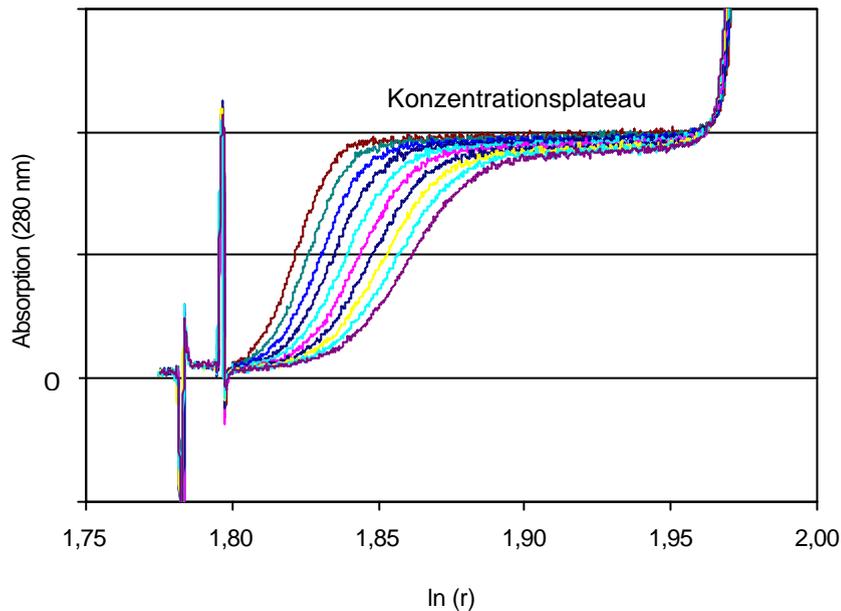
Der Sedimentationskoeffizient  $s$  errechnet sich nach folgender Gleichung:

$$s = \frac{1}{\omega^2} \int_{r_1}^{r_2} \frac{1}{r} \frac{dr}{dt} = \frac{\ln(r_2/r_1)}{\omega^2 t} \quad \text{Gleichung 14}$$

Die mit der Winkelgeschwindigkeit  $\omega$  im Zentrifugenrotor bewegten Proteinmoleküle vergrößern aufgrund der einwirkenden Zentrifugalkraft ihren Abstand vom Rotationszentrum mit dem beliebigen Anfangswert  $r_1$  zum Endwert  $r_2$ , der jeweils gemessenen radialen Position des Protein-Sedimentationsmaximums. Die Geschwindigkeit des Sedimentationsprozesses hängt entscheidend von der Masse der Teilchen und ihrer Form ab. Kompakte, kugelförmige Moleküle sedimentieren im allgemeinen schneller als stäbchenförmige oder expandierte Moleküle.

Die Messung der Wanderungsgeschwindigkeit der Grenzschicht zwischen Lösungsmittel- und Konzentrationsplateau und die Analyse ihrer Gestalt bilden die eigentliche Grundlage der Sedimentationsgeschwindigkeitsmethode. Nachdem man aus den gemessenen Abhängigkeiten der Protein-Absorption vom Logarithmus der radialen Position einer sedimentierenden Grenzschicht (**Abbildung 6**) die Wendepunkte ermittelt hat, kann  $r$  als

Funktion der Meßzeit  $t$  in der Form  $\ln(r) = f(\omega^2 t)$  aufgetragen werden. Nach linearer Regression ermittelt man aus dem Anstieg der Ausgleichsgeraden den Sedimentationskoeffizienten  $s_{app}$  für die jeweilige Konzentration des Proteins. Die auf diese Weise für mehrere Konzentrationen ermittelten Sedimentationskoeffizienten können auf die Proteinkonzentration  $c_{Prot} = 0$  extrapoliert werden, wodurch man die Sedimentationskonstante  $s^0$  erhält. Das verwendete Lösungsmittel und die Meßtemperatur werden indiziert.



**Abbildung 6:** Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse mittels Absorptionsoptik am Beispiel von 99% succinyliertem Legumin in Standardpuffer ( $c_{Prot} = 1,5 \text{ g/l}$ )

Der Sedimentationskoeffizient wird durch die Dichte des Lösungsmittels und die Viskosität der Lösung beeinflusst. Um bei unterschiedlichen Temperaturen in verschiedenen Lösungsmedien gemessene Sedimentationskoeffizienten miteinander vergleichen zu können, müssen sie auf Standardbedingungen reduziert werden. Bei Biopolymeren ist es üblich, die berechneten  $s^0$ -Werte auf die Dichte und Viskosität des Wassers bei  $20^\circ \text{C}$  zu beziehen. Für die Normierung wird Gleichung 15 herangezogen:

$$s_{20,W} = s_{app} \left[ \frac{h_{T,W}}{h_{20,W}} \right] \left[ \frac{h_{T,S}}{h_{T,W}} \right] \left[ \frac{1 - \bar{v} r_{20,W}}{1 - \bar{v} r_{T,S}} \right] \quad \text{Gleichung 15}$$

$s_{20,W}$  = auf Standardbedingungen normierter Sedimentationskoeffizient

$s_{app}$  = gemessener Sedimentationskoeffizient

$h$  = Viskosität von Wasser (W) bzw. Solvens (S)

$\bar{v}$  = partielles spezifisches Volumen des Proteins

$r$  = Dichte von Wasser (W) bzw. Solvens (S)

Indices:  $20 = 20^\circ \text{C}$ ;  $T = \text{Meßtemperatur}$

Sedimentationskoeffizienten makromolekularer Substanzen sind (mehr oder weniger) konzentrationsabhängig. Die Stärke der Konzentrationsabhängigkeit wird durch die physikalischen Eigenschaften (Masse, Form, Größe, Solvatationsgrad) der sedimentierenden Moleküle bestimmt. Es ist üblich, die Sedimentationskonstanten aus der Extrapolation der

Gleichung 
$$\frac{1}{s_{app}} = \frac{1}{s^0} + \frac{k_s}{s^0} c$$
 zu ermitteln [115], der zufolge der reziproke Sedi-

mentationskoeffizient eine lineare Funktion von  $c$  ist. Aus diesem Plot läßt sich die Konzentrationsabhängigkeitskonstante  $k_s$  ermitteln. Sie läßt Aussagen über die Form der Moleküle zu. Die Konzentrationsabhängigkeit, also der  $k_s$ -Wert, ist vergleichsweise klein bei kompakten Molekülen und groß bei linearen flexiblen Polymeren [28] und expandierten Molekülen [116].

**Durchführung (1).** Die Sedimentationsanalyse mit der Philpot-Svensson-Schlierenoptik erfolgt in der analytischen Ultrazentrifuge Modell 3170-B (MOM Optische Werke, Budapest) bei Geschwindigkeiten von 30 000 U/min (Philpotwinkel 44,8 °), 40 000 U/min (Philpotwinkel 18 °) und 50 000 U/min (Philpotwinkel 30 °) und einer Temperatur von jeweils 20 ° C.

Aus der lyophilisierten Probe wird eine Stammlösung mit einer Konzentration von 10 g/l hergestellt, gegen den Standardphosphatpuffer dialysiert und zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Sedimentationskoeffizienten Verdünnungen mit Konzentrationen zwischen 2 und 10 g/l hergestellt. Die Proteinkonzentration wird mit der Mikro-Biuret-Methode bestimmt. Die Untersuchung der Hauptkomponente von hochacetyliertem Legumin (Fraktion A) erfolgt nach Rechromatographie an Sepharose CL 4B bei 30 000 U/min und einem Philpotwinkel von 25 °.

Neben den Betrachtungen zum Einfluß von Acetylierung und Succinylierung auf das Ackerbohnen-Legumin mit der Schlierenoptik, wird der Einfluß der Ionenstärke auf die Sedimentationseigenschaften einer erschöpfend (99 %) succinylierten Probe mit der Absorptionsoptik untersucht. Im Vergleich zur Schlierenoptik, bei der das dem Konzentrationsgefälle  $dc/dr$  proportionale Brechzahlgefälle  $dn/dr$  aufgezeichnet wird, wird bei Anwendung der Absorptionsoptik die der Konzentration proportionale Absorption der Moleküle ausgenutzt.

**Durchführung (2).** Die Sedimentationsanalyse wird mit der analytischen Ultrazentrifuge BECKMANN XL-I bei 45 000 U/min durchgeführt. Die UV-Detektion erfolgt bei 280 nm, entsprechend dem Absorptionsmaximum der Aromaten. Der Verlauf der Sedimentation wird bei 20 ° C durch mindestens 10 Messungen im Zeitabstand von je 12 min verfolgt.

Die lyophilisierte Probe wird im Phosphatpuffer der Ionenstärke  $I=0,1$ ;  $I=0,5$  bzw.  $I=1,0$  gelöst, gegen den jeweiligen Puffer dialysiert und anschließend die Proteinkonzentration mit der Mikro-Biuret-Methode bestimmt. Die Konzentration der Stammlösung wird auf

3-4 g/l eingestellt und zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Sedimentationskoeffizienten eine Verdünnungsreihe hergestellt.

#### 3.3.1.4 Dynamische Lichtstreuung

Bei der Messung der Lichtstreuung werden zwei Methoden unterschieden: die statische und die dynamische Lichtstreuung. Die statische Lichtstreuung dient der Bestimmung von Molmassen, Trägheitsradien und zweiten Virialkoeffizienten als Maß intermolekularer Wechselwirkungen von Biopolymeren in Lösung. Die dynamische Lichtstreuung (DLS) wird zur Bestimmung der Abmessungen von Makromolekülen (z. B. Proteinmolekülen) und Partikeln in Lösung eingesetzt. Sie gestattet die Bestimmung von Translationsdiffusionskoeffizienten ( $D$ ). Aus den Diffusionskoeffizienten können die hydrodynamisch effektiven Abmessungen berechnet werden.

Die Konzentration von Molekülen in Lösung schwankt aufgrund der Brownschen Molekularbewegung, in Abhängigkeit von Ort und Zeit, um einen Mittelwert. Diese Konzentrationschwankungen relaxieren nach den Fickschen Gesetzen der Diffusion. Die Relaxationszeit  $t$  hängt in der Hauptsache von der Molekülgröße und -gestalt ab, sowie auch von der Temperatur und der Viskosität des Lösungsmittels. Durch die Messung der DLS erhält man Informationen über die zeitlichen Schwankungen der gestreuten Lichtintensität, die wiederum durch die Konzentrationsfluktuation der Proteinmoleküle in Lösung hervorgerufen werden und die somit Rückschlüsse auf diese Moleküle zulassen. Bei der DLS wird die Meßprobe mit der Strahlung eines Lasers beleuchtet und die Intensität der gestreuten Strahlung bei einem bestimmten Streuwinkel  $\Theta$  gemessen. Die Schwankungen des Feldes der gestreuten Welle werden durch die Zeit-Autokorrelationsfunktion (AKF) beschrieben. Sie enthält die Informationen über die streuenden Moleküle.

Für den Fall, daß die streuenden Moleküle identisch und kugelförmig sind, nimmt die Zeit-Autokorrelationsfunktion die Form einer einfachen Exponentialfunktion an:

$$g(t) = e^{-q^2 D t} \quad \text{Gleichung 16}$$

- $g(t)$  = Zeit-Autokorrelationsfunktion 1. Ordnung
- $q$  = Betrag des Streuvektors
- $D$  = Translationsdiffusionskoeffizient der streuenden Moleküle
- $t$  = Relaxationszeit

Der Streuvektor  $q$  ist folgendermaßen definiert:  $q \equiv |q| = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin \frac{\Theta}{2}$

- $n$  = Brechungsindex der Probe
- $\lambda_0$  = Wellenlänge der Laserstrahlung im Vakuum
- $\Theta$  = Streuwinkel

Der Logarithmus der Zeit-Autokorrelationsfunktion ergibt mit  $\ln g(\mathbf{t}) = -q^2 D \mathbf{t}$  eine Gerade. Da  $I_0$ ,  $\Theta$  und  $n$  bekannt sind bzw. gemessen werden, läßt sich aus der Auftragung von  $\ln g(\mathbf{t})$  über  $\mathbf{t}$  der Diffusionskoeffizient  $D$  ermitteln.

Häufig sind neben den monomeren Proteinmolekülen jedoch Anteile von Aggregaten oder Dissoziationsprodukten vorhanden. In diesem Fall nimmt die Zeit-Autokorrelationsfunktion die Form  $g(\mathbf{t}) = a_1 e^{-q^2 D_1 \mathbf{t}} + a_2 e^{-q^2 D_2 \mathbf{t}}$  an. Darin sind  $a_i$  die Amplitudenfaktoren, die der jeweiligen Anzahl  $N_i$  von Teilchen der Masse  $m_i$  pro Volumeneinheit proportional sind.

Der Radius der streuenden Makromoleküle kann bei Kenntnis von  $D$  und der Viskosität des Lösungsmittels nach den Beziehungen von EINSTEIN (Gleichung 17) und STOKES (Gleichung 18) berechnet werden.

$$D = \frac{k_B T}{f} \quad \text{Gleichung 17}$$

$$\begin{aligned} k_B &= \text{Boltzmann-Konstante} \\ T &= \text{Temperatur} \\ f &= \text{Reibungskoeffizient} \end{aligned}$$

Der Reibungskoeffizient  $f$  einer Kugel mit dem Radius  $R$  ist definiert als

$$f = 6 \pi \mathbf{h}_0 R \quad \text{Gleichung 18}$$

worin  $\mathbf{h}_0$  der Viskosität des Lösungsmittels entspricht.

Der Stokessche Radius, auch hydrodynamisch wirksamer Radius, kann demnach mit folgender Gleichung berechnet werden:

$$R_s = \frac{k_B T}{6 \pi \mathbf{h}_0 D} \quad \text{Gleichung 19}$$

$$\begin{aligned} k_B &= \text{Boltzmann-Konstante} \\ T &= \text{Temperatur} \\ \mathbf{h}_0 &= \text{Viskosität des Lösungsmittels} \\ D &= \text{Diffusionskoeffizient} \end{aligned}$$

Der  $R_s$ -Wert schließt die den Reibungskoeffizienten maßgeblich beeinflussende Hydrathülle des Proteins mit ein, so daß der Stokessche Radius nur dann Aussagen über die tatsächlichen Abmessungen des Moleküls zuläßt, wenn die Hydratation bekannt ist.

Mittels DLS wird der Einfluß der Ionenstärke des Lösungsmittels auf den Diffusionskoeffizienten einer erschöpfend succinylierten Leguminprobe untersucht.

**Durchführung.** Vom zu untersuchenden Protein werden je vier Lösungen mit Konzentrationen zwischen 2 und 5 g/l hergestellt, um die Streuintensität auf die Konzentration

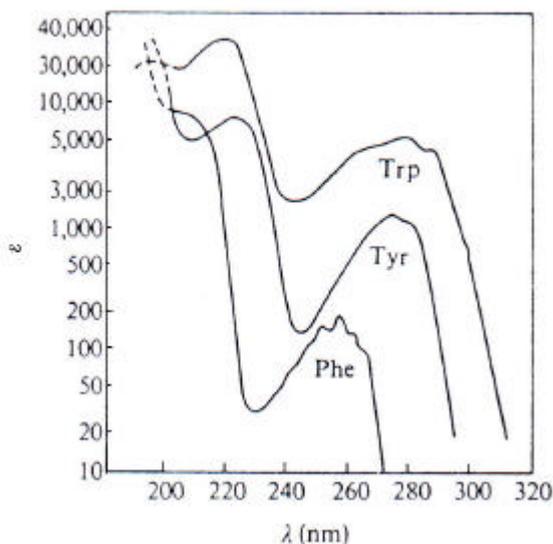
$c_{Prot} = 0$  extrapolieren zu können. Sie werden gegen den jeweiligen Phosphatpuffer (Ionenstärke  $I=0,1$ ;  $I=0,5$  bzw.  $I=1,0$ ) dialysiert und die Proteinkonzentrationen mit der Mikro-Biuret-Methode bestimmt. Die Lösungen werden durch Filter der Porenweite  $0,2 \mu\text{m}$  direkt in die Küvetten gefüllt.

Die Lichtstreuung der Proben wird mit dem Gerät SIMULTAN (ALV-Laser, Langen), einem Mehrfach- $\tau$ -Digitalkorrelator ALV-5000 und einem 400 mW Nd-YAG-Laser (ADLAS, Lübeck) gemessen.

### 3.3.2 Spektroskopische Methoden

#### 3.3.2.1 UV-Absorptionsspektroskopie

Im nahen UV-Bereich absorbieren die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr) und Tryptophan (Trp). Ihre Absorptionsspektren sind in **Abbildung 7** dargestellt.



**Abbildung 7:** UV-Absorptionsspektren der drei aromatischen Aminosäuren Phe, Tyr und Trp nach [117]

Der molekulare Extinktionskoeffizient  $\epsilon(\lambda)$  ist im logarithmischen Maßstab dargestellt. Aus dieser Abbildung ist zu entnehmen, daß das UV-Spektrum eines Proteins zwischen 240 nm und 320 nm hauptsächlich von seinem Gehalt an Tryptophan und in geringerem Maße vom Tyrosingehalt bestimmt wird; der Gehalt an Phenylalanin spielt nur eine untergeordnete Rolle. Diese Aussage gilt streng genommen nur, wenn die drei Aminosäurereste zu etwa gleichen Anteilen im Protein vorliegen. Da die Legumin-Untereinheiten vom Typ A 12 bzw. vom Typ B 13 Tyr-Reste aber nur 2 bzw. 3 Trp-Reste enthalten, wird der Verlauf des UV-Spektrums sowohl durch die Trp-Reste als auch durch die Tyr-Reste bestimmt. **Abbildung 7** verdeutlicht aber, daß bei einer Wellenlänge von 295 nm die UV-Absorption vor allem durch das im Molekül vorhandene Tryptophan bestimmt wird. Die Absorption der 17 bzw. 12 Phe-Reste beeinflusst das UV-Spektrum zwischen 240 und 320 nm nicht maßgeblich.

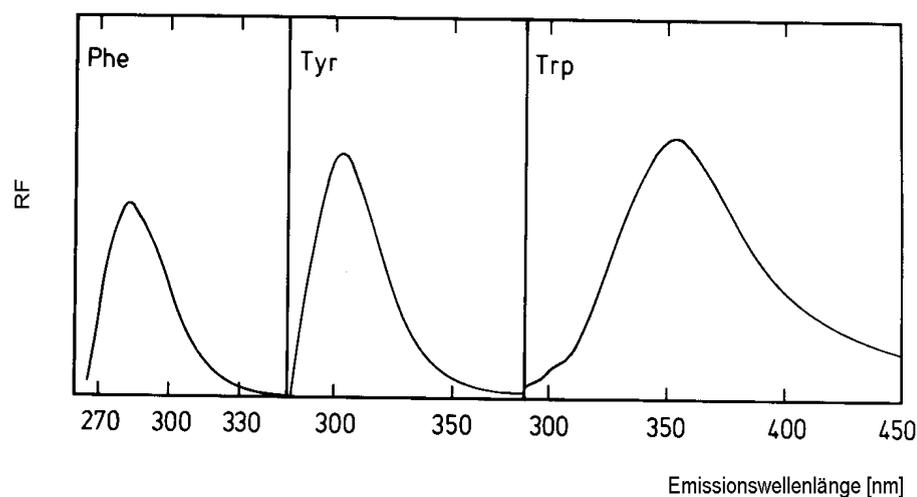
**Durchführung.** Für die UV-spektroskopischen Untersuchungen von Legumin und seinen acylierten Derivaten werden jeweils Lösungen mit einer Proteinkonzentration von 2 g/l

hergestellt, gegen den entsprechenden Puffer dialysiert und anschließend durch 0,2  $\mu\text{m}$  klar filtriert. Nach der Bestimmung des Proteingehaltes mit der Mikro-Biuret-Methode wird die Massenkonzentration mittels Wägung auf 1g/l eingestellt. Es wird am UV/VIS Spektralphotometer Lambda 2 (PERKIN-ELMER, Überlingen) im Wellenlängenintervall 240-400 nm (Messung bis 400 nm wegen anschließender Trübungskorrektur) gemessen. Die UV-Absorptionsspektren (nullter Ordnung) werden mit einer Geschwindigkeit von 1 nm/s und einer Spaltbreite von 2 nm aufgenommen.

Die UV-Derivationspektroskopie erlaubt es, störende Einflüsse, die bei Spektren nullter Ordnung auftreten können, auszuschalten bzw. zu minimieren [118]. So können die Streuung oder Absorption durch Puffersubstanzen und geringe Konzentrationsschwankungen zwischen den Proben als Fehlerquellen eliminiert werden. Ein großer Vorteil der Derivationspektroskopie ist die Erfassung schon sehr geringer Veränderungen in der Umgebung der Chromophoren. Es werden die zweiten Ableitungen ( $d^2A/d\lambda^2$ ) der UV-Absorptionsspektren nullter Ordnung berechnet.

Um Konformationsunterschiede zwischen nativem Legumin und den zunehmend stärker acylierten Proben (auch in Abhängigkeit von der Ionenstärke des Puffers) aufzuzeigen, empfiehlt es sich, zunächst die Differenzspektren aus modifizierter Probe und nativer Probe zu berechnen. Die 2. Ableitungen dieser Differenzspektren ( $d^2DA/d\lambda^2$ ) werden als Differenzableitungsspektren bezeichnet. Die Ableitung erfolgt über ein Intervall von 4,9 nm.

### 3.3.2.2 Fluoreszenzemissionsspektroskopie



**Abbildung 8:** Fluoreszenzemissionsspektren von 100  $\mu\text{mol}$  Phenylalanin (Exc. 257nm), 6  $\mu\text{mol}$  Tyrosin (Exc. 274 nm) und 1  $\mu\text{mol}$  Tryptophan (Exc. 278 nm) in 0,01 M Kalium-Phosphatpuffer nach [119]

Die Messung der Fluoreszenzemission erfolgt üblicherweise durch Anregung von Tyrosin und Tryptophan bei einer Wellenlänge von 280 nm (Anregung von Tryptophan und Tyrosin) bzw. bei 295 nm (Anregung von Tryptophan) [119]. In Proteinen, die alle drei aromatischen Aminosäuren (Trp, Tyr, Phe) enthalten, wird die Fluoreszenz in der Regel durch den Beitrag der Tryptophanreste bestimmt (s. auch **Abbildung 8**). Ursachen sind die bedeutend größere Absorption bei der Anregungswellenlänge und die beträchtlich höhere Quantenausbeute der Emission als bei Tyrosin und Phenylalanin. Die Phenylalanin-Fluoreszenz kann wegen ihrer zu geringen Sensitivität in nativen Proteinen in der Regel nicht beobachtet werden. Ein anderer wichtiger Aspekt ist der Energietransfer zwischen den Resten. Die Fluoreszenz von Phenylalanin z. B. kann auch deswegen kaum beobachtet werden, weil ihre Emission effizient durch den Energietransfer zu den Tryptophan- und Tyrosinresten gelöscht wird („Quenching“). Diese absorbieren stark in dem Bereich (280 nm), wo Phenylalanin Fluoreszenz emittiert.

**Durchführung.** Für die Untersuchung der Fluoreszenzemission von Legumin und seinen acylierten Derivaten hinsichtlich des Einflusses von Modifizierung und Ionenstärke des Lösungsmittels auf die Konformation, werden jeweils Proteinlösungen der Konzentration 2 g/l hergestellt, gegen den entsprechenden Puffer dialysiert und anschließend durch 0,2 µm klar filtriert. Nach der Bestimmung des Proteingehaltes mit der Mikro-Biuret-Methode wird die Massenkonzentration mittels Wägung auf 1,00 g/l eingestellt und anschließend auf 0,10 g/l verdünnt. Die Messungen erfolgen am Fluoreszenz-Spektrometer AB 2 (AMINCO-BOWMAN, Rochester) im Wellenlängenintervall 300–450 nm. Die Fluoreszenzemissionsspektren werden in Schritten von 0,2 nm mit einer Geschwindigkeit von 0,2 nm/s und einer Bandbreite von 4 nm für die Anregung und 0,5 nm für die Emission (HV 900 V) aufgenommen. Die Fluoreszenzemission jeder Probe wird sowohl nach Anregung bei 280 nm (Tyr und Trp) als auch nach Anregung bei 295 nm (Trp) gemessen.

### 3.3.2.3 *Circulardichroitische Spektrometrie*

Circulardichroitische Spektrometrie ist eine häufig angewendete Technik, mit der Daten über die Struktur (Sekundär- und Tertiärstruktur) eines Proteins in Lösung erhalten werden können. Unter Circulardichroismus (CD) versteht man die Eigenschaft, links- bzw. rechtscircularpolarisiertes Licht unterschiedlich stark zu absorbieren. Die Chiralität eines Chromophors ist Voraussetzung.

**Durchführung.** Die zu untersuchenden Proteinproben werden im jeweiligen Phosphatpuffer gelöst, dialysiert, durch 0,2 µm filtriert und anschließend die Endkonzentration auf exakt 2,0 g/l eingestellt. Alle Messungen werden am CD-Spektropolarimeter JASCO J-720 vorgenommen. Die Untersuchungen im fernen UV (190–260 nm) erfolgen in Quarzküvet-

ten mit einer Schichtdicke von 0,005 cm, die Messungen im nahen UV (245–320 nm) in 1 cm-Küvetten. Die Spektren werden mit einer Geschwindigkeit von 10 nm/min und einer Zeitkonstanten von 4s aufgenommen und jeweils dreifach akkumuliert. Aus der Elliptizität  $\Theta$ , gemessen in mdeg, wird die konzentrations- und schichtdickenunabhängige molare Elliptizität  $[\Theta]$  in  $[\text{deg} \cdot \text{cm}^2/\text{dmol}]$  berechnet. In diese Umrechnung geht die mittlere molare Masse der das Polymer konstituierenden Monomere (MRW = mean residue weight) ein, welche in Abhängigkeit von Art und Grad der Modifizierung unterschiedlich ist.

Das MRW wird folgendermaßen berechnet: Die Aminosäurezusammensetzung von Legumin (*Vicia faba* L., var. Scirocco) ist experimentell bestimmt worden [50]. Aus den Molmassen der Aminosäuren werden durch Subtraktion von 18 g/mol (entsprechend der Wasserabspaltung bei der Bildung von Peptidbindungen) die Molmassen der Aminosäurereste in der Polypeptidkette berechnet. Die Summe der Molmassen aller Aminosäurereste, dividiert durch die Anzahl der Aminosäuren aus [50], ergibt das MRW. Für die Berechnung des MRW von erschöpfend acetyliertem Legumin werden die zugrunde liegenden Molmassen der Lysin-, Threonin-, Serin und Tyrosinreste um 42 g/mol erhöht. Das entspricht der Einführung der Acetylgruppe  $-\text{CO}-\text{CH}_3$  unter Abspaltung eines Wasserstoffatoms aus der Amino- bzw. Hydroxylgruppe. Für die Berechnung des MRW von vollständig succinyliertem Legumin wird zur Molmasse der Lysin-, Threonin- und Serinreste ein Betrag von 99 g/mol, entsprechend dem Succinylrest  $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ , addiert. Die Molmasse der Tyrosinreste wird bei dieser Berechnung wegen der Reversibilität ihrer Succinylierung nicht verändert. Das MRW von Leguminproben mit nur teilweise acylierten Gruppen wird mit den entsprechend anteilig erhöhten Massen, also mit 58 % der Lysin- und 20 % der Threonin- und Serinreste im Falle 58%iger *N*-Acetylierung und 64 % der Lysinreste bei der zu 64 % succinylierten Probe, berechnet. Die Ergebnisse sind **Tabelle 1** zu entnehmen.

**Tabelle 1:** MRW ausgewählter acylierter Leguminproben zur Berechnung molarer Elliptizitäten

	Mittleres Restgewicht (MRW)
natives Legumin	113,6
58% Acetylierung	115,5
98% Acetylierung	120,9
64% Succinylierung	114,9
95% Succinylierung	127,9

### 3.3.3 Methoden zur Untersuchung der Konformationsstabilität

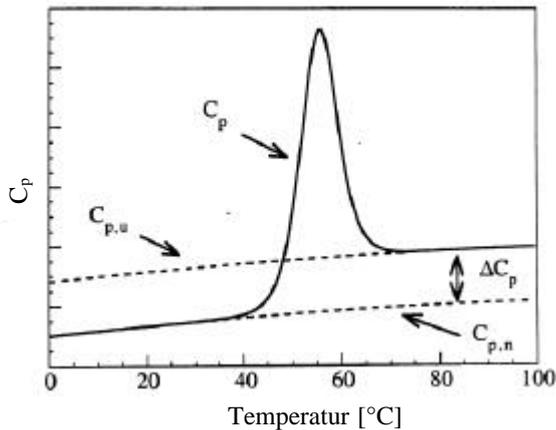
#### 3.3.3.1 Differential Scanning-Kalorimetrie zur Untersuchung der Thermostabilität

Die Differential Scanning-Kalorimetrie (DSC) ist im allgemeinen eine Technik zur Untersuchung thermotroper Übergänge. In der vorliegenden Arbeit wurde sie zur Bestimmung der Energetik bzw. Thermodynamik des Überganges vom gefalteten zum entfalteten Protein angewendet. Dabei wird das Protein in Lösung einem Streß in Form von permanent steigender Temperatur ausgesetzt, bis die anfangs vorliegende „native“ Struktur kollabiert und das Protein im Zustand vollständiger thermischer Entfaltung vorliegt [121]. Wenn ein System bei konstantem Druck erwärmt wird und außer Volumenarbeit keine andere Form der Arbeit zugelassen ist, so nimmt die Enthalpie  $H$  um einen Betrag zu, der äquivalent der als Wärme zugeführten Energie ist [120]. Wird die Wärmekapazität des Proteins als Funktion der Temperatur gemessen, kann daraus die Temperaturabhängigkeit der Enthalpie abgeleitet werden. Aus der Definitionsgleichung der Wärmekapazität,

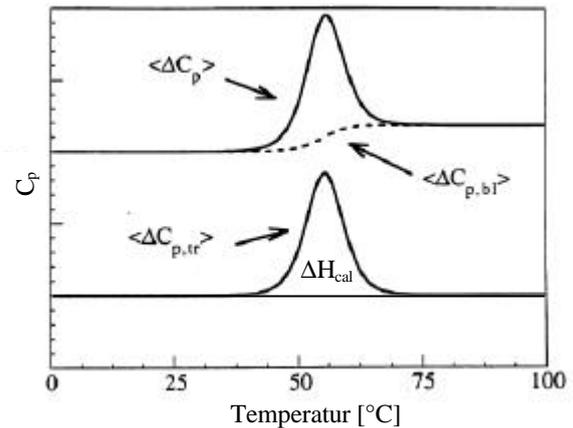
$$C_p = \left( \frac{\partial H}{\partial T} \right)_p,$$

erhält man durch Integration die Enthalpiefunktion  $H(T) = \int_{T_0}^T C_p(T) dT + H(T_0)$ .

**Abbildung 9** gibt die schematische Darstellung eines DCS-Thermogramms wieder. Beim Übergang des Proteins vom Ausgangszustand in einen anderen, thermisch denaturierten Zustand, hat die gemessene Wärmekapazitätsfunktion  $C_p$  bei einer charakteristischen Temperatur  $T_d$  ihr Maximum; es beinhaltet die Wärmekapazitäten aller beim Übergang vorliegenden Zustandsformen. Die Differenz aus molarer Wärmekapazität des Proteins im entfalteten Zustand  $C_{p,u}$  und im gefalteten („nativen“) Zustand  $C_{p,n}$  entspricht der Wärmekapazitätsänderung für den thermischen Entfaltungsprozeß  $\Delta C_p$ . Die Exzess-Wärmekapazitätsfunktion  $\langle \Delta C_p \rangle$  (**Abbildung 10**) erhält man durch Subtraktion der Wärmekapazität  $C_{p,n}$  des Proteins im nativen Zustand von der Wärmekapazitätsfunktion  $C_p$ . Die Basislinie des Thermogramms ( $\langle \Delta C_{p,bl} \rangle$ ) im Bereich der Denaturation wurde durch ‚spline‘-Interpolation zwischen  $C_{p,n}$  und  $C_{p,u}$  berechnet. Nach Abzug dieser sigmoidalen Funktion erhält man die Exzess-Wärmekapazitätsfunktion des Übergangs  $\langle \Delta C_{p,tr} \rangle$  die den oder die charakteristischen Übergangspeak(s) in der Wärmekapazitätsfunktion definiert („normiertes Thermogramm“). Die Fläche unter dem Peak entspricht der Denaturation-enthalpie  $\Delta H_{cal}$ .



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung des Funktionsverlaufes der molaren Wärmekapazität  $C_p$  für ein typisches globuläres Protein nach [121]



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung (nach [121]) der Exzess-Wärmekapazitätsfunktion  $\langle DC_p \rangle = C_p - C_{p,n}$  sowie der Exzess-Wärmekapazitätsfunktion des Überganges vom gefalteten Zustand eines Proteins in den denaturierten  $\langle DC_{p,tr} \rangle = \langle DC_p \rangle - \langle DC_{p,bl} \rangle$

**Durchführung:** Nach der Kalibrierung des Kalorimeters durch Meßzellenbeheizung (definierter Energiewert wird in definiertem Zeitintervall gemessen und mit der erhaltenen Peakfläche korreliert) wird die Wärmekapazität des Puffers durch Differenzmessung gegen Wasser ermittelt. Zur mikrokalorimetrischen Untersuchung der Probe wird eine Lösung mit einer Proteinkonzentration von etwa 5 mg/ml im entsprechenden Phosphatpuffer mit NaCl hergestellt, zur Einstellung des Gleichgewichtes dialysiert und anschließend zur Abtrennung von Aggregaten 15 min bei 17 000 x g zentrifugiert. Die nun vorliegende Proteinkonzentration wird mit der Mikro-Biuret-Methode spektrophotometrisch bestimmt. Die DSC-Messung der Probe erfolgt gegen den Puffer in einem DASM-4-Mikrokalorimeter (Au-Zelle mit  $V = 0,47$  ml) der Firma BIOPRIBOR, USSR, während eines Arbeitsaufenthaltes am Institut für Biochemische Physik der Russischen Akademie der Wissenschaften, Moskau.

---

Temperaturmeßbereich:	2 bis 95 $^{\circ}\text{C}$
Aufheizrate:	2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$
Druck:	$2 \cdot 10^5$ Pa

---

Komplexe Thermogramme können z. B. durch Denaturation verschiedener Moleküle oder verschiedener Domänen, durch aufeinander folgende Entfaltungsstufen innerhalb einer Domäne oder durch Dissoziation mit einher gehender Denaturation bedingt sein. Für die Auftrennung solcher überlappender Peaks, bezeichnet als Deconvolution der Wärmekapazitätsfunktion, ist ein Algorithmus entwickelt worden [122, 123]. Das Hauptziel der De-

convolutionsanalyse ist die Bestimmung der Anzahl von Zuständen, die während der thermischen Entfaltung vorliegen und ihrer thermodynamischen Parameter [124]. Die computergestützte Deconvolution der komplexen Thermogramme erfolgte in Moskau mit dem Gaußkurven-Fitting-Programm *PEAK FIT 4.0*.

Bei reversibler thermischer Entfaltung gilt für die freie Energie  $\Delta G$  im Gleichgewicht

$$\Delta G = \Delta H - T_d \Delta S = 0$$

Die freie Energie der Entfaltung - auch als molare Thermostabilität  $\Delta G(T)$  bezeichnet - kann, bei Annahme einer einstufigen Denaturation, für jede beliebige Temperatur  $T$  durch Einsetzen der molaren thermodynamischen Parameter in Gleichung 20 berechnet werden [125].

$$\Delta G(T) = \Delta H_{cal} \left( 1 - \frac{T}{T_d} \right) - \Delta C_p \left[ (T_d - T) + T \ln \left( \frac{T}{T_d} \right) \right] \quad \text{Gleichung 20}$$

### 3.3.3.2 Fluoreszenzspektroskopie zur Untersuchung der Denaturansstabilität

Die Methode dient der Erfassung von Unterschieden der Konformationsstabilität von Leguminpräparaten, aufgrund verschiedener Modifizierungsstufen. Die Stabilität der Konformation eines Proteins kann durch die Veränderung der freien Energie für die folgende Reaktion beschrieben werden [125]:



Die Konformationsstabilität, auch thermodynamische Stabilität, kann im Falle reversibler Entfaltung als Funktion der Denaturanskonzentration bestimmt werden. Die Reversibilität des Entfaltungsprozesses ist also stets zu prüfen [125]. Die Untersuchung der Konformationsstabilität auf diesem Wege erfordert eine Reihe von Annahmen [126]. So muß die Entfaltung ohne Zwischenstufen von einem Ausgangszustand zu einem Endzustand erfolgen. Die freie Energie des Ausgangsproteins kann anhand der gemessenen Werte in Gegenwart von Denaturans durch Extrapolation auf die Denaturanskonzentration  $c_{Denat} = 0$  erhalten werden [125]. Die lineare Regression erfolgt aufgrund der Annahme, daß zwischen der Exposition und der meßbaren Fluoreszenz des Tryptophans einerseits und zwischen der Tryptophan-Exposition und dem Entfaltungsgrad des Proteins andererseits eine lineare Abhängigkeit besteht.

**Durchführung.** Wegen des unerwünschten stabilisierenden Einflusses der  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ionen erfolgen sämtliche Untersuchungen zur Denaturansstabilität in 0,05 M Phosphatpuffer nach SÖRENSEN, pH 8, ohne NaCl.

*Reversibilitätstest.* Für den Nachweis der Reversibilität des Entfaltungsprozesses wird eine Stammlösung des jeweiligen Proteins in NaCl-freiem Phosphatpuffer mit einer Konzentration von 2,0 g/l hergestellt. Einerseits dient diese Protein-Stammlösung, nach Verdünnung auf die Proteinkonzentration 0,1 g/l und Äquilibrierung bei 4 ° C, der Untersuchung der Probe im Ausgangsfaltungszustand („nativ“). Andererseits werden zu 5 ml dieser Protein-Stammlösung 3,2 g Guanidiniumchlorid bzw. 2,7 g Harnstoff gegeben und mit Puffer auf 10 ml aufgefüllt, so daß eine Lösung von 1,0 g/l Protein mit 3,3 M Guanidiniumchlorid bzw. 4,4 M Harnstoff als Denaturans-Stammlösung vorliegt. Bei diesen Denaturanskonzentrationen sind die untersuchten Proteine nachgewiesenermaßen vollständig entfaltet. Nach 10facher Verdünnung mit 3,3 M Guanidiniumchlorid- bzw. 4,4 M Harnstofflösung und 18stündiger Äquilibrierung bei 4 ° C (Denaturation) kann die vollständig denaturierte Probe fluoreszenzspektroskopisch vermessen werden. Aliquote der ebenfalls 18 Stunden äquilibrierten Denaturans-Stammlösung werden mit Puffer auf Proteinkonzentration 0,1 g/l verdünnt, so daß nur noch sehr geringe Denaturanskonzentrationen vorliegen und die Rückfaltung erfolgen kann. Nach 18stündiger Äquilibrierung bei 4 ° C (Renaturation) können die Fluoreszenzintensitäten der renaturierten Proteinlösungen gemessen werden. Die Reversibilität wird aus dem Verhältnis der Fluoreszenz-Signale von nativer und renaturierter Probe zu dem der denaturierten Probe abgeleitet.

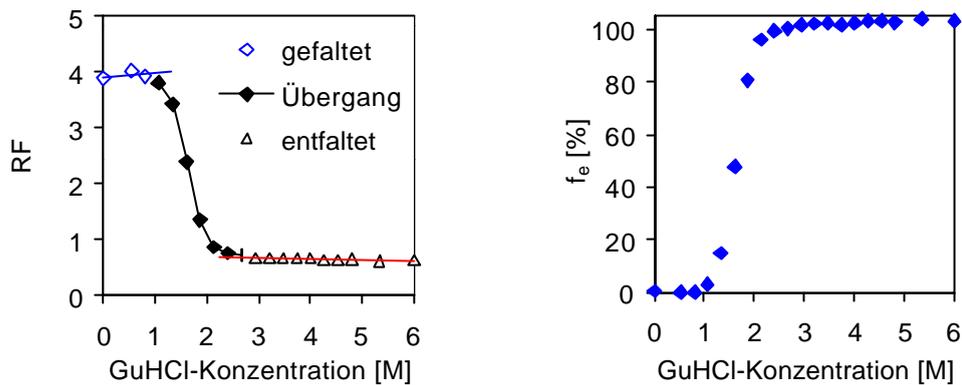
*Entfaltung.* Es werden Lösungen nativer und acylierter Leguminproben der Proteinkonzentration 1,1 g/l in NaCl-freiem Phosphatpuffer hergestellt und durch Filter der Porenweite 0,2 µm klar filtriert. Nach der Bestimmung des Proteingehaltes mit der Mikro-Biuret-Methode wird die Proteinkonzentration auf 1,0 g/l eingestellt. Für die Verfolgung des Denaturationsprozesses werden sogenannte Denaturations- oder Entfaltungskurven aufgenommen. Für jedes der zu untersuchenden Proteine werden Guanidiniumchlorid-Verdünnungsreihen hergestellt (Mehrfachbestimmung): Die durch Zugabe von 6,67 M Guanidiniumchloridlösung auf Denaturans-Endkonzentrationen von 0 bis 6 M eingestellten und auf eine Protein-Endkonzentration von jeweils 0,1 g/l verdünnten Lösungen werden 18-20 Stunden bei 4 ° C äquilibriert und anschließend fluoreszenzspektroskopisch gemessen.

Die Messung der Fluoreszenzemission erfolgt nach Anregung des Tryptophans mit einer Wellenlänge von 295 nm. Die Untersuchungen werden am Fluoreszenz-Spektrometer AB 2 (AMINCO-BOWMAN, Rochester) im Wellenlängenintervall 300–360 nm mit einer Geschwindigkeit von 0,2 nm/s und einer Bandbreite von 4 nm für die Anregung bzw. 2 nm für die Emission (HV 750 V) durchgeführt. Aus den aufgenommenen Guanidiniumchlorid-Verdünnungsreihen mit konstanter Proteinkonzentration werden zur Charakterisierung der Denaturansstabilität die Änderung der freien Energie  $\Delta G$  (linear extrapoliert auf  $c_{GuHCl} = 0$ ) und der molare Denaturanskonzentrationswert für das zu 50 % entfaltet vorliegende Protein,  $[GuHCl]_{1/2}$ , folgendermaßen ermittelt: Die maximale Differenz

der Fluoreszenzintensitäten von nativem und denaturiertem Protein wurde bei einer Wellenlänge von 320 nm gefunden und daher der Methode zugrunde gelegt. Aus der Veränderung des Fluoreszenzsignals bei 320 nm während der Entfaltung wird der Anteil entfaltetes Protein  $f_e$  am Gesamtprotein nach Gleichung 21 berechnet. Für  $RF_f$  bzw.  $RF_e$  wird jeweils der Ordinatenabschnitt der Regressionsgeraden aus den Fluoreszenzwerten der ge- bzw. entfaltenen Proben eingesetzt (s. auch **Abbildung 11**).

$$f_e = \frac{RF_f - RF_{obs}}{RF_f - RF_e}$$

Gleichung 21



**Abbildung 11:** Fluoreszenz (Exc. 295 nm, Em. 320 nm) bei GuHCl-induzierter Entfaltung von nativem Legumin (links) und Darstellung des prozentualen Anteils an entfaltetem Protein  $f_e$  im Verlauf dieser Denaturierung

Daraus lassen sich die Gleichgewichtskonstante  $K$  und die Änderung der freien Energie  $\Delta G$  für die Entfaltungsreaktion folgendermaßen ermitteln:

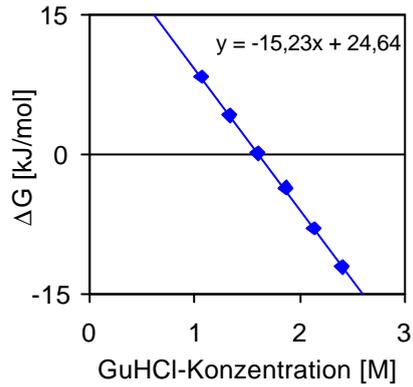
$$K = \frac{f_e}{1-f_e}$$

Gleichung 22

$$\Delta G = - RT \ln K$$

Gleichung 23

Die einfachste und daher auch weit verbreitete Methode für die Bestimmung der Konformationsstabilität in Abwesenheit von Denaturans,  $\Delta G_{\text{puffer}}$ , ist die Annahme einer linearen Beziehung zwischen  $\Delta G$  und der Denaturanskonzentration  $c_{\text{GuHCl}}$  (s. **Abbildung 12**, Gleichung 24) und dementsprechend die Extrapolation auf  $c_{\text{GuHCl}} = 0$  [127]. Die Größe  $m$  ist ein Maß für die Abhängigkeit der freien Energie der Denaturation von der Guanidiniumchloridkonzentration.



**Abbildung 12:** Freie Energie  $\Delta G$  bei der Entfaltung von nativem Legumin in Abhängigkeit von der GuHCl-Konzentration

$$\Delta G = \Delta G_{\text{Puffer}} - m c_{\text{GuHCl}}$$

Gleichung 24

Da im Gleichgewicht  $\Delta G = 0$  gilt, wird der Gleichgewichtswert für die Entfaltung (Wendepunkt der Entfaltungskurve),  $[\text{GuHCl}]_{1/2}$ , nach Gleichung 25 berechnet.

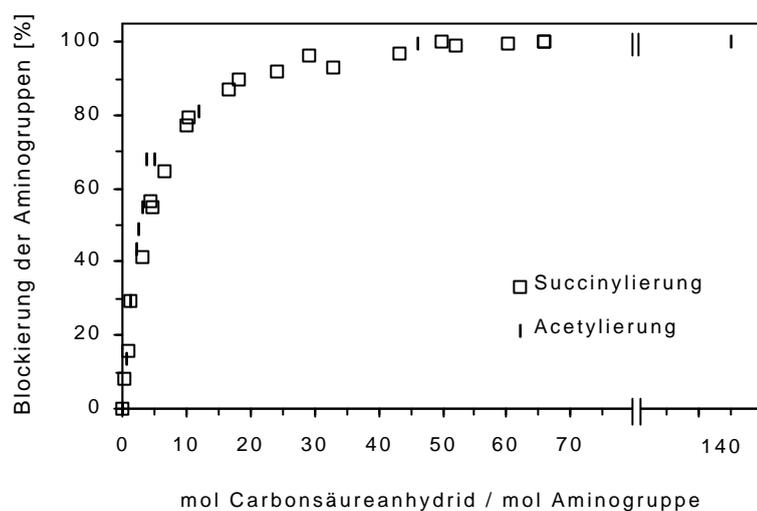
$$[\text{GuHCl}]_{1/2} = \frac{\Delta G_{\text{Puffer}}}{m}$$

Gleichung 25

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Acylierung funktioneller Gruppen des Legumins

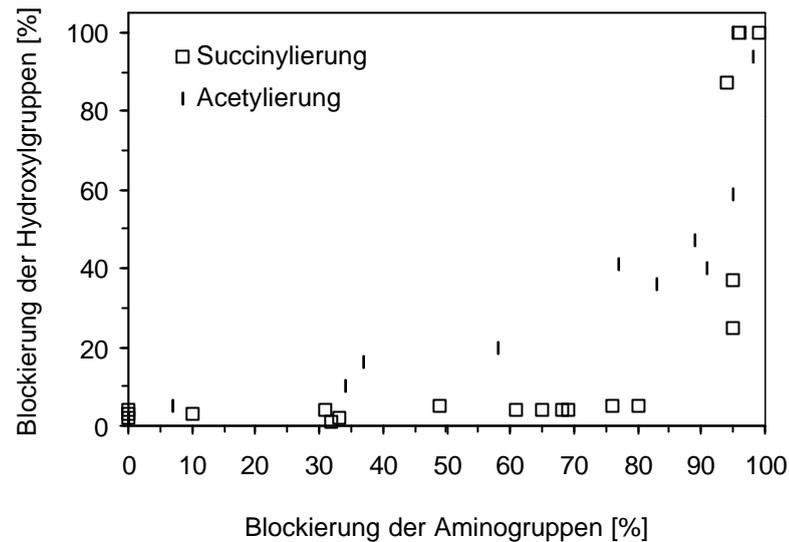
Um die gezielte Herstellung von Leguminproben unterschiedlicher Acylierungsgrade zu ermöglichen, wurde die Acylierung der Aminogruppen des Legumins in Abhängigkeit von der Menge des jeweiligen Acylierungsreagens untersucht. In **Abbildung 13** ist die Abhängigkeit der *N*-Blockierung vom molaren Verhältnis Carbonsäureanhydrid/Aminogruppe für die Reaktion mit Acet- und Bernsteinsäureanhydrid wiedergegeben.



**Abbildung 13:** Abhängigkeit der *N*-Acylierung vom molaren Überschuss an Carbonsäureanhydrid

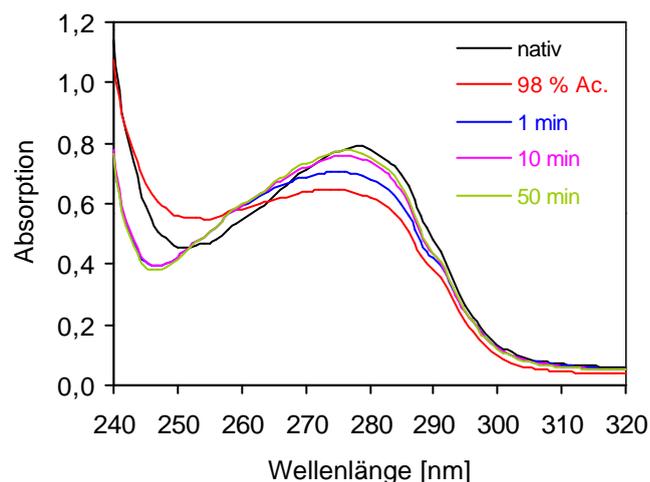
Acetylierung und Succinylierung zeigen einen ähnlichen Verlauf. 98 % der Aminogruppen werden bei einem etwa 45fachen molaren Überschuss des Reagens, 70 % der Aminogruppen bei einem fünffachen Überschuss acyliert.

Wird das Ausmaß der *O*-Acylierung als Funktion des Blockierungsgrades der Aminogruppen aufgetragen, ergibt sich die in **Abbildung 14** gezeigte Abhängigkeit. Die *O*-Succinylierung setzt erst ein, nachdem 93-95 % der Aminogruppen acyliert wurden. Hingegen ist eine geringe *O*-Acetylierung bereits bei einer Blockierung von 30 bis 40 % der Aminogruppen nachweisbar. Bei einer Acetylierung von 80 % der Aminogruppen liegen jedoch nur 30 bis 40 % der Hydroxylgruppen des Proteins (aus Tyrosin-, Serin- und Threoninresten) acetyliert vor. Im Extremfall lassen sich sämtliche Hydroxylgruppen acetylieren bzw. succinylieren.



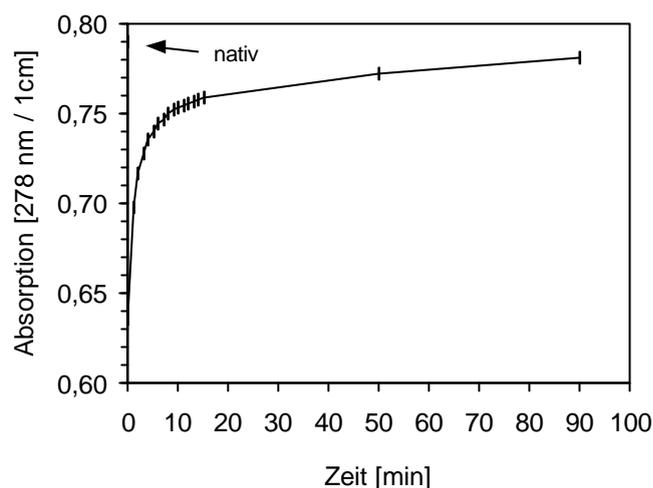
**Abbildung 14:** Zusammenhang zwischen dem Grad der O-Acylierung und dem Grad der N-Acylierung

Aus den Untersuchungen zur Deblockierung können Aussagen über den Anteil und die Bedeutung der Acylierung der phenolischen Tyrosin-Hydroxylgruppen des Legumins abgeleitet werden. Die Bestimmung von *O*-Acetyl-Tyrosingruppen erfolgte nach Spaltung mit Hydroxylamin unter milden Bedingungen bei pH 8 und Absorptionsmessung bei 278 nm. Die Veränderung des UV-Spektrums einer hochacetylierten Leguminprobe und die Änderung der Absorption bei 278 nm im Verlauf der Hydroxylaminolyse sind in **Abbildung 15** und **Abbildung 16** wiedergegeben.



**Abbildung 15:** Deacetylierung von Hydroxylgruppen einer hochacetylierten Leguminprobe: UV-Spektren nach unterschiedlich langer Inkubation mit Hydroxylamin-Hydrochlorid

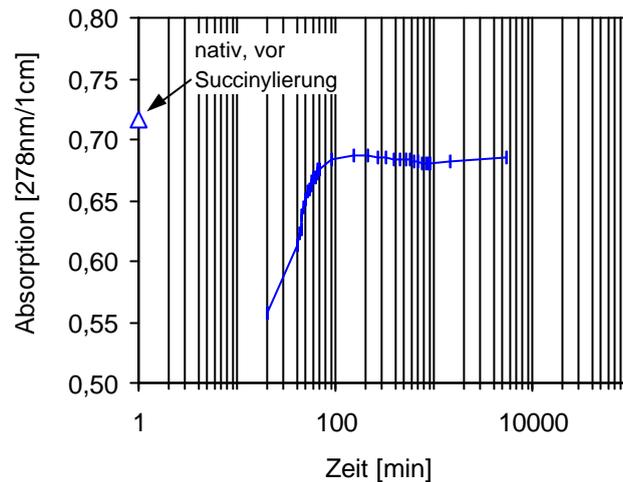
Entsprechend der Abspaltung der *O*-Acetylreste des Tyrosins nähert sich das Spektrum mit fortschreitender Hydroxylaminolyse dem des nativen Proteins an.



**Abbildung 16:** Deacetylierung von Hydroxylgruppen einer hochacetylierten Leguminprobe: Zeitabhängige Zunahme der UV-Absorption bei der Deblockierung mit Hydroxylamin-Hydrochlorid

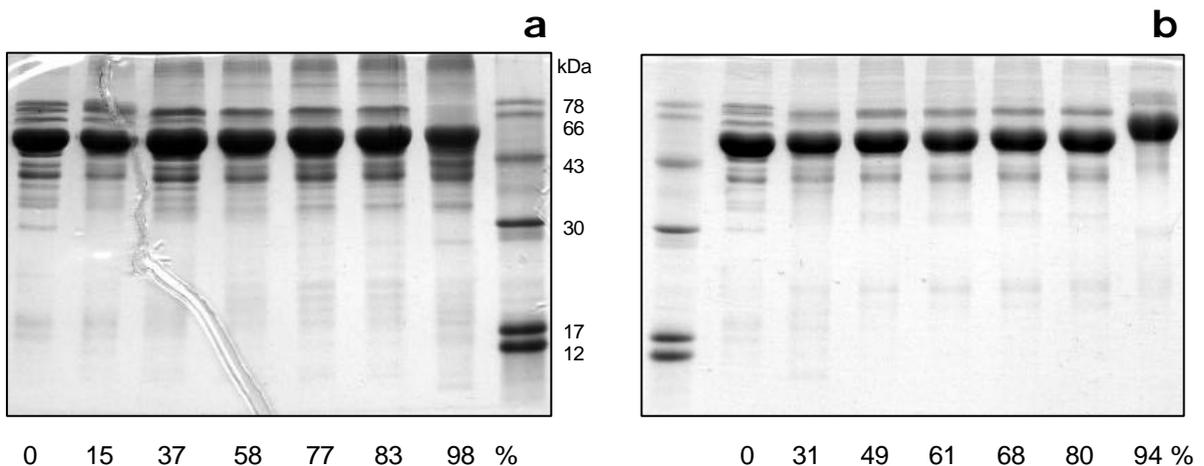
Aus der Absorptionsdifferenz bei 278 nm ergibt sich ein Wert von 35 *O*-acetylierten Tyrosinresten pro Mol Legumin. Bei einem aus der Aminosäureanalytik ermittelten Gehalt von 64 Tyrosinresten [50] entspricht dies einer 54 %igen Blockierung des Tyrosins. Bei Berücksichtigung des Tyrosinanteils von 22,4 % an der Gesamtmenge der Hydroxylgruppen enthaltenden Aminosäuren (Tyr, Ser, Thr) ergibt sich ein Anteil von 12 % der gesamten *O*-Acylierung im erschöpfend acetylierten Legumin, der auf die Blockierung von Tyrosinresten entfällt. Bei einem *N*-Blockierungsgrad von 80 % wurden 10 % (7 Reste) Tyrosin-Acetylierung ermittelt. Die Tyrosinreste einer 58 % *N*-acetylierten Leguminprobe wurden dagegen nicht modifiziert.

In **Abbildung 17** ist der Verlauf der spontanen Desuccinylierung (intramolekulare Hydrolyse entsprechend **Abbildung 3-3**) von *O*-Succinyl-Tyrosinresten in einer erschöpfend succinylierten Leguminprobe durch Verfolgung der Absorptionsänderung bei 278 nm wiedergegeben. Die Erniedrigung des Absorptionswertes bei 278 nm nach erfolgter Succinylierung weist auf eine Blockierung von 36 Tyrosinresten entsprechend 56 % aller Tyrosinreste des Legumins hin. Nach 6tägiger Inkubation im Standardphosphatpuffer wurden 34 Tyrosinreste (94 %) desuccinyliert.



**Abbildung 17:** Spontane Desuccinylierung des O-Succinylytyrosins in 99 % modifiziertem Legumin

**Abbildung 18** zeigt die SDS-PAGE von nativem Legumin und seinen acylierten Derivaten unter nichtreduzierenden Bedingungen.



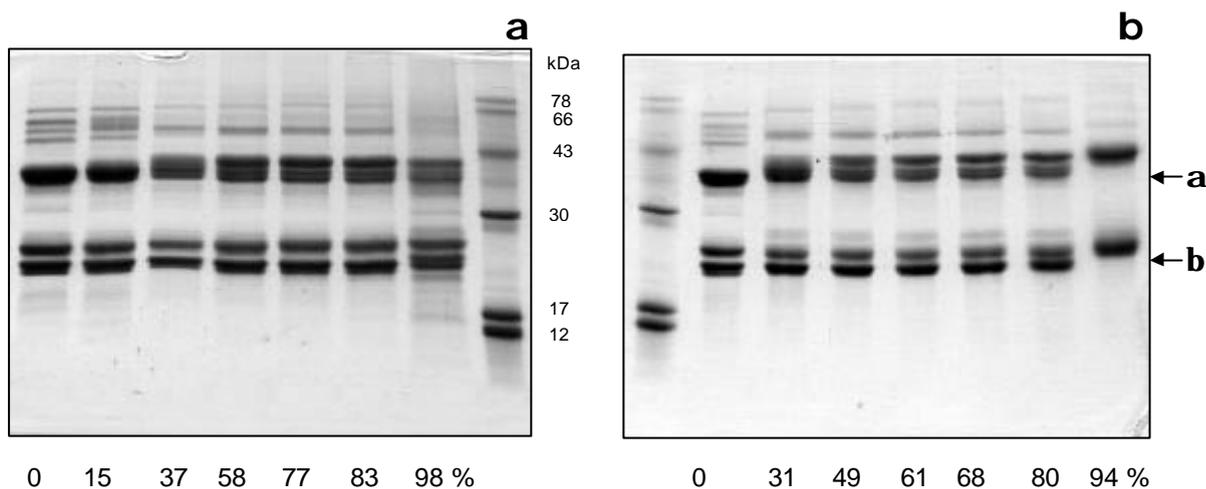
**Abbildung 18:** SDS-PAGE von acetylierten **(a)** und succinylierten **(b)** Leguminproben [% N-Acylierung] unter nichtreduzierenden Bedingungen  
Eichproteine: Cytochrom, Myoglobin, Carboanhydrase, Ovalbumin, Albumin, Ovotransferrin

Bei der 56 kDa-Hauptbande handelt es sich um die Legumin-Untereinheiten. Die unmittelbar darüber befindliche Bande resultiert aus dem Vorhandensein von Vicilin (3-5 %, s. Pkt. 3.1.1), und die beiden darüber gelegenen Banden entsprechen den schweren Legumin-Untereinheiten [53].

Im Falle der Acetylierung kommt es zur raschen Modifizierung der schweren Untereinheiten (bereits bei 15 % N-Acetylierung) und Vicilin (ab 37 % sichtbar) und der Anteil der Aggregate nimmt schrittweise zu.

Die succinylierten Proben sind charakterisiert durch den allmählichen, schrittweisen Massenzuwachs der 56 kDa-Untereinheiten des Legumins, der insbesondere bei 94 % Succinylierung beträchtlich ist. Die schweren Legumin-Untereinheiten und Vicilin unterliegen bereits bei 31 % *N*-Succinylierung der Modifizierung.

**Abbildung 19** zeigt die SDS-PAGE von nativem Legumin und seinen acylierten Derivaten nach Reduktion mit DTE.



**Abbildung 19:** SDS-PAGE von acetylierten (a) und succinylierten (b) Leguminproben nach Reduktion mit DTE [% *N*-Acylierung]

Eichproteine: Cytochrom, Myoglobin, Carboanhydrase, Ovalbumin, Albumin, Ovotransferrin

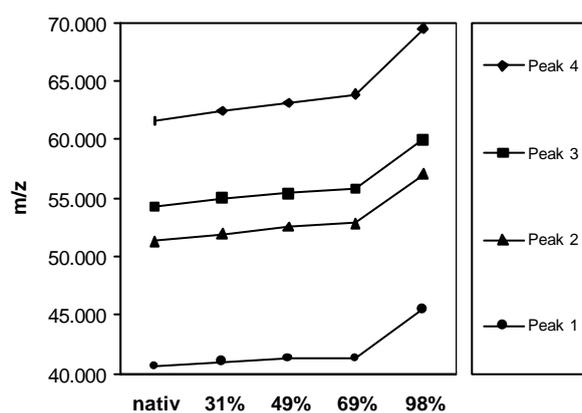
Die Elektrophorese des nativen Leguminpräparates unter reduzierenden Bedingungen weist vier scharfe Banden mit Molekularmassen von 63 und 45 kDa, resultierend aus dem Vorhandensein von 3-5 % Vicilin (s. Pkt. 3.1.1), und Molekularmassen von 55 und 49 kDa (schwere  $\alpha$ -Ketten des Legumins) auf. Es folgen die  $\alpha$ -Ketten mit 36 bzw. 34 kDa und die  $\beta$ -Ketten mit jeweils 24, 23 und 22 kDa.

Durch die Acetylierung nimmt die Molekularmasse der  $\alpha$ -Ketten zu. Veränderungen in Form einer dritten, etwa 4 kDa schwereren Bande im Molekularmassenbereich der  $\alpha$ -Ketten treten ab 37 % *N*-Acetylierung auf. Die Molekularmassenzunahme zwischen den  $\alpha$ -Ketten des nativen Proteins und denen des hochacetylierten Derivates beträgt etwa 400 Da. Die  $\beta$ -Ketten bleiben bis 83 % *N*-Acetylierung nahezu unverändert und weisen bei 98 % *N*-acetylierten Aminogruppen ein diffuses Bandenmuster auf. Die für die Hauptbanden ermittelten Massen sind etwa 1-1,5 kDa schwerer als die  $\beta$ -Ketten des nativen Legumins.

Die SDS-PAGE von 31 % succinyliertem Legumin zeigt neben der Modifizierung der schweren Untereinheiten vor allem den Massenzuwachs der  $\alpha$ -Ketten von 36 bzw. 34 kDa auf 37 bzw. 35 kDa. Bei 49 % Succinylierung betragen die Molekularmassen der  $\alpha$ -Ketten

41 bzw. 37 kDa und eine dritte Bande entsprechend 36 kDa zeichnet sich ab. Zwischen 49 % und 80 % bewirkt die Succinylierung der Aminogruppen keine weiteren, mit dieser Methode sichtbaren Veränderungen an den  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Ketten. Die 94 % *N*-succinylierte Probe läßt im SDS-Gel nur noch jeweils eine Bande in Bereich der  $\alpha$ -Ketten (41 kDa) und der  $\beta$ -Ketten (24 kDa) erkennen.

Natives Ackerbohnen-Legumin sowie verschiedene Stufen succinylierter Präparate wurden mit Matrix-unterstützter Laser-Desorptions-Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) untersucht. Die Spektren des Legumins und seiner succinylierten Derivate (ohne Abbildung) konnten gut ausgewertet werden, obwohl es bei großen Molekülen (> 20 kDa) häufig Probleme mit der Auflösung (breite Peaks) gibt. Lediglich das Spektrum der hochsuccinylierten Probe weist relativ breite Peaks auf. Nach erfolgter MALDI-TOF MS wurden die Veränderungen der Massenzahlen  $m/z$  von vier Hauptpeaks verglichen (**Abbildung 20**).



**Abbildung 20:** Vergleich der Massenzahlen  $m/z$  der Hauptpeaks von Legumin und succinylierten Derivaten nach MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die Molmassen der einzelnen Komponenten nehmen mit zunehmender Modifizierung zu. Sprunghaft erfolgt diese Zunahme beim Übergang von 69 % succinyliertem Protein zu 98 % *N*-Succinylierung.

Die Massenzahl von Peak 2 legt die Vermutung nahe, daß es sich bei der entsprechenden Komponente um eine Legumin-Untereinheit (Monomer) vom Typ B handelt; die Molmasse der Peak 3 zugrundeliegenden Komponente entspricht der der Legumin-Untereinheit vom Typ A.

In **Tabelle 2** werden die anhand ihrer Sequenz ([128], [56]) berechneten Molmassen der Untereinheiten von nativem Legumin mit den Daten der MALDI-TOF MS verglichen.

**Tabelle 2:** Vergleich von, aus der Sequenz [128, 56] berechneten und mit MALDI-TOF MS ermittelten, Molmassen der Untereinheiten von nativem Legumin

	A-Typ-Untereinheit	B-Typ-Untereinheit
Berechnung aus Sequenz	54 798 g/mol	52 008 g/mol
MALDI-TOF MS	54 223 ± 32 g/mol	51 364 ± 56 g/mol

Die Ergebnisse der MALDI-TOF MS stimmen mit den anhand der Sequenzen berechneten Molmassen gut überein. Die massenspektrometrisch bestimmten Werte sind etwas geringer, die Abweichung beträgt 1,0 bzw. 1,2 %.

Der Peak 1 des MALDI-TOF-Massenspektrums dürfte der leichten Untereinheit und Peak 4 der schweren Untereinheit vom B-Typ entsprechen. Die Untereinheiten vom A- und B-Typ liegen im Leguminmolekül zu gleichen Anteilen vor [54]. Für die schwere B-Typ-Untereinheit wurde mittels SDS-PAGE ein Anteil von 7 % am Gesamtprotein ermittelt, wohingegen die leichte Untereinheit in so geringen Mengen vorliegt, daß sie bei der Berechnung der mittleren Molekularmasse der Untereinheiten vernachlässigt werden kann.

In **Tabelle 3** sind die mittels MALDI-TOF MS bestimmten Molmassen der verschiedenen Legumin-Untereinheiten (entsprechend Peak 1-4) von unterschiedlich stark succinylierten Präparaten zusammengestellt. Neben diesen vier Peaks weisen alle MALDI-TOF-Spektren weitere Peaks geringerer Massenzahl auf, die nicht eindeutig zugeordnet werden können und nicht näher betrachtet werden. Dabei könnte es sich um  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten handeln.

**Tabelle 3:** Molmassen [g/mol] von nativen und unterschiedlich stark succinylierten Legumin-Untereinheiten ermittelt mit MALDI-TOF MS (Fehler < 0,3 %)

N-Succinylierung	Leichte Untereinheit	B-Typ-Untereinheit	A-Typ-Untereinheit	Schwere B-Typ-Untereinheit
nativ	40 758	51 364	54 223	61 568
31%	41 008	51 949	55 001	62 425
49%	41 234	52 509	55 429	63 075
69%	41 299	52 788	55 809	63 825
98%	45 500	57 000	60 000	69 500

**Tabelle 4** gibt den Molmassenzuwachs der Legumin-Untereinheiten aufgrund der schrittweisen Succinylierung von Amino- und Hydroxylgruppen wieder.

**Tabelle 4:** Molmassenzuwachs [g/mol] der Legumin-Untereinheiten bei zunehmender Succinylierung entsprechend MALDI-TOF Massenspektrometrie

Succinylierung	Berechneter* Molmassenzuwachs pro Untereinheit	Leichte Untereinheit	B-Typ-Untereinheit	A-Typ-Untereinheit	Schwere B-Typ-Untereinheit
31%	<b>751</b>	250	585	778	857
49%	<b>1 124</b>	476	1 145	1 206	1 507
69%	<b>1 439</b>	541	1 424	1 586	2 257
98%	<b>6 532</b>	4 742	5 636	5 777	7 932

\* aus den experimentell ermittelten Blockierungsgraden der  $\text{NH}_2$ -, OH-Gruppen sowie der AS-Analyse [50]

Für den Vergleich zwischen berechneten Untereinheiten-Massenzuwachswerten und den aus den MALDI-TOF Massenspektren ermittelten Werten muß die Berechnung der mittleren Molekularmasse der Untereinheiten unter Berücksichtigung der verkürzten bzw. verlängerten lysinreichen C-Termini der  $\alpha$ -Ketten erfolgen. Die resultierenden Werte (694 für 31 %, 1199 für 49 %, 1558 für 69 % und 5862 für 98 % Succinylierung) befinden sich in sehr guter Übereinstimmung mit den in **Tabelle 4** beschriebenen Werten. Dementsprechend wurde für die mittlere Molmasse der hochsuccinylierten Untereinheit ein Wert von 59 000 g/mol ermittelt.

## 4.2 Untersuchungen zur Struktur acylierter Leguminproben

### 4.2.1 Veränderung der Hydrophobizität infolge Acylierung

Die *N*/*O*-Acylierung durch hydrophobe Acetylgruppen oder hydrophile Succinylgruppen sollte zu einer Veränderung der Hydrophobizität des Legumins führen. Für die Untersuchung der „effektiven“ Hydrophobizität („Oberflächenhydrophobizität“) wurden die Fluoreszenzsondentechnik nach NAKAI und Mitarbeitern [129, 130], die RP-HPLC und die Verteilung in einem Polymer-Zweiphasensystem eingesetzt.

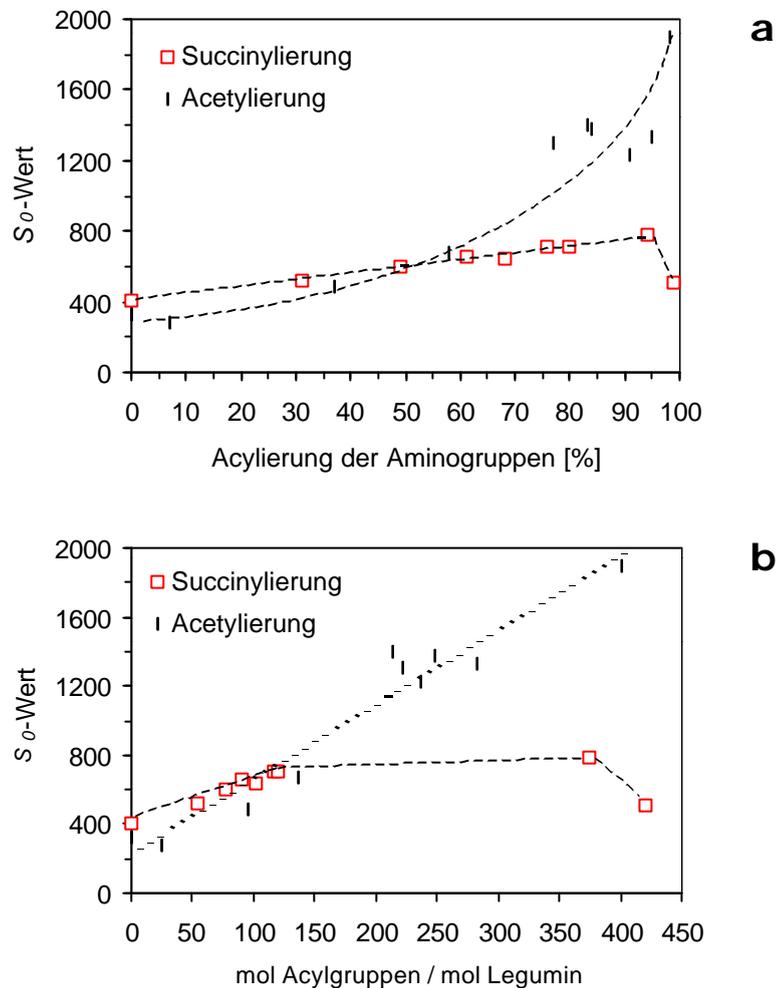
#### 4.2.1.1 Oberflächenhydrophobizität acylierter Leguminproben

##### *Bestimmung des $S_0$ -Wertes*

Als Fluoreszenzsonde wurde 8-Anilino-1-naphtalinsulfonsäure (ANS) eingesetzt. In **Abbildung 21** ist die Abhängigkeit des  $S_0$ -Wertes (ANS-Hydrophobizität) vom Ausmaß der Acylierung für acetylierte und succinylierte Leguminproben unter Berücksichtigung von *N*- und *O*-Blockierung dargestellt.

Wird der  $S_0$ -Wert gegen den Grad der Aminogruppen-Blockierung aufgetragen, so ergibt sich der in **Abbildung 21a** dargestellte Verlauf mit einer geringen Zunahme des  $S_0$ -Wertes bis etwa 60 % *N*-Acetylierung und einem starken Anstieg des  $S_0$ -Wertes bei höheren Acetylierungsgraden. Dieser Verlauf erklärt sich durch den zusätzlichen Beitrag der *O*-Acetylierung, der bei Acetylierungsgraden ab 60 % relevant wird (s. **Abbildung 14**). Im Falle der Succinylierung wird ein geringer, aber kontinuierlicher Anstieg des  $S_0$ -Wertes mit dem Grad der *N*-Acylierung festgestellt (**Abbildung 21a**). Bei einem Succinylierungsgrad von >95 % deutet sich eine Abnahme der Hydrophobizität an. Wird der  $S_0$ -Wert gegen die Gesamtzahl der pro Mol Legumin eingeführten, an die Amino- und Hydroxylgruppen gebundenen Acylreste aufgetragen, resultiert **Abbildung 21b**. Darin ist ein kontinuierlicher Anstieg der Hydrophobizität der acetylierten Proben mit wachsender Zahl eingeführter Acetylgruppen zu erkennen. Der  $S_0$ -Wert nimmt durch das Einfügen von

Succinylgruppen zunächst leicht zu; die Hydrophobizität sinkt jedoch nach Einfügen von etwa 370 Mol Succinylgruppen pro Mol Legumin und ist somit um ein Vielfaches geringer als die Hydrophobizität von acetyliertem Legumin bei vergleichbarer Anzahl eingeführter Acetylgruppen.



**Abbildung 21:** ANS-Hydrophobizität ( $S_0$ -Werte) von acetyliertem und succinyliertem Legumin  
**a:**  $S_0$ -Wert in Abhängigkeit vom Grad der N-Acylierung  
**b:**  $S_0$ -Wert in Abhängigkeit von der Gesamtheit eingeführter N- und O-Acylgruppen

#### Untersuchungen zur Bestimmung von Bindungskonstanten

Zur Bestimmung der Zahl der ANS-Bindungsstellen und der Bindungskonstanten für je zwei acetylierte (37 %, 98 %) und succinylierte (32 %, 95 %) Proben wurde der COGAN-Plot [111] benutzt. Die nach COGAN berechnete Zahl an hydrophoben Bindungsstellen ist bei allen Proben stark von der Proteinkonzentration abhängig. In **Tabelle 5** sind die Bin-

dungsstellen  $n$  und die berechneten Werte für die Dissoziationskonstante  $K_d$  des Protein-ANS-Komplexes für eine Proteinkonzentration wiedergegeben.

**Tabelle 5:** Zahl der Bindungsstellen und berechnete Dissoziationskonstanten des Protein-ANS-Komplexes nach COGAN-Plot [111] (Proteinkonzentration 1 g/l)

	Anzahl Bindungsstellen pro Molekül* $n$	Dissoziationskonstante $K_d \cdot 10^6$
natives Legumin	26,2	3,6
37 % Acetylierung	20,6	25,0
98 % Acetylierung	48,0	14,7
32 % Succinylierung	30,6	17,1
95 % Succinylierung	74,9	14,3

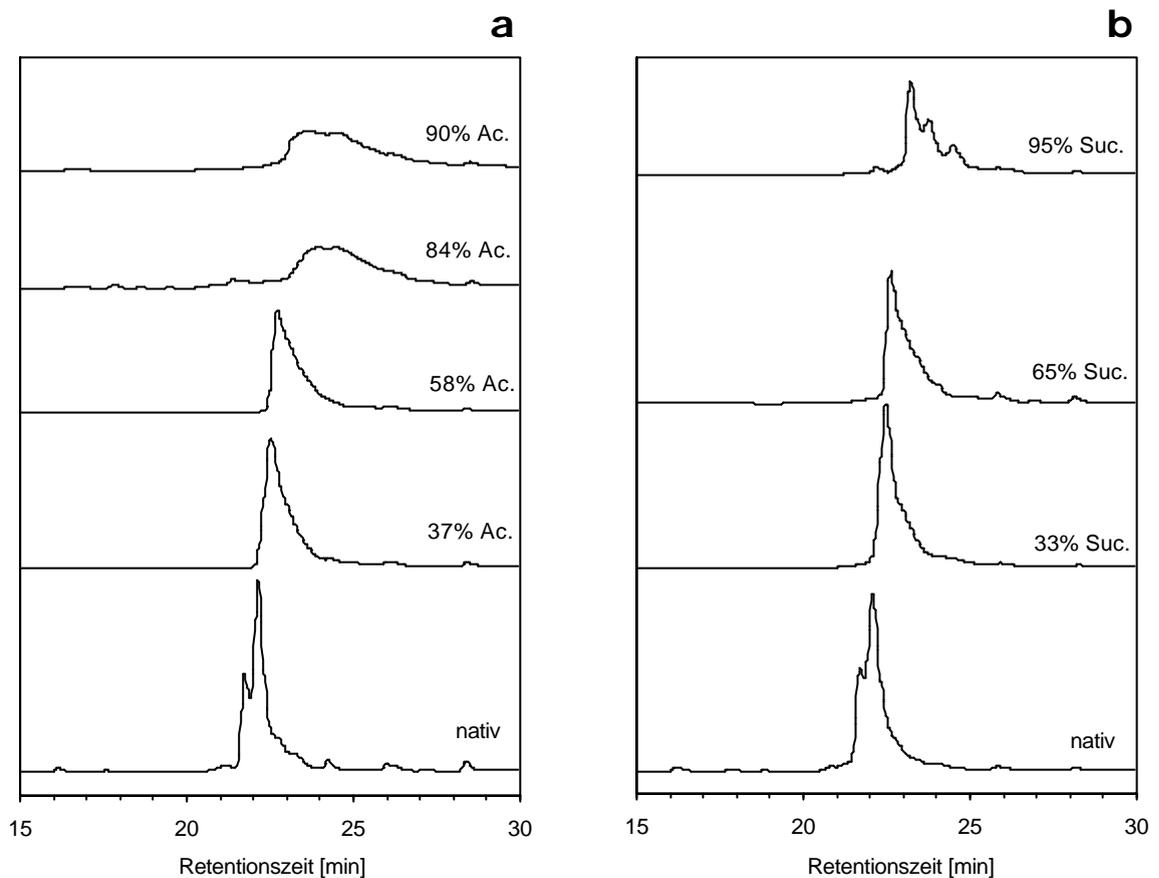
\* Die Berechnung der Bindungsstellen  $n$  pro Molekül erfolgte unter Berücksichtigung des Molmassenzuwachses durch die eingeführten Acylgruppen

Danach nimmt die Zahl der Bindungsstellen bei höheren Modifizierungsgraden erwartungsgemäß größere Werte an. Für die succinylierten Proben wurde eine größere Anzahl von Bindungsstellen als für die in ähnlichem Maße acetylierten Leguminderivate ermittelt. Diese Tendenz wurde auch bei anderen Proteinkonzentrationen festgestellt. Aus den höheren Werten für die Dissoziationskonstanten sowohl nach Acetylierung als auch nach Succinylierung folgt die allgemein deutlich schwächere Bindung des Liganden an die modifizierten Proteine als an das native Legumin.

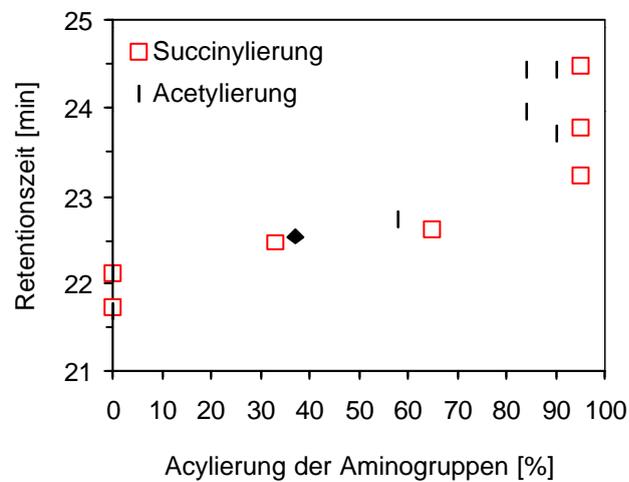
#### 4.2.1.2 Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie acylierter Legumine

Die Ergebnisse der Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (RP-HPLC) sind in **Abbildung 22** und **Abbildung 23** dargestellt. Aufgrund der stark sauren Bedingungen liegen die Proben in den untersuchten Lösungen in denaturierter Form vor. Nach den Ergebnissen dieser Methode verschieben sich die Peakpositionen der acetylierten Legumine (**Abbildung 22a**) nach längeren Retentionszeiten entsprechend einer mit zunehmendem Acetylierungsgrad (bis 80-85 %) steigenden Hydrophobizität. Bei Acetylierungsgraden über 80 % tritt Peakverbreiterung durch mehrere schlecht voneinander getrennte Fraktionen auf. Eine kontinuierliche Verschiebung der Peaks nach längeren Retentionszeiten mit steigendem Grad der Modifizierung wird auch bei den succinylierten Proben (**Abbildung 22b**) beobachtet. Im Gegensatz zur Acetylierung erfolgt hierbei jedoch eine Trennung der hochmodifizierten Proben in diskrete Fraktionen unterschiedlicher Hydrophobizität. **Abbildung 23** zeigt die Abhängigkeit der Retentionszeit der Hauptfraktionen vom  $N$ -Blockierungsgrad. Die bei einer  $N$ -Acetylierung von >84 % und einer  $N$ -

Succinylierung von > 90 % zu beobachtende Aufspaltung in mehrere Fraktionen mit größeren Retentionszeiten kann auf den Beitrag der *O*-Acylierung zurückgeführt werden.



**Abbildung 22:** RP-HPLC unterschiedlich hoch acetylierter (a) und succinylierter (b) Leguminproben an einer Nucleosil C4 MPN-Säule



**Abbildung 23:** Verschiebung der Retentionszeit durch Acetylierung und Succinylierung von Legumin bei der RP-HPLC (Nucleosil C4 MPN-Säule)

#### 4.2.1.3 Verteilung von Leguminproben in einem Polymer-Zweiphasensystem

Für das Zweiphasensystem wurden Ficoll- und Dextranlösungen verwendet. Die hydrophobere Oberphase enthält angereichert Ficoll, die hydrophilere Unterphase angereichert Dextran. Veränderungen der Verteilungskoeffizienten in diesem System in Richtung kleinerer Werte weisen dementsprechend auf eine abnehmende Hydrophobizität hin. Die für einige unterschiedlich hoch succinylierte Proteine erhaltenen Werte sind in **Tabelle 6** zusammengestellt. Darüber hinaus sind die aus den Verteilungskoeffizienten nach Gleichung 26 errechneten Werte für die freie Energie des Übergangs ( $\Delta G^0_{transfer}$ ) der Proteine von einer Phase in die andere (von Dextran nach Ficoll) angegeben.

$$\Delta G^0_{transfer} = - R T \ln K \quad \text{Gleichung 26}$$

**Tabelle 6:** Verteilungskoeffizienten ( $K$ ) und freie Energie des Phasenübergangs  $\Delta G^0_{transfer}$  von nativem und succinyliertem Legumin im Zweiphasensystem: Ficoll 400 (13,9 %) / Dextran T 70 (10,9 %) / CPS; 296 K

	$K$	$\ln K$	$\Delta \ln K$	$\Delta G^0_{transfer}$ [kJ/mol]
natives Legumin	$10,10 \pm 0,27$	$2,31 \pm 0,03$	0	$- 5,76 \pm 0,07$
32 % succinyliertes Legumin	$10,65 \pm 0,10$	$2,37 \pm 0,01$	0,054	$- 5,89 \pm 0,02$
33 % succinyliertes Legumin	$10,04 \pm 0,18$	$2,31 \pm 0,02$	-0,006	$- 5,74 \pm 0,05$
65 % succinyliertes Legumin	$7,23 \pm 0,23$	$1,98 \pm 0,03$	-0,334	$- 4,93 \pm 0,07$
95 % succinyliertes Legumin	$4,04 \pm 0,08$	$1,40 \pm 0,02$	-0,915	$- 3,48 \pm 0,05$

Die  $K$ -Werte weisen auf ein praktisch unverändertes Verteilungsverhalten der Leguminproben nach schwacher Modifizierung (32-33 %) hin. Die bei höheren Substitutionsgraden (65 % und 95 %) abnehmenden Werte der Verteilungskoeffizienten sind Ausdruck sinkender Hydrophobizität.

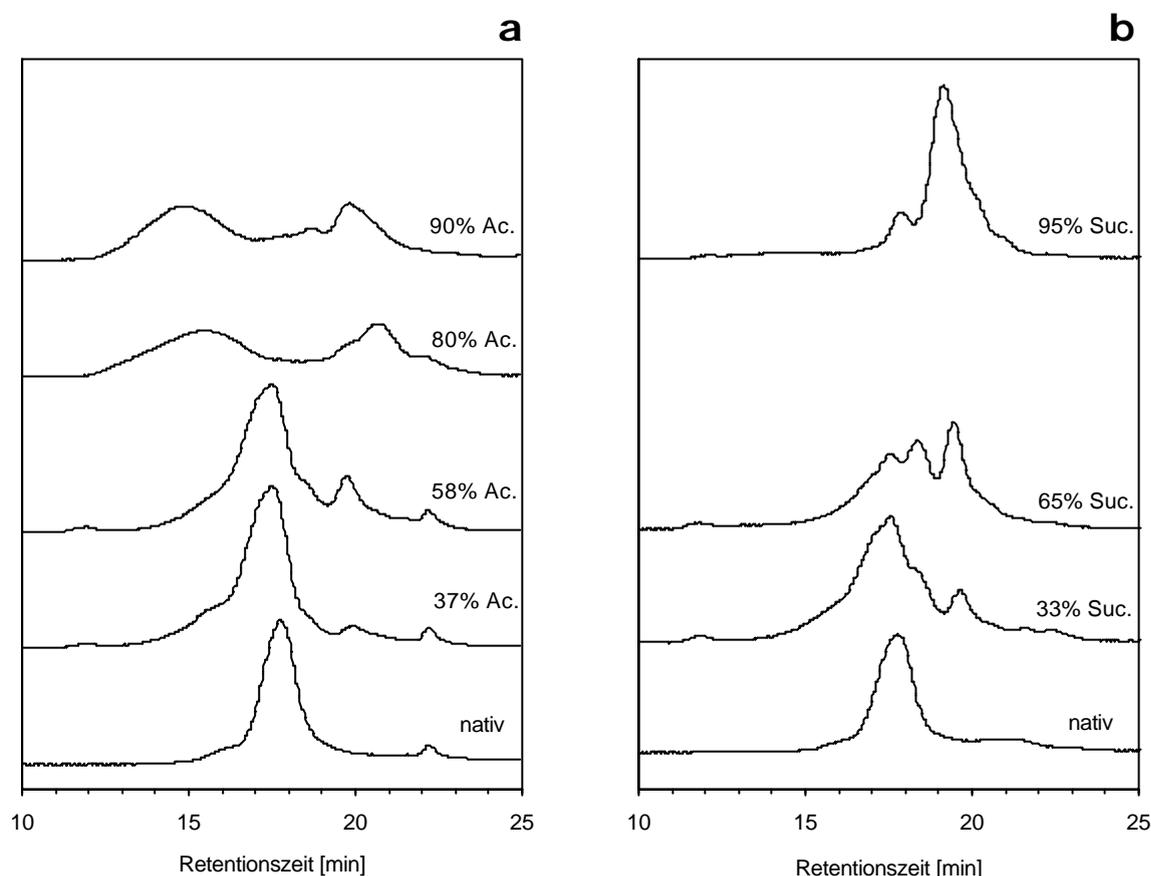
Versuche, acetylierte Leguminproben im vorliegenden System zu verteilen, scheiterten an der thermodynamischen Unverträglichkeit der Proteine mit den Polymerkomponenten des Zweiphasensystems, was zur Ausfällung der Proteine führte.

#### 4.2.2 Dissoziation und Assoziation acylierter Leguminproben

Die Untersuchungen zur Dissoziation und Assoziation acylierter Leguminproben erfolgten mittels Größenausschluß-Chromatographie (SE-HPLC), nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese im Gelgradienten (BN-PAGE) und analytischer Ultrazentrifugation.

#### 4.2.2.1 Größenausschluß-Chromatographie acylierter Leguminproben

In **Abbildung 24** sind die Elutionsdiagramme der SE-HPLC-Trennung für acetylierte **(a)** und succinylierte **(b)** Leguminproben wiedergegeben.



**Abbildung 24:** SE-HPLC-Chromatogramme für acetylierte **(a)** und succinylierte **(b)** Leguminproben an einer Bio Sep 4000-Säule

Für das unmodifizierte Legumin wurde nach Molekularmassenkalibrierung eine relative Molekularmasse von  $M_r = 350$  kDa, in guter Übereinstimmung mit dem Literaturwert [49], bestimmt. Schrittweise Acetylierung der Aminogruppen auf 30-60 % führt zu einer scheinbaren Vergrößerung der Molekularmasse der Hauptfraktion auf 380 kDa und zum Auftreten einer Minorkomponente (Dissoziationsprodukt) mit  $M_r = 100$  kDa. Bei *N*-Acetylierungsgraden über 80 % ist der Leguminpeak nicht mehr nachweisbar. Statt dessen treten höhermolekulare Assoziationsprodukte neben niedermolekularen Dissoziationsprodukten auf (**Abbildung 24a**). Erstere könnten mit relativen Molekularmassen von 900 bis 1300 kDa Tri- bis Tetrameren des Legumins entsprechen. Ihre Bildung läuft mit der bei hohen Modifizierungsgraden eintretenden zusätzlichen Acetylierung der Hydroxylgruppen parallel (s. **Abbildung 14**) und dürfte die Folge der stärkeren Hydrophobierung des Legumins sein (s. **Abbildung 21**). Die Zunahme der Dissoziationsprodukte

(scheinbare Molekularmasse  $M_r = 50\text{-}100$  kDa) bei hohen Modifizierungsgraden ( $> 80\%$ ) läuft stets parallel mit dem Auftreten der hochmolekularen Assoziante, so daß deren Bildung nach dem Schema

acetyliertes Legumin  $\rightarrow$  dissoziierte Untereinheiten  $\rightarrow$  Assoziat

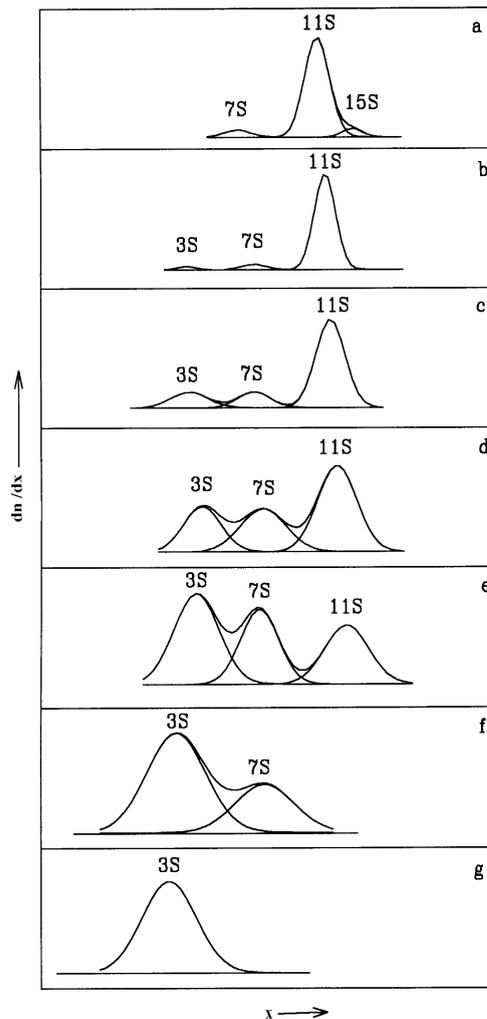
nicht eindeutig belegt werden kann. Ebenso können Dissoziation und Assoziation als parallel laufende Prozesse angenommen werden.

Im Falle der succinylierten Proben erfolgt eine schrittweise Dissoziation des Legumins mit zunehmendem Modifizierungsgrad ohne zusätzliche Assoziation (**Abbildung 24b**). Auch hierbei kommt es zu einer scheinbaren Vergrößerung der Molekularmasse des Legumins auf 380 kDa bei niedrigen und mittleren Modifizierungsgraden. Die für die Dissoziationsprodukte bestimmten  $M_r$ -Werte liegen zwischen 115 und 170 kDa. Sie spiegeln die Veränderung der Stokesschen Radien der stark expandierten dissoziierten Untereinheiten und nicht die wahren  $M_r$ -Werte wider. Ähnlich sind die erhöhten Werte für den Leguminpeak bei mäßig succinylierten und acetylierten Proben zu bewerten.

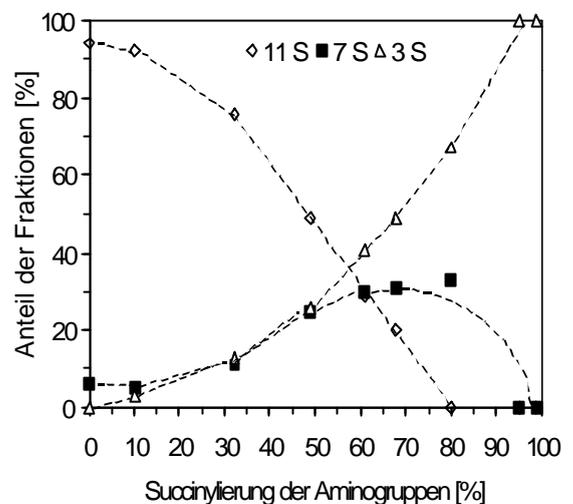
#### 4.2.2.2 Analytische Ultrazentrifugation acylierter Leguminproben

Das native Protein enthält neben der 11 S-Hauptfraktion ( $s_{20,S}^0 = 12,0 \pm 0,35$ ) geringe Anteile einer höhermolekularen 17 S-Komponente ( $s_{20,S}^0 = 17,8 \pm 0,5$  S) und einer 7 S-Komponente. Letztere besteht aus Vicilin und macht in den verwendeten Leguminpräparaten 2-5 % aus [132]. Die 17 S-Minorkomponente repräsentiert geringe Anteile aggregierten Legumins.

In **Abbildung 25** sind die Sedimentationsgeschwindigkeitsdiagramme für natives Legumin und die abgestuft succinylierten Leguminproben schematisch dargestellt. Bereits nach geringer Succinylierung der Aminogruppen ist eine dissoziierte Untereinheit als 3 S-Komponente nachzuweisen, deren Anteil sich mit zunehmender Modifizierung vergrößert und bei extrem hoher Succinylierung ( $> 90\%$ ) 100 % beträgt (s. **Abbildung 40**). Nach ca. 30 % Succinylierung nimmt auch der Anteil der 7S-Komponente zu, die bei 60-80 % Modifizierung ihren Maximalwert erreicht. Sie entspricht dem trimeren Halb molekül des hexameren 11 S-Proteins [131]. Der Anteil des hexameren 11 S-Proteins nimmt mit steigender Succinylierung ab und ist ab einem N-Blockierungsgrad von 80 % im Sedimentationsdiagramm nicht mehr nachweisbar. Die Ergebnisse der Sedimentationsanalyse der succinylierten Leguminproben sind in **Abbildung 26** zusammengefaßt dargestellt.



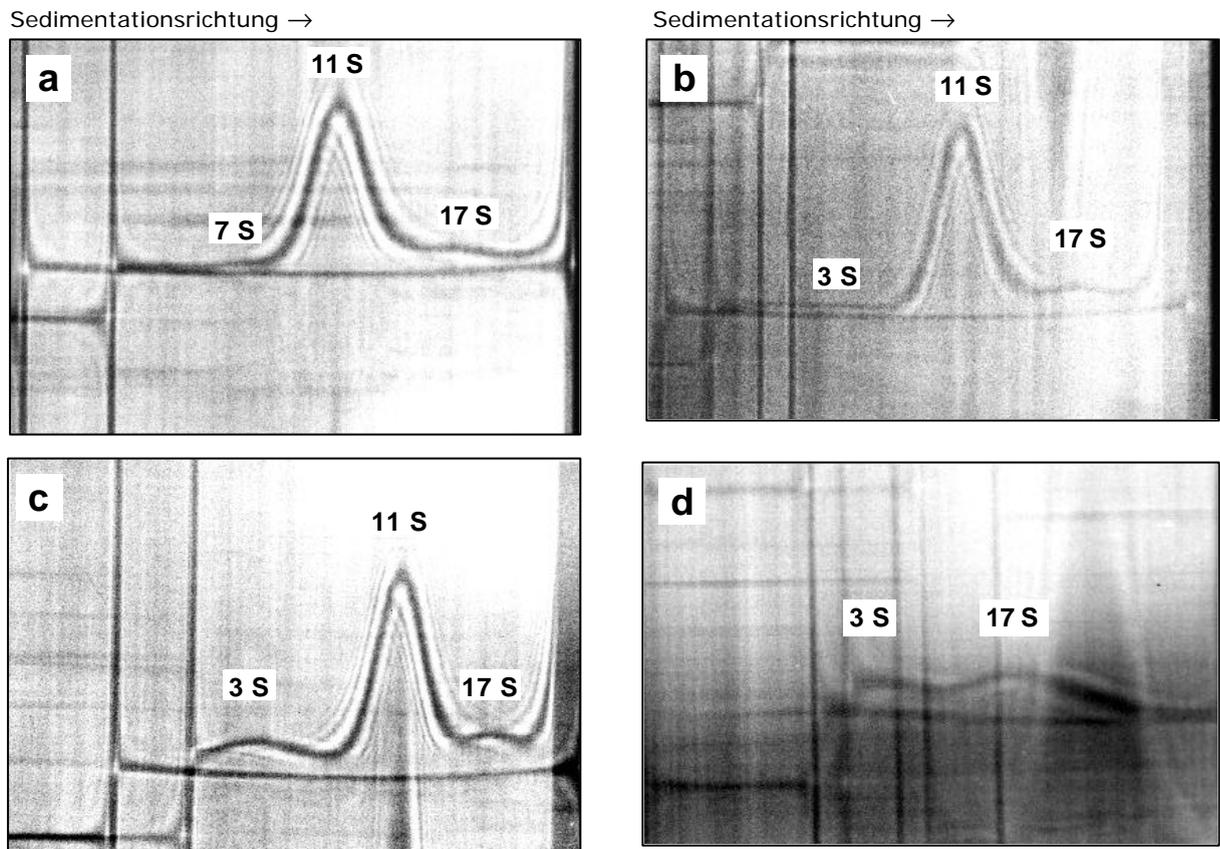
**Abbildung 25:** Schematische Darstellung der Sedimentationsdiagramme unterschiedlich succinylierter Leguminproben ( $c_{\text{Prot}}=10 \text{ g/l}$ ,  $50\,000 \text{ U/min}$ )  
**a:** nativ (28 min); **b:** 10% (40 min);  
**c:** 32% (25 min); **d:** 49% (44 min);  
**e:** 61% (47 min); **f:** 80% (73 min);  
**g:** 95% (82 min)



**Abbildung 26:** Relativer Gehalt der oligomeren Formen in succinylierten Leguminpräparaten als Funktion des Succinylierungsgrades für 11 S-, 7 S- und 3 S-Fractionen entsprechend den Sedimentationsgeschwindigkeitsdaten

In **Abbildung 27a-d** sind die Schlierenoptik-Aufnahmen der Ultrazentrifugation von nativem Legumin und acetylierten Leguminderivaten zusammengestellt. Im Gegensatz zur Succinylierung ist die 11 S-Komponente bis zu einem hohen Modifizierungsgrad (83 %, ohne Abbildung) stabil und wird kein 7 S-Produkt gefunden. Zudem erfolgt die Dissoziation in die Untereinheiten ( $s_{20,S}^0 = 2,8 \pm 0,34 \text{ S}$ ) erst bei höheren Modifizierungsgraden. Die Schlierenoptik-Aufnahme einer 98 % N- und hochgradig O-acetylierten Leguminprobe zeigt eine schnell laufende 17 S-Hauptkomponente und daneben die 3 S-Fraktion. Die Auswertung der Flächen unter den Kurven ergab einen Anteil von 70 % 17 S-

Komponente und 30 % 3 S-Komponente. Die Abhängigkeit der Fraktionsanteile vom Grad der Acetylierung ist **Tabelle 7** zu entnehmen.



**Abbildung 27:** Sedimentationsgeschwindigkeitsdiagramme von nativem Legumin **(a)** sowie 37% **(b)**, 58% **(c)** und 98% **(d)** acetyliertem Legumin  
 (a) 10,0 g/l; 40 000 U/min; 45 min; (b) 11,9 g/l; 40 000 U/min; 56 min  
 (c) 9,7 g/l; 40 000 U/min; 41 min; (d) 5,8 g/l; 30 000 U/min; 52 min

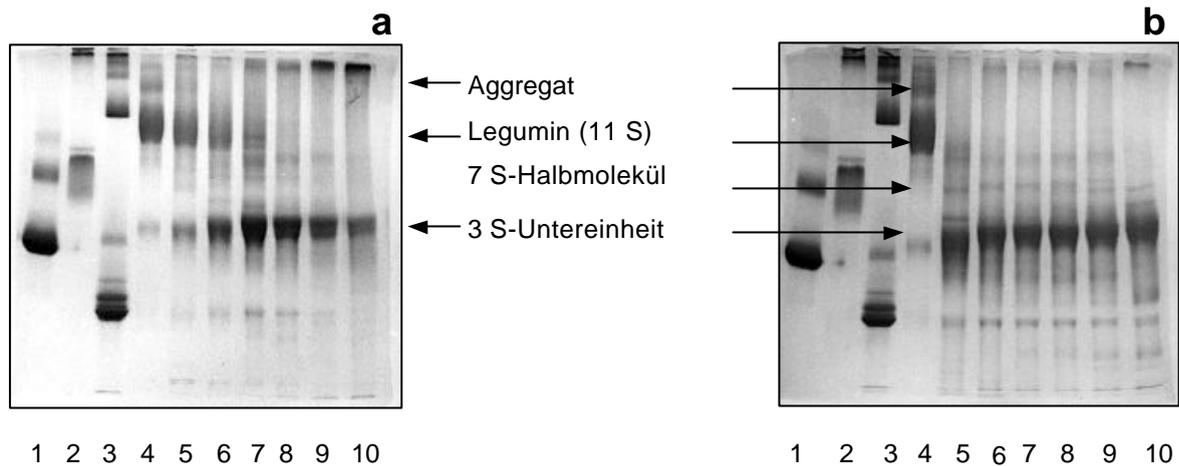
**Tabelle 7:** Relativer Gehalt der oligomeren Formen (17 S, 11 S und 3 S) in nativem Legumin und acetylierten Präparaten entsprechend den Sedimentationsgeschwindigkeitsdaten

	17 S	11 S	3 S
natives Legumin*	12 %	84 %	-
37% N-acetyliert	16 %	75 %	9 %
58 % N-acetyliert	17 %	64 %	19 %
98 % N-acetyliert	70 %	-	30 %

\* Neben dem hexameren und aggregierten Anteil liegen etwa 4 % einer 7 S-Komponente vor

#### 4.2.2.3 Native Gelelektrophorese acylierter Leguminproben

**Abbildung 28** zeigt die BN-PAGE-Muster [110] der acetylierten und succinylierten Leguminproben.



**Abbildung 28:** BN-PAGE von acetylierten (**a**) und succinylierten (**b**) Leguminproben

1 = RSA (66 000 g/mol)

2 = **b**-Amylase (200 000 g/mol)

3 = Ovalbumin (45 000 g/mol) und Ferritin (450 000 g/mol)

**a:** 4 = nativ; 5 = 7 %; 6 = 37 %; 7 = 58 %; 8 = 77 %; 9 = 86 %; 10 = 98 %

**b:** 4 = nativ; 5 = 31 %; 6 = 49 %; 7 = 61 %; 8 = 68 %; 9 = 80 %; 10 = 95 %

Im unmodifizierten Protein tritt neben der Leguminbande („11 S-Fraktion“) das in allen nativen 11 S-Proteinen vorhandene „15 S-Aggregat“ [132] als langsamer laufende Zone auf. Dieses Aggregat ist im Falle des entsprechenden Sojaproteins (Glycinin) als Dimeres der 11 S-Fraktion identifiziert worden [133].

Aus **Abbildung 28a** ist die Zunahme des Anteils einer hochaggregierten Fraktion bei hoher Acetylierung als am Start liegende Bande ersichtlich. Die dem modifizierten Legumin (11 S-Fraktion) entsprechenden Banden sind bis zu einem Modifizierungsgrad von ca. 60 % *N*-Acetylierung sichtbar. Ab etwa 30 % Modifizierung spalten sich zunehmend Dissoziationsprodukte (entsprechend der „3 S-Fraktion“) ab, die auch in unmodifizierten Proteinen in sehr geringen Mengen vorhanden sind. Ihr Anteil nimmt auf Kosten der 11 S-Banden mit steigendem Modifizierungsgrad zu.

Im Falle der Succinylierung (**Abbildung 28b**) stellen die dissoziierten Untereinheiten bereits nach 30 % Modifizierung die Hauptfraktion dar. Entsprechend der mit zunehmender Succinylierung steigenden Zahl gebundener Bernsteinsäurereste nimmt auch die relative Molekülmasse der Dissoziate zu und die Wanderungsgeschwindigkeit der Zonen ab. Darüber hinaus entsteht bereits nach geringer Modifizierung (30 % *N*-Succinylierung) eine Zwischenfraktion, die dem 7 S-Halbmolekül des Legumins [131] entsprechen dürfte. Die Aggregat-Fraktion verschwindet nach der Succinylierung. Im Falle der 95 % succinylierten Probe tritt jedoch eine am Start liegende Bande auf.

#### 4.2.2.4 Isolierung und Charakterisierung der aggregierten Fraktion in hochacetyliertem Legumin

Hochacetyliertes Legumin mit einem Modifizierungsgrad von ca. 90 % wurde an einer Sepharose CL 4B-Säule in zwei Fraktionen, A und B, aufgetrennt. In **Abbildung 29** ist die chromatographische Trennung dargestellt.

Die Hauptfraktion A mit 70-80 % der Proteine (dabei sollte es sich entsprechend Kap. 4.2.2.2 um die 17 S-Komponente handeln) wies einen N-Acetylierungsgrad von 95-98 % auf. Die niedermolekulare Nebenfraktion B (der 3 S-Komponente entsprechend), die nicht frei von Fraktion A erhalten wurde, wies differierende Blockierungsgrade zwischen 50 und 90 % auf.

Von Fraktion A wurden folgende physikochemische Größen (in Standardphosphatpuffer) bestimmt: Sedimentationskoeffizient, Grenzviskosität, Stokesscher Radius mittels Gelchromatographie, Molekularmasse mittels statischer Lichtstreuung.

Der Diffusionskoeffizient  $D$  wurde mit dem säulenchromatographisch ermittelten Stokesschen Radius nach Gleichung 19 (S. 37) errechnet. Die Abschätzung des Stokesschen Radius erfolgte an einer Sepharose CL 4B-Säule nach Kalibrierung mit Proteinen von bekanntem Stokesschen Radius [134], [135], [136] und ergab einen mittleren Wert von  $R_s = 10,0 \pm 0,7$  nm für die frisch chromatographierte Fraktion A aus verschiedenen Präparationen. Es resultiert der Wert  $D = (2,07 \pm 0,14) \cdot 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/s.

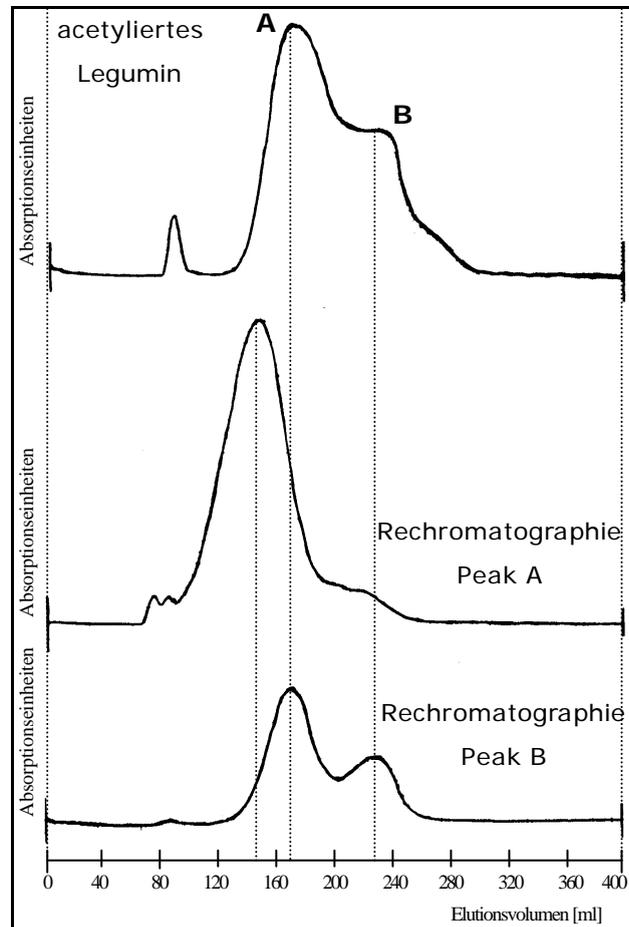
In **Abbildung 30** ist das Sedimentationsdiagramm von Fraktion A dargestellt. Aus der Konzentrationsabhängigkeit der Sedimentationskoeffizienten der Komponente A wurde ein Wert von  $s_{20,S}^0 = 16,82 \pm 0,20$  S ermittelt. Die Berechnung der Molekularmasse der Fraktion A erfolgte nach der SVEDBERG-Gleichung (Gleichung 30, S. 78) [137]. Es ergibt sich eine Molekularmasse von  $M_{s,D} = 692 \pm 80$  kDa für die aggregierte Fraktion A des hochacetylierten Legumins.

Die Auftragung der reduzierten dynamischen Viskosität zeigte eine zu vernachlässigende Konzentrationsabhängigkeit (**Abbildung 31**). Der aus der Grenzviskosität verschiedener Präparationen ermittelte Wert beträgt  $[\eta] = 9,47 \pm 0,65$  cm<sup>3</sup>/g.

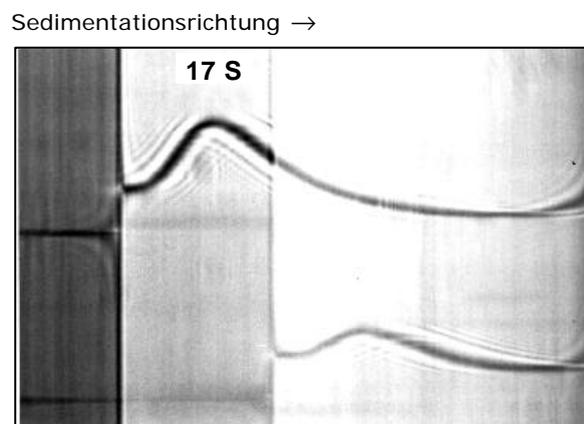
Eine Kombination von  $s$  und  $[\eta]$  zur Berechnung von  $M$  wurde von SCHACHMANN [138] vorgeschlagen (Gleichung 27). Sie beruht auf einem Ansatz von SCHERAGA & MANDELKERN [139] und gilt für Proteine, deren Molekülform nicht wesentlich von der Kugelgestalt abweicht und bei Vorliegen eines prolaten oder oblaten Rotationsellipsoids ein Achsenverhältnis von 5:1 nicht überschreitet. Dies kann aus dem Konzentrationsverlauf der reduzierten Viskosität als gegeben angenommen werden.

$$M_{s,[\eta]} = \frac{4690 \cdot s^{3/2} \cdot [\eta]^{1/2}}{(1 - \bar{v} \cdot \rho)^{3/2}} \quad \text{Gleichung 27}$$

Der aus Gleichung 27 berechnete Wert für die acetylierte Leguminfraktion A beträgt  $M_{s,[h]} = 655 \pm 65$  kDa. Die erhaltenen Molekularmassen belegen das Vorliegen eines dimeren Aggregates im Falle des hochacetylierten Legumins.

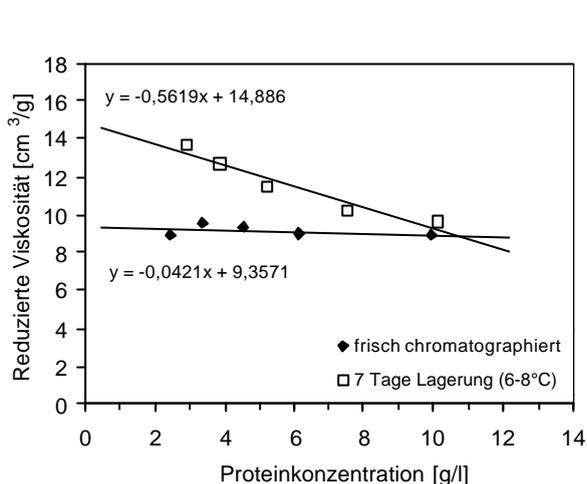


**Abbildung 29:** Säulenchromatographische Trennung von hochacetyliertem Legumin an Sepharose CL 4B

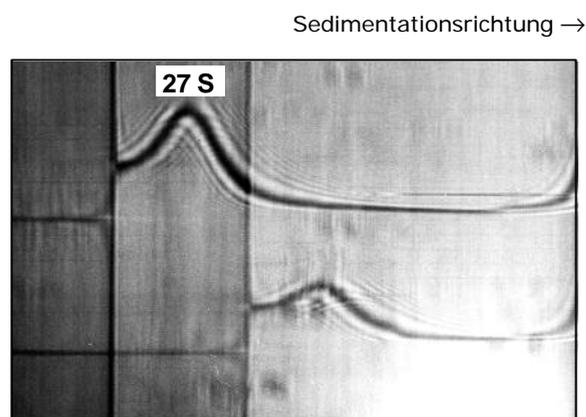


**Abbildung 30:** Sedimentationsgeschwindigkeitsdiagramm von Fraktion A aus hochacetyliertem Legumin (oben 6,0 g/l, unten 2,4 g/l; 30 000 U/min; 20 min)

**Abbildung 31** gibt die Konzentrationsabhängigkeit der reduzierten Viskosität der Fraktion A nach siebentägiger Lagerung im Kühlraum (6-8 °C) wieder. Daraus resultiert eine Grenzviskosität von  $[\eta] = 14,89 \text{ cm}^3/\text{g}$ . Der negative Anstieg der Regressionsgeraden weist auf eine zunehmende Kompaktheit der aggregierten Proteinmoleküle hin. Das entsprechende Sedimentationsdiagramm ist in **Abbildung 32** wiedergegeben.



**Abbildung 31:** Reduzierte Viskosität der Leguminfraktion A direkt nach Chromatographie an Sepharose CL 4B und nach 7tägiger Lagerung bei 6-8 °C



**Abbildung 32:** Sedimentationsdiagramm von Fraktion A nach 7tägiger Lagerung bei 6-8 °C (oben 8,0 g/l, unten 4,0 g/l; 30 000 U/min; 12 min)

Der Sedimentationskoeffizient beträgt  $s_{20,S}^0 = 27 \pm 5 \text{ S}$ . Der mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmte Stokessche Radius beträgt  $R_s = 14,5 \text{ nm}$ . Daraus resultiert für den scheinbaren Diffusionskoeffizienten ein Wert von  $D = 1,43 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ . Die Kombination dieser Daten in Gleichung 27 und 30 ergibt Molekularmassen von  $M_{s,D} = (1,61 \pm 0,30) \cdot 10^6 \text{ Da}$  bzw.  $M_{s,[\eta]} = (1,67 \pm 0,32) \cdot 10^6 \text{ Da}$ . Die Untersuchung mittels statischer Lichtstreuung lieferte Werte zwischen  $1,9 \cdot 10^6$  und  $2,1 \cdot 10^6 \text{ Da}$ .

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die hochacetylierte Hauptfraktion A des Legumins in Lösung von Standardphosphatpuffer zunächst als dimeres Assoziat vorliegt. Bei Lagerung der Lösung erfolgt eine weitere Oligomerisierung über tetra- und pentamere zu hexameren Legumin-Assoziaten. Obgleich die Aggregation schließlich zu unlöslichen Produkten führte, konnten höhere Molmassen als  $2,1 \cdot 10^6 \text{ g/mol}$  für die löslichen Aggregate bisher nicht nachgewiesen werden. Es ist nicht auszuschließen, daß die hexamere Form eine räumliche Anordnung der Legumin-Monomeren ähnlich derjenigen der sechs Untereinheiten im Leguminmolekül [40] aufweist, die eine höchstmögliche Kompaktheit der Assoziat gewährleisten.

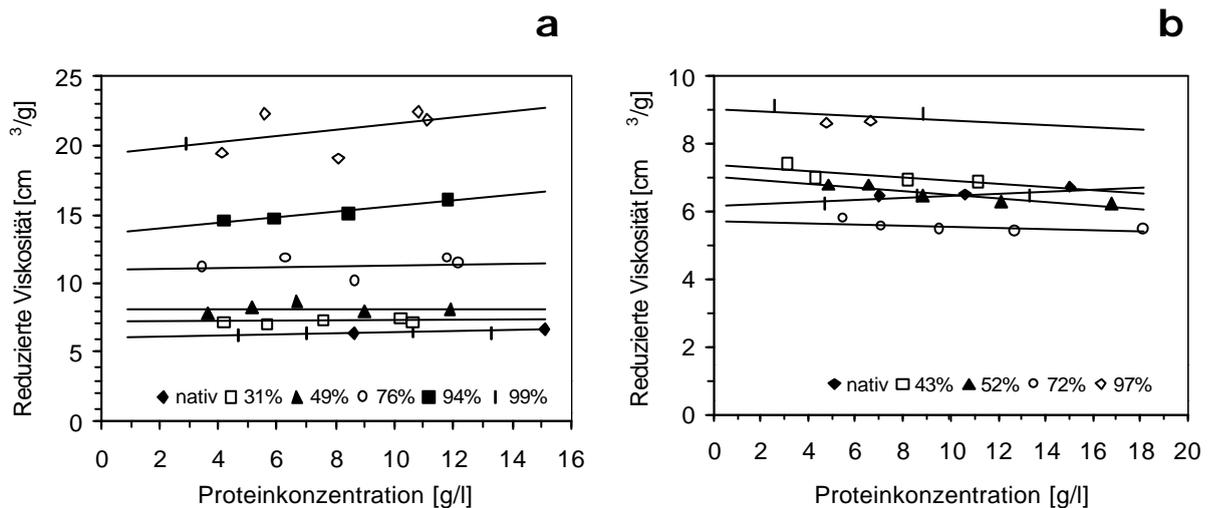
### 4.2.3 Bestimmung hydrodynamischer Größen

Da sich bei der Entfaltung, Rückfaltung, Dissoziation und Assoziation von Proteinen ihre hydrodynamischen Eigenschaften ändern, können Messungen von Viskosität, Dichte und partiellem spezifischem Volumen, Lichtstreuung und Sedimentationsverhalten Auskunft über den Faltungszustand bzw. die Konformation im jeweiligen Puffersystem geben.

#### 4.2.3.1 Viskosität acylierter Leguminproben

Die Veränderung der Proteinkonformation in Standardphosphatpuffer nach unterschiedlich hoher Acetylierung und Succinylierung wurde mit Hilfe der Kapillarviskosimetrie untersucht.

In **Abbildung 33** ist die Konzentrationsabhängigkeit der reduzierten Viskosität  $h_{sp}/c$  von succinylierten (**a**) und acetylierten (**b**) Leguminproben bei unterschiedlichen Modifizierungsgraden wiedergegeben.



**Abbildung 33:** Bestimmung der Grenzviskositäten von Legumin unterschiedlichen Acylierungsgrades in Standardphosphatpuffer

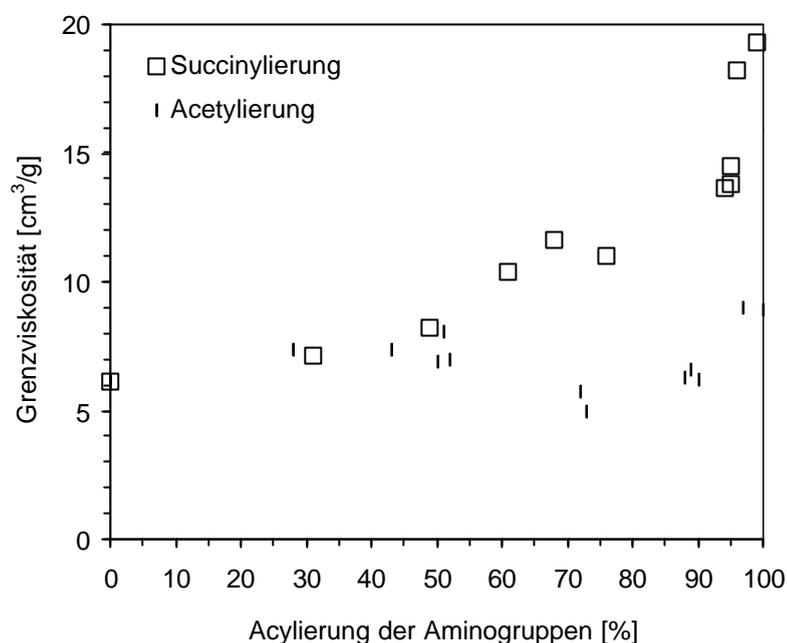
**a:** Legumin unterschiedlicher Succinylierungsgrade

**b:** Legumin unterschiedlicher Acetylierungsgrade

Die reduzierte Viskosität des nativen Legumins und seiner succinylierten Derivate ist bis zu einem Modifizierungsgrad von 76 % praktisch konzentrationsunabhängig. Bei Modifizierungsgraden über 90 % zeigt sich eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit mit einer Abnahme der reduzierten Viskosität bei niedrigen Konzentrationen.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Viskosität  $h_{red}$  der acetylierten Proben ist generell durch einen negativen Anstieg der Regressionsgeraden gekennzeichnet.

In **Abbildung 34** ist die Abhängigkeit der Legumin-Grenzviskositäten vom Grad ihrer Aminogruppen-Acylierung dargestellt.



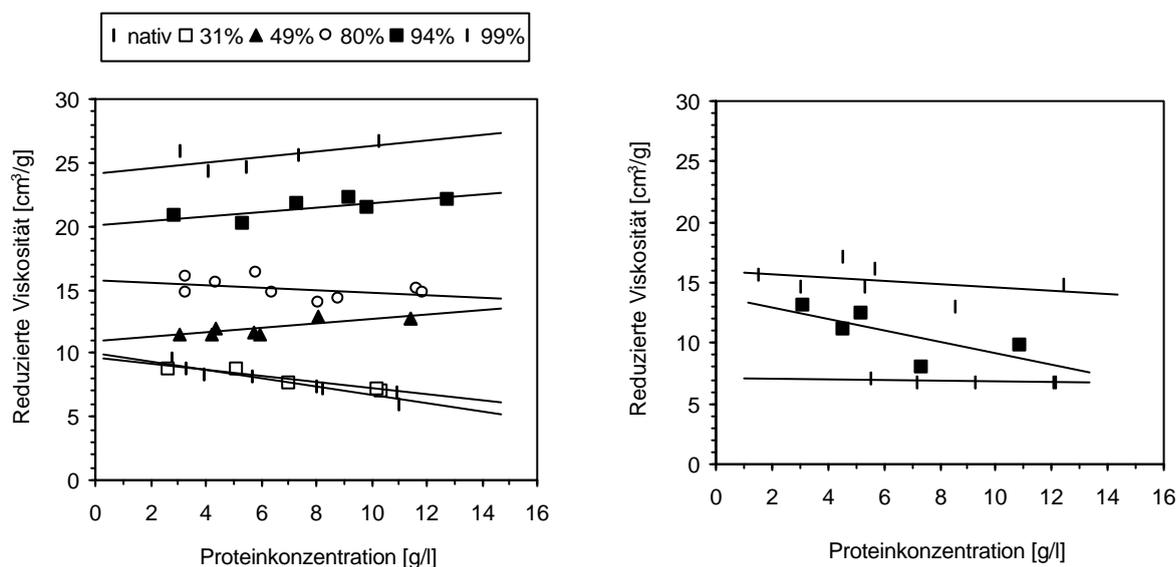
**Abbildung 34:** Abhängigkeit der Grenzviskosität vom  $N$ -Acylierungsgrad acetylierter und succinylierter Leguminpräparate in Standardphosphatpuffer

Die Grenzviskosität der acetylierten Proben erreicht unter den gewählten Versuchsbedingungen ( $I=0,5$ ) bei Modifizierungsgraden zwischen 30 und 55 % ein schwaches Maximum, um nach Durchlaufen eines Minimums bei 70-80 % Modifizierung wieder anzusteigen. Die Grenzviskosität der vollacetylierten Proben erreicht Maximalwerte von  $9,0 \text{ cm}^3/\text{g}$ .

Der Grenzviskositätsverlauf der succinylierten Leguminpräparate in Lösung der Standardionstärke ist durch einen langsamen Anstieg von  $[\eta]$  bis zu einem Modifizierungsgrad von 50 % gekennzeichnet. Ein stärkerer Anstieg mit einem Maximum bei 65-70 % Modifizierung und ein weiterer drastischer Anstieg der Grenzviskosität bei Succinylierungsgraden über 94 % kennzeichnen den weiteren Verlauf. Der letztgenannte Effekt kann als Folge einer starken Expansion des dissoziierten Leguminmoleküls infolge der zusätzlichen  $O$ -Succinylierung (s. **Abbildung 14**) interpretiert werden, während das Viskositätsmaximum bei 65-70 % Succinylierung auf vorangehende Konformationsänderung hinweist. Die Grenzviskosität der vollsuccinylierten Probe beträgt  $19,3 \text{ cm}^3/\text{g}$ .

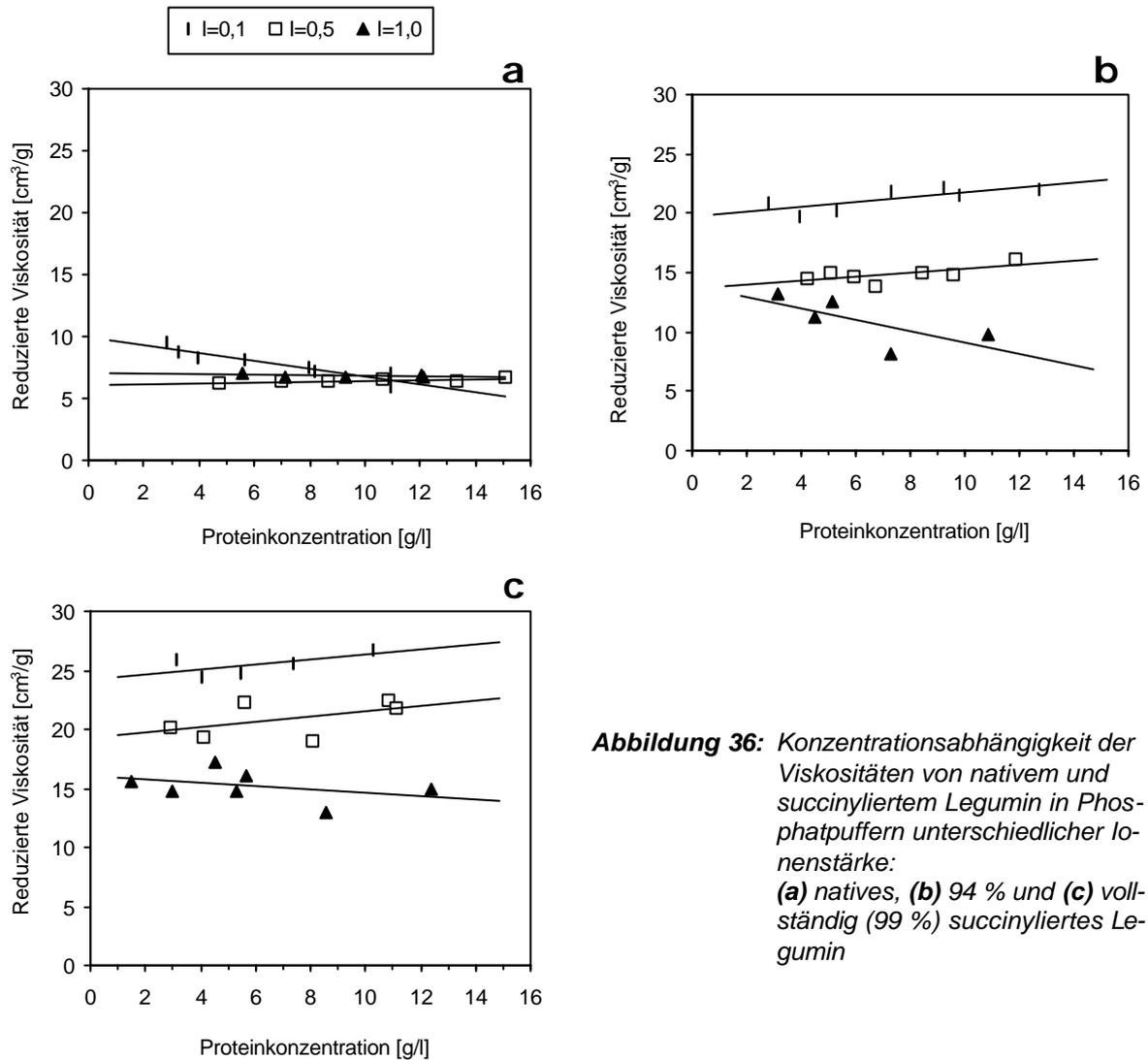
Desweiteren wurde der Einfluß der Ionenstärke des Lösungsmittels auf natives Legumin sowie Leguminproben unterschiedlichen Succinylierungsgrades untersucht.

Die Viskositätsmessung ausgewählter Proben erfolgte, außer im Standardpuffer bei  $I=0,5$ , auch in Phosphatpuffer niedriger ( $I=0,1$ ) und hoher ( $I=1,0$ ) Ionenstärke. **Abbildung 35a**, **Abbildung 33a** und **Abbildung 35b** zeigen die Konzentrationsabhängigkeit der reduzierten Viskositäten zunehmend succinylierter Leguminproben unter den Bedingungen der drei unterschiedlichen Ionenstärken. In niedriger Ionenstärke zeigen die Regressionsgeraden der Proben mit Modifizierungsgraden ab ca. 50 % einen positiven Anstieg (mit Ausnahme der zu 80 % succinylierten Probe) und bei niedrigem Modifizierungsgrad (bis ca. 30-40 %) sowie unmodifiziertem Protein einen negativen Anstieg. Das Verhalten succinylierter Proben in Puffer der Standardionenstärke wurde bereits in **Abbildung 33a** beschrieben. In hoher Ionenstärke ist die reduzierte Viskosität des nativen Legumins von der Proteinkonzentration unabhängig, die der hochsuccinylierten (> 90 %) nimmt bei geringen Konzentrationen zu.



**Abbildung 35:** Viskositäten von Ackerbohnen-Legumin unterschiedlichen Succinylierungsgrades in Puffer der Ionenstärke  $I=0,1$  (a) und  $I=1,0$  (b); (für  $I=0,5$  siehe **Abbildung 33a**)

**Abbildung 36a-c** verdeutlicht die veränderte Konzentrationsabhängigkeit der reduzierten Viskositäten drei ausgewählter Proben (nativ, hoch und vollständig succinyliertes Legumin) in Abhängigkeit von der Salzionenkonzentration des Lösungsmittels. Die deutlichen Unterschiede im Viskositätsverlauf der Proben bei unterschiedlicher Ionenstärke belegen den starken Einfluß der Ionenstärke auf die Proteinstruktur. Im Falle des nativen oligomeren Proteins zeigt sich der stabilisierende Effekt höherer ( $I=0,5$ ) Ionenstärke.



**Abbildung 36:** Konzentrationsabhängigkeit der Viskositäten von nativem und succinyliertem Legumin in Phosphatpuffern unterschiedlicher Ionenstärke: **(a)** natives, **(b)** 94 % und **(c)** vollständig (99 %) succinyliertes Legumin

Die Grenzviskosität  $[\eta]$  des nativen Ackerbohnen-Legumins (**Abbildung 36a**) sinkt mit steigender Ionenstärke und die Viskosität wird nahezu konzentrationsunabhängig. Die weitere Erhöhung der Ionenstärke von  $I=0,5$  auf  $I=1,0$  bringt keine wesentlichen Veränderungen mit sich. Ähnliches gilt für die Grenzviskosität einer hochsuccinylierten (94 %) Probe. Diese nimmt bei Erhöhung der Ionenstärke von  $I=0,1$  auf  $I=0,5$  deutlich ab und bleibt bei weiterer Erhöhung nahezu unverändert. Bis zu einem Modifizierungsgrad von 94 % wird die negative Ladung der Succinylreste bei einer Ionenstärke von 0,5 abgeschirmt. Es fällt jedoch auf, daß sich bei sehr hoher Ionenstärke ( $I=1,0$ ) die Konzentrationsabhängigkeit ändert: der Anstieg der Regressionsgeraden durch die Viskositätsmeßwerte der Verdünnungsreihe wird negativ. Die Ionenstärkeabhängigkeit der Viskosität der vollständig succinylierten Probe verhält sich ähnlich wie die der 94 % N-succinylierten Probe. Die hochsuccinylierten Proben enthalten extrem viele negative Ladungen, wodurch es zu großen elektrostatischen Effekten kommt. Das Lösungsmittel kann diese mehr oder weniger abschirmen. Erst bei einer Modifizierung über 94 % der Aminogruppen, wenn

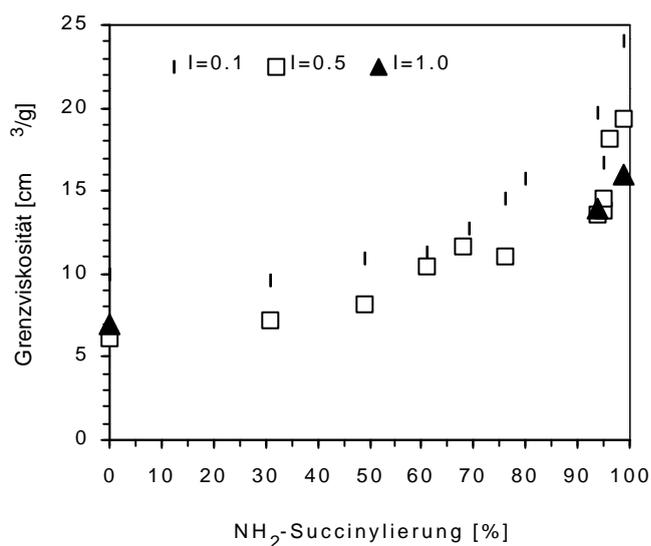
zusätzliche Succinylreste an die Hydroxylgruppen der Hydroxyaminosäuren gebunden werden, ist eine höhere Ionenstärke zur Abschirmung der eingeführten Ladung erforderlich: die Grenzviskosität sinkt kontinuierlich mit der Erhöhung der Ionenstärke auf 1,0.

Molekulare Wechselwirkungen wie intermolekulare Attraktion oder Repulsion, die Bildung von Doppelmolekülen oder hydrodynamische Wechselwirkungen zwischen den Molekülen haben Einfluß auf den Konzentrationsverlauf der Viskosität. Die nach HUGGINS [140] benannte Konstante  $k'$ , berechnet nach Gleichung 28, spiegelt diese Effekte wider.

$$h_{red} = [h] + k' \cdot [h]^2 \cdot c_{Prot} \quad \text{Gleichung 28}$$

Das Auftreten negativer HUGGINS-Konstanten im Puffer sehr hoher Ionenstärke ( $I=1,0$ ) kann demnach durch intermolekulare Abstoßung und/oder Veränderung der Molekülform durch Expansion oder Entfaltung erklärt werden.

In **Abbildung 37** ist die Änderung der Grenzviskosität mit zunehmendem Succinylierungsgrad in den drei Puffersystemen dargestellt.



**Abbildung 37:** Abhängigkeit der Legumin-Grenzviskosität von Succinylierungsgrad und Ionenstärke

In Lösung niedriger Ionenstärke ( $I=0,1$ ) werden höhere Werte für die Grenzviskosität bei gleichem Succinylierungsgrad entsprechend der geringeren Abschirmung elektrostatischer Effekte gemessen, was gleichzeitig den stabilisierenden Effekt der hohen Ionenstärke (Standardionenstärke) auf die Struktur der oligomeren Proteine belegt. Bis zu einem Succinylierungsgrad von ca. 60 % ist der Grenzviskositätswert dabei kaum verändert, um danach mit zunehmendem Modifizierungsgrad kontinuierlich anzusteigen. Das vollständig succinylierte Legumin erreicht eine Grenzviskosität von 24,2 cm<sup>3</sup>/g. Die Erhöhung der Ionenstärke des Lösungsmittels von  $I=0,5$  auf  $I=1,0$  hat kaum Einfluß auf die

Grenzviskosität des nativen Legumins, sehr wohl aber auf die Grenzviskosität der vollständig succinylierten Probe; diese sinkt von 19,3 auf 16,0 cm<sup>3</sup>/g.

#### Messung der Viskosität des Lösungsmittels

Die dynamische Viskosität  $\eta_0$  des Lösungsmittels bei der Temperatur  $T$  wird für die Berechnung der Viskosität des Proteins im jeweiligen Lösungsmittel und für die Berechnung der Stokeschen Radien aus den Diffusionskoeffizienten mit der STOKES-EINSTEIN-Gleichung benötigt (siehe Kap. 4.2.3.4). Für die drei Phosphatpuffer unterschiedlicher Ionenstärke wurden mittels Kapillarviskosimetrie folgende Werte bei einer Temperatur von  $T = 293$  K ermittelt:

0,025 M PB pH 8; $I=0,1$	$\eta_0 = 1,012 \pm 0,002$ mm <sup>2</sup> /s
0,05 M PB pH 8; $I=0,5$	$\eta_0 = 1,040 \pm 0,002$ mm <sup>2</sup> /s
0,05 M PB pH 8; $I=1,0$	$\eta_0 = 1,073 \pm 0,002$ mm <sup>2</sup> /s

Mit den aus der Dichtemessung erhaltenen Daten (siehe Kap. 4.2.3.2, **Tabelle 8**) konnten folgende dynamische Viskositäten des Lösungsmittels berechnet werden. Die übliche Einheit der dynamischen Viskosität sind Centipoise (cP).  $1\text{P} = 10^{-1} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

$I=0,1$ mit $\rho_0 = 1,003$ g/cm <sup>3</sup>	$\eta_0 = 1,015 \pm 0,002$ cP
$I=0,5$ mit $\rho_0 = 1,020$ g/cm <sup>3</sup>	$\eta_0 = 1,061 \pm 0,002$ cP
$I=1,0$ mit $\rho_0 = 1,040$ g/cm <sup>3</sup>	$\eta_0 = 1,116 \pm 0,002$ cP

#### 4.2.3.2 Partielles spezifisches Volumen und Dichte acylierter Leguminproben

##### Dichtemessung

Die Präzisionsdichtemessung ist für die Umrechnung von kinematischen Viskositäten in dynamische von Bedeutung. Auf diese Weise wurde die Dichte der drei Phosphatpuffer unterschiedlicher Ionenstärke mit Korrelationskoeffizienten zwischen 0,9993 und 0,9999 ermittelt. Die Dichte des jeweiligen Lösungsmittels  $\rho_0$  wird für die Berechnung einiger Parameter (z. B. Sedimentationskoeffizient, Molmasse) benötigt. Die Ergebnisse sind **Tabelle 8** zu entnehmen.

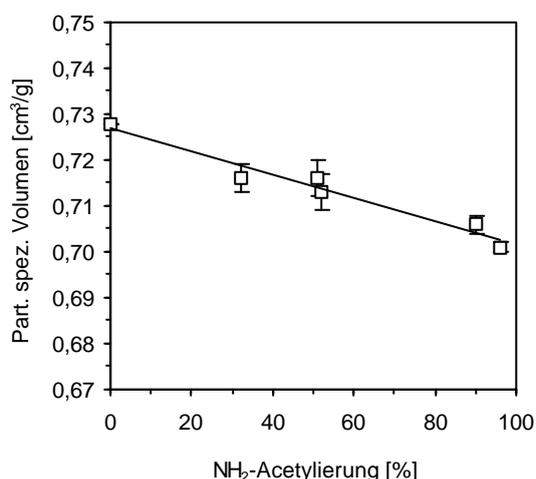
##### Ergebnisse der Bestimmung des partiellen spezifischen Volumens

Die Änderung des partiellen spezifischen Volumens  $\bar{v}$  von Legumin mit steigendem Acetylierungsgrad ist in **Abbildung 38** und mit steigendem Succinylierungsgrad in **Abbildung 39** dargestellt. Das partielle spezifische Volumen von Legumin in Standardphosphatpuffer nimmt mit zunehmendem Acetylierungsgrad ab. Für das erschöpfend acetylierte Protein

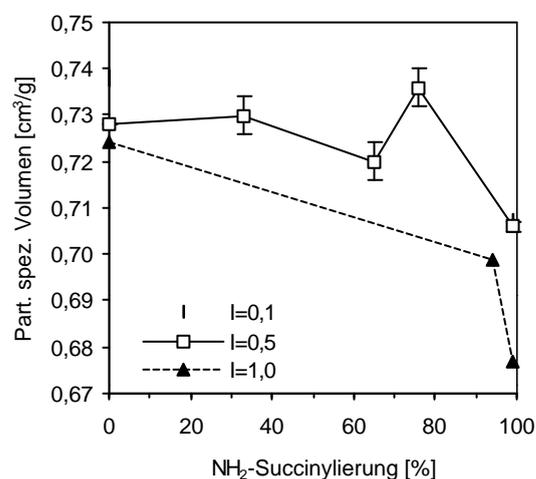
wurde ein Wert von  $0,701 \text{ cm}^3/\text{g}$  ermittelt, für das native Protein  $0,728 \text{ cm}^3/\text{g}$ .

In der Reihe der succinylierten Proben (Standardpuffer) nimmt das partielle spezifische Volumen des 65 % und besonders stark das des 99 % *N*-succinylierten Proteins ab. Diese Werte sind mit denen der succinylierten 11 *S*-Proteine aus Sonnenblumensamen [141], Erbsen [131] und succinylierter Aldolase [142] vergleichbar und weisen auf Veränderungen der Proteinstruktur hin. Im Unterschied zu den acetylierten Leguminproben nimmt das partielle spezifische Volumen der succinylierten Derivate im vergleichbaren Lösungsmittel jedoch nicht kontinuierlich ab. Ein maximales partielles spezifisches Volumen wurde bei 76 % Succinylierung ermittelt. Beim erschöpfend succinylierten Legumin fällt der  $\bar{v}$ -Wert unabhängig vom Lösungsmittel jeweils deutlich unter den des nativen Legumins.

**Abbildung 39** zeigt außerdem das partielle spezifische Volumen von nativem und hochsuccinyliertem Legumin in sehr hoher ( $I=1,0$ ) und niedrigerer ( $I=0,1$ ) Ionenstärke. Mit zunehmender Salzkonzentration verringert sich im allgemeinen das partielle spezifische Volumen von Legumin und seinen succinylierten Derivaten. Der ermittelte Wert für natives Legumin in hoher Ionenstärke ( $I=1,0$ ) unterscheidet sich lediglich im Bereich des Fehlers der Bestimmungsmethode vom entsprechenden Wert in Standardpuffer ( $I=0,5$ ). Die niedrige Ionenstärke bedingt dagegen ein erhöhtes partielles spezifisches Volumen von nativem Legumin. Die Meßwerte der erschöpfend succinylierten Probe stimmen in den Puffern mit Ionenstärke  $I=0,5$  und  $I=0,1$  überein; in hoher Ionenstärke weist das Protein ein deutlich geringeres spezifisches Volumen auf.



**Abbildung 38:** Änderung des partiellen spezifische Volumens von Legumin in Standardpuffer durch zunehmende Acetylierung



**Abbildung 39:** Partielles spezifisches Volumen von Legumin in Abhängigkeit vom Grad der Succinylierung und der Ionenstärke des Lösungsmittels

In **Tabelle 8** sind die Ergebnisse der Dichtemessung von nativem Legumin und einem erschöpfend succinylierten Leguminpräparat in Phosphatpuffern unterschiedlicher Ionenstärke zusammengefaßt.

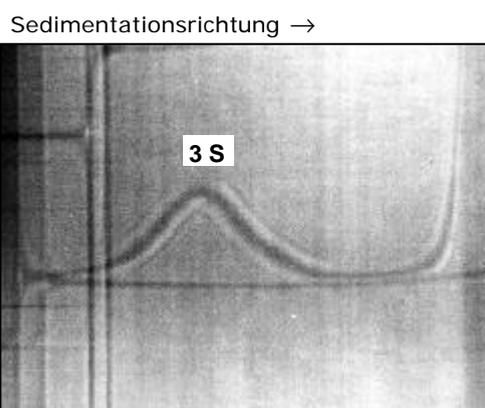
**Tabelle 8:** Ausgewählte Ergebnisse der Dichtemessung in Puffern unterschiedlicher Ionenstärke

		$r_D$ [g/cm <sup>3</sup> ]	Korrelationskoeffizient R	$\bar{v}$ [cm <sup>3</sup> /g]
I=0,1	natives Legumin	1,0034	0,9999	<b>0,738</b>
	99 % succinyliert	1,0034	0,9995	<b>0,707</b>
I=0,5	natives Legumin	1,0223	0,9993	<b>0,725</b>
	99 % succinyliert	1,0197	0,9999	<b>0,705</b>
I=1,0	natives Legumin	1,0404	0,9995	<b>0,724</b>
	99 % succinyliert	1,0400	0,9995	<b>0,677</b>

#### 4.2.3.3 Sedimentationskoeffizienten von hochsuccinyliertem Legumin

Neben den Betrachtungen zum Einfluß von Acetylierung und Succinylierung auf das Ackerbohnen-Legumin (siehe Punkt 4.2.2.2) wurde der Einfluß der Ionenstärke des Lösungsmittels auf die Sedimentationseigenschaften einer erschöpfend (99%) succinylierten Probe untersucht.

Für das native Ackerbohnen-Legumin in Standardphosphatpuffer wurde ein Sedimentationskoeffizient von  $s_{20,S}^0 = 12,0 \pm 0,35$  S [143] bestimmt. Bei 95 % N-succinyliertem Legumin trat in der Ultrazentrifugationsanalyse (Schlierenoptik) ein einziger breiter Peak auf, der als 3 S-Komponente identifiziert und dessen Sedimentationskoeffizient mit  $s_{20,S}^0 = 2,61 \pm 0,07$  S bestimmt wurde. **Abbildung 40** zeigt das entsprechende Sedimentationsgeschwindigkeitsdiagramm.

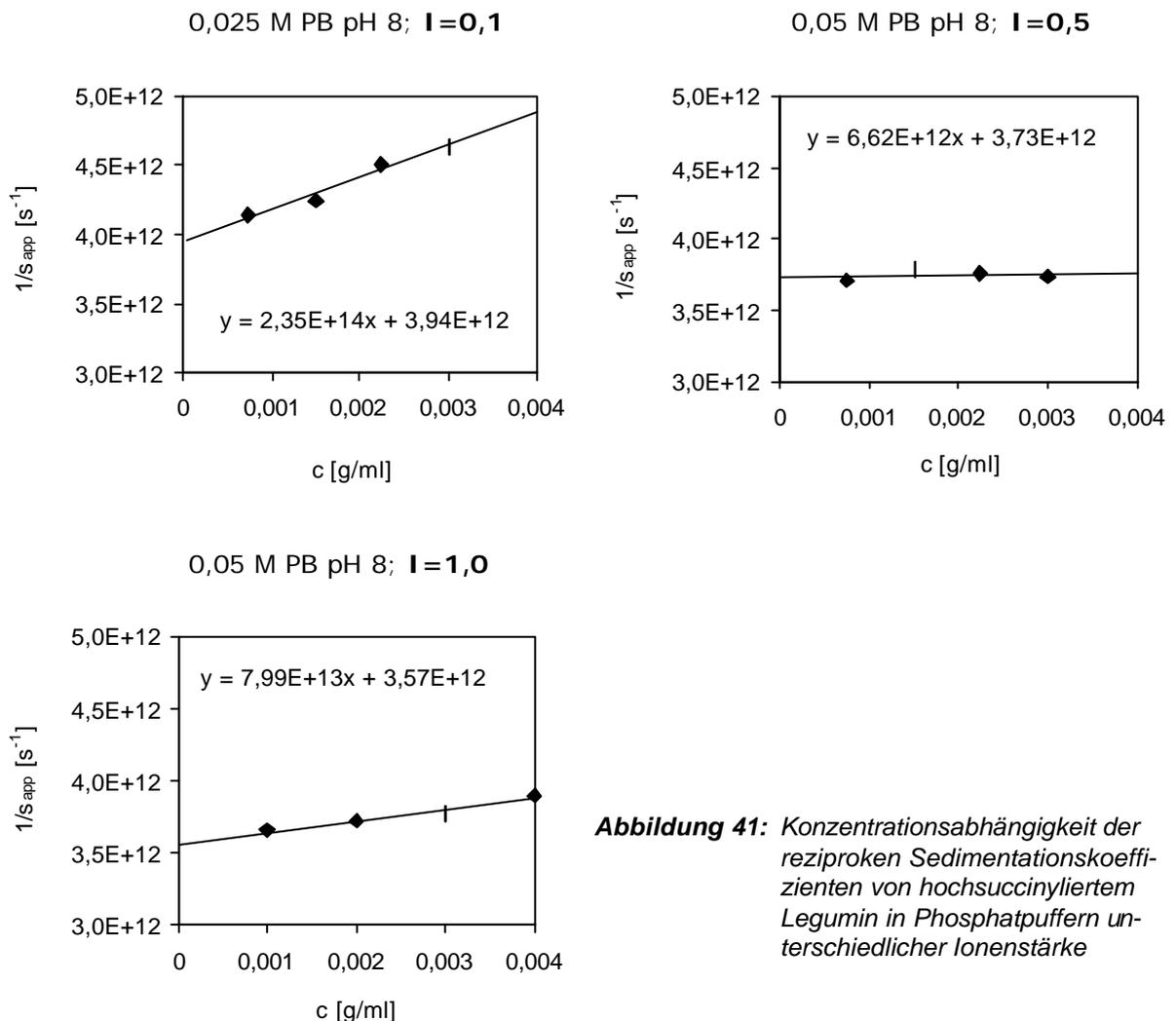


**Abbildung 40:** Sedimentationsdiagramm einer 95% N-succinylierten Leguminprobe in Standardpuffer (9,3 g/l; 50 000 U/min; 83 min)

Dieses Ergebnis wurde durch die Sedimentationsanalyse des vollständig succinylierten Legumins mittels Absorptionsoptik bestätigt, wonach in Standardpuffer der auf  $c_{Prot} = 0$  extrapolierte Sedimentationskoeffizient  $s_{20,S}^0 = 2,68$  S beträgt (**Tabelle 9**).

Die Form der aufgenommenen Sedimentationskurven, Absorption vs.  $\ln(r)$  (als Beispiel siehe **Abbildung 6**), läßt auf das Vorliegen einer einzigen Komponente schließen. Der vor und nach dem Übergang lang auslaufende Kurvenverlauf sowie das relativ späte Erreichen des Nullwertes entspricht einem relativ breiten Schlierenpeak (vgl. **Abbildung 40**).

**Abbildung 41** zeigt die Ergebnisse der Sedimentationsanalyse von hochsuccinyliertem Legumin in Phosphatpuffern unterschiedlicher Ionenstärke. Aus der Geradengleichung dieser Darstellung lassen sich einige charakteristische Parameter ablesen bzw. berechnen. Sie sind in **Tabelle 9** zusammengefaßt.



**Abbildung 41:** Konzentrationsabhängigkeit der reziproken Sedimentationskoeffizienten von hochsuccinyliertem Legumin in Phosphatpuffern unterschiedlicher Ionenstärke

Im Standardpuffer (**Abbildung 41b**) ist keine Konzentrationsabhängigkeit des Sedimentationskoeffizienten festzustellen. Im Plot  $s_{app}$  vs.  $c_{Prot}$  hat die Regressionsgerade einen Anstieg von lediglich  $m = 0,0049$ . Zu anderen Abhängigkeiten kommt man bei der Untersuchung von hochsuccinyliertem Legumin in niedriger (**Abbildung 41a**) und hoher (**Abbildung 41c**) Ionenstärke. Die größte Konzentrationsabhängigkeit tritt im Puffer niedriger Ionenstärke auf. Der Anstieg im Plot  $s_{app}$  vs.  $c_{Prot}$ , als Maß für die Konzentrationsabhängigkeit des Sedimentationskoeffizienten, ist mit  $m = 0,1225$  deutlich größer. Der Sedimentationskoeffizient der höchsten gemessenen Konzentration,  $c_{Prot} = 3$  g/l, liegt bei  $I=0,1$  um immerhin 14 % niedriger als der entsprechende Extrapolationswert  $s^0$ . Das unterschiedlich stark von der Konzentration abhängige Sedimentationsverhalten des 3 S-Proteins könnte an einer entsprechend der Ionenstärke des Lösungsmittels unterschiedlich stark ausgeprägten Entfaltung liegen. Intermolekulare, vor allem elektrostatische Wechselwirkungen dürften dabei die entscheidende Rolle spielen.

**Tabelle 9:** Ergebnisse der Ultrazentrifugationsanalyse von hochsuccinyliertem Legumin in Phosphatpuffern unterschiedlicher Ionenstärke

$1/s_{app} = 1/s^0 + k_s/s^0 * c$ ( y = n + m x )	I=0,1	I=0,5	I=1,0
$k_s/s^0$	2,348E+14	6,615E+12	7,999E+13
$1/s^0$	3,939E+12	3,732E+12	3,566E+12
$s^0_{20,S}$ [S]	<b>2,54</b> ± 0,08	<b>2,68</b> ± 0,08	<b>2,80</b> ± 0,08
$s^0_{20,W}$ [S]	<b>2,61</b> ± 0,10	<b>3,00</b> ± 0,10	<b>3,42</b> ± 0,10
$k_s$ [ml/g]	59	1,8	22

Im Gegensatz zur Konzentrationsabhängigkeit  $k_s$  des Sedimentationskoeffizienten ändert sich der auf  $c_{Prot} = 0$  extrapolierte Sedimentationskoeffizient  $s^0_{20,S}$  in Abhängigkeit von der Ionenstärke des Lösungsmittels nicht wesentlich. Nach der zum Vergleich zweckmäßigen Normierung auf Wasser als Lösungsmittel verstärken sich die Differenzen. Der  $s^0_{20,W}$ -Wert steigt mit zunehmender Ionenstärke um etwa 0,3 S (**Tabelle 9**).

#### 4.2.3.4 Diffusionskonstanten von hochsuccinyliertem Legumin

Die bei einer Temperatur von  $T = 293$  K und einem Streuwinkel von  $\Theta = 90^\circ$  ermittelten Diffusionskoeffizienten im jeweiligen Lösungsmittel, extrapoliert auf die Proteinkonzentration  $c_{Prot} = 0$  ( $D^0_{20,S}$ ), sind in **Tabelle 10** zusammengefaßt. Die auf Wasser als Lösungs-

mittel normierten Diffusionskoeffizienten  $D_{20,W}^0$  wurden mit folgender Gleichung berechnet:

$$D_{20,W}^0 = D_{20,S}^0 \frac{h_{20,S}}{h_{20,W}} \quad \text{Gleichung 29}$$

**Tabelle 10:** Diffusionskoeffizienten\* hochsuccinylierter Ackerbohnen-Legumine in Phosphatpuffern unterschiedlicher Ionenstärke, bestimmt mit dynamischer Lichtstreuung bei  $T=293\text{ K}$   
\* Fehler  $\pm 0,05 \cdot 10^{-7} [\text{cm}^2/\text{s}]$

	$I=0,1$	$I=0,5$	$I=1,0$
$D_{20,S}^0 [\text{cm}^2/\text{s}]$	$4,04 \cdot 10^{-7}$	$3,80 \cdot 10^{-7}$	$3,65 \cdot 10^{-7}$
$D_{20,W}^0 [\text{cm}^2/\text{s}]$	$4,09 \cdot 10^{-7}$	$4,02 \cdot 10^{-7}$	$4,07 \cdot 10^{-7}$

Die  $D_{20,S}^0$ -Werte des succinylierten Legumins nehmen mit zunehmender Salzkonzentration ab. Sie unterscheiden sich jedoch in Puffer der Ionenstärke  $I=0,5$  und  $I=1,0$  nicht wesentlich. Im Puffer niedrigster Ionenstärke ist der Wert deutlich höher.

Der Diffusionskoeffizient nativen Legumins  $D_{20,W}^0 = (3,38 \pm 0,05) \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  ist bestimmt worden [49]. Die für hochsuccinyliertes Legumin ermittelten und auf Wasser als Lösungsmittel normierten Diffusionskoeffizienten unterscheiden sich nicht und liegen erwartungsgemäß höher als der Diffusionskoeffizient des nativen Proteins.

Mit den aus Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse ( $s_{20,S}^0$ ) und dynamischer Lichtstreuung ( $D_{20,S}^0$ ) ermittelten hydrodynamischen Größen läßt sich die Molmasse der succinylierten Legumine im jeweiligen Puffersystem berechnen. Dazu dient die SVEDBERG-Gleichung:

$$M_{s,D} = \frac{s_{20,S}^0 RT}{D_{20,S}^0 (1 - \bar{v} r_0)} \quad \text{Gleichung 30}$$

- $R$  = universelle Gaskonstante
- $T$  = Meßtemperatur
- $\bar{v}$  = partielles spezifisches Volumen des Proteins
- $r_0$  = Dichte des Lösungsmittels

Die jeweiligen Werte für  $\bar{v}$  und  $r_0$  sind Kapitel 4.2.3.2, **Tabelle 8** zu entnehmen. Die aus der Untersuchung der Lichtstreuung ermittelten hydrodynamischen Radien und die nach SVEDBERG berechneten Molmassen für das hochsuccinylierte Legumin in Phosphatpuffern unterschiedlicher Ionenstärke sind in **Tabelle 11** zusammengestellt.

Für das hexamere native Leguminmolekül sind von PLIETZ *et al.* [49] die hydrodynamischen Größen  $R_s = 6,3 \pm 0,2$  nm und  $M_{s,D} = 350\,000 \pm 20\,000$  g/mol bestimmt worden.

**Tabelle 11:** *Hydrodynamische Radien\* und Molmassen\*\* von hochsuccinyliertem Legumin in Phosphatpuffern unterschiedlicher Ionenstärke (\* Fehler  $\pm 3$  % \*\* Fehler  $\pm 7$  %)*

	$I=0,1$	$I=0,5$	$I=1,0$
$R_s$ [nm]	5,2	5,5	5,7
$M_{s,D}$ [g/mol]	52 000	62 000	63 000

Die DLS-Messung zeigte, daß in den untersuchten Proteinlösungen, neben der Hauptkomponente, jeweils sehr geringe Anteile einer zweiten Komponente (Minorkomponente) vorlagen (bimodale Verteilung). Dabei dürfte es sich um Aggregate handeln (vgl. BN-PAGE, **Abbildung 28b**-slot 10), deren Stokessche Radien etwa 8 nm betragen.

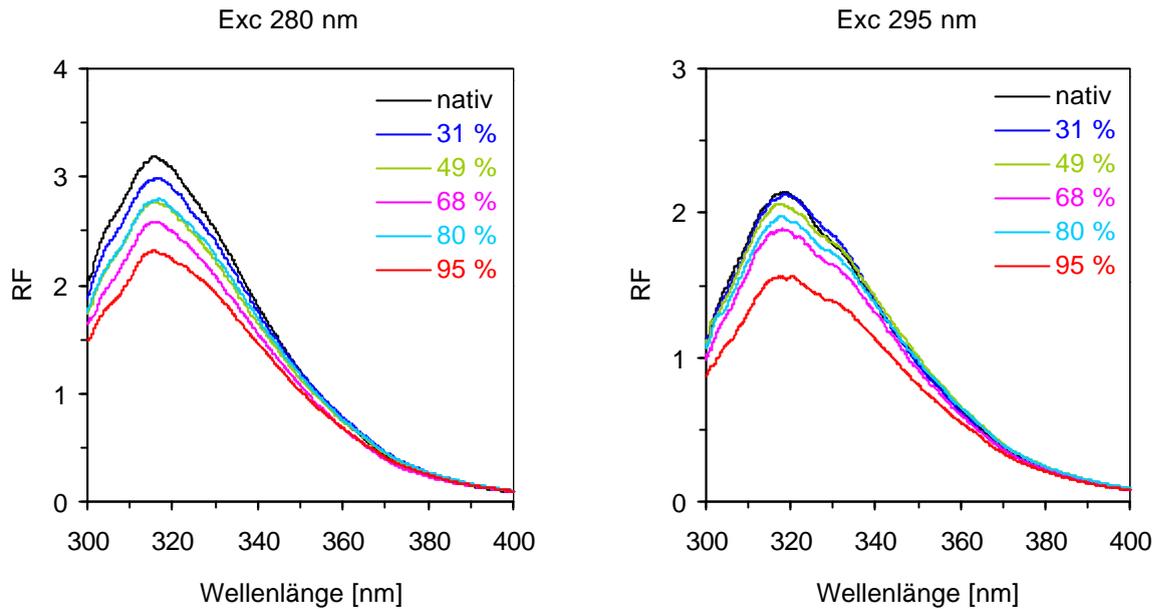
Die Molmassen von succinyliertem Legumin in  $I=0,5$  und  $I=1,0$  sind im Bereich des Meßfehlers identisch. Entsprechend dem verringerten Sedimentations- und gleichzeitig erhöhten Diffusionskoeffizienten, ergibt sich für das Protein in Puffer niedrigster Ionenstärke eine geringere Molmasse von  $52\,000 \pm 4\,000$  g/mol.

#### 4.2.4 Spektroskopische Untersuchungen

##### 4.2.4.1 Fluoreszenzemissionsspektroskopie acylierter Leguminproben

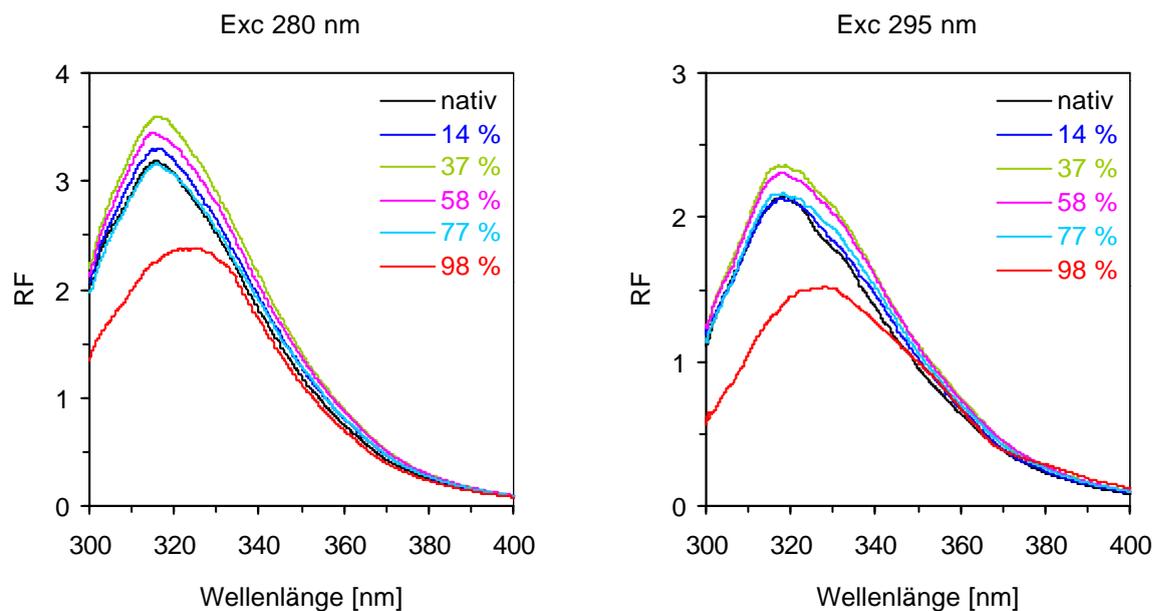
**Abbildung 42** gibt die Fluoreszenzemissionsspektren von nativem Legumin und succinylierten Leguminproben in Standardpuffer wieder. Das Fluoreszenzspektrum des nativen Proteins nach einer Anregung mit 280 nm (Tyrosin- und Tryptophan-Anregung) zeigt ein Maximum bei 317 nm, was den dominierenden Einfluß der Tyrosin-Chromophoren belegt [144, 145].

Das Fluoreszenzmaximum der unmodifizierten Leguminprobe nach Anregung bei 295 nm (bevorzugte Tryptophan-Anregung) liegt bei 319 nm. Daneben ist eine Schulter im Bereich von 330 nm (Tryptophan-Bande) ausgebildet. Mit zunehmenden Succinylierungsgrad bis zu 68 % Modifizierung nimmt die Fluoreszenzintensität ab, bei 80 % Succinylierung steigt sie an, um bei 95 % Succinylierung wieder deutlich abzufallen. Der Beitrag der Tryptophan-Bande bei 330 nm bleibt bis zum höchsten (> 95 %) Modifizierungsgrad ausgeprägt; ein Doppelmaximum (321 und 330 nm) deutet sich an. Die bei 95 % *N*-Succinylierung gemessene Rotverschiebung des Maximums beträgt 2 nm.



**Abbildung 42:** Fluoreszenzemissionsspektren von nativem Legumin und unterschiedlich hoch *N*-succinylierten Leguminproben in Standardpuffer

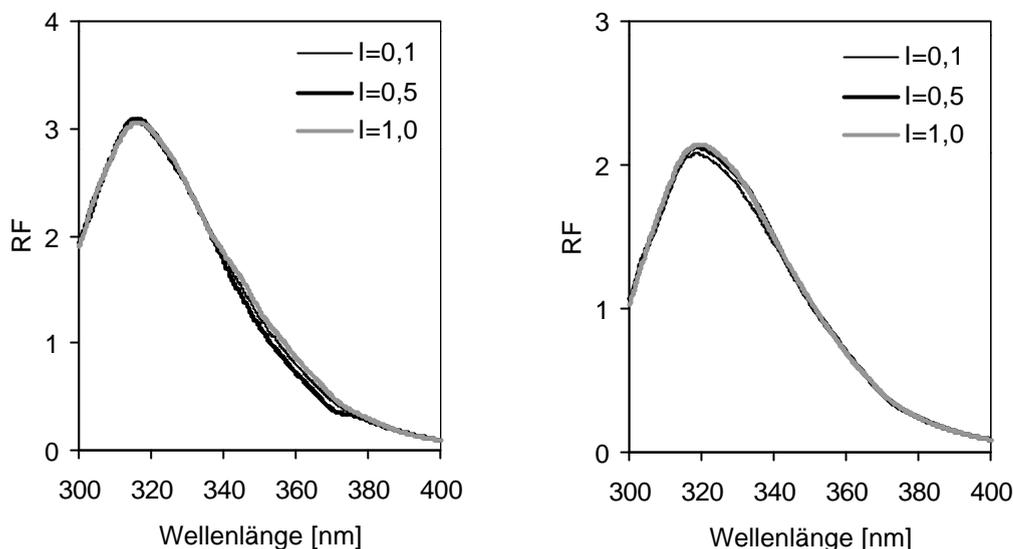
Im Falle der acetylierten Proben (**Abbildung 43**) tritt bei 98 % *N*-Modifizierung eine Rotverschiebung des Fluoreszenzmaximums um etwa 10 nm ein. Sie entspricht Strukturveränderungen mit einem Übergang der aromatischen Chromophoren in eine stärker polare Umgebung, wie sie beispielsweise für Denaturationsprozesse charakteristisch ist [145]. Die Fluoreszenzintensität erreicht Maximalwerte bei mittleren Modifizierungsgraden (37-58 %) und zeigt die stärkste Abnahme bei Acetylierungsgraden über 90 %.



**Abbildung 43:** Fluoreszenzemissionsspektren von nativem Legumin und unterschiedlich hoch *N*-acetylierten Leguminproben in Standardpuffer

### Ionenstärkeabhängigkeit der Fluoreszenzemission von Legumin und acylierten Derivaten

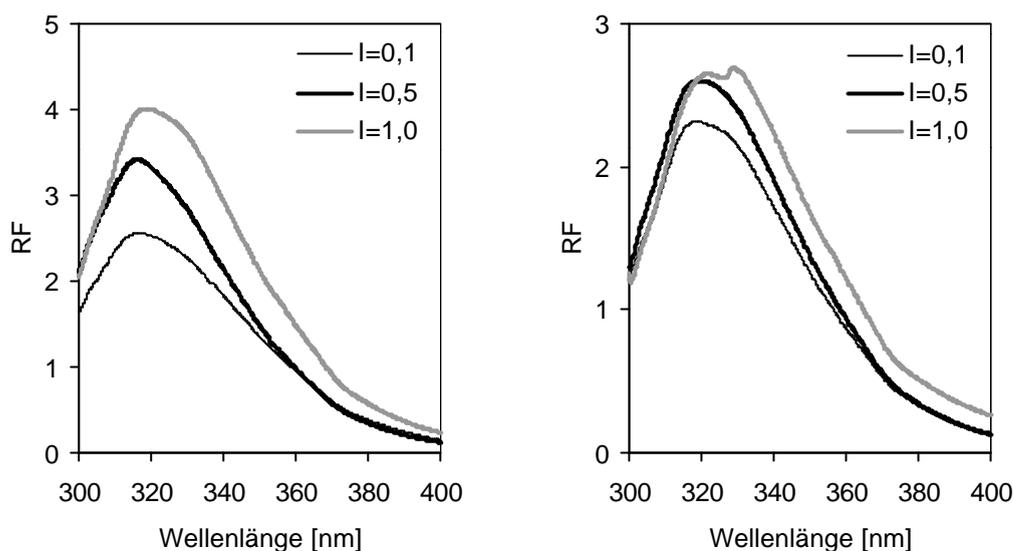
Die Fluoreszenzemissionsspektren von nativem Ackerbohnen-Legumin in Phosphatpuffern mit Ionenstärken zwischen  $I=0,1$  und  $I=1,0$  unterscheiden sich kaum (**Abbildung 44**).



**Abbildung 44:** Fluoreszenzemissionsspektren von nativem Legumin in Puffern unterschiedlicher Ionenstärke nach Anregung bei 280 nm (links) und 295 nm (rechts)

In allen drei Puffersystemen wurden in den normierten Proteinlösungen nach Anregung von Tyrosin und Tryptophan (280 nm) maximale relative Fluoreszenzen von 3,0 bei Emissionswellenlängen zwischen 316 und 317 nm gemessen (starker Einfluß der Tyrosin-Chromophoren). Mit einem Wert von 2,1 liegt der Wert der maximalen relativen Fluoreszenz nach bevorzugter Anregung der Tryptophanreste (295 nm) erwartungsgemäß niedriger; die entsprechenden Emissionswellenlängen liegen jeweils zwischen 318 und 320 nm (s. **Tabelle 12**, S. 85).

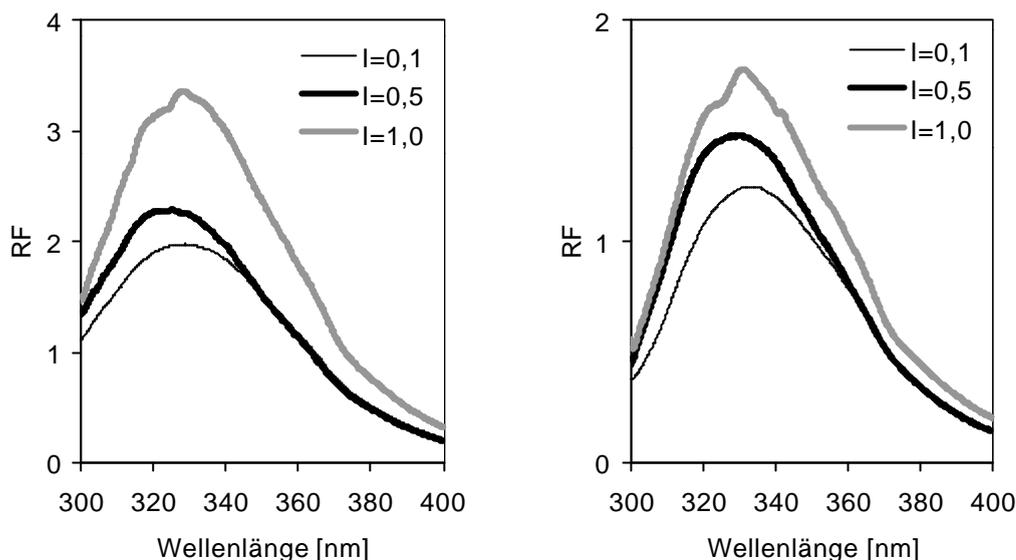
In **Abbildung 45** sind Fluoreszenzemissionsspektren einer 58 % *N*-acetylierten Leguminprobe dargestellt. Im Gegensatz zum nativen Legumin beeinflusst die Ionenstärke die Konformation der teilweise acetylierten Probe deutlich. Die meßbare relative Fluoreszenz nimmt im untersuchten Bereich, bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm, mit steigender Ionenstärke deutlich zu. Das Fluoreszenzmaximum verschiebt sich von 316 nm bei  $I=0,1$  und  $I=0,5$  auf 319 nm bei  $I=1,0$  bathochrom. Die Werte sind detailliert **Tabelle 12** (S. 85) zu entnehmen.



**Abbildung 45:** Fluoreszenzemissionsspektren von 58 % acetyliertem Legumin in Puffern unterschiedlicher Ionenstärke nach Anregung bei 280 nm (links) und 295 nm (rechts)

Regt man dagegen nur die Tryptophanreste des 58 % *N*-acetylierten Leguminmoleküls an, so fällt einerseits eine Fluoreszenzzunahme zwischen  $I=0,1$  und  $I=0,5$  auf, andererseits der abweichende Verlauf des Spektrums in hoher Ionenstärke ( $I=1,0$ ). Die Ausbildung eines Doppelmaximums mit einer relativen Fluoreszenz von etwa 2,7 bei 321 nm und 329 nm weist auf Veränderungen in der Umgebung des Tryptophans aufgrund von Konformationsänderungen insbesondere im Lösungsmittel hoher Ionenstärke hin. Die gleichzeitige Fluoreszenzzu- und UV-Absorptionsabnahme (**Abbildung 55**), kann als Hinweis auf eine, durch die hohe Salzkonzentration forcierte, kompaktere Konformation des Moleküls interpretiert werden.

**Abbildung 46** gibt die Fluoreszenzemissionsspektren einer 98 % *N*-acetylierten Leguminprobe wieder. Die relative Fluoreszenz der hochacetylierten Probe ist in allen drei Puffersystemen relativ gering. Ähnlich der nur anteilig acetylierten Probe, nimmt auch bei der vollständig modifizierten Probe die relative Fluoreszenz mit zunehmender Ionenstärke zu (**Tabelle 12**). Nach Anregung des hochacetylierten Legumins im Standardpuffer ( $I=0,5$ ) mit einer Wellenlänge von 280 nm liegt das Fluoreszenzmaximum bei einer Emissionswellenlänge von 325 nm und ist somit gegenüber dem Maximum in niedriger Ionenstärke ( $I=0,1$ ) hypsochrom verschoben. Im Puffer hoher Ionenstärke ( $I=1,0$ ) kann man, neben der Ausbildung eines zweiten Maximums bei 327 nm, eine weitere Verschiebung des Maximums zu etwas geringerer Wellenlänge beobachten. Das Tryptophan-angeregte Fluoreszenzspektrum weist, ähnlich wie das Tyr/Trp-Spektrum, eine (etwas kontinuierlichere) Fluoreszenzzunahme sowie eine Blauverschiebung des Spektrums mit steigender Ionenstärke und die Herausbildung eines zweiten Maximums in hoher Ionenstärke auf.

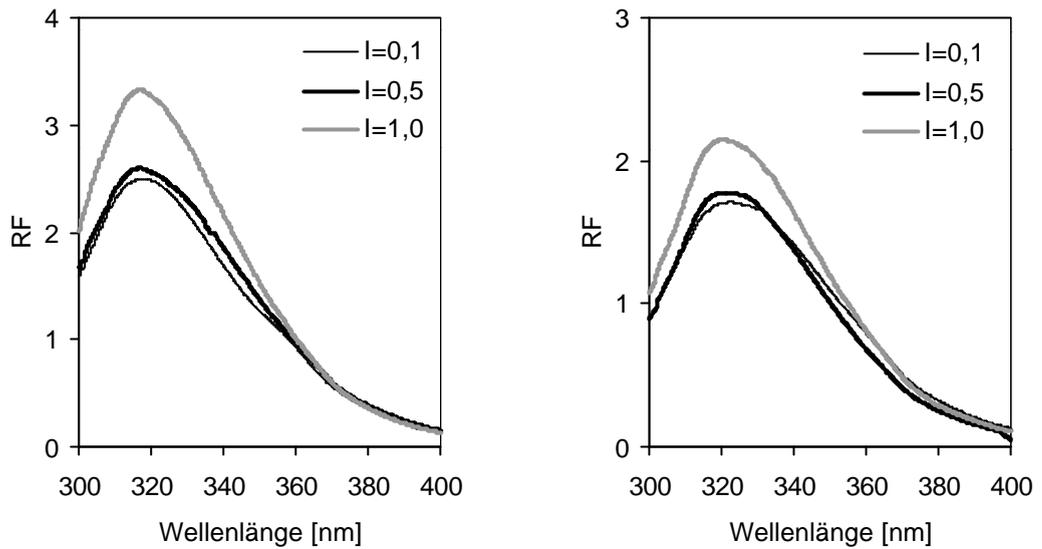


**Abbildung 46:** Fluoreszenzemissionsspektren von 98 % acetyliertem Legumin in Puffern unterschiedlicher Ionenstärke nach Anregung bei 280 nm (links) und 295 nm (rechts)

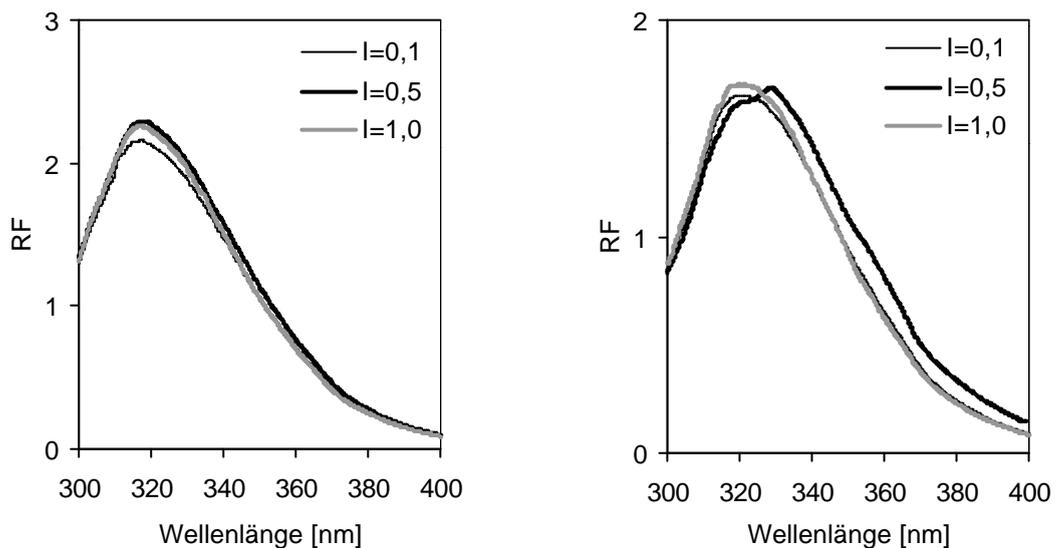
Weder die Erhöhung noch die Verringerung der Ionenstärke des Lösungsmittels, ausgehend von der Standardionenstärke, verhindert die stark ausgeprägte Rotverschiebung des Fluoreszenzmaximums zwischen dem nativen und dem hochacetylierten Legumin um 8-14 nm.

Wie bereits gezeigt, nimmt die relative Fluoreszenz von (normierten) Proteinlösungen mit fortschreitender Succinylierung im allgemeinen ab. Desweiteren wurde festgestellt, daß die relative Fluoreszenz der acetylierten Proben mit zunehmender Ionenstärke des Puffers steigt. Auch bei einer 64 % *N*-succinylierten Probe wurde die höchste relative Fluoreszenz bei Ionenstärke  $I=1,0$  gemessen (**Abbildung 47**). Allerdings gibt es keine wesentlichen Änderungen der Fluoreszenzintensität zwischen Standard- und niedriger Ionenstärke (**Tabelle 12**). Diese Aussage gilt sowohl für die Fluoreszenzemissionsspektren nach Tyrosin- und Tryptophan-Anregung als auch für die Spektren nach bevorzugter Anregung des Tryptophan.

Die Fluoreszenzemissionsspektren einer vollsuccinylierten Leguminprobe sind **Abbildung 48** zu entnehmen. Auf die Exponierung der Aromaten einer so hoch modifizierten Probe hat die Ionenstärke des Puffers offensichtlich nur geringen Einfluß. Die Fluoreszenzspektren nach Anregung mit 280 nm unterscheiden sich bezüglich der Fluoreszenzintensität und der Lage des Fluoreszenzmaximums kaum (**Tabelle 12**). Auffällig ist das Spektrum in Standardpuffer nach Tryptophan-Anregung. Neben dem typischen Maximum bei 321 nm tritt ein zweites Maximum bei einer Emissionswellenlänge von 329 nm (Trp-Bande) auf (vgl. auch das Spektrum der 95 % succinylierten Probe in **Abbildung 42**).



**Abbildung 47:** Fluoreszenzemissionsspektren von 64 % succinyliertem Legumin in Puffern unterschiedlicher Ionenstärke nach Anregung bei 280 nm (links) und 295 nm (rechts)



**Abbildung 48:** Fluoreszenzemissionsspektren von 99 % succinyliertem Legumin in Puffern unterschiedlicher Ionenstärke nach Anregung bei 280 nm (links) und 295 nm (rechts)

Eine mit 1-3 nm relativ geringfügige Rotverschiebung des Fluoreszenzmaximums zwischen nativem und hochsuccinyliertem Legumin ist unabhängig von der Ionenstärke des Puffers und der Anregungswellenlänge festzustellen.

**Tabelle 12:** Lage vom und relative Fluoreszenz (RF) am Fluoreszenzmaximum nativer und acylierter Leguminpräparate in Phosphatpuffern unterschiedlicher Ionenstärke

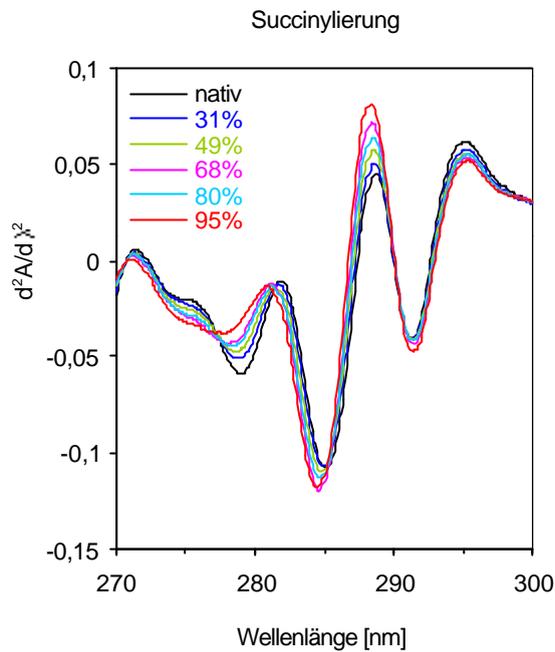
		280 nm		295 nm	
		$RF_{max}$	Lage von $RF_{max}$ [nm]	$RF_{max}$	Lage von $RF_{max}$ [nm]
nativ	$I=0,1$	3,0	316	2,1	318
nativ	$I=0,5$	3,1	316	2,1	319
nativ	$I=1,0$	3,0	317	2,2	320
58% ac	$I=0,1$	2,7	316	2,3	319
58% ac	$I=0,5$	3,4	316	2,6	319
58% ac	$I=1,0$	4,0	319	2,7	321 / 329
98% ac	$I=0,1$	2,0	328	1,2	333
98% ac	$I=0,5$	2,3	325	1,5	329
98% ac	$I=1,0$	3,4	324 / 327	1,8	321 / 331
64% suc	$I=0,1$	2,5	318	1,7	322
64% suc	$I=0,5$	2,6	317	1,8	322
64% suc	$I=1,0$	3,4	317	2,1	320
99% suc	$I=0,1$	2,1	317	1,7	321
99% suc	$I=0,5$	2,3	318	1,6	321 / 329
99% suc	$I=1,0$	2,3	317	1,7	321

#### 4.2.4.2 UV-Absorptionsspektroskopie acylierter Leguminproben

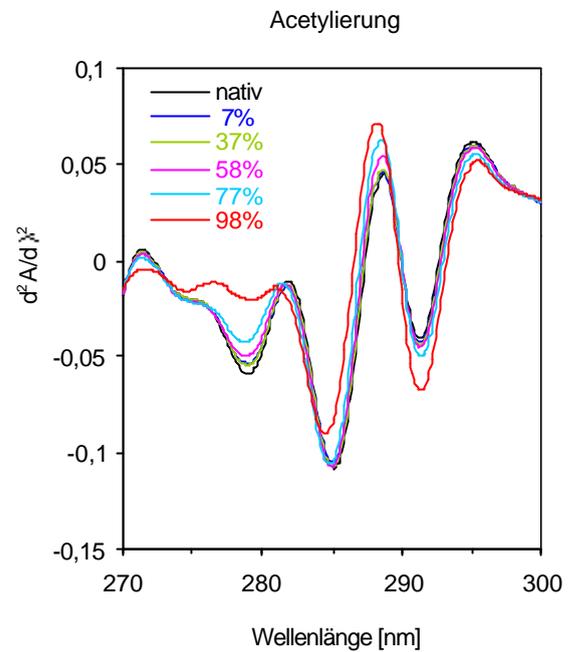
Die zweiten Ableitungsspektren der UV-Spektren von succinylierten und acetylierten Leguminproben sowie nativem Legumin sind in **Abbildung 49** und **Abbildung 50**, die entsprechenden Differenzableitungsspektren in **Abbildung 51** und **Abbildung 52** dargestellt. Die Banden der Ableitungsspektren 2. Ordnung lassen eine Blauverschiebung sowohl der succinylierten als auch der acetylierten Proteinproben insbesondere im Tyrosinbereich (275-290 nm) erkennen. Im Falle der succinylierten Proben erfolgt diese relativ kontinuierlich mit steigendem Modifizierungsgrad. Im Falle der acetylierten Proben ist besonders der Übergang von 77 % zu 98 % Modifizierung als deutliche spektrale Veränderung über den gesamten untersuchten Wellenlängenbereich zu beobachten.

Die Differenzableitungsspektren weisen deutliche Veränderungen sowohl im Bereich der Tryptophan-Banden (> 290 nm) als auch der Tyrosin-Banden (275-290 nm) und der Phenylalanin-Banden (< 275 nm) auf, welche die Beteiligung aller aromatischen Chromophoren an der Konformationsänderung der succinylierten und acetylierten Leguminproben belegen. Die Differenzableitungsspektren verdeutlichen erneut einen Unter-

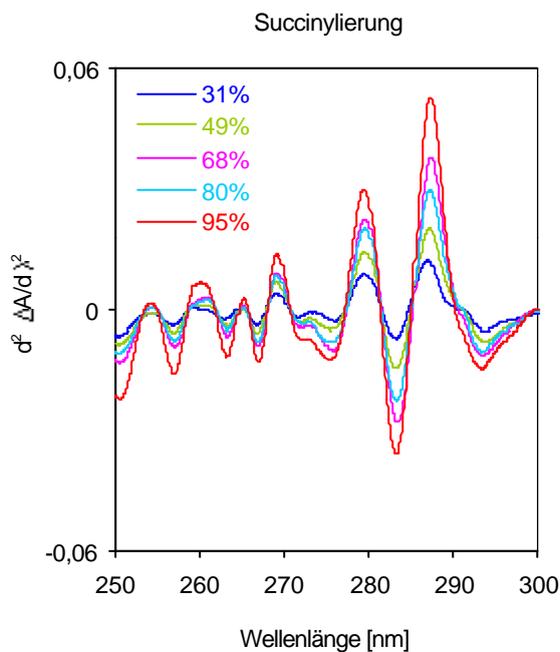
schied zwischen Acetylierung und Succinylierung: Die spektroskopischen Eigenschaften ändern sich mit schrittweiser Succinylierung relativ kontinuierlich, die der acetylierten Proben sind durch sprunghafte Veränderungen zwischen 77 % und 98 % gekennzeichnet.



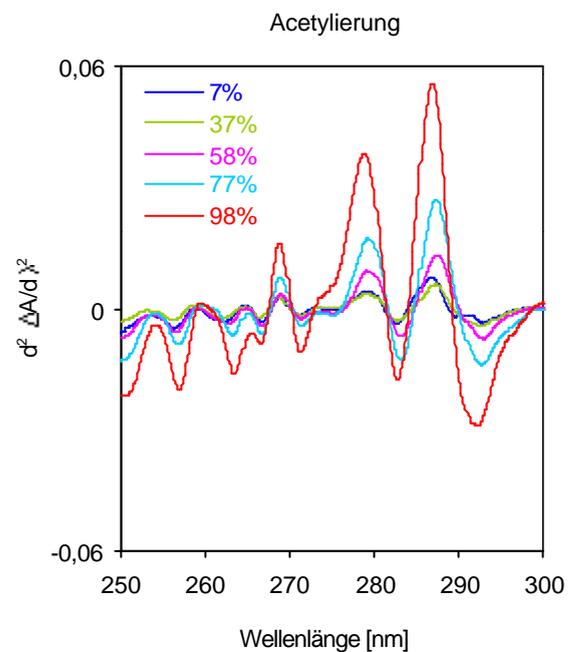
**Abbildung 49:** UV-Ableitungsspektrum (2. Ord.) succinylierter Leguminproben in Standardpuffer



**Abbildung 50:** UV-Ableitungsspektrum (2. Ord.) acetylierter Leguminproben in Standardpuffer

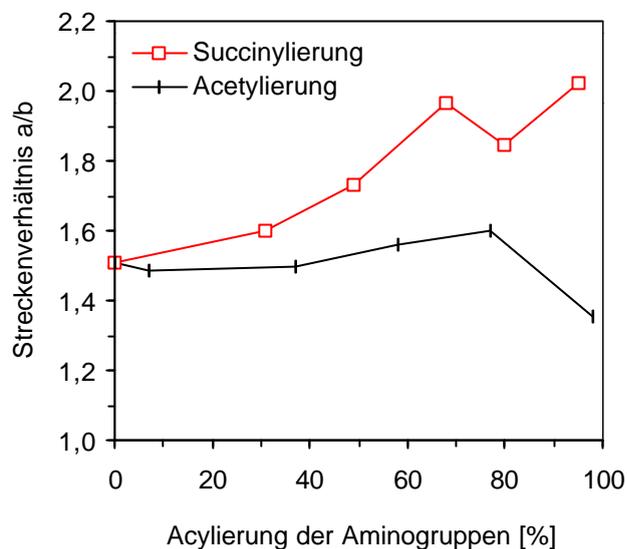


**Abbildung 51:** UV-Differenzableitungsspektren: Succinylierte Derivate minus natives Legumin



**Abbildung 52:** UV-Differenzableitungsspektren: Acetylierte Derivate minus natives Legumin

Nach RAGONE *et al.* [146] wurde das Verhältnis der Peak-zu-Peak-Abstände zwischen dem Maximum bei 288 nm und dem Minimum bei 285 nm einerseits (Strecke a) und dem Maximum bei 295 nm und dem Minimum bei 291 nm andererseits (Strecke b) als Maß für das Verhältnis der Tyrosin-Exponierung zur Tryptophan-Exponierung bestimmt (**Abbildung 53**).

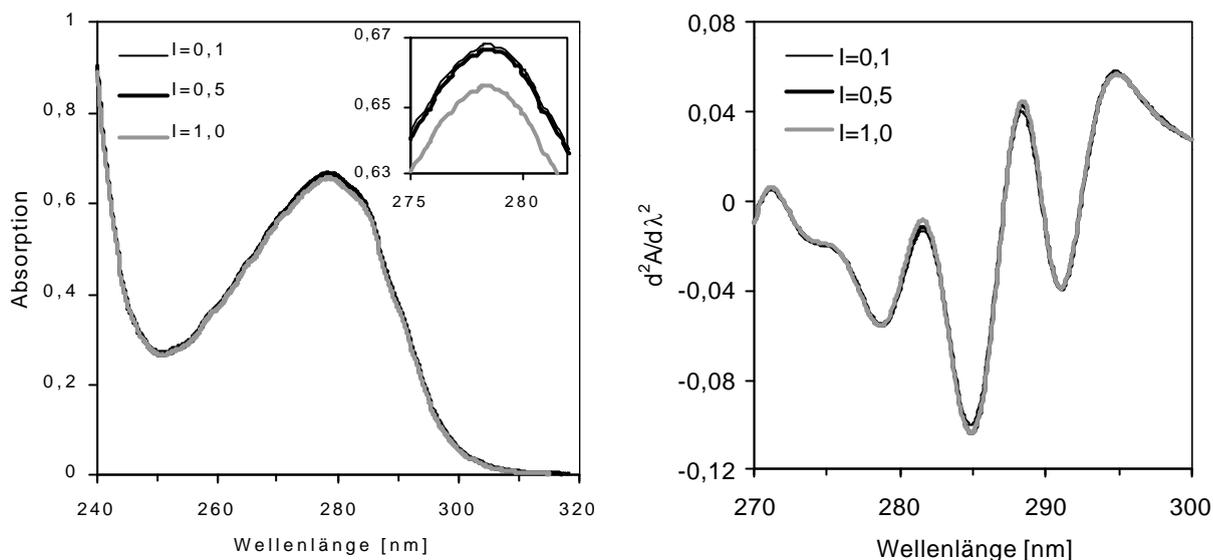


**Abbildung 53:** Veränderung der Tyrosin-/Tryptophan-Exponierung (Streckenverhältnis a/b aus den UV-Ableitungsspektren 2. Ordnung [146]) in Abhängigkeit vom Grad der Acylierung von Leguminpräparaten in Standardpuffer

Für das native Legumin ergibt sich ein Wert von  $a/b = 1,51$ . Mit fortschreitender Succinylierung bis 68 % steigt er auf 1,98 an. Der  $a/b$ -Quotient fällt bei weiterer Modifizierung (80 % Succinylierung) wieder ab, um nach 95 % Modifizierung den Höchstwert von 2,02 zu erreichen. Dies entspricht den Ergebnissen der Viskosimetrie und Fluoreszenzspektroskopie, aus denen im Bereich von 70-80 % *N*-Succinylierung das Vorliegen einer speziellen Konformation abgeleitet werden kann. Der Verlauf der Tyrosin-Exponierung der acetylierten Proben ist durch ein Maximum bei 77 % Aminogruppen-Modifizierung gekennzeichnet ( $a/b = 1,60$ ). Erschöpfende Acetylierung (98 %) ergibt mit  $a/b = 1,35$  den niedrigsten Wert.

#### *Ionenstärkeabhängigkeit der UV-Absorption von Legumin und acylierten Derivaten*

Die UV-Absorptionsspektren des nativen Legamins in Phosphatpuffern unterschiedlicher Ionenstärke sind in **Abbildung 54** dargestellt. Desweiteren gibt sie die daraus berechneten Ableitungsspektren 2. Ordnung wieder.



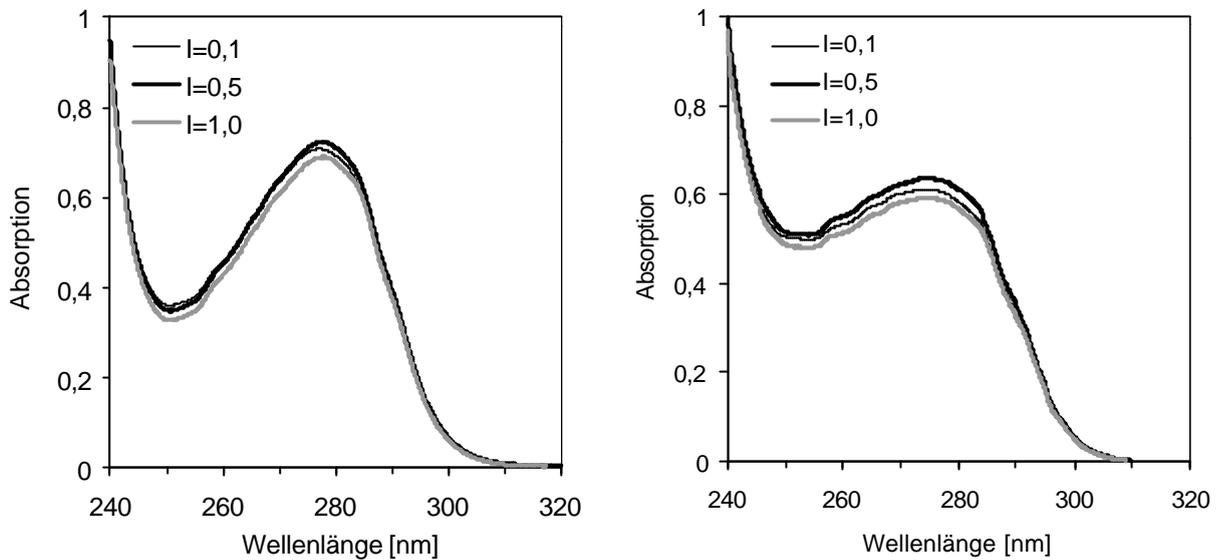
**Abbildung 54:** UV-Absorptionsspektrum (links) und Ableitungsspektrum 2. Ordnung (rechts) von nativem Legumin in Phosphatpuffern unterschiedlicher Ionenstärke

Die UV-Absorption des nativen Legumins ändert sich durch Variation der Lösungsmittel-Ionenstärke von  $I=0,1$  bis  $I=1,0$  kaum. Es gibt weder eine Verschiebung der Banden noch nennenswerte Unterschiede hinsichtlich der UV-Absorption. Das UV-Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 278,5 nm.

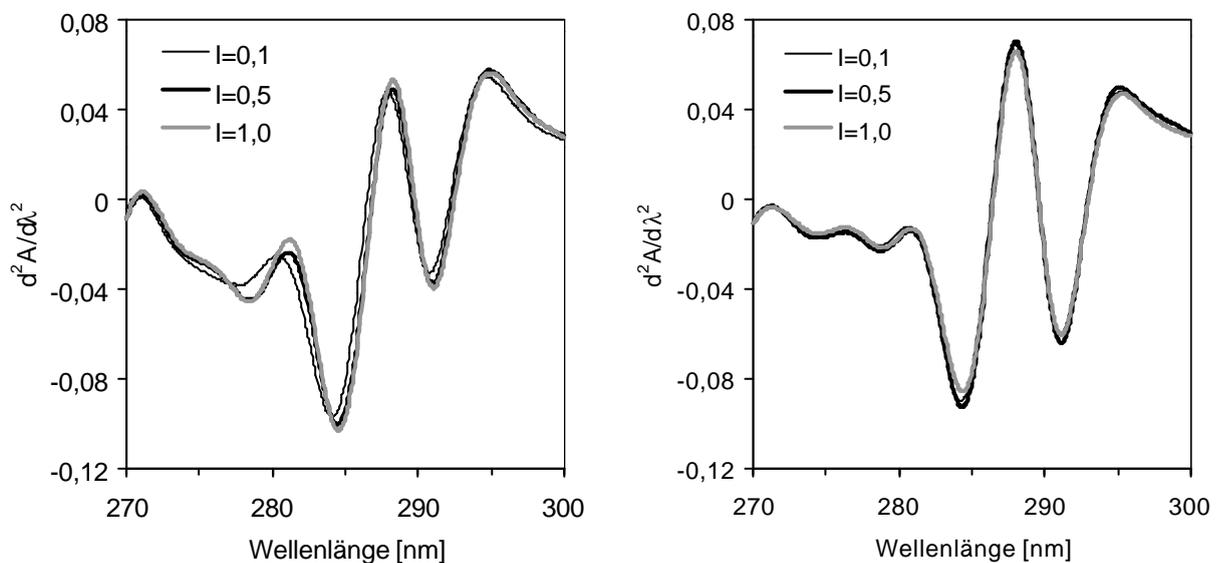
Die UV-Absorptionsspektren von 58 % und 98 % acetyliertem Legumin in Phosphatpuffern unterschiedlicher Ionenstärke sind in **Abbildung 55** dargestellt. Die maximale UV-Absorption der 58 % acetylierten Probe nimmt bei hoher Ionenstärke ( $I=1,0$ ) geringfügig ab. Das Absorptionsmaximum liegt unabhängig vom Puffer bei 277,5 nm. Die sehr breiten UV-Absorptionsspektren der hochacetylierten Probe zeigen leichte Absorptionzunahme bei Erhöhung der Ionenstärke von  $I=0,1$  auf  $I=0,5$  und bei weiterer Erhöhung auf  $I=1,0$  eine Absorptionsabnahme von  $A^{1\text{cm}}[278\text{ nm}] = 0,64$  auf 0,59.

In **Abbildung 56** sind die entsprechenden Ableitungsspektren 2. Ordnung und in **Abbildung 57** die Differenzableitungsspektren dargestellt. Die zweite Ableitung der UV-Absorptionsspektren (**Abbildung 56**) zeigt, daß es Veränderungen in der Umgebung der Chromophoren der 58 % acetylierten Probe in Abhängigkeit von der Ionenstärke gibt. Die UV-Banden dieses modifizierten Legumins sind in niedriger Ionenstärke blauverschoben. Besonders deutliche, auf Tyrosinreste zurückzuführende Veränderungen sieht man im Wellenlängenbereich 273-283 nm. Der Einfluß der niedrigen Ionenstärke auf die Konformation der 58 % acetylierten Probe wird auch durch die spektralen Veränderungen im Differenzableitungsspektrum (**Abbildung 57**) deutlich. Die Ableitungsspektren und Differenzableitungsspektren des vollacetylierten Legumins sind im Gegensatz dazu nahezu

identisch, was bedeutet, daß die Änderung der Ionenstärke nicht zu UV-spektroskopisch meßbaren Änderungen der Konformation führt.



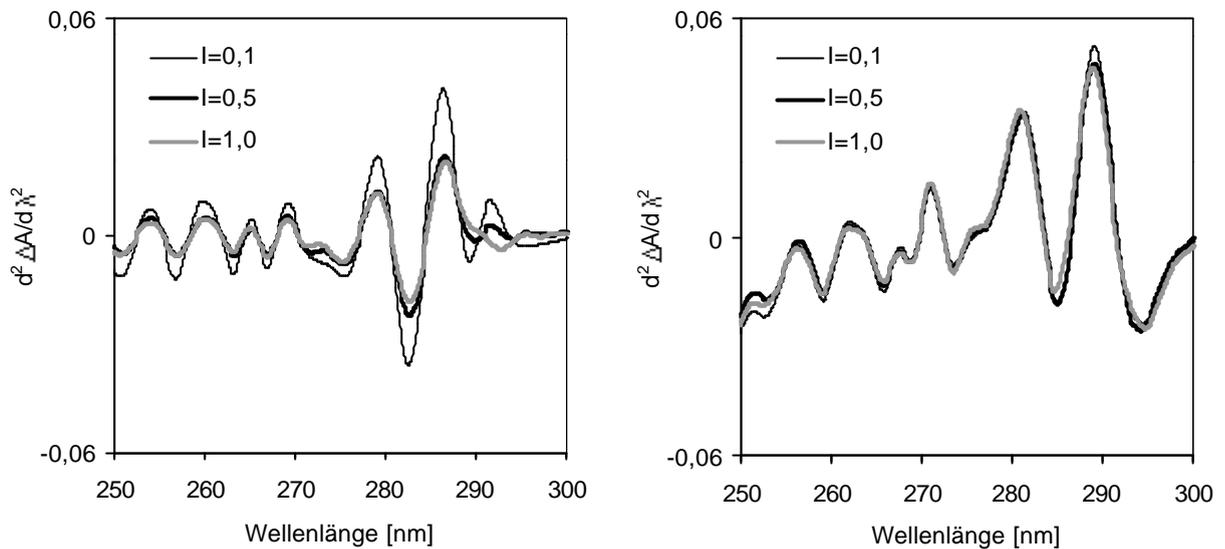
**Abbildung 55:** UV-Absorptionsspektren von 58% (links) und 98% (rechts) acetyliertem Legumin in Phosphatpuffern unterschiedlicher Ionenstärke



**Abbildung 56:** UV-Ableitungsspektren 2. Ordnung von 58% (links) und 98% (rechts) acetyliertem Legumin in Phosphatpuffern unterschiedlicher Ionenstärke

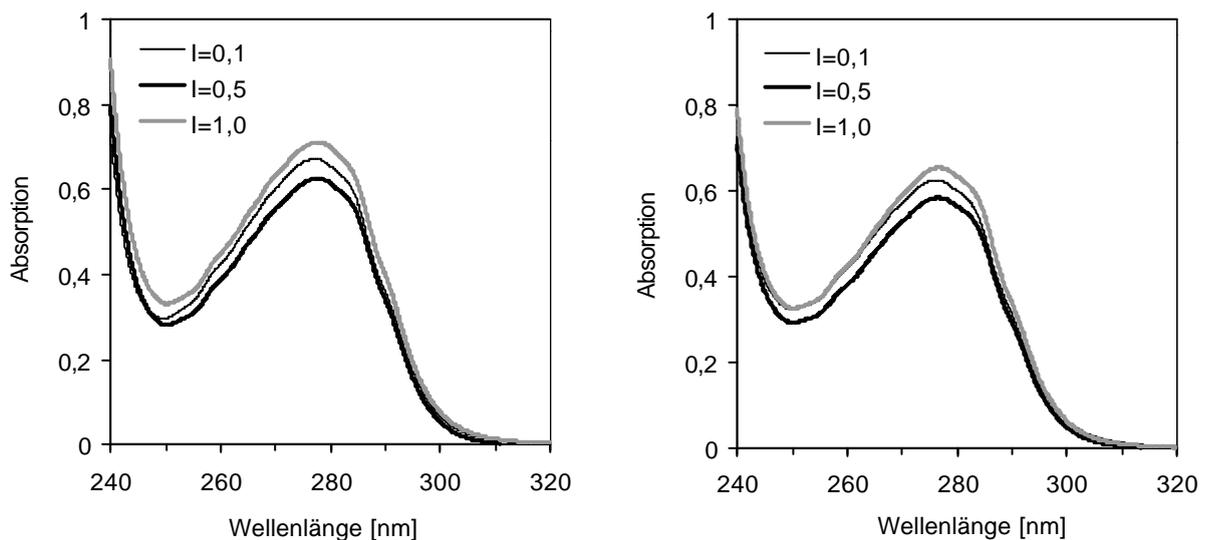
Der Einfluß der Ionenstärke auf das Verhältnis der Peak-zu-Peak-Abstände im Ableitungsspektrum 2. Ordnung nach RAGONE *et al.* [146], als Maß für die Tyrosin/Tryptophan-Exponierung, wurde berechnet. Die Werte sind **Tabelle 13** (S. 92) zu entnehmen. Die Abhängigkeit der a/b-Streckenverhältnisse von der Ionenstärke ist bei nativem und acetyliertem Legumin nicht signifikant. Die hochmodifizierte Probe weist,

im Gegensatz zum nativen Legumin, in niedriger Ionenstärke den Maximalwert der Tyrosin-Exponierung auf. Die Tyrosin-Exponierung der 58 % *N*-acetylierten Probe ist durch ein Minimum bei Standardionenstärke  $I=0,5$  gekennzeichnet.



**Abbildung 57:** Differenzableitungsspektren von 58% (links) und 98% (rechts) acetyliertem Legumin in Phosphatpuffern unterschiedlicher Ionenstärke

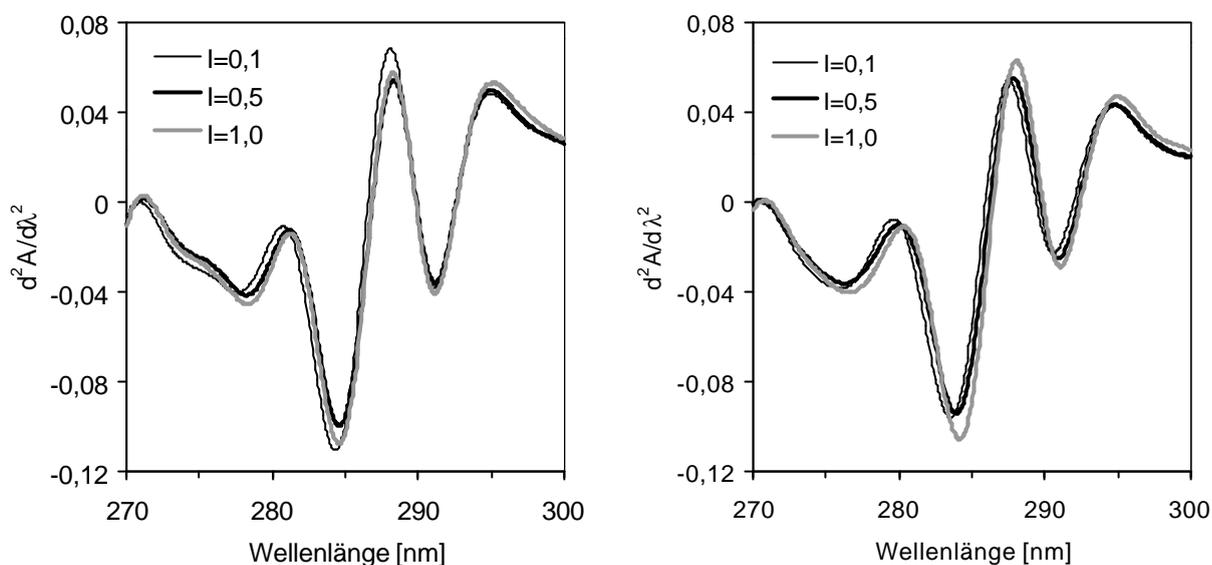
Die UV-Absorptionsspektren von 64 % und 99 % succinyliertem Legumin in Phosphatpuffern unterschiedlicher Ionenstärke sind in **Abbildung 58** dargestellt.



**Abbildung 58:** UV-Absorptionsspektren von 64% (links) und 99% (rechts) succinyliertem Legumin in Phosphatpuffern unterschiedlicher Ionenstärke

Beide succinylierte Leguminproben absorbieren bei hoher Ionenstärke ( $I=1,0$ ) am stärksten und bei Standardionenstärke ( $I=0,5$ ) am schwächsten.

Die Ableitungsspektren 2. Ordnung und die Differenzableitungsspektren succinylierter Leguminderivate sind **Abbildung 59** und **Abbildung 60** zu entnehmen.

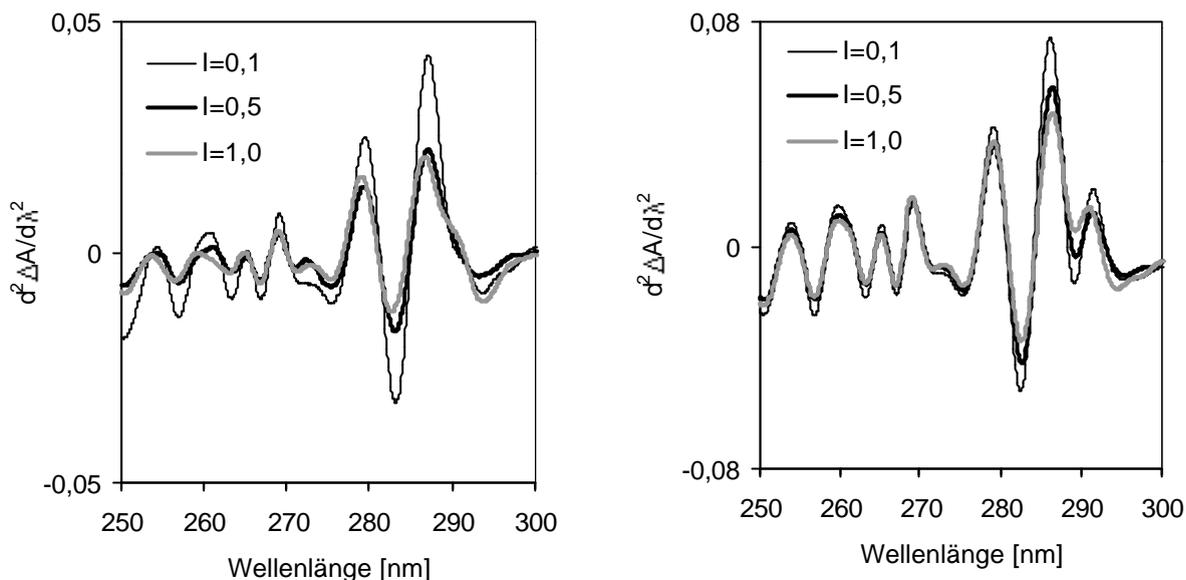


**Abbildung 59:** UV-Ableitungsspektren 2. Ordnung von 64% (links) und 99% (rechts) succinyliertem Legumin in Phosphatpuffern unterschiedlicher Ionenstärke

Im Falle der 64 % succinylierten Probe bewirkt der Puffer niedriger Ionenstärke ( $I=0,1$ ), insbesondere zwischen 278 nm und 289 nm, eine Blauverschiebung der UV-Banden um 0,5 nm gegenüber Standard- und hoher Ionenstärke. Der nach RAGONE *et al.* [146] ermittelte a/b-Quotient (s. **Tabelle 13**) für 64 % succinyliertes Legumin in Puffer der Ionenstärke  $I=0,1$  ist deutlich größer als in den beiden Puffern höherer Ionenstärke. Das deutet auf ein zugunsten des Tyrosins verschobenes Verhältnis der Tyr/Trp-Exponierung hin. Auch das Differenzableitungsspektrum verdeutlicht, daß die Unterschiede zwischen 64 % succinylierter und nativer Probe im Puffer der Ionenstärke  $I=0,1$  am gravierendsten sind.

Ebenso wie die Ableitungsspektren 2. Ordnung der 64 % succinylierten Probe sind die Ableitungsspektren des hochsuccinylierten Legumins durch eine geringfügige (1 nm) Rotverschiebung der UV-Banden mit steigender Ionenstärke gekennzeichnet. Die Exponierung von Tyrosin und Tryptophan erfolgt in allen drei Puffern in annähernd gleicher Weise (s. a/b-Quotienten in **Tabelle 13**). Auch die Differenzableitungsspektren aus hochsuccinyliertem und nativem Legumin weisen nur sehr geringe Unterschiede auf.

Abschließend wird darauf hingewiesen, daß ausgehend vom Standardphosphatpuffer weder die Erhöhung noch die Verringerung der Ionenstärke die durch die Acylierung bedingte leichte Blauverschiebung der UV-Banden verhindert.



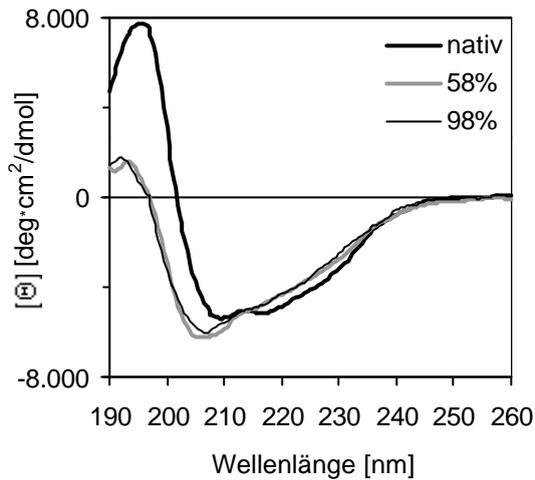
**Abbildung 60:** Differenzableitungsspektren von 64% (links) und 99% (rechts) succinyliertem Legumin in Phosphatpuffern unterschiedlicher Ionenstärke

**Tabelle 13:** Streckenverhältnis  $a/b$  berechnet aus den UV-Ableitungsspektren 2. Ordnung nach RAGONE et al. [146]

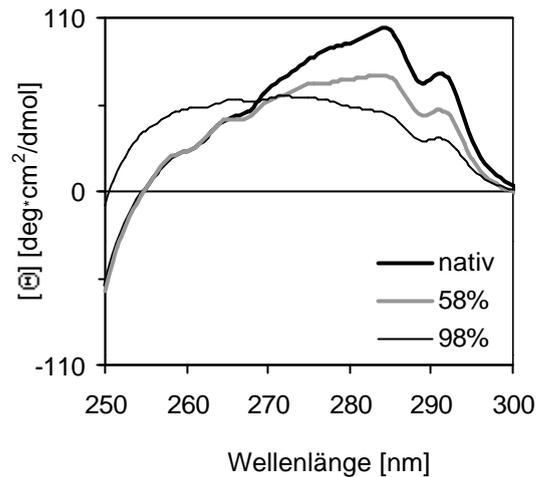
	nativ	58% ac	98% ac	64% suc	94% suc	99% suc
$I=0,1$	1,44	1,65	1,47	2,06	2,12	2,24
$I=0,5$	1,52	1,57	1,43	1,79	2,12	2,17
$I=1,0$	1,55	1,63	1,41	1,77	2,06	2,22

#### 4.2.4.3 Circulardichroitische Spektrometrie acylierter Leguminproben

Circulardichroitische Untersuchungen acetylierter Legumine erfolgten in Standardphosphatpuffer ( $I=0,5$ ). **Abbildung 61** und **Abbildung 62** zeigen die entsprechenden Spektren im fernen und nahen UV. Im CD-Spektrum des nativen Legumins im fernen UV deutet sich ein Doppelminimum bei 209 und 216 nm an, welches auf das Vorhandensein eines gewissen Anteils helikaler Strukturen hinweist. Die im fernen UV aufgenommenen CD-Spektren zeigen, daß bereits bei 58 % Acetylierung Änderungen in der Sekundärstruktur stattgefunden haben (Blauverschiebung des Minimums von 209 zu 206 nm). Die Spektren von 58 % und 98 % acetyliertem Legumin ähneln sich sehr und lassen dementsprechend ähnliche Sekundärstrukturen vermuten. Berechnungen von Strukturanteilen sind in **Tabelle 14** und **Abbildung 69** (S. 97) zusammengefaßt.



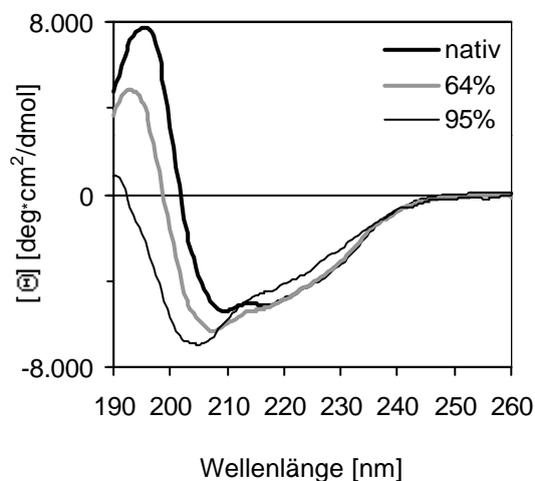
**Abbildung 61:** CD-Spektren von nativem und acetyliertem Legumin im fernen UV und Standardpuffer



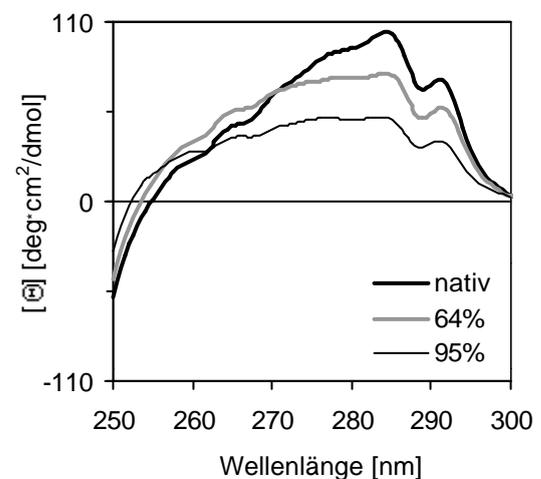
**Abbildung 62:** CD-Spektren von nativem und acetyliertem Legumin im nahen UV und Standardpuffer

Das CD-Spektrum des nativen Legumins im nahen UV weist ein Maximum bei 284 nm und ein Minimum bei 291 nm entsprechend den Tyrosin- und Tryptophan-Chromophoren auf. Die Acetylierung führt nicht zur Verschiebung der Maxima zwischen 280 und 300 nm. Im nahen UV nimmt die molare Elliptizität, besonders im Bereich des Tryptophans (Wellenlängenbereich 288-295 nm [147]) durch Acetylierung stufenweise ab. Das CD-Spektrum der vollständig acetylierten Probe zeigt außerdem Veränderungen im Bereich des Tyrosins (270-280 nm [147]) und eine Zunahme der Elliptizitäten bei Wellenlängen unter 270 nm.

**Abbildung 63** und **Abbildung 64** stellen die CD-Spektren succinylierter Legumine sowie die des nativen Legumins im fernen und nahen UV-Bereich dar.



**Abbildung 63:** CD-Spektren von nativem und succinyliertem Legumin im fernen UV und Standardpuffer



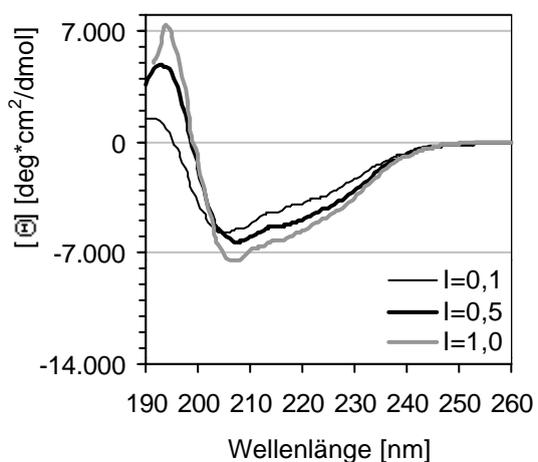
**Abbildung 64:** CD-Spektren von nativem und succinyliertem Legumin im nahen UV und Standardpuffer

Mit zunehmender Succinylierung verändert sich das CD-Spektrum im fernen UV. Die Änderung der Sekundärstruktur zeigt sich besonders bei den für helikale Strukturanteile typischen zwei Minima. Die Blauverschiebung der 216/209 nm-Doppelbande bis zu einer Wellenlänge von 205 nm (hochsuccinylierte Probe) weist auf Denaturationseffekte infolge Succinylierung hin. Auch das Maximum verschiebt sich aufgrund der Succinylierung von 64 % der Aminogruppen um 3 nm hypsochrom; das CD-Spektrum der vollständig succinylierten Probe bleibt bis  $\leq 190$  nm ohne Maximum. Differenzierte Aussagen zur Berechnung der Sekundärstrukturanteile aus den Fern-UV-CD-Spektren sind **Tabelle 14** und **Abbildung 69** zu entnehmen.

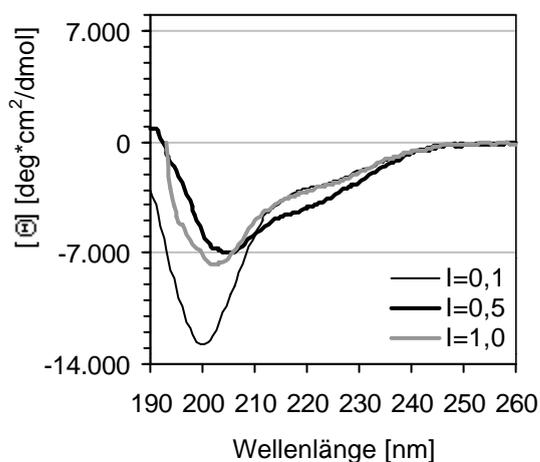
Die CD-Spektren im nahen UV (**Abbildung 64**) zeigen nach Einführung von Succinylgruppen deutliche Veränderungen sowohl im Bereich der Tryptophan- als auch der Tyrosin-Absorptionsbanden (291 nm und 284 nm). Der Verlauf der CD-Spektren von 64 % und 95 % succinylierten Leguminproben ähnelt sich, aber die Elliptizität nimmt mit zunehmender Succinylierung des Proteins ab.

#### *Ionenstärkeabhängigkeit des CD von nativem und succinyliertem Legumin*

Unmodifiziertes, sowie teilweise succinyliertes und hochsuccinyliertes Legumin wurden in Phosphatpuffern unterschiedlicher Ionenstärke untersucht. In **Abbildung 65** und **Abbildung 66** sind die CD-Spektren succinylierter Proben im fernen UV-Bereich, in **Abbildung 67** und **Abbildung 68** die CD-Spektren im nahen UV dargestellt. Der Puffer hoher Ionenstärke ( $I=1,0$ ) ist für die Aufnahme von CD-Spektren im fernen UV relativ ungeeignet, weil die hohe Ionendichte die Aufnahme des Spektrums unterhalb 195 nm (hochmodifizierte Probe) bzw. 192 nm verhindert.



**Abbildung 65:** Fern-UV-CD-Spektren von 64 % succinyliertem Legumin in Puffern unterschiedlicher Ionenstärke



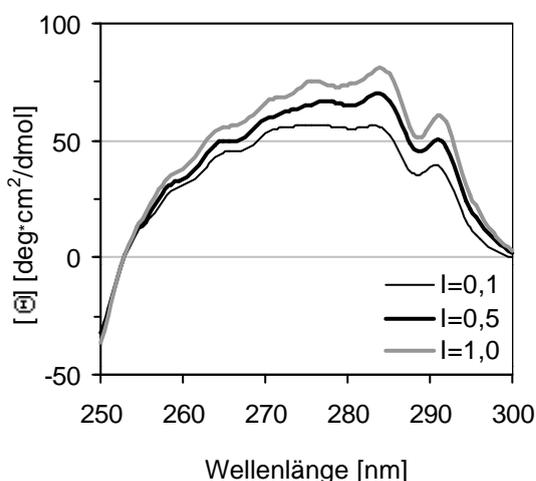
**Abbildung 66:** Fern-UV-CD-Spektren von 99 % succinyliertem Legumin in Puffern unterschiedlicher Ionenstärke

Die CD-Spektren von nativem Legumin in den Phosphatpuffern unterschiedlicher Ionenstärke verlaufen im fernen UV-Bereich quasi identisch und sind daher nicht abgebildet (zum Vergleich siehe natives Legumin in Standardpuffer in **Abbildung 63**).

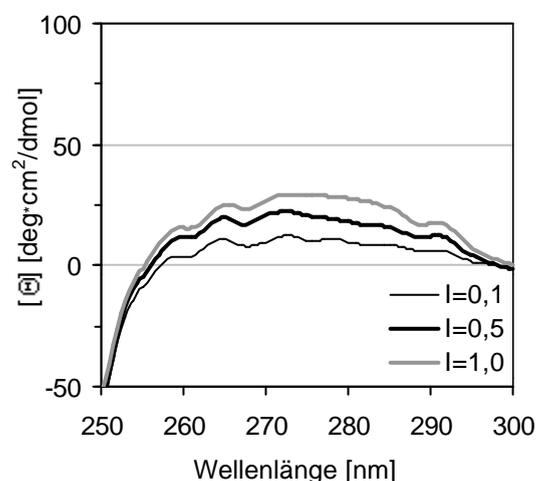
**Abbildung 65** zeigt deutlich, daß die gemessenen Elliptizitäten (Maximum und Minimum) 64 % succinylierter Ackerbohnen-Legumine im fernen UV mit steigender Salzionenkonzentration zunehmen. Das Minimum verschiebt sich in niedriger Ionenstärke um 3 nm zu einer Wellenlänge von 204 nm (Blauverschiebung). Auch bei 99 % Succinylierung hängt die Sekundärstruktur stark von der Ionenstärke des Lösungsmittels ab (**Abbildung 66**). Zu besonders deutlichen Veränderungen der Sekundärstruktur dieser Probe kommt es in Puffer niedriger Ionenstärke. Mit dem Minimum der Elliptizität bei einer Wellenlänge von nur 199 nm entspricht das CD-Spektrum der für ungeordnete Konformation bekannten Kurvenform.

Zur Ionenstärkeabhängigkeit der berechneten Sekundärstrukturanteile siehe **Tabelle 15**.

Im nahen UV weisen die CD-Spektren der nativen und der teilweise succinylierten Probe in den Puffern mit  $I=0,1$  und  $I=0,5$  zwei Maxima auf: bei 291 nm (Trp) und 284 nm (Tyr, Trp). Der Nah-UV-CD des nativen Legumins ist in den drei untersuchten Phosphatpuffersystemen quasi identisch und daher nicht abgebildet (zum Vergleich siehe natives Legumin in Standardpuffer in **Abbildung 64**).



**Abbildung 67:** Nah-UV-CD-Spektren von 64 % succinyliertem Legumin in Puffern unterschiedlicher Ionenstärke



**Abbildung 68:** Nah-UV-CD-Spektren von 99 % succinyliertem Legumin in Puffern unterschiedlicher Ionenstärke

Die Nah-UV-CD-Spektren von 64 % N-succinyliertem Legumin (**Abbildung 67**) ändern sich in Abhängigkeit von der Ionenstärke des Lösungsmittels. Die Elliptizität nimmt mit höherer Ionenstärke zu. Bei einer Wellenlänge von 284 nm steigt der Wert der molaren

Elliptizität von  $55 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$  bei niedriger Ionenstärke auf  $\Theta = 80 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$  in Phosphatpuffer der Ionenstärke 1,0.

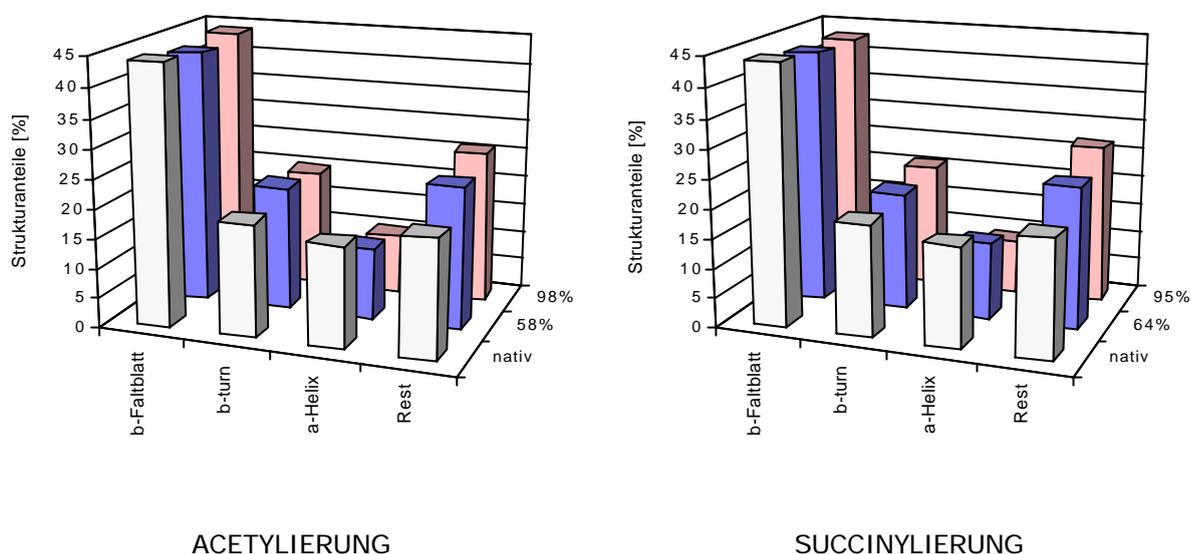
Die CD-Spektren der hochsuccinylierten Probe (**Abbildung 68**), bei denen unabhängig von der Ionenstärke ohnehin nur sehr geringe Elliptizitäten gemessen werden, verhalten sich ähnlich. Der geringe Circular dichroismus der aromatischen Reste weist auf das Fehlen von größeren Anteilen an geordneten Strukturen hin [119]. Die Spektren spiegeln dennoch den stabilisierenden Effekt hoher Ionenstärke auf die übrige Tertiärstruktur wider. Die molare Elliptizität bei 284 nm Wellenlänge steigt von  $8 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$  ( $I=0,1$ ) auf  $\Theta = 25 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$  ( $I=1,0$ ).

#### *Berechnungen von Sekundärstrukturanteilen*

CD-Banden im nahen UV-Bereich (250–320 nm) entstehen durch die Absorption an den aromatischen Seitenketten. Sie wird beobachtet, wenn in den Chromophoren durch deren unmittelbare Umgebung eine elektronische Chiralität induziert wird, z. B. durch die Faltung und Entfaltung eines Proteins. Auf diese Weise enthält der Circular dichroismus Informationen über die Tertiärstruktur.

Es gibt eine große Anzahl an statistischen Auswerteprogrammen, um die Sekundärstrukturanteile eines Proteins anhand seines CD-Spektrums im fernen UV vorauszusagen, da diese Spektren im Spektralbereich der Amidchromophore (170–250 nm) hauptsächlich von der Sekundärstruktur der Polypeptidketten im Protein (Peptidbindungen) bestimmt werden. Sie beruhen auf der Annahme, daß ein Protein-CD-Spektrum in diesem Bereich als lineare Kombination der Beiträge der unterschiedlichen Sekundärstrukturen (Helix,  $\beta$ -Faltblatt, turn- und nichtreguläre, auch als "Rest" bezeichnete Strukturen) dargestellt werden kann. Die verschiedenen Methoden zur Berechnung der Sekundärstrukturanteile unterscheiden sich vor allem durch die Anzahl und Auswahl der Basisspektren, sowie im mathematischen Formalismus und der Auswahl der Selektionskriterien. Für die von mir aufgenommenen Spektren bot sich die Methode nach PROVENCHER & GLÖCKNER [34] (Computerprogramm *CONTIN*) an, die bereits in früheren Arbeiten an ähnlichen Proteinen [33, 131] herangezogen worden ist. Zugrunde liegen die CD-Spektren von 17 strukturell aufgeklärten Proteinen als Referenzspektren. Bevorzugt wurde von mir die nach JOHNSON [148] modifizierte *CONTIN*-Methode der Auswertung, die, abgesehen von der Übereinstimmung mit den typischen Referenzspektren, die Lösung mit den geringsten Freiheitsgraden auswählt. Für die Berechnung von Sekundärstrukturanteilen nach dieser Methode müssen die CD-Spektren, analog den Referenzspektren, im Bereich von 190-240 nm aufgenommen werden. Da das jedoch im Phosphatpuffer der Ionenstärke  $I=1,0$  nicht möglich war, sind die für dieses Puffersystem dennoch angegebenen berechneten Strukturanteile mit großer Unsicherheit behaftet. Es wird darauf hingewiesen, daß

die Berechnung der Sekundärstrukturanteile generell eher den Charakter einer Abschätzung hat. **Abbildung 69** zeigt die Änderung der berechneten Sekundärstrukturanteile mit zunehmender Acetylierung und Succinylierung. Die entsprechenden Werte sind **Tabelle 14** zu entnehmen.



**Abbildung 69:** Änderung der Sekundärstrukturanteile durch Acylierung von Legumin in Standardpuffer, berechnet nach PROVENCHER & GLÖCKNER [34], modifiziert nach JOHNSON [148]

**Tabelle 14:** Sekundärstrukturanteile acylierter Ackerbohnen-Legumine in Standardpuffer, berechnet nach PROVENCHER & GLÖCKNER [34], modifiziert nach JOHNSON [148]. Der Fehler der Methode beträgt  $\pm 1\%$ .

	$\beta$ -Faltblatt [%]	$\beta$ -turn [%]	$\alpha$ -Helix [%]	Rest [%]
nativ	44	19	17	20
58% Acetylierung	43	21	12	24
98% Acetylierung	44	20	10	26
64% Succinylierung	43	20	13	24
95% Succinylierung	43	21	9	27

Sowohl bei der Acetylierung als auch durch die Succinylierung nimmt der Anteil an  $\alpha$ -helikalen Strukturen ab, während der Anteil an  $\beta$ -Strukturen fast konstant bleibt. Dementsprechend erhöht sich der Anteil ungeordneter Strukturen.

Der Einfluß der Ionenstärke des Lösungsmittels auf die Sekundärstruktur von nativem und succinyliertem Legumin wurde anhand der CD-Spektren im fernen UV untersucht und ebenfalls mit dem Auswerteverfahren nach PROVENCHER & GLÖCKNER [34], modifi-

ziert nach JOHNSON [148], quantifiziert. Die Ergebnisse sind **Tabelle 15** zu entnehmen. Die für Puffer der Ionenstärke  $I=1,0$  berechneten, in Klammern angegebenen, Werte sind wegen der bereits beschriebenen Gründe nicht abgesichert.

**Tabelle 15:** Sekundärstrukturanteile von nativem Legumin und succinylierten Leguminderivaten in Phosphatpuffern unterschiedlicher Ionenstärke, berechnet nach der Methode von PROVENCHER & GLÖCKNER [34], modifiziert nach JOHNSON [148] (Fehler  $\pm 1$  %)

		$\beta$ -Faltblatt [%]	$\beta$ -turn [%]	$\alpha$ -Helix [%]	Rest [%]
nativ	$I=0,1$	49	25	14	13
	$I=0,5$	44	19	17	20
	$I=1,0$	(45)	(19)	(14)	(22)
64% suc	$I=0,1$	46	21	8	26
	$I=0,5$	43	20	13	24
	$I=1,0$	(40)	(20)	(17)	(23)
99% suc	$I=0,1$	44	22	5	30
	$I=0,5$	43	21	9	27
	$I=1,0$	(42)	(23)	(7)	(29)

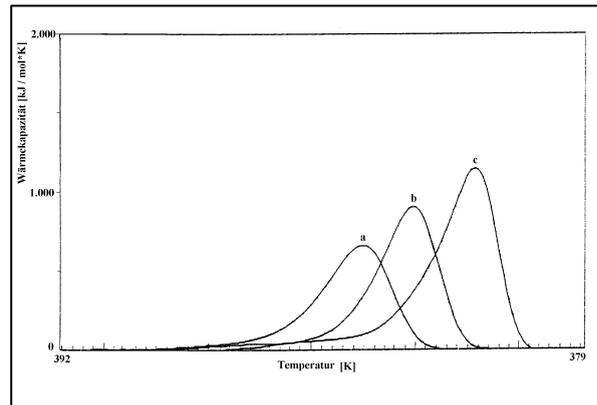
Für natives Legumin wurden höhere Anteile an  $\beta$ -Faltblatt und  $\beta$ -turns in Puffer niedriger Ionenstärke berechnet. Der berechnete Anteil an  $\alpha$ -Helix ist mit 17 % im Standardpuffer ( $I=0,5$ ) etwas höher als in niedriger Ionenstärke ( $I=0,1$ ).

Auch bei der 64 % succinylierten Probe wird durch die Erhöhung der Ionenstärke der Anteil an  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen herabgesetzt. Unter Einbeziehung des möglichen Fehlers ist der Unterschied jedoch nicht signifikant. In der Hauptsache ist die Abnahme  $\alpha$ -helikaler Strukturen entsprechend einer geringeren Stabilisierung bei niedriger Ionenstärke zu verzeichnen.

Die Sekundärstruktur der erschöpfend succinylierten Probe ist den Fern-UV-CD-Spektren zufolge von der Ionenstärke wenig abhängig. Die errechneten  $\beta$ -Strukturanteile ändern sich lediglich im Fehlerbereich der Methode. In allen drei Puffersystemen wurden mit einem Anteil von weniger als 10 % nur sehr geringe  $\alpha$ -Strukturbereiche (am geringsten bei  $I=0,1$ ), zugunsten erhöhter nichtregulärer Strukturanteile, berechnet.

#### 4.2.5 Thermostabilität acylierter Leguminproben

In **Abbildung 70** sind die DSC-Thermogramme von nativem Legumin bei Standardionenstärke ( $I=0,5$ ), mittlerer ( $I=0,22$ ) und niedriger ( $I=0,1$ ) Ionenstärke und in **Abbildung 71** die Ionenstärke-Abhängigkeit der Denaturationstemperatur ( $T_d$ ) und der kalorimetrischen Enthalpie ( $\Delta H_{cal}$ ) dargestellt.

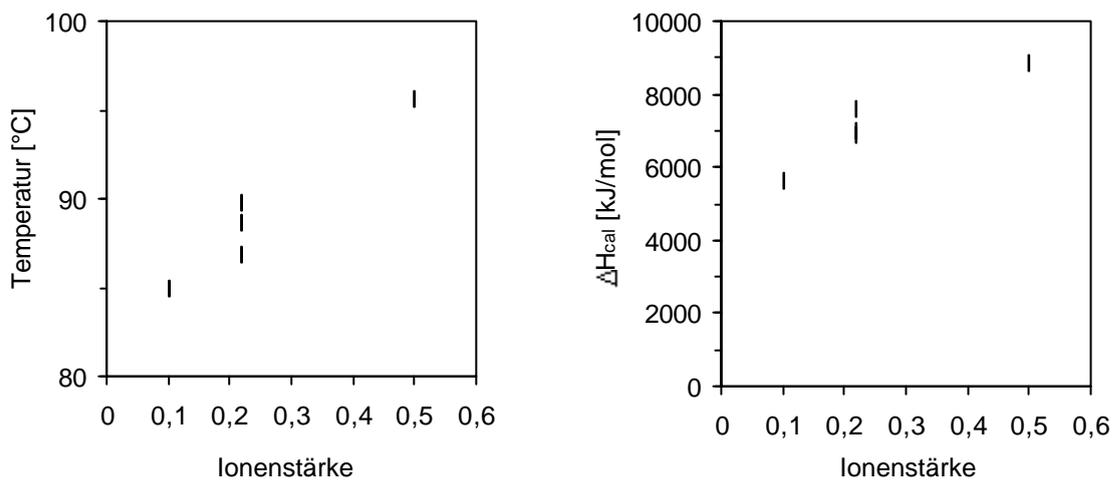


**Abbildung 70:** Normierte Thermogramme von nativem Legumin in Na-/K-Phosphatpuffer pH 8,0 unterschiedlicher Ionenstärke eingestellt mit NaCl

a: 0,01 M Phosphatpuffer mit 0,076 M NaCl;  $I = 0,1$

b: 0,05 M Phosphatpuffer mit 0,1 M NaCl;  $I = 0,22$

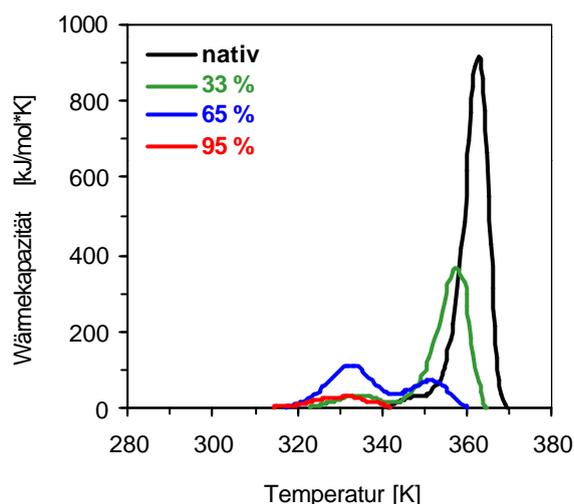
c: 0,05 M Phosphatpuffer mit 0,38 M NaCl;  $I = 0,5$



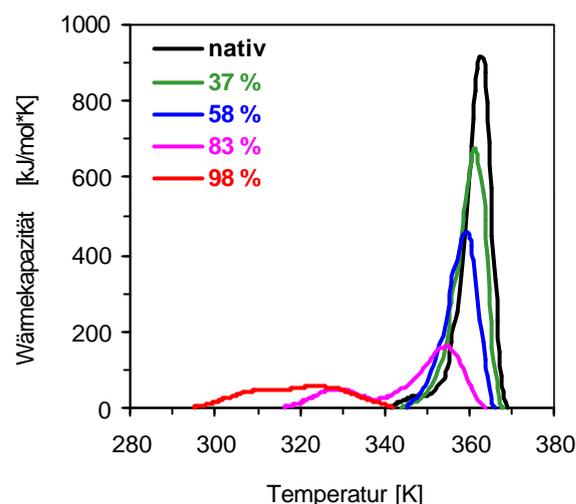
**Abbildung 71:** Abhängigkeit der Denaturationstemperatur  $T_d$  (links) und der kalorimetrischen Enthalpie  $\Delta H_{cal}$  (rechts) des nativen Legumins von der Ionenstärke des Lösungsmittels (PB)

Die Denaturationstemperatur von Legumin steigt mit Erhöhung der Ionenstärke von 84,9 °C auf 95,6 °C und der Enthalpie-Wert von 5647 auf 8868 kJ/mol entsprechend dem zunehmenden Stabilisierungseffekt hoher Salzionenkonzentrationen (s. dazu [149]).

Die normierten DSC-Thermogramme von nativem Legumin und einigen succinylierten Derivaten sind in **Abbildung 72**, die von ausgewählten acetylierten Proben in **Abbildung 73** dargestellt.



**Abbildung 72:** Normierte Thermogramme von Leguminproben unterschiedlichen Succinylierungsgrades sowie von nativem Legumin in 0,05 M Phosphatpuffer pH 8 mit 0,1 M NaCl



**Abbildung 73:** Normierte Thermogramme von Leguminproben unterschiedlichen Acetylierungsgrades sowie von nativem Legumin in 0,05 M Phosphatpuffer pH 8 mit 0,1 M NaCl

Die DSC-Thermogramme zeigen, daß die Denaturation von Legumin bzw. seinen acylierten Derivaten von recht komplexem Charakter ist. Das Denaturationsthermogramm von nativem Legumin weist unter den beschriebenen Bedingungen einen asymmetrischen Wärmeabsorptionspeak mit einer Denaturationstemperatur von 363 K auf. Das entsprechende Sedimentationsdiagramm (**Abbildung 27a**) zeigt eine Hauptkomponente mit einem Sedimentationskoeffizienten von etwa 12 S.

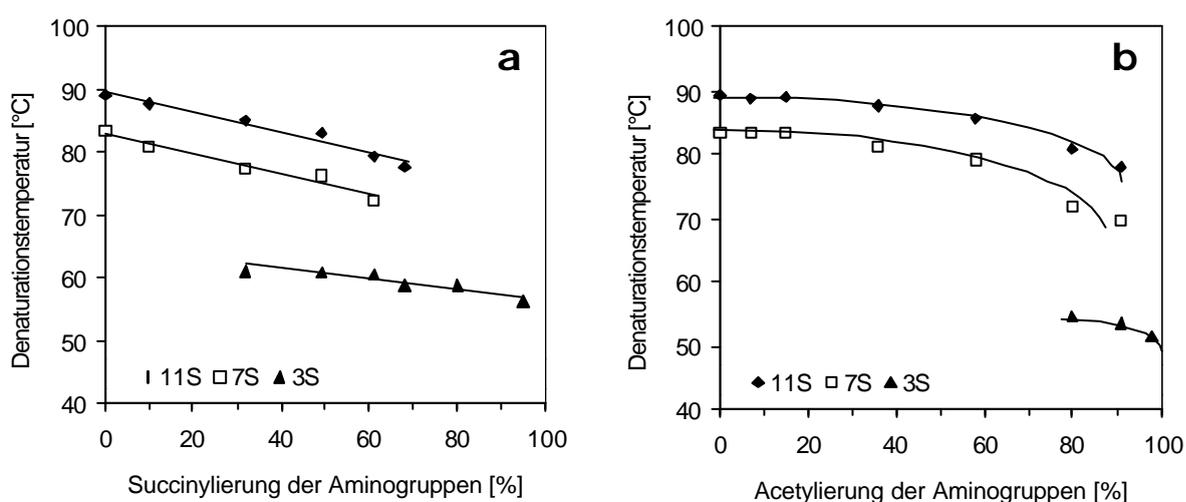
Die Thermogramme der 30-80 % succinylierten und der 70-90 % acetylierten Proben sind (mindestens) bimodal. Sie bestehen aus teilweise überlappenden Peaks, die thermodynamisch differenzierten Übergängen entsprechen. Das Thermogramm der 33 % succinylierten Probe zeigt einen Hauptpeak mit einer Denaturationstemperatur von 357 K und einen Nebenpeak bei 335 K. Bei einer Probe mit 65 % succinylierten Aminogruppen ist dagegen der Denaturationspeak bei 332 K der Hauptpeak und die Denaturationsenthalpie des Überganges bei  $T_d = 351$  K geringer. Das Thermogramm der nahezu vollständig *N*-succinylierten Leguminprobe läßt nur einen sehr breiten „Peak“ sehr geringer Fläche und mit einer Denaturationstemperatur von etwa 333 K erkennen; bei hinzukommender vollständiger Succinylierung der Hydroxylgruppen sinkt die thermodynamische Stabilität weiter ( $T_d = 327$  K, ohne Abbildung).

Die Bimodalität der Thermogramme zeigt sich bei den acetylierten Leguminproben erst ab etwa 70 % *N*-Blockierung. Das in **Abbildung 73** gezeigte Thermogramm eines 83 % acetylierten Präparates weist einen Hauptpeak mit einer Denaturationstemperatur von 355 K und einen Nebenpeak mit  $T_d = 330$  K auf. Die 91 % acetylierte Leguminprobe (ohne Abbildung) weist neben 3-4 K geringeren Denaturationstemperaturen auch eine Ver-

änderung im Verhältnis der Denaturationsenthalpien auf: es verschiebt sich zugunsten der Komponente mit  $T_d = 327\text{ K}$  ( $\Delta H_{cal,351\text{K}} < \Delta H_{cal,327\text{K}}$ ). Die quasi vollständige Acetylierung von Legumin führt zu einem Thermogramm mit einem extrem breiten Peak geringer Fläche und einer Denaturationstemperatur von etwa 327 K.

Um die relative Fläche für jeden dieser Peaks zu bestimmen und daraus die „Teilenthalpien“ für den jeweiligen Übergang ermitteln zu können, erfolgte die formalistische mathematische Auftrennung der komplexen Thermogramm-Kurven in separate, einfachere Gausskurven (Deconvolution). Durch die Deconvolution wurde für die succinylierten (bis etwa 60 %) und acetylierten (bis etwa 90 %) Leguminproben ein weiterer thermodynamischer Übergang errechnet ( $T_d = 356\text{--}345\text{ K}$ ), dessen Integral jedoch nur einen geringen prozentualen Anteil (bis maximal 15 %) an der totalen Denaturationsenthalpie ausmacht. Die Zuordnung der, durch die Aufspaltung des Legumin-Denaturationspeaks infolge Acylierung entstandenen einzelnen „Teildenaturationspeaks“ kann nur im Zusammenhang mit den Ergebnissen der analytischen Ultrazentrifugation erfolgen (s. Diskussion). In Übereinstimmung mit den Daten zur Legumin-Quartärstruktur (Kap. 4.2.2.2) kann man den Peak mit einer Denaturationstemperatur von 363–351 K der Denaturation des (modifizierten) 11 S-Hexamers und die Denaturation bei 334–327 K dem modifizierten 3 S-Monomer zuschreiben (s. auch [150]). Der kalkulierte Peak mit Denaturationstemperaturen, die zwischen denen des „11 S“- und des „3 S“-Proteins liegen, könnte aus der Denaturation des 7S-Legumin-Intermediates resultieren, was im Fall der Succinylierung mit den Ergebnissen der Ultrazentrifugationsmessungen korreliert.

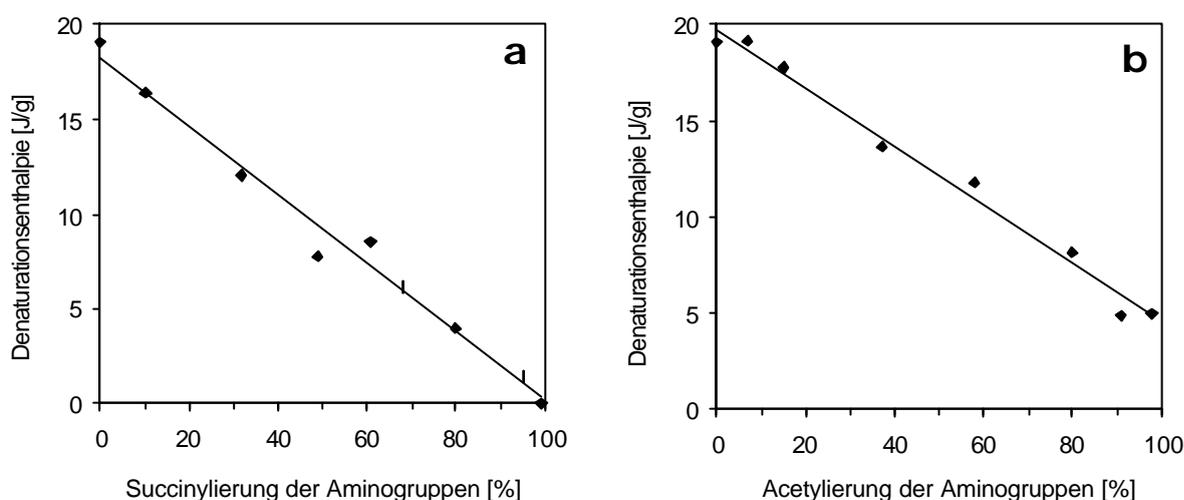
**Abbildung 74** gibt die Änderungen der Denaturationstemperaturen mit fortschreitender Succinylierung und Acetylierung für die nach Deconvolution separierten und den drei Komponenten zugeordneten Peaks wieder.



**Abbildung 74:** Abhängigkeit der Denaturationstemperaturen  $T_d$  der den oligomeren Formen des Legumins zugeordneten Peaks nach Deconvolution vom Grad der Acylierung (a = Succinylierung; b = Acetylierung)

Die Denaturationstemperatur jeder Komponente sinkt sowohl bei der Succinylierung als auch bei der Acetylierung mit steigendem Modifizierungsgrad, wobei die Abstufung  $T_d(11\text{ S}) > T_d(7\text{ S}) > T_d(3\text{ S})$  gilt.

Die Änderung der totalen spezifischen Enthalpie der Legumin-Denaturation  $\Delta H_{cal}$  (Summe aller „Teildenaturationsenthalpien“) in Abhängigkeit vom Grad der Proteinmodifizierung ist in **Abbildung 75** dargestellt. Die  $\Delta H_{cal}$ -Werte fallen mit zunehmendem Acylierungsgrad entsprechend sinkender Konformationsstabilität; bei vollständiger Succinylierung geht  $\Delta H_{cal}$  gegen Null.



**Abbildung 75:** Abhängigkeit der totalen spezifischen Denaturationsenthalpie  $\Delta H_{cal}$  vom Grad der Acylierung (**a** = Succinylierung; **b** = Acetylierung)

Die auf der Grundlage der DSC-Messungen ermittelten thermodynamischen Parameter von ausgewählten Proben sind **Tabelle 16** zu entnehmen.

**Tabelle 16:** Mikrokalorimetrisch (DSC) ermittelte thermodynamische Parameter von nativem Legumin und einigen ausgewählten acylierten Derivaten im Vergleich

	nativ	33 % suc	37 % ac	96 % suc	98 % ac
$T_d$ [K]	$363 \pm 1$	$358 \pm 1$	$362 \pm 1$	$327 \pm 2$	$327 \pm 2$
$\Delta H_{cal}$ [J/g]	$20 \pm 1$	$11 \pm 0,5$	$16 \pm 0,5$	$\sim 1$	$\sim 5$
$\Delta C_p$ [J/gK]	$0,31 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,01$	0,02	$0,23 \pm 0,02$

Der Wert  $\Delta H_{cal}$  beschreibt die totale Denaturationsenthalpie des Proteins, die angegebene Denaturationstemperatur bezieht sich auf den Hauptpeak des jeweiligen Thermogramms.

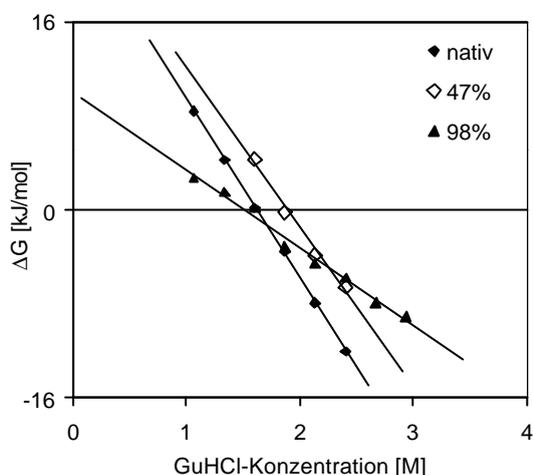
Die Denaturationstemperatur der 37 % N-acetylierten Leguminprobe ist in Rahmen des Fehlers der Bestimmungsmethode gleich dem Wert des nativen Legumins. Dagegen führt

die Succinylierung von nur 33 % der Aminogruppen zur Herabsetzung der Konformationsstabilität, die sich u. a. in der um etwa 5 K verringerten Denaturationstemperatur äußert. Hochacetylierte und -succinylierte Legumine denaturieren bei etwa der gleichen Temperatur und zwar bei wesentlich geringerer Temperatur als das native Legumin. Die totale Denaturationsenthalpie  $\Delta H_{cal}$  wird durch die Acylierung der funktionellen Gruppen des Legumins grundsätzlich verringert. Die Succinylierung bewirkt eine stärkere Abnahme von  $\Delta H_{cal}$  als die Acetylierung bei einer Modifizierung von etwa der gleichen Anzahl Aminogruppen. Der Enthalpie-Wert der hochgradig *N*- und *O*-succinylierten Probe ist im Vergleich zum Wert des nativen Legumins verschwindend gering. Das beweist, daß das Protein bereits vor der thermischen Belastung in weitestgehend denaturierter Form vorgelegen haben muß. Ebenso nimmt die Änderung der Wärmekapazität durch die thermische Entfaltung,  $\Delta C_p$ , insbesondere bei hoher Succinylierung stark ab; Wärmekapazität von ge- und entfaltetem (3 S-)Protein sind fast gleich. Auch das zeigt, daß das Protein weitgehend entfaltet vorliegt. Im Gegensatz dazu weisen die thermodynamischen Daten der hochacetylierten Probe auf das Vorhandensein restlicher Strukturen hin (vgl. Nah-UV-CD-Spektren der Proben in **Abbildung 62 und Abbildung 68**). Die Denaturationsenthalpie hochacetylierter Leguminproben ist gering aber deutlich höher als nach erschöpfender Succinylierung, und auch die Wärmekapazitäten von ge- und entfaltetem Protein unterscheiden sich beträchtlich.

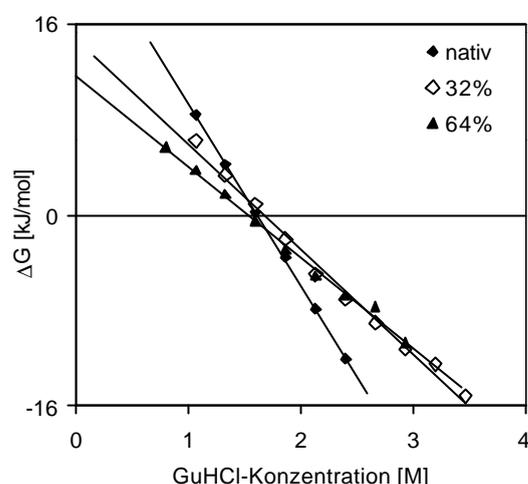
#### 4.2.6 Denuransstabilität acylierter Leguminproben

Es wurde nachgewiesen, daß die Guanidiniumchlorid- (GuHCl) und die Harnstoff-induzierte Denaturation von nativem Legumin reversibel verlaufen. Die Reversibilität der Entfaltung acylierter Legumine mit Harnstoff konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Nach erfolgter Renaturation wurden 20-30 % geringere Fluoreszenzintensitäten gemessen. Die Reversibilität der Entfaltung mittels Guanidiniumchlorid wurde an folgenden Leguminpräparaten unterschiedlicher Acylierungsgrade untersucht: 47 %, 77 % und 98 % *N*-Acetylierung sowie 32 %; 49 %; 64 %; 79 %; 98 % *N*-Succinylierung. Die Rückfaltung der acetylierten Proben erfolgt zu etwa 90 %. Bei den succinylierten Präparaten konnte die (mindestens 95 %ige) Reversibilität der Entfaltung bis zu einem Modifizierungsgrad von einschließlich 64 % der Aminogruppen nachgewiesen werden. Bei allen höheren Succinylierungsgraden wurde nach der Rückfaltung eine Zunahme der Fluoreszenz gemessen, die besonders bei vollständiger Succinylierung mit einer Fluoreszenzzunahme von 35 % beträchtlich ist. Aus diesen Gründen wurde die Untersuchung der Denuransstabilität bei den acetylierten Präparaten auf die zu etwa 50 % und die vollständig modifizierte Probe beschränkt. Auf die Untersuchung von höher als 64 % *N*-succinylierten Leguminproben wurde verzichtet, und nur für die übrigen Proteine mit nachgewiesener Rever-

sibilität der Entfaltung wurden die Entfaltungskurven aufgenommen. Die jeweiligen Veränderungen der freien Energie  $\Delta G$  während der Entfaltung sind in **Abbildung 76** und **Abbildung 77** dargestellt und die daraus berechneten charakterisierenden Größen in **Tabelle 17** zusammengefaßt.



**Abbildung 76:** Änderung der freien Energie der Entfaltung von acetyliertem Legumin in Abhängigkeit von der GuHCl-Konzentration



**Abbildung 77:** Änderung der freien Energie der Entfaltung von succinyliertem Legumin in Abhängigkeit von der GuHCl-Konzentration

**Tabelle 17:** Thermodynamische Parameter berechnet aus den GuHCl-Entfaltungskurven von nativem und acyliertem Legumin

	$\Delta G_{\text{Puffer}}$ [kJ/mol]	$[\text{GuHCl}]_{1/2}$ [M]	$m$ [kJ/mol/M]
Legumin	$24,64 \pm 1,0$	$1,62 \pm 0,1$	$15,23 \pm 1,0$
47 % Acetylierung	$25,49 \pm 0,8$	$1,88 \pm 0,1$	$13,57 \pm 1,0$
98 % Acetylierung	$10,00 \pm 0,4$	$1,51 \pm 0,1$	$6,64 \pm 0,3$
32 % Succinylierung	$14,83 \pm 0,5$	$1,68 \pm 0,1$	$8,82 \pm 0,4$
49 % Succinylierung	$10,79 \pm 0,5$	$1,53 \pm 0,1$	$7,14 \pm 0,3$
64 % Succinylierung	$11,63 \pm 0,5$	$1,54 \pm 0,1$	$7,56 \pm 0,3$

Die Acylierung von Legumin führt erwartungsgemäß zur Veränderung der Denaturansstabilität.

Die Acetylierung von 47 % der Aminogruppen bewirkt kaum eine Stabilitätsänderung gegenüber dem Denaturans. Die hohe Strukturstabilität der 47 % *N*-acetylierten Probe wird vor allem durch den unverändert hohen  $\Delta G_{\text{Puffer}}$ -Wert als ein Maß der Denatu-

ransstabilität beschrieben. Der Wert der Denaturanshalbwertkonzentration  $[GuHCl]_{1/2}$  ist gegenüber dem des nativen Legumins leicht erhöht. Die vollständig acetylierte Leguminprobe ist gegenüber Guanidiniumchlorid wesentlich instabiler als natives oder nur teilweise acetyliertes Legumin; ihr  $\Delta G_{Puffer}$ -Wert ist deutlich geringer. Der  $m$ -Wert als Maß für die Abhängigkeit der Denaturansstabilität von der Denaturanskonzentration sinkt mit zunehmender Acetylierung von 49 % auf 98 % weiter.

Im Falle der Succinylierung sinkt die Denaturansstabilität von Legumin bereits durch die Modifizierung von 32 % der Aminogruppen stark und mit fortschreitender Succinylierung von 32 % auf 49 % weiter. Eine Erhöhung des Anteils an Succinylgruppen auf 64 % bewirkt dagegen keine fortschreitende Verringerung der Denaturansstabilität. Die Denaturanshalbwertkonzentrationen der 49 und 64 % succinylierten Präparate unterscheiden sich nur im Fehlerbereich der Bestimmungsmethode. Die Abhängigkeit der Denaturansstabilität von der Guanidiniumchloridkonzentration sinkt durch die Modifizierung, jedoch auch nur bis zu einem Anteil von etwa 50 % succinylierten Aminogruppen. Aussagen über die Denaturansstabilität der Konformation hochgradig succinylierter Ackerbohnen-Legumine können wegen der Irreversibilität der Denaturation nicht getroffen werden.

## 5 Diskussion

- *Succinylierung und Acetylierung: Dissoziation und Assoziation*

Zur Interpretation der durch Acylierung bewirkten strukturellen Veränderungen im Ackerbohnen-Legumin werden, neben den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen, Strukturvorhersagen für das native 11 S-Protein [51, 151] sowie die Hydrophathie-Profile der konstituierenden Polypeptidketten der A- und B-Untereinheiten herangezogen. Zur Erstellung der Hydrophathie-Profile wurde die Methode von KYTE & DOOLITTLE [152] benutzt. Die zugrundeliegenden Aminosäuresequenzen entstammen den Arbeiten von SCHLESIER *et al.* [128] und BÄUMLEIN *et al.* [56]. Folgende Betrachtungen zur Acylierung der Amino- (Lysin) und Hydroxylgruppen (Serin, Threonin, Tyrosin) und damit einhergehenden strukturellen Veränderungen des Proteins können angestellt werden.

Von den 21 **Lysin**resten der A-Typ-Untereinheit des Leguminmoleküls sind 11 in der  $\alpha$ -Kette und 10 in der  $\beta$ -Kette lokalisiert. Von den insgesamt 13 Lysinresten der B-Typ-Untereinheit befinden sich 8 in der  $\alpha$ -Kette und 5 in der  $\beta$ -Kette. Nach dem von PLIETZ *et al.* [51] entwickelten Strukturmodell sind die hydrophoben  $\beta$ -Ketten im Inneren des Leguminmoleküls lokalisiert, während die hydrophilen C-terminalen Stränge der  $\alpha$ -Ketten an der Moleküloberfläche liegen. Die C-terminalen Bereiche der  $\alpha$ -Ketten beider Untereinheiten-Typen enthalten insgesamt 15 Lysinreste. Basierend auf der Annahme, daß die zwei Untereinheiten-Typen A und B zu gleichen Teilen die Quartärstruktur des *Vicia faba*-Legumins bilden [55, 54], entspricht der Anteil der Lysinreste im C-Terminus 44 % der gesamten Lysinreste. Auf Grund ihrer Lage in hydrophilen, unstrukturierten, flexiblen Strukturbereichen [151] sollten mindestens 6 Lysinreste der  $\alpha$ -A-Kette (Aminosäurepositionen 110; 259; 268; 278; 280; 285) und mindestens 5 Lysinreste der  $\alpha$ -B-Kette (Aminosäurepositionen 113; 119; 187; 209; 273), also 32 % der gesamten Lysinreste, bevorzugt acyliert werden (vgl. **Abbildung 13**). Die  $\beta$ -Ketten der A- und B-Untereinheiten weisen eine Verteilung der Lysinreste über den gesamten Sequenzbereich auf. Die Acylierung dieser Reste sollte dementsprechend nur bei einer Entfaltung der globulären Struktur möglich sein bzw. als kooperativer Prozeß mit der Entfaltung einher gehen.

Der **Dissoziationsverlauf** des 11 S-Proteins **nach Succinylierung** (s. **Abbildung 26**) zeigt bereits bei geringen Modifizierungsgraden das Auftreten der 3S-Untereinheit. Die Abnahme des Anteils der 11 S-Komponente bis zu einem Blockierungsgrad von ca. 50 % der Aminogruppen erfolgt zugunsten der Bildung gleicher Anteile des 7 S-Trimers und 3 S-Monomers. Die Dissoziation von 11 S-Globulinen über ein trimeres 7 S-Intermediat

in ihre 3 S-Untereinheiten ist bereits für das Arachin der Erdnuß [18] und das Legumin der Erbse [131] beschrieben worden.

Maximale Mengen der 7S-Komponente sind nach Succinylierung von 60-80 % der Aminogruppen des Ackerbohnen-Legumins nachweisbar. Bei höheren Modifizierungsgraden liegt nur noch die 3S-Komponente vor, deren Anteil kontinuierlich mit dem Grad der Modifizierung zunimmt. Während somit bei Succinylierungsgraden ab etwa 60 % eine Dissoziation nach dem Schema  $11\text{ S} \rightarrow 7\text{ S} \rightarrow 3\text{ S}$  angenommen werden kann, weist die Dissoziation bis zu einem Modifizierungsgrad von etwa 50-60 % auf die parallele Bildung von 7 S- und 3 S-Komponenten hin. Die unterschiedliche Verteilung der Lysinreste in den  $\alpha$ -Ketten der A- und B-Untereinheiten sollte zu einer ungleichen Acylierung dieser Untereinheiten mit einer deutlich unterschiedlichen lokalen Häufung der eingeführten negativ geladenen Succinylreste führen. Daraus könnte ein Dissoziationsverhalten mit gleichzeitiger Bildung von 7S-Trimer und 3 S-Monomer resultieren. Der maximale Anteil des 7S-Zwischenproduktes bei 60-80 % N-Succinylierung fällt mit nachweisbaren Veränderungen in den viskosimetrischen (Konzentrationsabhängigkeit der Viskosität ab etwa 75 % Succinylierung und Diskontinuität im Verlauf der Grenzviskosität zwischen 60 und 80 %) und spektroskopischen Eigenschaften der Proben zusammen und spiegelt einen strukturellen Zustand wider, der sich von dem des voll modifizierten und dem des wenig modifizierten Legumins unterscheidet.

Die **Änderung der oligomeren Struktur** des Legumins **nach Acetylierung** zeigt einen prinzipiell anderen Verlauf als nach Succinylierung. Die 11 S-Komponente bleibt bis zu hohen Acetylierungsgraden (83 %) erhalten, ein 7S-Dissoziationsprodukt ist nicht nachweisbar (**Abbildung 27**). Als Dissoziationsprodukt entsteht mit einem maximalen Anteil von 30 % die 3 S-Untereinheit. Die Bildung von Assoziationsprodukten, bei hochgradiger Acetylierung das Hauptprodukt, ist in Kap. 4.2.2 bereits beschrieben worden. Die schon diskutierte mögliche unterschiedliche Beteiligung der A- und B-Untereinheiten an der Dissoziation des succinylierten Legumins kann auch für die Dissoziation und Assoziation des acetylierten Legumins nicht ausgeschlossen werden. Für die mögliche unterschiedliche Beteiligung der A- und B-Untereinheiten an der Dissoziation des Legumins kommt als Ursache neben den Unterschieden in der Ladungsverteilung auch eine unterschiedliche Anordnung in der Quartärstruktur [153] in Betracht. Während die Succinylierung durch die Einführung zusätzlicher Carboxylgruppen zur Erhöhung der negativen Nettoladung führt, nimmt diese im Falle der Acetylierung nur durch die Neutralisierung der die Carboxylatgruppen abschirmenden protonisierten Aminogruppen zu. Dieser insgesamt geringere Ladungszuwachs bedingt eine geringere elektrostatische Abstoßung und kann so den Verlauf der Dissoziation/Assoziation des 11 S-Moleküls infolge Acetylierung erklären.

Die **Serin-** und **Threonin**reste sind über den gesamten Sequenzbereich der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten verteilt. Ihre Succinylierung, die nach einer Blockierung von über 90 % der Ami-

nogruppen erfolgt und bei großem Reagensüberschuß alle Hydroxylgruppen erfaßt (**Abbildung 14**), muß infolge elektrostatischer Abstoßung zur völligen Dissoziation und zur Entfaltung der Ketten oder zumindest zur Expansion führen, wie die viskosimetrischen (**Abbildung 33a**, **Abbildung 34**) und thermodynamischen (**Abbildung 75**, **Tabelle 16**) Daten aufzeigen.

Die **Tyrosinreste** der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten sind im wesentlichen in *N*-terminalen Bereichen und mit Ausnahme eines Restes der  $\alpha$ -A- und  $\alpha$ -B-Ketten, der jeweils in einem flexiblen und exponierten Bereich [151] liegt, in strukturierten Segmenten lokalisiert. Ihre vollständige Acylierung sollte dementsprechend erst nach einer Entfaltung der Ketten möglich sein. In der vorliegenden Arbeit sind nach jeweils erschöpfender Modifizierung 54 % der Tyrosinreste acetyliert und 56 % (reversibel) succinyliert worden. Da die Succinylierung der Tyrosinreste nicht zur Bildung stabiler *O*-Succinyl-Bindungen führt, kann ihr Einfluß auf die Nettoladung des Proteins vernachlässigt werden. Der Verlauf der *O*-Acylierung entspricht den Ergebnissen anderer Autoren über die Succinylierung von Pepsinogen [154], Rinderserumalbumin [155] sowie Erbsen-Legumin [131], nach denen die Hydroxyaminosäuren erst nach weitgehender Blockierung der Aminogruppen des Lysins acyliert werden.

Die Acetylierung führt zu deutlicheren spektroskopischen Veränderungen als die Succinylierung, was bei vergleichbarem *N*-Blockierungsgrad auf stärkere Konformationsänderung durch Acetylierung als durch Succinylierung hinweist. Neben der Einfuhr der hydrophoben Reste in das Leguminmolekül begünstigt insbesondere die bei der Acetylierung früher einsetzende *O*-Acylierung zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den *N*- und *O*-acetylierten Resten in Konkurrenz zu den proteinstabilisierenden Wechselwirkungen. Bei erschöpfender *N*-, *O*-Acetylierung, d. h. einer Verteilung der Acetylreste über die gesamten Sequenzbereiche, müssen diese Effekte so groß sein, daß eine Assoziation begünstigt wird.

- Diskussion der Untersuchungen zur Hydrophobizität

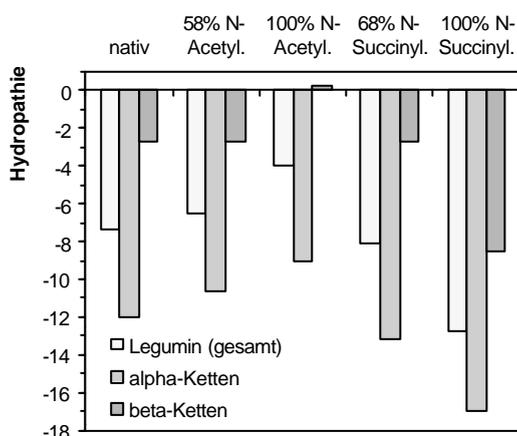
Die Messungen der Hydrophobizität (Kap. 4.2.1) liefern, bis auf die Zweiphasen-Verteilung, relative und zudem methodenspezifische Werte. Am deutlichsten treten die Unterschiede zwischen den mit verschiedenen Methoden erhaltenen Daten bei den succinylierten Leguminproben in Erscheinung. Während die Ergebnisse der Zweiphasen-Verteilung eine mit dem Succinylierungsgrad kontinuierlich ansteigende Hydrophilie signalisiert, weisen die Untersuchungen mittels RP-HPLC und Fluoreszenzsonden-Bindung auf eine Zunahme der Hydrophobizität hin. Nur bei extrem hoher Succinylierung ergeben sich auch mit der Fluoreszenzsonden-Technik Hinweise auf wieder abnehmende Hydrophobizität. Die acetylierten Proteinproben ergeben erwartungsgemäß höhere Hydrophobizitätswerte als die succinylierten Leguminderivate. Ein größerer Anstieg des  $S_0$ -Wertes ab

$S_0$ -Wertes ab etwa 60 % *N*-Acetylierung, sowohl mit ANS als auch mit *cis*-Parinar säure als Fluoreszenzsonden, ist bereits von KRAUSE *et al.* [75] beschrieben worden. Er kann auf den zunehmenden Einfluß der an den Hydroxylgruppen eingeführten Acetylreste aber vor allem auf eine mit der Modifizierung einhergehende Proteinentfaltung zurückgeführt werden. Im Falle der Succinylierung ist die nur geringfügige Zunahme der ANS-Hydrophobizität mit steigender Blockierung der Aminogruppen (**Abbildung 21a**) auf Konformationsänderungen des Legumins zurückzuführen. Bei extrem hoher *N*-Succinylierung (> 90 %), bei der zudem die Succinylierung der Hydroxylgruppen relevant wird (**Abbildung 14**), kann die Häufung der hydrophilen, negativ geladenen Succinylreste zu einer elektrostatischen Abstoßung der ANS-Moleküle und damit zu einer geringeren Bindung des hydrophoben Liganden führen, was die Abnahme des  $S_0$ -Wertes erklärt. Daneben dürfte auch das Einführen der vielen negativen Ladungen zur Abschirmung der hydrophoben Bindungsstellen im Protein führen. Der unterschiedliche Einfluß von Acetylierung und Succinylierung auf die Oberflächenhydrophobizität von Ackerbohnen-Legumin wird besonders in **Abbildung 21b** deutlich. Der Anstieg der ANS-Hydrophobizität ( $S_0$ -Wert) mit der Zahl eingeführter Acetylreste an den Amino- und Hydroxylgruppen ist praktisch linear und weist auf Wechselwirkungen des hydrophoben Liganden ANS mit den eingeführten Acetylresten hin bzw. auf eine mit der Zahl eingeführter Acetylreste parallel laufende Zunahme der Exponierung hydrophober Cluster. Die Succinylierung beeinflusst die ANS-Hydrophobizität in wesentlich geringerem Maß. Die  $S_0$ -Werte von nativem Legumin und einem Leguminderivat mit vollständig succinylierten Amino- und Hydroxylgruppen unterscheiden sich kaum.

Die Methodenspezifität der Ergebnisse kann als Folge unterschiedlicher Mechanismen verstanden werden. So spricht die Fluoreszenzsondentechnik nicht nur auf eingeführte hydrophobe Gruppen sondern auch auf exponierte hydrophobe Cluster und somit deutlich auf Konformationsänderungen der Proteine an. Dem entgegen wirkende elektrostatische Wechselwirkungen (Abstoßung) zwischen dem negativ geladenen ANS-Sondenmolekül und dem nach erschöpfender Succinylierung extrem geladenen Protein lassen sich jedoch nicht ausschließen. Hier könnte die Untersuchung mit neutralen Sondenmolekülen eindeutigere Ergebnisse liefern. Bei der RP-HPLC wird für beide Acylierungsmethoden eine zunehmende Bindung der Proteine an die hydrophobe Matrix (beobachtet als zunehmende Retentionszeit) mit steigendem Modifizierungsgrad entsprechend zunehmender Hydrophobizität festgestellt. Aus früheren Untersuchungen am succinylierten Erbsen-Legumin [156] ergeben sich Hinweise darauf, daß die so ermittelte Hydrophobizität sowohl auf Beiträge aus exponierten hydrophoben Clustern des Proteins als auch auf die Beiträge der Methylengruppen der Succinylreste zurückgeführt werden könnte. Bei dieser Methode sind neben den dominanten hydrophoben Wechselwirkungen die elektrostatischen (fast) ohne Bedeutung. Im Fall der Polymer-Zweiphasen-Verteilung dürfte der Ein-

fluß der mit den Succinylresten eingeführten Carboxylatgruppen, die das chemische Potential der Proteine bestimmen, dominant sein. Mit dieser Methode erfaßt man sowohl die hydrophoben Wechselwirkungen als auch die elektrostatischen. Orientierende Versuche mit succinylierten Erbsen-Leguminproben zeigten ebenfalls eine drastische Abnahme des Verteilungskoeffizienten nach erschöpfender Acylierung der reaktionsfähigen Gruppen.

Ergänzend lassen sich Aussagen zur Beeinflussung der Hydrophobizität durch die Acylierung auf der Grundlage der Aminosäuresequenz [128, 56] des Legumins berechnen. Zu diesem Zweck wurde nach der Methode von KYTE & DOOLITTLE [152] aus den Hydrophathie-Profilen der konstituierenden Polypeptidketten der A- und B-Untereinheiten der sogenannte GRAVY-Wert (grand average of hydropathicity) berechnet. Die zugrunde liegenden Hydrophobizitätswerte der Aminosäuren Serin, Threonin und ggf. Tyrosin sowie die Werte von Lysin und der jeweils *N*-terminalen Aminosäure wurden entsprechend dem Grad und der Art der Modifizierung durch die Addition der Hydrophobizitätswerte für Alanin bzw. Glutaminsäure korrigiert, um die Erhöhung bzw. Verringerung der Hydrophobizität durch die eingeführten Acetyl- bzw. Succinylgruppen zu simulieren. Aufgrund der Annahme ihrer Gleichverteilung [54] wurde **Abbildung 78** der Durchschnitt der GRAVY-Werte beider Untereinheiten-Typen dargestellt. Ausgehend vom nativen Legumin bedeutet ein zunehmend negativer Hydropathiewert die Zunahme der Hydrophilie, die Verringerung der negativen Werte bis hin zu positiven Hydropathiewerten entspricht zunehmender Hydrophobizität. Aus **Abbildung 78** wird ersichtlich, daß zunächst (bei mittleren Modifizierungsgraden) die exponierten  $\alpha$ -Ketten den größeren Anteil an der Zunahme der Hydrophilie infolge Succinylierung und der Hydrophobizität infolge Acetylierung haben. Bei fortschreitender Acylierung, insbesondere Acylierung der Hydroxylgruppen, gewinnen zunehmend die Änderungen der Hydrophobizität bzw. der Hydrophilie der  $\beta$ -Ketten an Relevanz für die hydrophoben/hydrophilen Eigenschaften des Gesamtmoleküls.



**Abbildung 78:** Durchschnittliche Hydropathiewerte (GRAVY [152]) von nativem, acetyliertem und succinyliertem Legumin und der entsprechenden *a* und *b*-Ketten

Die aus den Messungen mit der ANS-Fluoreszenzsondentechnik ermittelte deutliche Zunahme der Hydrophobizität infolge zunehmender Acetylierung (**Abbildung 21**), und die aus der Verteilung in einem Polymer-Zweiphasen-system errechnete Zunahme der Hydrophilie von Ackerbohnen-Legumin infolge Succinylierung (Kap. 4.2.1.3) korrelieren gut mit den in

**Abbildung 78** dargestellten, berechneten Daten zur Hydropathieänderung.

Eine sinnvolle Kombination hydrodynamischer (Viskosimetrie, Dichtemessung, Ultrazentrifugation), spektroskopischer (UV-, Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie) und thermodynamischer (DSC, spektroskopische Denaturationsuntersuchungen) Untersuchungen liefert auch für den strukturellen Zustand in oligomeren Proteinsystemen schlüssige Argumente. Dabei ist die Regulierung der effektiven Ladungen des modifizierten Proteins durch Variation des Modifizierungsgrades und der Ionenstärke von Bedeutung. Ein Vergleich zwischen nativer Quartärstruktur und der dissoziierten acylierten Untereinheit oder deren Assoziaten ist schwierig, da die Daten über die Struktur der nativen Untereinheiten nur über eine Modellbetrachtung erhältlich sind. Erschwerend für die Interpretation experimenteller Daten ist außerdem das Vorliegen einer oligomeren Struktur, dessen globuläre Grundeinheit, die A- oder B-Untereinheit, selbst nur nach in gewisser Weise denaturierenden Eingriffen in die Gesamtstruktur zu erhalten ist.

- Diskussion der hydrodynamischen Untersuchungen

Für die Interpretation des Konzentrationsverlaufs der reduzierten **Viskosität** sind verschiedene Ansätze vorgeschlagen worden [157]. Der Ansatz von HUGGINS [140], [158], [159] ist in der Proteinchemie häufig benutzt worden. Die HUGGINS-Konstante  $k'$ , berechnet nach Gleichung 28 (S. 72) kann die folgenden molekularen Wechselwirkungen widerspiegeln [158], [160]:

1. Hydrodynamische Wechselwirkungen zwischen Molekülpaaren, die zu einem ( $[\eta]^2 \cdot c$  proportionalen) Anstieg des hydrodynamischen Volumens führen, wobei dieser Effekt für dicht gepackte Kugeln größer ist als für flexible, lösungsmitteldurchströmte Knäuel
2. Bildung von Doppelmolekülen
3. Intermolekulare Attraktion oder Repulsion

Ein positiver Beitrag zu  $k'$  ist im Falle von Punkt 1 und 2 bei schlechten Lösungsmitteln zu erwarten und kann bei guten Lösungsmitteln Null betragen oder negativ werden. Im Fall 3 führt eine molekulare Repulsion zu negativen und eine Attraktion zu positiven Werten von  $k'$ . Schlechte Lösungsmittel begünstigen die Bildung kompakter sphärischer Polymerstrukturen und beeinflussen damit  $k'$ .

Im vorliegenden Fall der unterschiedlich hoch succinylierten und acetylierten Leguminproben ist von der Überlagerung aller drei Effekte auszugehen. Der starke Einfluß der Ladung, dominierend insbesondere nach Succinylierung aber auch bei zunehmender Acetylierung durch die Demaskierung der Carboxylatgruppen, ist ebenso zu berücksichtigen wie die Veränderung der kompakten Molekülform des Legumins durch molekulare Expansion/Entfaltung, Dissoziation und Reaggregation. Die negativen HUGGINS-Konstanten der **acetylierten Proben** dürften die Tendenz zur Bildung relativ kompakter Aggregate (s.

Kap. 4.2.2) der hydrophobierten Proteine widerspiegeln, für die der Standardpuffer mit einer relativ hohen Ionenstärke von  $I=0,5$  ein schlechtes Lösungsmittel darstellt. Besonders das Viskositätsverhalten einer hochacetylierten Leguminprobe nach siebentägiger Lagerung (**Abbildung 31**) - starker Anstieg der Grenzviskosität und sehr stark negative HUGGINS-Konstante - spricht für die mit zunehmender Verdünnung eihergehende molekulare Expansion der aggregierten Moleküle. Auf die Aggregation weisen bereits die SE-HPLC-Chromatogramme (**Abbildung 24a**) hin; sie konnte durch die Ultrazentrifugationsmessungen (**Abbildung 27** und **Tabelle 7**) bestätigt werden. Die Ergebnisse der Ultrazentrifugationsstudien stehen allerdings im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Autoren [z. B. 161, 162], die für acetylierte 11 S-Globuline (Arachin und Glycinin) die Dissoziation in ihre Untereinheiten beschreiben. Von YAMAUCHI [162] wird für hochacetyliertes Soja-Glycinin neben den Dissoziationsprodukten zwar eine hochmolekulare Protein-Hauptfraktion beschrieben aber nicht charakterisiert. Das Fehlen von Dissoziationsprodukten nach der Acetylierung von Raps-Cruciferin ist von GERBANOWSKI *et al.* [163] beschrieben worden. Wie orientierende viskosimetrische und chromatographische Versuche zur Temperaturabhängigkeit der Aggregation des hochacetylierten Ackerbohnen-Legumins gezeigt haben, begünstigen erhöhte Temperaturen den Aggregationsprozeß. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf hydrophobe Wechselwirkungen.

Die Viskositäten der **succinylierten Proben** sind nahezu konzentrationsunabhängig. Erst ab einer Modifizierung von 90 % der Aminogruppen werden positive  $k'$ -Werte ermittelt. Das zeigt, daß bei einer Ionenstärke von  $I=0,5$  im Falle der besonders stark geladenen Modifikate elektrostatische Effekte nicht vollständig abgeschirmt werden. Im Gegensatz dazu sind die HUGGINS-Konstanten der hochsuccinylierten Leguminproben im Phosphatpuffer mit der Ionenstärke  $I=1,0$  negativ, was durch intermolekulare Abstoßung und/oder die Veränderung der Molekülform durch Expansion oder Entfaltung erklärt werden kann. Die vergleichende Betrachtung einer hochsuccinylierten sowie einer erschöpfend succinylierten Probe in drei Phosphatpuffern unterschiedlicher Ionenstärke (**Abbildung 36b, c**) beweist, daß die elektrostatischen Wechselwirkungen ganz entscheidenden Einfluß auf die Konformation bzw. die hydrodynamischen Eigenschaften, insbesondere auf das Viskositätsverhalten der succinylierten Präparate haben, was sie vom nativen Legumin (**Abbildung 36a**) unterscheidet.

Die Kombination hydrodynamischer Daten, mit dem Ziel Informationen über die **Molekülform** ableiten zu können, wird von CREETH & KNIGHT [164] diskutiert. Nach YANG [165] ergibt der Quotient aus Grenzviskosität  $[\eta]$  und partiellem spezifischen Volumen  $\bar{v}$  die dimensionslose Größe  $n$  (Gleichung 31), die als Viskositätsinkrement bezeichnet wird.

$$n = [\eta] / \bar{v}$$

Gleichung 31

Für steife, impermeable sphärische Partikel (quasi undurchlässige starre Kugeln) erreicht  $n$  einen Grenzwert von 2,5. Im Fall asymmetrischer oder expandierter Moleküle wird das Viskositätsinkrement größer. Das Verhältnis von  $n/2,5$  kann demnach als ein Indikator für die molekulare Expansion bzw. Kompaktheit gelten [164]. Wie bereits in Kap. 3.3.1.3 beschrieben, lassen sich auch aus der Konzentrationsabhängigkeit der Sedimentation von Teilchen Aussagen über deren Form ableiten. Um die Information zu erhalten, ob es sich bei den Leguminproben nach Acylierung noch um annähernd sphärische Moleküle handelt, können die Sedimentationsdaten mit den Ergebnissen der Viskositätsmessungen kombiniert werden [166, 167]. Die Beziehung zwischen der Konzentrationsabhängigkeitskonstante  $k_s$  der Sedimentationsgeschwindigkeit und der Grenzviskosität des Proteins hat für kompakte sphärische (globuläre) und expandierte (random coil, entfaltete) Proteine Gültigkeit, und stellt somit ein, sowohl von der Molekülgröße als auch von der Hydratation unabhängiges Maß für die Molekülform dar [164]. Für kompakte sphärische Makromoleküle aber auch für entfaltete Polymere gilt  $k_s / [\eta] \approx 1,6$ . Der  $k_s / [\eta]$ -Quotient wird für asymmetrische Moleküle kleiner und tendiert für stäbchenförmige Moleküle gegen Null [167].

Für natives Ackerbohnen-Legumin in Standardpuffer wurde das Viskositätsinkrement  $n = 8,4$  bzw.  $n/2,5 = 3,4$  ermittelt und  $k_s / [\eta] = 1,15$ . Diese Werte entsprechen etwa denen von  $\gamma$ -Globulin [164]. Das Einführen von **Acetylgruppen** verringert die Kompaktheit des Moleküls nur wenig ( $n_{50\% Ac.} / 2,5 = 4,2$ ). Die chromatographierte Hauptfraktion des hochacetylierten Legumins wurde bereits in Kap. 4.2.2.4 als dimeres Assoziat beschrieben. Informationen über die Molekülform dieses Dimeren lassen sich aus den ermittelten hydrodynamischen Daten ableiten. Aus Grenzviskosität und partiellem spezifischen Volumen folgt für das Viskositätsinkrement der Wert  $n = 13,5$  und  $n/2,5 = 5,4$ . Dieser Wert entspricht einer 1,5fachen Expansion des Moleküls. Aus der Konzentrationsabhängigkeitskonstante der Sedimentation  $k_s = 16,9$  ml/g und der Grenzviskosität ergibt sich der Molekülform-Parameter  $k_s / [\eta] = 1,78$ , der für ein relativ kompaktes Makromolekül spricht [167]. Demnach dürfte es sich bei der Hauptfraktion des hochacetylierten Legumins um ein fast sphärisches, nur leicht expandiertes dimeres Molekül (mit einer Molekularmasse von ungefähr 700 kDa) handeln. Die Lagerung dieser Fraktion führt zu einem, wahrscheinlich aus sechs Leguminmolekülen bestehenden, Assoziat (s. Kap. 4.2.2.4). Das Viskositätsinkrement beträgt  $n = 21,2$  und dementsprechend  $n/2,5 = 8,5$ . Dieser Wert ist Ausdruck deutlich verringerter Kompaktheit (molekulare Expansion auf etwa 2,5faches Volumen). Eine Betrachtung über das Verhältnis  $k_s / [\eta]$  kann wegen der großen Streuung der  $s_{app}$ -Werte für die 27 S-Komponente mit den vorliegenden Daten nicht sinnvoll angestellt werden. Als Hinweis auf einen annähernd globulären Zustand dieser löslichen Assoziat mit nicht allzu großen Abweichungen von der sphärischen Form kann die recht gute Übereinstimmung der, zum einen aus Sedimentations- und Viskosi-

tätsdaten (nach SCHERAGA & MANDELKERN [139]) und zum anderen aus Sedimentationsdaten und Messungen der Lichtstreuung (nach SVEDBERG [137]), berechneten Molmassen gewertet werden.

Die Betrachtung der  $n/2,5$ -Quotienten von Leguminproben zunehmender **Succinylierung** in Standardpuffer belegt, daß sich die Kompaktheit der modifizierten Moleküle zunächst nur langsam verringert (von nativ = 3,4 auf 3,9 bei 33%), zwischen etwa 60 % und 80 % entsprechend beginnender molekularer Expansion schon deutlich abnimmt (65 %  $\approx$  6,1; 76 % = 6,0) aber erst nach einsetzender Succinylierung der Hydroxylgruppen drastisch sinkt ( $n/2,5 = 10,9$ ). Der Vergleich mit den von CREETH & KNIGHT [164] für andere Proteine berechneten Werte zeigt, daß es sich beim hochsuccinylierten Legumin nicht um ein kompaktes sphärisches Molekül handelt. Das Volumen des relativ entfalten Proteins erhöht sich auf etwa das Dreifache des Volumens vom nativem Leguminmolekül. Am Beispiel einer 99 % **succinylierten** Leguminprobe konnte festgestellt werden, daß die Ionenstärke des Lösungsmittels die Molekülform des hochacylierten Ackerbohnen-Legumins stark beeinflußt. Die Quotienten  $n/2,5$  wurden berechnet. Sie ergeben mit steigender Ionenstärke des Lösungsmittels eine Abnahme von 13,7 ( $I=0,1$ ) über 10,9 ( $I=0,5$ ) nach 9,4 ( $I=1,0$ ), was einer Erhöhung der Kompaktheit des stark expandierten Moleküls durch die stabilisierenden Effekte hoher Ionendichte entspricht. Im Puffer der niedrigsten Ionenstärke ist die Konzentrationsabhängigkeitskonstante  $k_s$  der erschöpfend succinylierten Leguminprobe besonders groß, und der Koeffizient  $k_s/[h]$  nimmt mit 2,5 einen hohen Wert an, vergleichbar mit dem des Thyroglobulins aber auch dem von Gelatine [164]. Die extrem geladene 3 S-Untereinheit ist im Puffer niedriger Ionenstärke als Polyelektrolyt aufzufassen, was auf relativ starke elektrostatische Wechselwirkungen und eine daraus resultierende expandierte, asymmetrische Molekülform hinweisen kann. Die Unterscheidung zwischen elektrostatischen und hydrodynamischen Effekten ist jedoch problematisch [164]. Im Standardpuffer ist dagegen kaum eine Konzentrationsabhängigkeit des Sedimentationskoeffizienten von erschöpfend succinyliertem Legumin bestimmbar;  $k_s$  ist praktisch Null, so daß  $k_s/[h]$  nicht berechnet werden kann. In hoher Ionenstärke ( $I=1,0$ ) ergibt das Verhältnis  $k_s/[h]$  den Wert 1,4. Durch die hohe Ionendichte erfolgt die Abschirmung der Molekül-Ladung. Im Zusammenhang mit dem Viskositätsinkrement weist der  $k_s/[h]$ -Wert auf das Vorliegen als entfaltetes Molekül hin [164]. Das 99 % succinylierte Legumin im Phosphatpuffer hoher Ionenstärke läßt sich demnach als quasi ungeladenes, stark entfaltetes Makromolekül auffassen.

- Diskussion der spektroskopischen Untersuchungen

Neben den Ergebnissen der hydrodynamischen Untersuchungen belegt auch die spektroskopische Charakterisierung das Vorhandensein deutlicher Strukturunterschiede zwischen

nativem und acyliertem Protein einerseits, andererseits auch zwischen den succinylierten und den acetylierten Leguminderivaten bei vergleichbaren Modifizierungsgraden.

Durch die **Acetylierung** erfolgt eine deutliche Konformationsänderung, was sich in der Rotverschiebung der Fluoreszenzemission (**Abbildung 43**) und der Blauverschiebung der UV-Absorptionsbanden (**Abbildung 50** und **Abbildung 52**) ausdrückt und sich durch den Übergang der Chromophoren in eine stärker polare Umgebung, d. h. durch einen stärker entfalteten Zustand der Moleküle begründen läßt [144, 168, 169]. Demnach dürfte die Änderung der Konformation zwischen 77 % und 98 % *N*-Acetylierung am größten sein. An Hand vergleichender Untersuchungen der Tryptophan-Fluoreszenz von 17 nativen und denaturierten Proteinen ist festgestellt worden, daß die Tryptophan-Quantenausbeute für native Proteine größer oder kleiner sein kann als die der freien Aminosäure, und eine einfache Beziehung zwischen Exponierung und Quantenausbeute oder Fluoreszenzintensität der Tryptophanreste nicht abgeleitet werden kann [170]. Die Interpretation der Fluoreszenzintensität kann daher nur äußerst zurückhaltend erfolgen. Die Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität bei einer Acetylierung von 37-58 % der Aminogruppen deutet auf eine zumindest geringfügig veränderte Struktur dieser teilweise modifizierten Leguminmoleküle hin. Das Phänomen der mit dem Acylierungsgrad zunächst zu- und ab einem gewissen Grad wieder abnehmenden Fluoreszenzintensität ist bereits am Beispiel der succinylierten 11 S-Proteine aus Erbsen [131] und Erdnüssen [18] beschrieben und diskutiert worden. SHETTY & RAO [18] erklären diesen Effekt durch die Bildung einer neuen Proteinstruktur, in der die Chromophoren stärker im Inneren "vergraben" sind, wodurch eine höhere Quantenausbeute zustande kommt. Im allgemeinen wird die Proteindenaturierung durch die Abnahme der Fluoreszenzintensität aufgrund der Änderungen in der Umgebung der Tryptophan- und Tyrosinreste begleitet [171], was mit der deutlichen Fluoreszenzabnahme der 98 % acetylierten Probe korreliert. Aus den UV-Ableitungsspektren 2. Ordnung (**Abbildung 52**) kann die zwischen 40 % und 80 % *N*-Blockierung zunehmende Exponierung von Tyrosin abgeleitet werden (**Abbildung 53**). Die bei weiterer Modifizierung (98 %) zu beobachtende Abnahme des *a/b*-Quotienten [146] dürfte auf die Acetylierung der phenolischen Hydroxylgruppen bei extremer Modifizierung und die daraus resultierende Verringerung der Absorption des Tyrosins einerseits, andererseits auf eine zunehmende Tryptophan-Exponierung zurückzuführen sein. Die CD-Spektren acetylierter Leguminderivate im fernen UV (**Abbildung 61**) weisen bereits bei 58 % Modifizierung auf eine Änderung der Konformation gegenüber dem nativen Protein hin. Aus der Berechnung der entsprechenden Sekundärstrukturanteile [34, 148] (**Tabelle 14**) kann man folgern, daß aufgrund des praktisch gleichbleibenden Gehaltes an  $\beta$ -Strukturen die Sekundärstruktur des Legumins, sogar nach erschöpfender Acetylierung, weitgehend erhalten bleibt. Nach ZIRWER *et al.* [33] und PLIETZ *et al.* [51] sind die  $\beta$ -Strukturen für die Stabilisierung der Domänen von 11 S-Samenglobulinen entschei-

dend, so daß sich die Verringerung des ohnehin geringen  $\alpha$ -Helix-Anteils infolge Acetylierung kaum entscheidend auf die Domänenstruktur auswirken dürfte [51, 151, 172]. Somit kann man aus den CD-spektroskopischen Untersuchungen für die Konformation von Legumin schließen, daß die Acetylierung zur Änderung der Tertiärstruktur führt (s. **Abbildung 62**), die Sekundärstruktur dagegen weitgehend unverändert bleibt. Die Daten der UV- und Fluoreszenzmessungen machen deutlich, daß die (Tertiär-)Struktur von Ackerbohnen-Legumin insbesondere im Bereich zwischen 77 und 98 % Aminogruppen-Acetylierung nachhaltig modifiziert wird. Die umfassenden strukturellen Änderungen können mit der in diesem Bereich extensiv erfolgenden Acetylierung der Hydroxylgruppen erklärt werden.

Die **Succinylierung** bewirkt im Unterschied zur Acetylierung lediglich eine Rotverschiebung der Fluoreszenzemission um 1-3 nm (**Abbildung 42**). Die relative Intensität der Fluoreszenz nimmt bis 68 % *N*-Succinylierung ab, steigt danach nochmals an (80 %) und fällt bei hoher Acylierung (95 % der Aminogruppen) wieder drastisch ab. Das spricht einerseits für die (unstetig) zunehmende Exponierung der Chromophoren im Verlauf der Succinylierung und andererseits für das Vorliegen einer speziellen Konformation bei 70-80 % *N*-succinylierten Proteinen. Analog zu diesen Beobachtungen ist die Unstetigkeit im Bereich von 70-80 % *N*-Succinylierung auch anhand der UV-Ableitungsspektren festzustellen (stetige Abnahme der UV-Absorption bis 68 %, leichter Anstieg bei 80 % und erneute Abnahme bei 95 % Modifizierung). Diese Veränderungen spiegeln sich auch im Viskositätsverhalten (Anstieg der Grenzviskosität bis 68 % Succinylierung, Abnahme bei 76 % succinylierten Aminogruppen und anschließend wieder Zunahme, s. **Abbildung 34**) wider. Die stufenweise Succinylierung bewirkt eine Blauverschiebung der UV-Banden, die im Unterschied zur Acetylierung relativ kontinuierlich erfolgt (**Abbildung 49**) und besonders im Bereich der Tyrosin-Absorption deutlich wird. Sie spiegelt die zunehmende Entfaltung des Proteins wider. Der Verlauf des *a/b*-Verhältnisses nach RAGONE *et al.* [146] (**Abbildung 53**) als Ausdruck der Chromophoren-Exponierung unterstützt die Annahme bezüglich einer speziellen Konformation der 70-80 % succinylierten Leguminpräparate, was im Zusammenhang mit der Dominanz der 7S-Untereinheiten in eben diesem Bereich der Modifizierung stehen dürfte. Die Tyrosinreste werden bis etwa 70 % Aminogruppen-Blockierung stark exponiert (viel stärker als im Falle der Acetylierung), dann sinkt der *a/b*-Wert bis etwa 80 % wieder, um bei 95 % *N*-Succinylierung, trotz der in diesem Bereich eintretenden massiven Modifizierung der Hydroxylgruppen, weiter anzusteigen. Die starke Exponierung der Tyrosinreste des dissoziierten Legumins liefert einen weiteren Beweis für die starke Expansion der succinylierten Legumin-Untereinheiten. Daneben läßt sich der Anstieg des *a/b*-Quotienten im hochmodifizierten Bereich auch durch die Instabilität der *O*-Succinyl-Bindung (s. Kap. 4.1) erklären. Neben der Abnahme der Elliptizitätswerte im nahen UV-Bereich (**Abbildung 64**), die durch eine

erhöhte Beweglichkeit der aromatischen Reste mit steigendem Grad der Succinylierung erklärt werden kann, zeigen die succinylierten Leguminproben (wie auch die acetylierten Derivate) charakteristische Veränderungen des Circular dichroismus im fernen UV-Bereich (**Abbildung 63**), die eine deutliche Abnahme des helikalen Konformationsanteils nachweisen. Kennzeichnend ist einerseits die Abnahme der positiven Elliptizität im Maximum um 195 nm und die Blauverschiebung der Minima zu 206 nm mit leicht erhöhtem negativen Elliptizitätswert andererseits [147, 173]. Nach den mit dem *CONTIN*-Verfahren [34] erhaltenen Daten (s. **Tabelle 14**) bleibt der Anteil der domänenstabilisierenden  $\beta$ -Faltblattstruktur [51, 151, 172, 174] nach Modifizierung praktisch unverändert. Demnach nimmt durch erschöpfende Succinylierung lediglich der Anteil an  $\alpha$ -Helix um etwa 8% zugunsten ungeordneter Sekundärstrukturanteile ab. Dies würde bedeuten, daß die Succinylierung des Proteins nicht zu einem vollständig entfalteten Protein führt sondern Teile der Sekundärstruktur erhalten bleiben. Für die Annahme, daß die vorgenommene chemische Modifizierung zu anderen Strukturen (Restsekundärstrukturen) führt als eine Denaturierung durch Hitzebehandlung oder Einwirkung von Denaturantien gibt es Gründe [174, 175]. Dennoch sind die errechneten Werte für die  $\beta$ -Struktur-Anteile mit Zurückhaltung zu betrachten, da die Berechnung des Anteils an  $\beta$ -Faltblatt-Konformation in denaturierten Proteinen mittels Circular dichroismus-Spektroskopie nur mit geringerer Genauigkeit erfolgen kann als die Bestimmung des Helix-Anteils [147]. Die nach dem *CONTIN*-Verfahren [34] berechneten Sekundärstrukturanteile hängen stark von den in der Referenzdatenbank enthaltenen Standardproteinen ab und scheinen im Falle entfalteter Proteine für  $\alpha$ -Proteine realistischere Werte als für  $\beta$ -Proteine (wie das Ackerbohnen-Legumin) zu liefern. Allerdings werden die hier mittels CD-Spektroskopie ermittelten Daten durch die Ergebnisse der infrarotspektroskopischen Untersuchung von 95 % *N*-succinyliertem Erbsen-Legumin gestützt, wonach durch die Modifizierung neben einer Abnahme des Helix-Gehaltes von 16 % auf 6 % sogar der Anstieg des Anteils an  $\beta$ -Faltblattstruktur von 41 % auf 50 % erfolgt [176].

- Einfluß der Ionenstärke auf die Konformation (spektroskopische Betrachtungen)

Die Bedeutung elektrostatischer Wechselwirkungen für die hydrodynamischen Eigenschaften wie Viskosität und Sedimentationsverhalten von succinylierten Leguminderivaten ist, auf der Grundlage von diversen Untersuchungen in drei Phosphatpuffersystemen unterschiedlicher Ionenstärke, bereits beschrieben und diskutiert worden. Darüber hinaus sollten anhand von spektroskopischen Untersuchungen (Kap. 3.3.2) ausgewählter Modifikate Aussagen über den Einfluß der Ionenstärke des Lösungsmittels auf die Tertiär- und Sekundärstruktur getroffen werden.

Die UV-Spektroskopie einer 64 % *N*-**succinylierten** Leguminprobe ergab, daß die deutlichsten Denaturationseffekte, einhergehend mit der stärksten Exponierung von Tyrosin,

im Puffer niedrigster Ionenstärke ( $I=0,1$ ) zu beobachten sind (**Tabelle 13**). Mit der Fluoreszenzemissionsspektroskopie konnte der konformationsstabilisierende Effekt (Zunahme der relativen Fluoreszenz, **Abbildung 47**) durch einen Puffer hoher Ionenstärke ( $I=1,0$ ) bestätigt werden. Die Fluoreszenz (sowohl Intensität als auch die Lage der Banden) von hochsuccinyliertem Legumin zeigt sich dagegen von der Ionenstärke relativ unabhängig (**Abbildung 48**). Unter Berücksichtigung des in dieser Arbeit nachgewiesenen starken Einflusses der Ionenstärke auf die hydrodynamischen Eigenschaften hochsuccinylierter Legumine, kann dieser Befund nur in der Weise interpretiert werden, daß die Exponierung der Aromaten von den durch die veränderte Ionenstärke induzierten Konformationsänderungen des bereits stark expandierten Moleküls nur geringfügig betroffen ist. Auch das nach RAGONE *et al.* [146] den UV-Ableitungsspektren 2. Ordnung zu entnehmende Verhältnis der Tyr/Trp-Exponierung hochsuccinylierter Leguminproben ist in den drei Lösungsmitteln nahezu unverändert (**Tabelle 13**). Die Erhöhung der Ionenstärke bewirkt jedoch eine geringfügig bathochrome Verschiebung der UV-Absorptionsbanden succinylierter Proben (**Abbildung 59, Abbildung 60**). Das weist auf eine, die vorhandenen Reststrukturen stabilisierende Wirkung des Puffers hoher Ionendichte hin. Diese Annahme wird durch die CD-Spektroskopie im nahen UV-Bereich unterstützt. Sowohl die 64 % (**Abbildung 67**) als auch die 99 % (**Abbildung 68**) *N*-succinylierte Probe, erbringen durch die Zunahme der Elliptizitäten mit steigender Ionenstärke, entsprechend einer verringerten Beweglichkeit der aromatischen Reste, einen Nachweis über Veränderungen in der Tertiärstruktur. Dieser Stabilisierungseffekt durch hohe Lösungsmittel-Ionenstärke befindet sich in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der hydrodynamischen Untersuchungen. Der Vergleich der Nah-UV-CD-Spektren mit den entsprechenden Elliptizitätswerten des nativen Proteins belegt, daß die hohe Ionenstärke ( $I=1,0$ ) selbst bei mittlerem Modifizierungsgrad bestenfalls eine partielle Rückfaltung des Proteins bewirkt. Die ursprüngliche Tertiärstruktur dürfte zumindest im Fall der hochsuccinylierten Leguminprobe bei einer maximalen Elliptizität von  $25 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$  ( $I=1,0$ ) nur in sehr geringem Ausmaß vorhanden sein. Daneben liefert die Fern-UV-CD-Spektroskopie der hochsuccinylierten Probe in Phosphatpuffer niedriger Ionenstärke ( $I=0,1$ ) ein Spektrum, das, mit einer Blauverschiebung des Minimums von 216/209 nm zu 199 nm, praktisch dem eines entfalteten Proteins entspricht (**Abbildung 66**). Der daraus mit Hilfe des *CONTIN*-Programms [34] berechnete Anteil von 30 % ungeordneten Strukturbereichen ist, mit einer Erhöhung um weit über 100 % im Vergleich zum nativen Legumin, beträchtlich. Die Entfaltung bedingt den weitgehenden Verlust der  $\alpha$ -Helix-Strukturbereiche. Darüber hinaus nimmt der Anteil der stabilisierenden  $\beta$ -Strukturanteile nach *CONTIN* nur im Puffer niedriger Ionenstärke durch die Succinylierung um 10 % ab (**Tabelle 15**).

Aus meßtechnischen Gründen konnte nur der Einfluß der Ionenstärke auf die Tertiärstruktur (UV- und Fluoreszenzemissionsspektroskopie) **acetylierter** Leguminproben untersucht werden. Die UV-Absorption acetylierter Derivate in Phosphatpuffern unterschiedlicher Ionenstärke unterscheidet sich nicht wesentlich (**Abbildung 55**). Das UV-Ableitungsspektrum der 58 % *N*-acetylierten Probe zeigt jedoch ausgehend vom Standardpuffer eine hypsochrome Verschiebung der Tyrosin-UV-Absorptionsbanden bei niedriger Ionenstärke (**Abbildung 56**). Aus dem Ableitungsspektrum der hochmodifizierten Probe läßt sich die stärkste Exponierung von Tyrosinresten (= maximaler *a/b*-Wert, s. **Tabelle 13**) in Puffer niedrigster Ionenstärke ableiten, was als Hinweis auf eine begrenzte Abschwächung von Konformationsänderungen durch erhöhte Ionenstärke (ab  $I=0,5$ ) gewertet werden kann. Diese Vermutung wird durch die beobachtete Beeinflussung der Fluoreszenzeigenschaften mäßig acetylierter (58 %, **Abbildung 45**) und hochacetylierter (98 %, **Abbildung 46**) Leguminproben gestützt. Die relative Fluoreszenzintensität nimmt durch die Erhöhung der Ionenstärke zu, was als Zunahme der Kompaktheit gewertet werden kann. Besonders große Intensitätsunterschiede wurden nach gemeinsamer Anregung von Tyrosin und Tryptophan (280 nm) gemessen. Die Verschiebung der Fluoreszenzemissionsmaxima ist aufgrund der sehr breiten, teilweise „inhomogenen“ Spektren nur schwer zu diskutieren. Der Verlauf der Spektren kann durch das Vorliegen von zwei (oder mehr) Molekülen abweichender Tertiärstruktur und dementsprechend auch unterschiedlichen (Fluoreszenz-)Eigenschaften begründet werden. Im Falle der hochacetylierten Probe z. B. ist der Spektrenverlauf in hoher Ionenstärke interpretierbar, wenn man bedenkt, daß in der Probe nebeneinander 17 S-Dimere und die 3 S-Dissoziate vorliegenden. Sie weisen Konformationsunterschiede auf, sind von unterschiedlicher Kompaktheit. Die Erhöhung der Ionenstärke bewirkt einerseits eine Blauverschiebung des Fluoreszenzintensitätsmaximums von 328 auf 324 nm (Exc. 280 nm) bzw. von 333 auf 321 nm (Exc. 295 nm, **Abbildung 46**), was auf eine Komponente mit einer stärker globulären Konformation als im Lösungsmittel niedriger Ionenstärke schließen läßt. Andererseits deutet die Ausbildung eines zweiten Maximums bei 327 bzw. 331 nm auf eine Proteinkomponente hin, deren Chromophoren sich in vergleichsweise polarerer Umgebung befinden. Dabei könnte es sich um eine acetylierte Proteinkomponente handeln, deren Struktur durch die Variation der Ionenstärke zwischen  $I=0,1$  und  $I=1,0$  nicht wesentlich verändert wird, deren Aromaten jedoch durch erhöhte Ionenstärke in eine zunehmend kompaktere Struktur (Sekundär- und Tertiärstruktur) von nativem Legumin wird durch die Variation der Ionenstärke zwischen  $I=0,1$  und  $I=1,0$  nur marginal beeinflußt.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, daß die zunehmende Succinylierung in allen drei Puffern in annähernd gleicher Weise zur schrittweisen Denaturation führt, was sich in einer Rotverschiebung der Fluoreszenzemission und einer Blauverschiebung der UV-

Absorption ausdrückt. Die CD-Spektroskopie liefert den Beweis für den generell stabilisierenden Effekt hoher Ionenstärke auf die Tertiärstruktur, selbst auf die stark expandierten, denaturierten Legumin-Untereinheiten, sowie das Forcieren der Denaturationsprozesse von hochsuccinyliertem Legumin in Phosphatpuffer niedriger Ionenstärke. Die stets nachweisbare Rotverschiebung der Fluoreszenzemission infolge Acetylierung verdeutlicht, daß unter den Bedingungen der drei untersuchten Puffersysteme die Chromophore jeweils in eine stärker polare Umgebung gelangen und belegt somit, die unabhängig von der Ionenstärke, durch die zunehmende Acetylierung induzierte Expansion des Leguminmoleküls.

- Diskussion der Untersuchungen zur Proteinstabilität

Veränderungen der Proteinstruktur haben Einfluß auf die Proteinstabilität. Diese Struktur- bzw. Konformationsstabilitätsänderungen wurden im Rahmen dieser Arbeit als thermische Stabilität anhand von DSC-Messungen (Kap. 4.2.5) und als Stabilität gegenüber Denaturans durch Untersuchungen der Fluoreszenzemission (Kap. 4.2.6) erfaßt.

Die Klärung der Frage, ob der Entfaltungsprozeß als einstufiger oder als mehrstufiger Vorgang beschrieben werden kann, ist Grundvoraussetzung für die Interpretation der thermodynamischen Daten. Die Entfaltung kleiner globulärer (Ein-Domänen-)Proteine ( $M_r = 12\text{-}30$  kDa) ist ein Gleichgewichtsübergang zwischen den beiden thermodynamischen Proteinzuständen „nativ“ und „denaturiert“ [177]. Komplexere und höhermolekulare Proteine wie das Ackerbohnen-Legumin weisen verschiedene strukturelle Domänen auf, die von weniger geordneten Bereichen unterbrochen werden, deren Entfaltung sich jedoch ebenfalls durch einen einstufigen Prozeß beschreiben läßt [178, 149]. Notwendiges und hinreichendes Kriterium für eine einstufige Modellierung des Entfaltungsprozesses ist die Übereinstimmung von experimentell bestimmter thermischer Entfaltungsenthalpie  $\Delta H_{cal}$  und der nach der VAN 'T HOFF-Gleichung (Gleichung 32) berechneten Enthalpie  $\Delta H^{vH}$  [177, 179, 180].

$$\left( \frac{\partial \ln K}{\partial T} \right)_p = \frac{\Delta H^{vH}}{RT^2} \quad \text{Gleichung 32}$$

Das Verhältnis  $\Delta H_{cal}/\Delta H^{vH}$  ist für eine Reihe von 11 S-Globulinen von GRINBERG *et al.* [149] bestimmt worden. Der für das Ackerbohnen-Legumin ermittelte Wert von 1,01 erlaubt die Anwendung des Einstufen-Modells auf den Entfaltungsprozeß [149, 181]. Das Leguminmolekül läßt sich demnach in erster Näherung als eine Anordnung von 12 weitestgehend thermodynamisch äquivalenten Domänen, entsprechend den konstituierenden Polypeptidketten, beschreiben [149]. Die thermodynamische Äquivalenz dieser Domänen begründet die Annahme eines hochkooperativen, näherungsweise einstufigen Legumin-Entfaltungsprozesses. Der thermodynamische Beitrag, der aus den Wechselwir-

kungen zwischen den konstituierenden Polypeptidketten innerhalb der Untereinheiten oder zwischen den Untereinheiten resultiert, ist im Vergleich zum Wärmebeitrag durch die Entfaltung der Ketten vernachlässigbar gering [149].

Die spezifische Denaturationsenthalpie ist ein universelles Charakteristikum der untersuchten Proteinprobe. Die abnehmende spezifische Denaturationsenthalpie (**Abbildung 75**) deutet auf eine relativ kontinuierliche Abnahme der Stabilität von Legumin und seinen Untereinheiten sowohl mit zunehmender Acetylierung als auch, in noch stärkerem Maß, infolge Succinylierung hin. Der demnach kontinuierliche Verlust der kompakten globulären Struktur gibt keinen Hinweis auf das Vorhandensein von Intermediaten mit besonders stabiler Konformation.

Für den Vergleich der Eigenschaften von Substanzen mit unterschiedlichen Strukturen sind die molaren Größen oftmals informativer als die spezifischen. Im vorliegenden Fall sollen daher die thermodynamischen Parameter auf ein Mol konstituierende Kette, also  $M_w/12$  (s. o.), bezogen werden. Auf diese Weise zeigt man, wie die Denaturationsenthalpie der Legumin-Untereinheit von Art und Grad der Modifikation abhängt, und daß intermolekulare und „intermonomere“ Wechselwirkungen nicht in die Denaturationsenthalpie eingeschlossen sind. Die nachfolgende Tabelle enthält die thermodynamischen Parameter einiger Leguminproben bezogen auf ein Mol konstituierende Kette sowie die daraus nach Gleichung 20 (S. 44) für eine Temperatur von 20 ° C berechnete molare Thermostabilität  $\Delta G(293\text{ K})$ .

**Tabelle 18:** Mikrokolorimetrisch (DSC) ermittelte thermodynamische Parameter von nativem Legumin und einigen ausgewählten acylierten Derivaten im Vergleich

	nativ	33 % suc	37 % ac	96 % suc	98 % ac
$T_d$ [K]	$363 \pm 1$	$358 \pm 1$	$362 \pm 1$	$327 \pm 2$	$327 \pm 2$
$\Delta H_{cal}$ [kJ/mol]	$583 \pm 30$	$321 \pm 15$	$467 \pm 15$	~ 29	~ 146
$\Delta C_p$ [kJ/mol·K]	$9,04 \pm 0,88$	$8,17 \pm 0,88$	$2,04 \pm 0,29$	0,58	$6,71 \pm 0,58$
$\Delta G(293\text{ K})$ [kJ/mol]	48	7	75	2	3

Die molaren Größen wurden mit einer Molmasse von  $M_w = (350\ 000\ \text{g/mol})/12$  berechnet, der Wert von  $\Delta H_{cal}$  beschreibt die totale molare Denaturationsenthalpie.

Die in **Tabelle 16** und **Tabelle 18** für natives Ackerbohnen-Legumin enthaltenen Werte stimmen mit den von GRINBERG *et al.* [149] ermittelten Daten weitgehend überein. Die Abnahme der Konformationsstabilität mit zunehmender Modifizierung, in stärkerem Maße infolge Succinylierung, ist in Kap. 4.2.5 bereits beschrieben worden. Ebenso nimmt die für den einfachen Fall eines Einstufenprozesses und  $T = 293\text{ K}$  berechnete molare Thermostabilität,  $\Delta G$ , durch die Succinylierung ab. Sie wird bereits durch die Modifizierung von 33 % der Aminogruppen des Legumins stark verringert, sinkt jedoch bei zunehmen-

der Blockierung der funktionellen Gruppen weiter bis zum fast vollständigen Verlust der Tertiärstruktur. Im Falle der Acetylierung fällt auf, daß die molare Thermostabilität nach einer Modifizierung von 37 % der Aminogruppen zunächst deutlich zunimmt. Wie bereits durch die spektroskopischen Untersuchungen gezeigt wurde (s. **Abbildung 43**), ändert sich die Konformation zunächst bis 37 % Acetylierung (erhöhte Fluoreszenz entsprechend stärkerer Vergrabung der Chromophoren) in Richtung einer Zunahme der Molekülkompaktheit. Nach weiterer, vor allem hoher ( $\geq 70$  %) Modifizierung ist die Auffaltung des Moleküls nachweisbar. In guter Übereinstimmung dazu sind die hochacetylierten Leguminderivate, ähnlich den hochsuccinylierten Leguminproben, nur von geringer Thermostabilität. Der Vergleich der molaren thermodynamischen Denaturationsparameter von hochsuccinylierten und hochacetylierten Proben deutet dennoch auf die Existenz einer geringfügig höheren Konformationsstabilität der acetylierten Derivate hin.

Zur Untersuchung der Konformationsstabilität wurden die Ergebnisse der DSC für die Charakterisierung der Tertiärstruktur [177, 178] und die der analytischen Ultrazentrifugation für die Charakterisierung der Quartärstruktur eines Proteins [182] in Zusammenhang gebracht. Aus der Deconvolution der Ultrazentrifugationsbilder und der Thermogramme wurde die Zusammensetzung der untersuchten Proben und die thermodynamischen Charakteristika für die Stabilität der Tertiärstruktur der verschiedenen Formen des Proteins ermittelt. Das Auftreten verschiedener Peaks in den Thermogrammen entsprechend den unterschiedlichen Proteinformen (11-, 7- und 3 S) ist mit den Ergebnissen der Ultrazentrifugation, für die in vielen Stufen untersuchte Succinylierung, gut in Einklang zu bringen. Es wurde gefunden, daß die Succinylierung zu einer Dissoziation der hexameren 11 S-Form des Proteins in seine trimere 7 S-Form und die Untereinheiten (3 S-Form) führt und bei steigendem Acylierungsgrad der Anteil an Untereinheiten auf Kosten der anderen Formen (11 S und 7 S) wächst. Ausgehend vom nativen Protein (Hexamer) korrespondiert das Auftreten eines neuen Peaks im Thermogramm mit dem Auftreten eines neuen Peaks im Ultrazentrifugationsbild; die Anzahl der konstituierenden Kurven der Thermogramme stimmt mit der Anzahl der mittels Ultrazentrifugation beobachteten Komponenten überein. Die „Identifizierung“ der deconvolutionierten Thermogrammpeaks acetylierter Derivate ist weitaus schwieriger. Sie erfolgte einfach in Anlehnung an die Zuordnung für die thermischen Übergänge der succinylierten Leguminderivate und steht dadurch im Widerspruch zu den Ultrazentrifugationsdaten. Die durch Peak-Deconvolution berechnete Denaturation einer der „7 S“-Leguminform zugeordneten Komponente ist rein formalistisch und findet keine Bestätigung durch die Ultrazentrifugation oder andere Untersuchungsmethoden. Auch wird der Aggregation keine Rechnung getragen. Die Bimodalität der Thermogramme kann aber ebenso in der unterschiedlichen Konformationsstabilität von Polypeptidketten anderer als der zugeordneten Leguminformen begründet

sein, was für das Ergebnis der DSC-Untersuchungen nur von untergeordneter Bedeutung ist. Es wird an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen, daß der KIRCHHOFF-Plot [149, 183] die Annahme einer homologen Tertiärstruktur der unterschiedlichen Leguminformen unterstützt. Die mit zunehmender Modifizierung (stärker bei Succinylierung) und in der Folge  $11S > 7S > 3S$  sinkende Stabilität der Tertiärstruktur bezeichnet jeweils die Abnahme der Konformationsstabilität der die unterschiedlichen Leguminformen konstituierenden Polypeptidketten.

Als weitere Informationsquelle für die Abschätzung des Einflusses der Acylierung auf die Konformationsstabilität von Ackerbohnen-Legumin wurde die Entfaltung in Gegenwart von Denaturans betrachtet. Aus den in Kap. 4.2.6 bereits genannten Gründen konnte die Denaturansstabilität acylierter Leguminproben nur in Gegenwart von Guanidiniumchlorid, nicht aber die Harnstoff-Denaturationsstabilität gemessen werden. Für den Mechanismus der Proteindenaturation mit Guanidinium-Hydrochlorid werden von TANFORD [179] hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen mit den polaren Seitenketten diskutiert. Die Denaturanshalbwertkonzentration  $[GuHCl]_{1/2}$  hängt jedoch in erster Näherung nicht vom Entfaltungsmechanismus ab [126]. Grundlegende Voraussetzungen für diese Methode sind jedoch die Annahme einer einstufigen Denaturation (s. o.) und ihre Reversibilität. Es wurde nachgewiesen, daß neben der Denaturation mit Harnstoff auch die Guanidinium-Denaturation von succinylierten Proben mit Modifizierungsgraden über 64 % zu irreversiblen Veränderungen der Proteinkonformation führt, weshalb zu höher succinylierten Leguminderivaten keine Aussagen getroffen werden können. Die leichte Zunahme der Denaturanshalbwertkonzentration  $[GuHCl]_{1/2}$  im Vergleich zum nativen Legumin ist durch die bei gleichbleibend hohem  $\Delta G_{Puffer}$ -Wert verringerte Abhängigkeit der Denaturansstabilität von der Denaturanskonzentration bedingt. Sie allein läßt keine sichere Aussage über eine Änderung der Konformationsstabilität zu. Die Steilheit der Entfaltungskurve, und somit auch der Wert  $m$ , verringert sich z. B. bei Abweichungen des Entfaltungsprozesses vom einstufigen (two-state) Modell [125]. Derartige Modellabweichungen kann man nicht völlig ausschließen. An einer gegenüber Denaturans (Guanidinium) sehr stabilen Konformation der 47 % acetylierten Leguminprobe besteht jedoch kein Zweifel.

Die erhöhte Thermostabilität der 37 % acetylierten Probe und die mindestens mit nativem Legumin vergleichbar hohe Denaturansstabilität der 47 % acetylierten Probe fallen beide in den Bereich, in dem bereits die Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchungen auf eine veränderte, kompaktere Molekülform hindeuten. Die Untersuchungen zur Strukturstabilität sprechen für eine gegenüber Temperatur und Denaturans erhöhte Stabilität der Leguminstruktur nach Acetylierung von etwa 30-50 % der Aminogruppen, wogegen durch die weitere Einfuhr von Acetylgruppen die Konformationsstabilität stark

vermindert wird. Im Unterschied dazu verringert sich die Leguminstabilität durch die Einführung von Succinylgruppen generell, was sicher in erster Linie auf den starken Ladungseinfluß zurückzuführen ist.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluß einer stufenweisen Acetylierung und Succinylierung des 11 S-Globulins der Ackerbohne (Legumin) auf die Struktur dieses oligomeren 350 kDa-Speicherproteins beschrieben. Erstmals werden die Ergebnisse einer umfassenden physikochemischen Charakterisierung von Acyl-Leguminderivaten durch kombinierte hydrodynamische, chromatographische, spektroskopische und thermodynamische Untersuchungen vorgestellt.

Die **Acylierung** erfolgt vorrangig an den  $\epsilon$ -Aminogruppen der Lysinreste und nach deren weitgehender Modifizierung (> 95 % N-Succinylierung; > 60 % N-Acetylierung) auch an den Hydroxylgruppen von Serin, Threonin und Tyrosin. In erschöpfend acetyliertem oder succinyliertem Legumin liegen 50 % der Tyrosinreste acyliert vor, wobei O-Succinyl-Tyrosin spontan desuccinyliert wird.

Die **Succinylierung** führt zur stufenweisen **Dissoziation** des aus 6 polymorphen Untereinheiten aufgebauten Leguminmoleküls nach dem Schema: *Hexamer @ Trimer + Monomer @ Monomer*. Ab etwa 60 % N-Succinylierung tritt in der zweiten Dissoziationsstufe nur das Trimer auf. Es konnte nachgewiesen werden, daß maximale Mengen der trimeren 7 S-Komponente nach 60 - 80 % Succinylierung vorliegen. Nach einer Blockierung von 95 % der Aminogruppen liegen ausschließlich die monomeren Untereinheiten des Legumins vor.

Die **Acetylierung** von Legumin bewirkt einen prinzipiell anderen Verlauf der Strukturänderung als die Succinylierung: *Hexamer @ Hexamer + Monomer @ Assoziat + Monomer*. Bis zu Modifizierungsgraden von etwa 80 % bildet die 11 S-Komponente den Hauptanteil. Erst bei höheren Modifizierungsgraden erfolgt eine partielle Dissoziation in die monomeren Untereinheiten (maximal 30 %). Ein 7 S-Dissoziationsprodukt ist nicht nachweisbar. Als Hauptprodukt hochgradig acetylierter Leguminderivate treten **17 S-Assoziate** auf. Aufgrund der für sie ermittelten Molmasse von etwa 700 000 g/mol, konnte erstmals das Vorliegen einer Hauptfraktion aus dimeren Leguminmolekülen (12 Untereinheiten) abgeleitet werden. Dieses Phänomen der Assoziation acetylierter 11 S-Proteine ist bisher nicht beschrieben worden. Die Untersuchungsergebnisse belegen eindeutig die schrittweise **Oligomerisierung** des acetylierten Proteins nach hochgradiger N-/O-Blockierung sowie den Zusammenhang zwischen der Zahl eingeführter hydrophober Gruppen und der Assoziation über hydrophobe Wechselwirkungen. Lagerungsversuche zeigten, daß in Lösung die weitere Oligomerisierung von hochacetyliertem Legumin bis hin zu löslichen hexame-

ren Legumin-Assoziaten (36 Untereinheiten) mit Sedimentationskoeffizienten von  $S_{20,S}^0 = 27$  S erfolgt.

Aus der Kombination von hydrodynamischen Untersuchungen konnten Aussagen über die **Form der acylierten Moleküle** abgeleitet werden.

Es wurde gefunden, daß die Leguminmoleküle bei **Succinylierungsgraden** zwischen 60 und 80 % mit deutlich verringerter Kompaktheit vorliegen, doch erst nach Succinylierung der Hydroxylgruppen eine drastische molekulare Expansion auftritt.

Durch das Einführen von **Acetylgruppen** verringert sich die Kompaktheit des globulären Moleküls nur wenig. Das 17 S-Assoziat ist gegenüber dem nativem Leguminmolekül 1,5fach expandiert. Es handelt sich um ein relativ kompaktes und nahezu sphärisches Molekül. Für die höheren Assoziate konnten eine annähernd globuläre Struktur und geringe Molekülkompaktheit abgeleitet werden.

Für die gezielte Einstellung funktioneller Eigenschaften des Legumins durch Acylierung sind Ladungs- und Hydrophobizitätsänderungen sowie resultierende Konformationsänderungen entscheidend.

Die Veränderung der **Hydrophobizität** des Legumins infolge Acylierung wurde mit ANS-Fluoreszenzsondentechnik, RP-HPLC und Verteilung in einem Polymer-Zweiphasensystem untersucht. Es resultierte ein mit der Anzahl eingeführter Acetylgruppen kontinuierlich ansteigender  $S_0$ -Wert als Maß der Oberflächenhydrophobizität. Die Oberflächenhydrophobizität der (hoch)succinylierten Proteine ist geringer als die der (hoch)acetylierten Derivate. Durch die Verteilung succinylierter Leguminderivate im Ficoll-Dextran-System wurde eine, ab einem Succinylierungsgrad von 65 %, kontinuierlich ansteigende Hydrophilie nachgewiesen. Die Ergebnisse wurden durch das Erstellen von modifizierten Hydrophathieprofilen auf der Grundlage der Legumin-Aminosäuresequenzen untermauert.

Zur physikochemischen Charakterisierung der stufenweise acylierten Leguminderivate wurden neben analytischer Ultrazentrifugation und dynamischer Lichtstreuung die Kapillarkviskosimetrie und Präzisionsdichtemessung angewendet.

Die **Grenzviskosität succinylierter** Legumine erhöht sich ausgehend vom nativen Legumin ( $[\eta] = 6,1 \text{ cm}^3/\text{g}$ ) bis 50 % *N*-Succinylierung nur geringfügig und bei weiterer Succinylierung mit einem Zwischenmaximum bei 65 - 70 % stärker. Ein drastischer Anstieg auf Maximalwerte von  $[\eta] = 19,3 \text{ cm}^3/\text{g}$  wird für hochgradig *N*- und *O*-succinylierte Derivate nachgewiesen. Die Viskosität succinylierter Legumine ist unter Standardbedingungen (pH 8;  $I=0,5$ ) erst ab Modifizierungsgraden von 90 % konzentrationsabhängig; sie nimmt mit steigender Proteinkonzentration zu. Im Unterschied dazu wird eine generell negative Konzentrationsabhängigkeit der **acetylierten** Derivate nachgewiesen. Die

Grenzviskosität von Legumin wird durch die Acetylierung weniger beeinflusst als infolge Succinylierung. Bis 50 % *N*-Acetylierung sind die Werte der Grenzviskosität vergleichbar mit denen der succinylierten Proteine. Infolge der Acetylierung von 70 - 75 % der Aminogruppen werden minimale Grenzviskositäten induziert, die ab etwa 90 % *N*-Acetylierung auf Werte von maximal  $[\eta] = 9,0 \text{ cm}^3/\text{g}$  ansteigen.

Das **partielle spezifische Volumen** nimmt unter Standardbedingungen mit zunehmendem Acetylierungsgrad stetig von  $\bar{v}_{\text{nativ}} = 0,728 \text{ cm}^3/\text{g}$  auf  $\bar{v}_{98\% \text{ ac}} = 0,701 \text{ cm}^3/\text{g}$  ab. Das partielle spezifische Volumen succinylierter Leguminderivate ist ab etwa 65 % Modifizierung gegenüber nativem Legumin geringfügig und nach erschöpfender Succinylierung mit  $\bar{v}_{99\% \text{ suc}} = 0,705 \text{ cm}^3/\text{g}$  deutlich verringert. Nach der Succinylierung von 75 % Aminogruppen wurde ein maximales partielles spezifisches Volumen von  $0,736 \text{ cm}^3/\text{g}$  bestimmt. Succinylierte und acetylierte Leguminproben unterscheiden sich deutlich in ihren physikochemischen Eigenschaften.

Art und Ausmaß der **Konformationsänderungen** in Abhängigkeit von Grad und Natur der chemischen Modifizierung wurden durch Fluoreszenzemissionsmessungen, UV-Ableitungs- und Differenzableitungsspektren sowie circulardichroitische Spektroskopie im nahen und fernen UV-Bereich untersucht.

Die mit zunehmender **Succinylierung** einhergehende Auffaltung des Legumins und der Verlust geordneter Sekundärstrukturanteile wurden nachgewiesen. Die Fluoreszenzintensität sinkt mit zunehmender Succinylierung bis 68 % kontinuierlich, steigt bei 80 % *N*-Succinylierung nochmals an und fällt bei 95 % auf einen Minimalwert. Die Succinylierung bewirkt eine geringfügige Rotverschiebung der Fluoreszenzemission. Die dementsprechende Blauverschiebung der UV-Absorptionsbanden bei zunehmender Modifizierung spiegelt den mit der Succinylierung einhergehenden Entfaltungsprozeß wider. Die Differenzableitungsspektren unterstreichen die Beteiligung aller aromatischen Chromophoren an der Konformationsänderung. Das ermittelte Verhältnis der Tyr/Trp-Exponierung steigt ausgehend vom nativen Legumin bis 65 % Succinylierung stark an, fällt bei weiterer Modifizierung und erreicht bei erschöpfender Succinylierung einen Maximalwert. Aus dem Zusammenhang der beschriebenen physikochemischen Eigenschaften und spektroskopischen Studien **60 - 80 % *N*-succinylierter Leguminderivate** wurde ein **besonderer struktureller Zustand** abgeleitet, der sich sowohl von der kompakten globulären Konformation des nativen Proteins als auch von der stark expandierten Struktur des erschöpfend succinylierten Legumins unterscheidet. Erstmals konnte gezeigt werden, daß diese speziellen Eigenschaften 60 - 80 % succinylierter Derivate mit dem Auftreten maximaler Gehalte des moderat expandierten 7 S-Halbmoleküls korrelieren.

Durch spektroskopische Untersuchungen **acetylierter** Legumine ließen sich ausgeprägte Veränderungen in der Tertiärstruktur nachweisen, was mit der Hydrophobizitätserhöhung

begründet wurde. **Größte Konformationsänderungen** treten beim **Übergang zwischen 80 und 98 % N-Acetylierung** auf. Sie äußern sich in einer drastischen Abnahme der Fluoreszenzintensität bei Rotverschiebung des Fluoreszenzemissionsmaximums um etwa 10 nm sowie durch die sprunghafte Blauverschiebung sämtlicher UV-Banden. Diese Konformationsänderungen wurden auf die Ausbildung von Assoziaten mit aufgelockerter Molekülstruktur zurückgeführt. Aus der Begünstigung hydrophober Wechselwirkungen und der größeren molekularen Flexibilität läßt sich für hochacetylierte Leguminderivate eine erhöhte Grenzflächenaktivität ableiten.

Aus dem Fern-UV-CD-Spektrum von nativem Legumin sind mit 45 %  $\beta$ -Faltblattstrukturen und 19 %  $\alpha$ -helikalen Anteilen für ein 11 S-Globulin typische Werte bestimmt worden. Die CD-Spektren von moderat und **hochacetylierten Derivaten** weisen auf einen nahezu unveränderten Anteil der domänenstabilisierenden  $\beta$ -Faltblattstruktur hin und liefern Gründe für die Annahme, daß trotz hochgradiger Acetylierung **relativ geordnete Reststrukturen** vorliegen. Die in der Literatur für einige hochacetylierte 11 S-Globuline beschriebene scheinbare Zunahme des  $\alpha$ -Helixgehaltes wurde widerlegt.

Die **Konformationsstabilität** der modifizierten Proteine wurde durch DSC untersucht. Es wurden thermische Übergänge beobachtet, die den einzelnen Leguminformen zugeordnet werden konnten. Die Denaturationstemperatur sinkt in der Abstufung 11 S > 7 S > 3 S und jeweils mit zunehmender Acylierung. Die spezifische Denaturationsenthalpie verringert sich mit zunehmender Modifizierung weitgehend linear. Die molare **Thermostabilität** hochmodifizierter Legumine ist im Vergleich zum nativen Protein extrem gering. Moderat acetylierte Derivate sind deutlich thermostabiler als moderat succinylierte Derivate.

Aussagen über die Konformationsstabilität acylierter Leguminderivate wurden durch fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen der **Entfaltung in Gegenwart von Denaturans** getroffen. Die Denaturation von unmodifiziertem Legumin verlief sowohl in Gegenwart von Harnstoff als auch von Guanidinium-Hydrochlorid (GuHCl) reversibel. Hingegen ließ sich die Reversibilität der Entfaltung acylierter Leguminproben lediglich nach Denaturation mit GuHCl nachweisen. Die GuHCl-Denaturation **acetylierter** Leguminproben ist mindestens zu 90 % reversibel. Denaturans- und Thermostabilität von Legumin werden durch eine etwa 50 %ige N-Acetylierung nicht verringert. Die Konformationsstabilität sinkt nach erschöpfender Acetylierung drastisch. Für **succinylierte** Leguminproben wurde die Entfaltung bei Modifizierungsgraden bis 64 % als reversibel, bei höheren Succinylierungsgraden als irreversibel nachgewiesen. Die Denaturansstabilität wird bereits durch die Succinylierung von 32 % der Aminogruppen deutlich herabgesetzt und sinkt bei zunehmender Modifizierung bis 50 % weiter. Die Denaturansstabilität von 50 % succinylier-

tem Legumin entspricht etwa der verminderten Stabilität hochacetylierter Derivate und bleibt bei weiterer Erhöhung des Blockierungsgrades auf 65 % unverändert.

Der strukturelle Zustand acylierter Leguminderivate unter wechselnden Milieubedingungen (**Einfluß der Ionenstärke**) wurde mit hydrodynamischen und spektroskopischen Methoden untersucht. Dabei wurde gezeigt, daß Neutralsalze einen stabilisierenden Effekt auf die Struktur von acylierten 11 S-Globulinen ausüben.

Die Elliptizitätswerte **succinylierter** Derivate steigen mit der Erhöhung der Ionenstärke von 0,1 auf 1,0 entsprechend einer abnehmenden Beweglichkeit der aromatischen Reste. Es konnte belegt werden, daß die stärksten Denaturationseffekte im Puffer niedrigster Ionenstärke auftreten. Die Abnahme der molaren Expansion von erschöpfend succinyliertem Legumin mit steigender Ionenstärke wurde nachgewiesen. Das Verringern der Ionenstärke von 0,5 auf 0,1 führt aufgrund starker elektrostatischer Wechselwirkungen zu drastisch veränderten hydrodynamischen Eigenschaften dieses Legumins. Es konnte gezeigt werden, daß die hohe Ionenstärke bestenfalls eine partielle Unterdrückung der durch die Succinylierung induzierten molekularen Expansion oder Entfaltung des Proteins bewirkt. Die strukturellen Veränderungen des Proteins können bei geringen Blockierungsgraden kompensiert werden, bei hochsuccinylierten Derivaten ist der Einfluß hoher Ionenstärke auf die Leguminstruktur geringer.

Die Erhöhung der Ionenstärke bewirkt die Zunahme der Kompaktheit **acetylierter** Moleküle mit größten Effekten nach erschöpfender Acetylierung und verstärkt die Aggregationsstendenz. In Übereinstimmung damit führt eine Verringerung der Ionenstärke zur stärkeren Exponierung der Chromophoren.

## 7 Literatur

- 1 FAO Production Yearbook Vol. 50, Statistics Series, Rome (1996) 33
- 2 Pahl H.: Potential and constraints in production and end-uses of grain legumes in Europe. Proc. 3<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes, 14-19 November 1998, Valladolid, Spain, 3-4
- 3 Gatel F., Champ M.: Grain Legumes in Human and Animal Nutrition. Up to Date Results and Questions. Proc. 3<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes, 14-19 November 1998, Valladolid, Spain, 7-11
- 4 FAO Food Balance Sheets, Statistics Series, Rome (1996) 133
- 5 Bourdillon A.: Advantages and constraints of grain legumes for the feed market. Proc. 3<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes, 14-19 November 1998, Valladolid, Spain, 5
- 6 Kozłowska H., Zdunczyk Z., Honke J.: Legume grains for food and non food uses. Proc. 3<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes, 14-19 November 1998, Valladolid, Spain, 43-47
- 7 Beelitz H.D., Grosch W.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Springer-Verlag, Berlin, 1987
- 8 Belikow W.M., Kharatyan S.G., Besrukow M.G., Wolnowa A.I.: Untersuchung des Nährwertes von selektiv acyliertem Casein. Nahrung **19** (1975) 65-67
- 9 Schwenke K.D., Rauschal E.J., Linow K.J., Pätz W.: Chemische Modifizierung von Proteinen. 7. Mitt. Beeinflussung physikochemischer und funktioneller Eigenschaften von Casein durch Succinylierung. Nahrung **25** (1981) 201-212
- 10 Murphy M.C., Howell N.K.: Effect of succinylation on the functional and physicochemical properties of bovine serum albumin. J. Sci. Food Agric. **51** (1990) 109-123
- 11 Rao A.G.A., Rao M.S.N.: Effect of succinylation on the oligomeric structure of glycinin. Int. J. Peptide Protein Res. **14** (1979) 307-312
- 12 Franzen K.L., Kinsella J.E.: Functional properties of succinylated and acetylated soy protein. J. Agric. Food Chem. **24** (1976) 788-795
- 13 Thompson L.U., Cho Y.S.: Chemical composition and functional properties of acylated low phytate rapeseed protein isolate. J. Food Sci. **49** (1984) 1584-1587
- 14 Nitecka E., Schwenke K.D.: Functional properties of plant proteins. Part 8. Effect of succinylation on some functional properties of the main globulin fraction from rapeseed (*Brassica napus* L.). Nahrung **30** (1986) 969-974
- 15 Schwenke K.D.: Structural studies on native and chemically modified storage proteins from rapeseed (*Brassica napus* L.) and related plant proteins. Nahrung **34** (1990) 225-240
- 16 Canella M., Castriotta G., Bernardi A.: Functional and physicochemical properties of succinylated and acetylated sunflower protein. Lebensm. Wiss. Technol. **12** (1979) 95-101
- 17 Beuchat L.R.: Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein. J. Agric. Food Chem. **25** (1977) 258-261
- 18 Shetty K.Y., Rao, M.S.N.: Effect of succinylation on the oligomeric structure of arachin. Int. J. Peptide Protein Res. **11** (1978) 305-313
- 19 Schwenke K.D., Anders K., Junker B., Schneider C.: Chemical and gel electrophoretic characterization of acetylated faba bean protein isolates. Nahrung **35** (1991) 759-766
- 20 Schwenke K.D., Dudek S., Mothes R., Raab B., Seifert A.: Physico-chemical and enzymatic studies on acetylated protein isolates from faba beans (*Vicia faba* L.). Nahrung **37** (1993) 258-268
- 21 Schwenke K.D., Pahl L., Danilenko A.N., Grinberg V.J., Tolstoguzov V.B.: `Continuous` conformational change in succinylated faba bean protein isolates. Nahrung **34** (1990) 399-401
- 22 Krause J.-P., Schwenke K.D.: Relationships between adsorption and emulsifying of acetylated protein isolates from faba beans (*Vicia faba* L.). Nahrung **40** (1996) 12-17
- 23 Krause J.-P.: Grenzflächenverhalten acetylierter Globuline der Ackerbohne (*Vicia faba* L.). Dissertation, Universität Potsdam 1995
- 24 Osborne T. B.: The vegetable proteins. Monographs in Biochemistry, Longmans, Breen & Co, London, 1924
- 25 Derbyshire E., Wright D.J., Boulter D.: Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. Phytochem. **15** (1976) 3-24
- 26 Schulz G.E.: Structural rules for globular proteins. Angew. Chem. **16** (1977) 24-33

- 27 Ludescher R.D.: Physical and chemical properties of amino acids and proteins. In: Food proteins: Properties and characterization, Nakai S., Modler H.W. (Hrsg.), VCH Publishers, Weinheim, 1996, 23-71
- 28 Tanford C.: Physical chemistry of macromolecules. Wiley & Sons, New York, 1961
- 29 Freitas R., Ferreira R., Teixeira A.: Structural Comparison among the major storage proteins from legume seeds. Proc. 3<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes, 14-19 November 1998, Valladolid, Spain, 240
- 30 Casey R., Domoney C.: The biochemical genetics of pea storage proteins. Kulturpfl. **32** (1984) 99-108
- 31 Casey R.: The Seed Composition of Grain Legumes. Proc. 3<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes, 14-19 November 1998, Valladolid, Spain, 73-75
- 32 Schwenke K.D.: Pflanzliche Samenglobuline als dissoziierende und assoziierende Proteinsysteme. Nahrung **19** (1975) 69-82
- 33 Zirwer D., Gast K., Welfle H., Schlesier B., Schwenke K.D.: Secondary structure of globulins from plant seeds: A re-evaluation from circular dichroism measurements. Int. J. Biol. Macromol. **7** (1985) 105-108
- 34 Provencher S.W., Glöckner J.: Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. Biochem. **20** (1981) 33-37
- 35 Sáenz de Miera L.E., Llorente A., Garcia P., Pérez de la Vega M.: Storage protein gene sequences in lentil (lens). Proc. 3<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes, 14-19 November 1998, Valladolid, Spain, 80-81
- 36 Plietz P., Zirwer D., Schlesier B., Gast K., Damaschun G., Schwenke K.D.: Comparison of the structures of different 11S and 7S globulins by small-angle X-ray scattering, quasi-elastic light scattering and circular dichroism spectroscopy. Kulturpfl. **32** (1984) 159-163
- 37 Koshiyama I., Fukushima D.: Physico-chemical studies on the 11S globulin in soybean seeds: Size and shape determination of the molecule. Int. J. Pept. Prot. Res. **8** (1976) 283-289
- 38 Wright D.J., Bumstead M.R.: Legume proteins in food technology. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B **304** (1984) 381-393
- 39 Danilenko, A.N.; Bikbov, T.M.; Burova, T.V.; Grinberg, V.Y.; Tolstoguzov, V.B.: The effect of neutral salts on the conformational stability of 11 S globulins from some seeds using differential scanning microcalorimetry. Nahrung **30** (1986) 257-262
- 40 Plietz P., Damaschun G.: The structure of the 11 S seed globulins from various plant species: Comparative investigations by physical methods. Stud. Biophys. **116** (1986) 153-173
- 41 Hawtin G.C., Hebblethwaite P.D.: The faba bean (*Vicia faba* L.). A Basis of Improvement. Butterworth, London, 1983
- 42 Schultze-Motel J.: Die archäologischen Reste der Ackerbohne *Vicia faba* und die Genese der Art. Kulturpfl. **19** (1971) 321-358
- 43 Jacob F., Jäger E.J., Ohmann E.: Kompendium der Botanik, Gustav Fischer Verlag, Jena, 1981
- 44 Schmandke H.: Die Ackerbohne (*Vicia faba*) als Lebensmittelrohstoff, Akademie-Verlag, Berlin, 1988
- 45 Colonna P., Gallant D., Mercier C.: *Pisum sativum* and *Vicia faba* carbohydrates: Studies of fractions obtained after dry and wet protein extraction processes. J. Food Sci. **45** (1980) 1629-1636
- 46 Utsumi S., Yokoyama Z., Mori T.: Comparative Studies of subunit compositions of legumins from various cultivars of *Vicia faba* L. seeds. Agric. Biol. Chem. **44** (1980) 595-601
- 47 Müntz K., Horstmann C., Scholz G.: Proteine und Proteinbiosynthese in Samen von *Vicia faba* L. Kulturpfl. **20** (1972) 277-326
- 48 Wright D.J., Boulter D.: Purification and subunit structure of legumin of *Vicia faba* L. (broad bean). Biochem. Journal **141** (1974) 413-418
- 49 Plietz P., Zirwer D., Gast K., Schlesier B., Damaschun G.: Shape, symmetry, hydration and secondary structure of the legumine from *Vicia faba* in solution. Biochim. Biophys. Acta **784** (1984) 140-146
- 50 Schwenke K.D., Staatz A., Dudek S., Krause J.-P., Noack J.: Legumin-T from faba bean legumin: isolation, partial characterization and surface functional properties. Nahrung **39** (1995) 193-202
- 51 Plietz P., Drescher B., Damaschun G.: Relationship between the amino acid sequence and the domain structure of the subunits of the 11 S seed globulins. Int. J. Biol. Macromol. **9** (1987) 161-165
- 52 Müntz K., Jung R., Saalbach G.: Synthesis, processing and targeting of legume seed proteins. Annual Proc. Phytochem. Soc. Europe **35** (1993) 128-146
- 53 Horstmann C.: Specific subunit pairs of legumin from *Vicia faba*. Phytochem. **22** (1983) 1861-1866

- 54 Horstmann C., Schlesier B., Otto A., Kostka S., Müntz K.: Polymorphism of legumin subunits from field bean (*Vicia faba* L. var. *minor*) and its relation to the corresponding multigene family. *Theoret. Appl. Genet.* **86** (1993) 867-874
- 55 Heim U.R., Schubert R., Bäumlein H., Wobus U.: The legumin gene family: structure and evolutionary implications of *vicia faba* B-type genes and pseudogenes. *Plant Mol. Biol.* **13** (1989) 653-664
- 56 Bäumlein H., Wobus U., Pustell J., Kafatos F.C.: The legumin gene family: structure of a B type gene of *Vicia faba* and a possible legumin gene specific regulatory element. *Nucleic Acids Res.* **14** (1986) 2707-2720
- 57 Schlesier B., Manteufel R., Rudolph A.: Reinigung und Charakterisierung von Legumin aus *Vicia faba* L. *Biochem. Physiol. Pfl.* **180** (1985) 225-237
- 58 Howell, N.K.: Chemical and enzymatic modifications. In: *Food proteins: Properties and characterization*, Nakai S., Modler H.W. (Hrsg.), VCH Publishers, Weinheim, 1996, 235-280
- 59 Means G.E., Feeney R.E.: *Chemical modifications of proteins*. Holden-Day, San Francisco, 1971
- 60 Feeney R.E., Whitaker J.R.: Chemical and enzymatic modification of plant proteins. In: *New protein foods*. Vol. 5, Altschul A.M., Wilcke H.L. (Hrsg.), Academic Press, London, 1985, 181-219
- 61 Feeney R.E.: Chemical modification of food proteins. In: *Food proteins: Improvement through chemical and enzymatic modifications*. Feeney R.E., Whitaker J.R. (Hrsg.), ACS Advances in Chemistry Series 160, American Chemical Society, Washington DC, 1977, 3-36
- 62 Glazer A.N., Delange R.J., Sigman D.S.: Chemical modification of proteins. Selected methods and analytical procedures. *Lab. Tech. Biochem. Mol. Biol.* **4** (1976) 1-205
- 63 Nakai S. In: *Food proteins: Properties and characterization*, Nakai S., Modler H.W. (Hrsg.), VCH Publishers, Weinheim, 1996, 12
- 64 Kilara A.: Effects of temperature on food proteins and its implications on functional properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **23** (1986) 323-395
- 65 Jimenez-Flores R., Bleck G.T.: Biotechnology. In: *Food proteins: Properties and characterization*, Nakai S., Modler H.W. (Hrsg.), VCH Publishers, Weinheim, 1996, 505-534
- 66 Müntz K., Christov V., Saalbach G., Waddel D., Pickhardt T., Schieder O., Wüstenhagen T.: Genetic engineering for high methionine grain legumes. *Nahrung* **42** (1998) 125-127
- 67 Utsumi S., Kito M.: Improvement of food protein functionality by chemical, physical and biological modifications. *Comments Agric. Food Chem.* **2** (1991) 261-278
- 68 Schwenke K.D.: Enzyme and chemical modification. In: *Food proteins and their applications*, Damodaran S., Paraf A. (Hrsg.), Marcel Dekker, New York, 1997, 393-423
- 69 Kabirullah M., Wills R.B.H.: Functional properties of acetylated and succinylated sunflower protein isolate. *J. Food Technol.* **17** (1982) 235-249
- 70 Butler P.J.G., Harris J.I., Hartley B.S., Lebermann R.: Reversible blocking of peptide amino groups by maleic anhydride. *Biochem. J.* **103** (1967) 78-79
- 71 Ismond M.A.H., Murray E.D., Arntfield S.D.: Stability of vicilin, a legume seed storage protein, with stepwise electrostatic modification. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **26** (1985) 584-590
- 72 Dixon H.B.F., Perham R.N.: Reversible Blocking of amino groups with citraconic anhydride. *Biochem. J.* **109** (1968) 312-314
- 73 Schmandke H., Maune R., Schmidt G., Schulz M., Kroll J.: Modifizierung der funktionellen Eigenschaften von Ackerbohnenprotein durch Acetylierung. *Nahrung* **21** (1977) 901-909
- 74 Seifert A., Schultz M., Strenge K., Muschiolik G., Schmandke H.: Mechanical barrier preventing the centrifugal creaming of O/W food emulsions stabilized by proteins. *Nahrung* **34** (1990) 293-295
- 75 Krause J.-P., Mothes R., Schwenke K.D.: Some physicochemical and interfacial properties of native and acetylated legumin from faba beans (*Vicia faba* L.). *J. Agric. Food Chem.* **44** (1996) 429-437
- 76 Schwenke K.D.: Beeinflussung funktioneller Eigenschaften von Proteinen durch chemische Modifizierung. *Nahrung* **22** (1978) 101-120
- 77 Schwenke K.D., Rauschal E.J.: Effect of succinylation on the physico-chemical properties of some food proteins. *Nahrung* **24** (1980) 593-595
- 78 Rauschal E.J., Linow K.-J., Pätz W., Schwenke K.D.: Chemische Modifizierung von Proteinen. 8. Mitt. Beeinflussung physico-chemischer und funktioneller Eigenschaften von Proteinen aus Ackerbohnen durch Succinylierung. *Nahrung* **25** (1981) 241-248
- 79 Schwenke K.D., Zirwer D., Gast K., Linow K.-J., Görnitz E., Gueguen J., Subirade M.: Dissociation of 11 S globulins from plant seeds after succinylation - a problem of subunit interaction. In: *Protein Interactions*, Visser H., VCH Publishers, Weinheim, 1992, 233-252

- 80 Schwenke K.D., Rauschal E.J., Robowsky K.D.: Functional properties of plant proteins. Part IV. Foaming properties of modified proteins from faba beans. *Nahrung* **27** (1983) 335-350
- 81 Krause J.-P., Krägel J., Schwenke K.D.: Properties of interfacial films formed by succinylated legumin from faba beans (*Vicia faba* L.). *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **8** (1997) 279-286
- 82 Wofsy L., Singer S.J.: Effects of the amidination reaction on antibody activity and on the physical properties of some proteins. *Biochem.* **2** (1963) 104-116
- 83 Goulet G., Ponnampalam R., Amoit J., Roy A., Brisson G.J.: Nutritional value of acylated oat protein concentrates. *J. Agric. Food Chem.* **35** (1987) 589-592
- 84 Mattarella N., Craemer L.K., Richardson T.: Amidation or esterification of bovine  $\beta$ -lactoglobulin to form positively-charged proteins. *J. Agric. Food Chem.* **31** (1983) 968-972
- 85 Lewis S.D., Shafer J.A.: Conversion of exposed aspartyl und glutamyl reidues in proteins to asparginyl and glutaminyll residues. *Biochim. Biophys. Acta* **303** (1973) 284-291
- 86 Fraenkel-Conrat H., Mohammad A., Ducay E.D., Mecham D.K.: The molecular weight of lysozyme after reduction and alkylation of the disulfide bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **73** (1951) 625-627
- 87 Lewin, A.: The molecular biology potential of the ascorbate system. Academic Press, London, 1974
- 88 Howell N.K., Taylor C.: Effect of ascorbic acid on the physicochemical and functional properties of globular proteins. *Int. J. Food Sci. Technology* **30** (1989) 321-334
- 89 Han K.K., Richard C., Biserte G.: Current developments in chemical cleavage of proteins. *Int. J. Biochem.* **15** (1983) 875-884
- 90 Shih, F.F.: Modification of proteins by non-enzymatic methods. In: *Biochemistry of food proteins*, Hudson B.J.F. (Hrsg.), Elsevier Publishers, London, 1992, 235-248
- 91 Edwards R.H., Saunders R.M., Kohler G.O.: Pilot scale preparation of protein concentrates from wheat millrun and wheat shorts using a wet alkaline process. *J. Food Sci.* **45** (1980) 860-863
- 92 Kato Y., Watanabe K., Sato Y.: Effect of Maillard reactions on some physical properties of ovalbumin. *J. Food Sci.* **46** (1981) 1835-1839
- 93 Kitabatake N., Cuq J.L., Chafel J.C.: Covalent binding of glycosyl residues to  $\beta$ -lactoglobulin: Effects on solubility and heat stability. *J. Agric. Food Chem.* **33** (1985) 125-130
- 94 Baniel A., Caer D., Colas B., Gueguen J.: Functional properties of glycosylated derivatives of the 11 S storage protein from pea (*pisum sativum* L.). *J. Agric. Food Chem.* **40** (1992) 200-205
- 95 Matheis G., Penner M.H., Feeney R.E., Whitaker J.R.: Phosphorylation of casein and lysozyme by phosphorus oxychloride. *J. Agric. Food Chem.* **32** (1983) 379-387
- 96 Matheis G., Whitaker J.R.: Chemical phosphorylation of food proteins: An overview and a prospectus. *J. Agric. Food Chem.* **32** (1984) 699-705
- 97 Woo S.L., Craemer L.K., Richardson T.: Chemical phosphorylation of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* **66** (1983) 984-987
- 98 Stoll V.S., Blanchard J-S.: Buffers: Principle and practice. *Meth. Enzymol.* **182** (1990) 24
- 99 Ismond M.A.H., Murray E.D., Arntfield S.D.: The role of non-covalent forces in micelle formation by vicilin from *Vicia faba*. *Food Chem.* **21** (1986) 27-46
- 100 Popello I.A., Suchkov V.V., Grinberg V.Y., Tolstoguzov V.B.: Isolation and purification of 11 S globulins from seeds of broad beans and pea. *Prikl. Biochim. Mikrobiol.* **24** (1988) 50-55 (*in Russisch*)
- 101 Itzhaki R.F., Gill D.M.: A micro-biuret method for estimating proteins. *Anal. Biochem.* **9** (1964) 401-410
- 102 Matissek R., Schnepel F.-M., Steiner G.: *Lebensmittelanalytik*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1989
- 103 Lange R., Friebe R., Linow F., Schaffner B.: Zur Anwendung der Methodenkombination Kjeldahl-Naßaufschluß/Berthelot-Reaktion bei der Stickstoffbestimmung in biologischen Materialien. 2. Mitt. Aufbau und Erprobung einer teilautomatisierten Apparatur zur routinemäßigen Bestimmung des Stickstoffs. *Nahrung* **23** (1975) 549-559
- 104 Fields R.: The rapid determination of amino groups with TNBS. *Methods Enzymol.* **25** (1972) 464-468
- 105 Riordan J.F., Vallee B.L.: Succinylcarboxypeptidase. *Biochem.* **3** (1964) 1768-1774
- 106 Habeeb A.F.S.A., Atassi M.Z.: Enzymic and immunochemical properties of lysozyme II. Conformation, immunochemistry and enzymic activity of a derivative modified at Tryptophan. *Immunochem.* **6** (1966) 555-566
- 107 Schwenke K.D., Knopfe C., Mikheeva L.M., Grinberg V.Y.: Structural changes of legumin from faba beans (*vicia faba* L.) by succinylation. *J. Agric. Food Chem.* **46** (1996) 2080-2086

- 108 Weber U., Osborne M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244** (1969) 4406-4412
- 109 Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (1970) 680-685
- 110 Schägger H., Cramer W.A., v. Jagow G.: Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* **217** (1994) 220-230
- 111 Cogan U., Kopelman M., Makady S., Shinitzky, M.: Binding affinities of retinol and related compounds to retinol binding properties. *Eur. J. Biochem.* **65** (1976) 71-78
- 112 Albertsson P.A.: Fractionation of cell parts and macromolecules in aqueous two phase systems. Almqvist u. Wiksell, Uppsala, 1960
- 113 Rauscher K., Voigt J., Wilke I., Wilke K.-T.: Chemische Tabellen und Rechentafeln für die analytische Praxis. VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1972
- 114 Tanford C.: Intrinsic and kinematic viscosity. *J. Phys. Chem.* **59** (1955) 798-799
- 115 Elias H.-G.: Ultrazentrifugenmethoden. Beckmann Instruments GmbH, München, 1961
- 116 Comper W.D., Williams R.P.W.: Hydrodynamics of concentrated proteoglycan solutions. *J. Biol. Chem.* **262** (1987) 13464-13471
- 117 Wetlaufer D.B.: Ultraviolet spectra of proteins and amino acids. *Adv. Protein Chem.* **17** (1962) 303-386
- 118 Fell A.F.: *Trends Anal. Chem.* **2** (1983) 63-66
- 119 Schmid F.X.: Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. In: Protein structure a practical approach, Creighton T.E. (Hrsg.), IRL press, Oxford, 1989, 251-285
- 120 Lehrbuch Chemische Thermodynamik, Herausgeberkollektiv, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1973
- 121 Freire E.: Differential scanning calorimetry. In: Methods in molecular biology, Vol. 40, Shirley B.A. (Hrsg.), Humana Press, Toronto, 1995, 191-218
- 122 Freire E., Biltonen R.L.: Statistical mechanical deconvolution of thermal transitions in macromolecules. I. Theory and application. *Biopolymers* **17** (1978) 463-479
- 123 Privalov P.L., Potekhin S.A.: Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. *Meth. Enzymol.* **131** (1986) 4-51
- 124 Creighton T.E.: Conformational restrictions on the pathway of folding and unfolding of the pancreatic trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.* **113** (1977) 275-294
- 125 Pace C.N., Shirley B.A., Thomson J.A.: Measuring the conformational stability of a protein. In: Protein structure – a practical approach, Creighton T.E. (Hrsg.), IRL Press, Oxford, 1989, 311-330
- 126 Pace C.N.: Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Meth. Enzymol.* **131** (1986) 266-280
- 127 Greene R.F., Pace C.N.: Urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease, lysozyme,  $\alpha$ -chymotrypsin, and  $\beta$ -lactoglobulin. *J. Biol. Chem.* **249** (1974) 5388-5393
- 128 Schlesier B., Bassüner R., van Hai N., Müntz K.: The cDNA derived primary structure of two distinct legumin A subunit precursors from field bean (*Vicia faba* L.). *Nucleic Acid Res.* **18** (1990) 7146
- 129 Kato A., Nakai S.: Hydrophobicity determined by fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **624** (1980) 13-20
- 130 Li-Chan E., Nakai S., Wood D.F.: Relationship between functional (fat binding, emulsifying) and physicochemical properties of muscle proteins. Effect of heating, freezing, pH and species. *J. Food Sci.* **50** (1985) 1034-1040
- 131 Schwenke K.D., Zirwer D., Gast K., Görnitz E., Linow K.-J., Gueguen J.: Changes of the oligomeric structure of legumin from pea (*Pisum sativum* L.) after succinylation. *Eur. J. Biochem.* **194** (1990) 621-627
- 132 Schwenke K.D., Dudek S., Seifert A., Mothes R., Staatz A.: Isolation of faba bean legumin - a comparative study of various methods. *Nahrung* **38** (1994) 559-567
- 133 Wolf W.J., Nelsen T.C.: Partial purification and characterization of the 15 S globulin of soybeans, a dimer of glycinin. *J. Agric. Food Chem.* **44** (1996) 785-791
- 134 Ackers G.K.: Molecular exclusion and restricted diffusion processes in molecular-sieve chromatography. *Biochem.* **3** (1964) 723-730

- 
- 135 Andrews P.: The gel-filtration behavior of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* **96** (1965) 595-606
- 136 Rogers K., Hellerman L., Thompson T.E.: L-glutamate dehydrogenase. III. Molecular size of bovine glutamate dehydrogenase and the methylmercuric bromide - activated enzyme in the concentration range of enzymatic assay. *J. Biol. Chem.* **240** (1965) 198-200
- 137 Svedberg T., Pedersen K.D.: *Die Ultrazentrifuge*, Steinkopf, Dresden, Leipzig, 1940
- 138 Schachman H.K.: Ultracentrifugation, diffusion, and viscometry. *Methods Enzymol.* **4** (1957) 32-103
- 139 Scheraga H.A., Mandelkern L.: Consideration of the hydrodynamic properties of proteins. *J. Amer. Chem. Soc.* **75** (1953) 179-184
- 140 Huggins M.L.: The viscosity of dilute solutions of long-chain molecules. IV. Dependence on concentration. *J. Am. Chem. Soc.* **64** (1942) 2716-2718
- 141 Schwenke K.D., Rauschal E., Zirwer D., Linow K.J.: Structural changes of the 11 S globulin from sunflower seed (*Helianthus annuus* L.) after succinylation. *Int. J. Peptide Protein Res.* **25** (1985) 347-354
- 142 Hass L.F.: Aldolase dissociation into subunits by reaction with succinic anhydride. *Biochem.* **3** (1964) 535-541
- 143 Seifert A., Schwenke K.D.: Improved approach for characterizing the coalescence stability of legumin stabilized O/W emulsions by analytical ultracentrifugation. *Colloid Polym. Sci.* **99** (1995) 31-38
- 144 Chen R.F., Edelhoch H., Steiner, R.F.: Fluorescence of proteins. In: *Physical principles and techniques of protein chemistry*, Clach S.J. (Hrsg.), Academic Press, New York, 1969, 171-244
- 145 Lakowicz I.R.: *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd. ed. Plenum Press, New York, London, 1986
- 146 Ragone R., Colonna G., Balestrici C., Servillo L., Irace G.: Determination of tyrosine exposure in proteins by second-derivative spectroscopy. *Biochem.* **23** (1984) 1871-1875
- 147 Venyaminov S.Y., Yang Y.T.: Determination of Protein Secondary structure. In: *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*, Fasman G.D. (Hrsg.), Plenum Press, New York, 1996, 69-107
- 148 Manavalan P., Johnson W.C.: Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.* **167** (1987) 76-85
- 149 Grinberg, V.Y., Danilenko, A.N., Burova, T.V., and Tolstoguzov, V.B.: Conformational stability of 11 S globulins from seeds. *J. Sci. Food Agric.* **49** (1989) 235-248
- 150 Danilenko A.N., Bikbov T.M., Grinberg V.Y. et. al: The effect of pH upon thermal stability of 11 S globulin of Glycine max seeds according to differential scanning calorimetry. *Biofizika* **32** (1987) 402-406 (*in Russisch*)
- 151 Dudek S., Horstmann C., Schwenke K.D.: Limited tryptic hydrolysis of legumin from faba bean (*Vicia faba* L.): formation of an 'unequal' subunit pattern. *Nahrung* **40** (1996) 171-176
- 152 Kyte J., Doolittle R.F.: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157** (1982) 105-132
- 153 Plietz P., Damaschun G., Müller J.J., Schwenke K.D.: The structure of 11 S globulins from sunflower and rape seed - a small angle X-ray scattering study. *Eur. J. Biochem.* **130** (1983) 315-320
- 154 Gounaris A.D., Perlman G.E.: Succinylation of pepsinogen. *J. Biol. Chem.* **242** (1967) 2739-2745
- 155 Chang T.S., Sun S.F.: Structural studies on the succinylated bovine serum albumin. *Int. J. Peptide Protein Res.* **11** (1978) 65-72
- 156 Schwenke K.D., Mothes R., Raab B., Rawel H., Gueguen Y.: Selected physico-chemical properties of succinylated legumin from pea (*Pisum sativum* L.). *Nahrung* **37** (1993) 519-527
- 157 Elias H.-G.: *Makromoleküle*. 3. Aufl., Hüthig & Nepf, Basel, Heidelberg, 1975
- 158 Cragg L.H., Bigelow C.C.: The viscosity slope constant  $k'$  - ternary systems: polymer-polymer-solvent. *J. Polymer Sci.* **26** (1955) 177-191
- 159 Tanford C., Kawahara K., Lapange S.: Proteins as random coils. I. Intrinsic viscosities and sedimentation coefficients in concentrated guanidin hydrochloride. *J. Am. Chem. Soc.* **89** (1967) 729-736
- 160 Diep O., Boulet M., Castaigue F.: Effect of extreme pH and salt concentration on intrinsic viscosity and Huggins constant ( $k'$ ) of 7 S and 11 S soybean globulins. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* **15** (1982) 316-318
- 161 Shyamasundar R., Rao D.R.: Acetylated arachins. Physicochemical properties. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **23** (1984) 25-31

- 162 Yamauchi F., Ono H, Kamata Y., Shibasaki K.: Acetylation of amino groups and its effect on the structure of soybean glycinin. *Agric. Biol. Chem.* **43** (1979) 1309-1315
- 163 Gerbanowski A., Malabat C., Rabiller C., Gueguen J.: Grafting of aliphatic and aromatic probes on rapeseed 2 S and 12 S: Influence on their structural and physicochemical characteristics. *J. Agric. Food Chem.* **47** (1999) 5218-5226
- 164 Creeth J.M., Knight C.G.: On the estimation of the shape of macromolecules from sedimentation and viscosity measurements. *Biochim. Biophys. Acta* **102** (1965) 549-558
- 165 Yang J.T.: The viscosity of macromolecules in relation to molecular conformation. *Adv. Protein Chem.* **16** (1961) 323-399
- 166 Ogston A.G.: *Trans Faraday Soc.* **49** (1953) 1481-1485
- 167 Wales M., van Holde K.E.: The concentration dependence of the sedimentation constants of flexible macromolecules. *J. Polymer Sci.* **14** (1954) 81-86
- 168 Janary S., Bovey F.A.: Interpretation of the ultraviolet spectral changes of proteins. *J. Biol. Chem.* **235** (1960) 2818-2826
- 169 Donovan J.W.: Ultraviolet absorption. In: *Physical principles and techniques of protein chemistry*, Leach S.J. (Hrsg.), Academic Press, New York, 1969, 107-170
- 170 Kronman M.J., Holmes L.G.: The fluorescence of native, denatured and reduced-denatured proteins. *Photochem. Photobiol.* **14** (1971) 113-134
- 171 Teale F.W.J.: The ultraviolet fluorescence of proteins in neutral solutions. *Biochem J.* **76** (1960) 381-388
- 172 Shutov A.D., Kakhovskaya I.A., Braun H., Bäumlein H., Müntz K.: Legumin and vicilin like storage proteins: Evidence for a common-single domain ancestral gene. *J. Mol. Evol.* **41** (1995) 1057-1069
- 173 Kallenbach N.R., Lyu P., Zhong H.: CD-spectroscopy and the helix-coil transition in peptides and polypeptides. In: *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*, Fasman G.D. (Hrsg.), Plenum Press, New York, 1996, 201-259
- 174 Richards F.M.: Folded and unfolded proteins: an introduction. In: *Protein folding*, Creighton T.E. (Hrsg.), W.H. Freeman & Comp., New York, 1992, 1-58
- 175 Ptitsyn O.B.: The molten globule. In: *Protein folding*, Creighton T.E. (Hrsg.), W.H. Freeman & Comp., New York, 1992, 243-300
- 176 Schwenke K.D., Mothes R., Zirwer D., Gueguen J., Subirade M.: Modification of the structure of 11 S globulins from plant seeds by succinylation. In: *Food proteins: structure and functionality*, Schwenke K.D., Mothes R. (Hrsg.), VCH Publishers, Weinheim, 1993, 143-153
- 177 Privalov P.L.: Stability of proteins. Small globular proteins. *Adv. Protein Chem.* **33** (1979) 167-241
- 178 Privalov P.L.: Stability of proteins. Proteins which do not present a single cooperative system. *Adv. Protein Chem.* **35** (1982) 1-104
- 179 Tanford C.: Protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* **23** (1968) 121-282
- 180 Sturtevant J.M.: Biochemical Applications of differential scanning calorimetry. *Ann. Rev. Phys. Chem.* **38** (1987) 463-488
- 181 Privalov P.L., Khechinavili N.N.: A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure. A calorimetric study. *J. Mol. Biol.* **86** (1974) 665-684
- 182 Klotz I.M., Darnall D.W., Langerman N.R.: Quarternary structure of proteins. In: *The proteins. Volume I*, Neurath H., Hill R.L. (Hrsg.), Academic Press, New York, 293-411
- 183 Mikheeva L.M., Grinberg N.V., Golubeva I.A., Grinberg V.Y., Knopfe C., Schwenke K.D.: Stability of acylated derivatives of broad bean legumin. Poster Proc. Conference on Plant Proteins from European Crops, 25-27 November 1996, Nantes, France, 155-157