

Bergische Universität Wuppertal



**Fachbereich 9
Lebensmittelchemie**

**Bindungsverhalten von Geruchstoffen an
makromolekulare Lebensmittelinhaltsstoffe**

Roberto Fritzler

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften an der Bergischen Universität Wuppertal**

**Die Vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter Leitung von
Herrn Prof. Dr. Helmut Guth**

Wuppertal 2003

Herrn Prof. Dr. Helmut Guth danke ich sehr, für die mir gebotene Möglichkeit in Deutschland in seinem Arbeitskreis zu promovieren sowie für die fachliche Betreuung und die mir jederzeit gewährte Unterstützung.

Mein Dank gilt desweiteren der Heinrich Hertz Stiftung und meiner Heimatuniversität Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER) Facultad de Bromatología, in Gualeguaychú Entre Ríos Argentinien, für die finanzielle Unterstützung.

Besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Paul Höher und seiner Ehefrau Renate bedanken. Durch sie kam der Kontakt nach Deutschland überhaupt zustande und sie nahmen mich in meiner ersten Zeit in Deutschland in ihrer Privatwohnung sehr herzlich auf.

Ein besonderes Dankeschön geht an Prof. Dr. Michael Petz und seine Ehefrau Regine die mich in der Anfangszeit in Deutschland sehr unterstützt haben, um Fuß zu fassen.

Einen besonderen Dank möchte ich meinen lieben Kollegen und Kolleginnen für die hilfsbereite Zusammenarbeit aussprechen.

Ganz besonders möchte ich meine Freunde hervorheben.

Herr Michael Marschner und Herr Thorsten Münstedt sowie seine Frau Christa nebst Nachwuchs, die mir in vielen schwierigen Situationen beigestanden haben. Außerdem möchte ich Herrn Marschner dafür danken, dass er mir bei der schwierigen deutschen Sprache in vielerlei Korrekturfragen zur Seite gestanden hat.

Abkürzungen

AC	Affinitätschromatographie
BLG	β -Lactoglobulin
CHARMM	Chemistry at Harvard Molecular Mechanics
CoMFA	Comparative Molecular Field Analysis
CFDD	Continuous-Flow Dynamic Dialysis
FID	Flammenionisationsdetektor
FEP	Free Energy Perturbation
GA	genetische Algorithmus
GC	Gaschromatographie
GRAMM	Global Range Molecular Matching
HA	Headspace-Technik
HF	Hartree-Fock
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie
HRGC	High Resolution Gas Chromatography
K	Bindungskonstante
K_A	Assoziationskonstante
K_D	Dissoziationskonstante
LCAO	Linear Combination of Atomic Orbitals
LGA	Lamarckian Genetische Algorithmus
LCAO	Linear Combination of Atomic Orbitals
LS	Local Search Methode
MC	Monte Carlo
MDA	Mikrodialyse
MD	Moleküldynamik
MLR	Multipler Linearer Regressionsanalyse
MM	Molekülmechanik
MP	Møller-Plesset
MSD	Massenspektrometrie-Detektor
MS(EI)	Massenspektrometrie / Elektronenstoß-Ionisation
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
n	Bindungsstellen
n.b.	nicht bestimmt
NMR	kernmagnetische Resonanz

ODB's	Geruchsstoff-Bindende-Proteine (odorant-binding-proteins)
PLS	Partial-Least-Square regression
PTI	Purge and Trap Injector
QM	Quantenmechanik
QSAR	Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen
RBP's	Retinol-Bindende-Proteine (retinol-binding-proteins)
RC	Regenerierte Cellulose
RMSD	Root Mean Square Deviation
RSA	Rinderserumalbumin
SHA	statische Headspace Analyse
STO	Slater-Typ-Orbitale
TCT	Thermal Desorption Cold Trap Injector
UCF	Ultrazentrifugation

1. Einleitung	1
1.1 Wechselwirkungen von Geruchsstoffen an Proteine.....	1
1.2 Experimentelle Methode zur Bestimmung der Bindungskonstanten.....	6
1.3 Eigenschaften und strukturelle Merkmale von β -Lactoglobulin und Rinderserumalbumin.....	10
1.4 Bestimmung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen mittels Molekular Modelling Simulation und Quantitativen Struktur-Aktivitätsbeziehungen (QSAR).....	15
1.4.1 Kraftfeldmethoden.....	17
1.4.2 Quantenmechanische Methoden.....	20
1.4.3 Molekular Dynamik (MD) und Monte Carlo (MC) Simulationen.....	25
1.4.4 Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen (QSAR).....	28
1.4.5 Vorhersage von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen – der Hydrophobizitätsindex (Log P-Wert).....	31
2. Protein-Ligand-Wechselwirkungen	34
2.0 Protein-Ligand-Wechselwirkungen bei β -Lactoglobulin und Rinderserumalbumin Modelvorstellungen und postulierte Bindungsstellen.....	34
2.1 Problemstellung und Zielsetzung.....	42
Ergebnisse und Diskussion	
3. Bestimmung von Bindungskonstanten	43
3.1 Ultrazentrifugation (UCF).....	43
3.2 Mikrodialyse (MDA).....	46
3.3 Statische Headspace Analyse (SHA).....	47
3.4 Modelle zur Ermittlung von Bindungskonstanten aus den experimentellen Daten (Bindungsisotherme).....	49
3.5 Bindungskonstanten von Lactonen an Rinderserumalbumin (RSA) und β -Lactoglobulin (BLG).....	52
3.6 Gegenüberstellung von Protein-Bindungskonstanten und physiko-chemischen Eigenschaften der γ - und δ -Lactone - Verteilungskoeffizient (Log P-Wert) und Löslichkeit.....	57

3.7	Einflüsse von Rinderserumalbumin (RSA) und β -Lactoglobulin (BLG) auf die Headspacekonzentrationen ausgewählter Lactone.....	63
4.	Molekular Modelling Experimente.....	66
4.1	Strukturelle Merkmale von β -Lactoglobulin (BLG).....	66
4.2	Ermittlung der Bindungsposition der Lactone an β -Lactoglobulin (BLG).....	68
4.3	Kompetitive Bindungsstudien.....	74
4.4	Quantitative Struktur-Aktivitätsbeziehungen (QSAR) von γ - und δ -Lactonen an β -Lactoglobulin (BLG).....	76
4.5	Quantitative Struktur Aktivität Beziehungen (QSAR) von Literaturdaten und Vergleich mit eigenen Studien.	87
5.	Experimenteller Teil.....	101
5.1	Referenzsubstanzen, Materialien und Software.....	101
	Gaschromatographie und Massenspektrometrie.....	101
	Software.....	102
5.2	Bestimmung der physiko-chemischen Eigenschaften von ausgewählten Lactonen.....	103
5.2.1	Bestimmung der Verteilungskoeffizienten (LogP-Werte) Octanol/Wasser und Cyclohexan /Wasser.....	103
5.2.2	Bestimmung der Löslichkeit in Wasser und in Phosphatpuffer.....	105
5.3	Bestimmung der Bindungskonstanten.....	105
5.3.1	Bestimmung der Bindungskonstanten mittels Ultrazentrifugation (UCF).....	105
5.3.2	Bestimmung der Bindungskonstanten mittels Mikrodialyse (MDA).....	106
5.3.3	Konzentrationsbestimmung der Lactone im Gasraum in Anwesenheit von Proteinen: Statische-Headspace-Analyse (SHA).....	107
6.	Zusammenfassung.....	109
7.	Literatur.....	112

Abstract

Aroma compounds can interact with food matrix components e.g. proteins. This can be related to a chemical reaction between aroma compounds and the macromolecule or with not covalent interaction between aroma compounds and proteins. The free binding energy of a macromolecule/odorant-complex is influenced by steric, entropic and thermodynamic contributions. The binding strength of a ligand-protein complex is characterized by the experimentally measurable association constant (K_A) or by the dissociation constant (K_D).

The aim of the present research work was the determination of the binding constants of selected flavour compounds (γ - and δ -Lactones and aliphatic esters) to important food proteins (β -lactoglobulin, BLG and bovine serum albumin, BSA).

In this work, ultracentrifugation and micro dialysis technique were used for the determination of the binding constants. A headspace method was developed for the measurement of partition coefficient of odorant/protein solutions.

Using dialysis technique, the highest association constant was found for γ -undecalacton (BSA: $K_A = 1.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$; BLG: $K_A = 5.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$).

In the series of γ - and δ -lactones, respectively, the association constants decreased with decreasing molecular weights of the lactones. The determination of the air/protein-solution partition coefficient of odorants revealed a reduction of odorant in the headspace in the presence of a protein (e.g. the δ -decalactone concentration in the headspace decreased by a factor of about two in the presence of BSA in comparison to the water solution without protein).

To determine the influence of the lipophilicity of odorants on the binding behaviour, the Log P values octanol/water and cyclohexan/water were examined. The highest $\text{Log}P_{\text{Oct}/\text{H}_2\text{O}}$ values were found for γ -undecalacton ($\text{Log}P_{\text{Oct}/\text{H}_2\text{O}} = 3.30$) and δ -undecalacton ($\text{Log}P_{\text{Oct}/\text{H}_2\text{O}} = 2.93$). These both odorants also showed the highest binding affinities to the proteins.

The application of molecular modelling (AUTODOCK, GRAMM) led to the identification of a specific "lactone-binding position" to BLG, not described up to now in the literature. These findings were supported by competitive binding experiments with ligands with known binding positions to BLG. The experimental results from binding energies were compared with the data calculated by molecular modelling (van der Waals and electrostatic interactions of the protein-ligand complexes; intramolecular energy, rotational degrees of freedom and $\text{Log} P_{\text{Oct}/\text{H}_2\text{O}}$ values of the ligands). A statistical investigation of experimental and calculated bindings energies by means of Partial Least Square (PLS) analysis showed a correlation coefficient for the calibration of 0.992 and for the cross validation of 0.980.

The molecular modelling method developed in this work is a suitable procedure for the prediction of binding constants of unknown compounds to macromolecules.

Resumen

Compuestos aromáticos pueden interactuar, con sustancias contenidas en los alimentos como por ejemplo las proteínas. Este hecho puede estar relacionado, con una reacción química entre el compuesto aromático y la macromolécula. Así como con una reacción no covalente entre ambos. La energía libre de enlace del complejo macromolécula-aromático, esta influida por efectos estéricos, entrópicos y termodinámicos. La fuerza de enlace entre el complejo ligando-proteína está caracterizada por medio de la constante de asociación (K_A) o por la constante de disociación (K_D).

El objetivo del presente trabajo es desarrollar una investigación sistemática de las constantes de enlace de compuestos aromáticos seleccionados (γ - , δ -Lactonas y esterés alifáticos) con importantes proteínas alimenticias (β -lactoglobulina, BLG y albúmina bovina, AB). Aplicándose para tal fin técnicas de ultra-centrifugación y micro diálisis. Por otro lado el desarrollo, y la aplicación de un método de headspace (espacio de cabeza) para la medición del coeficiente de partición aromático-proteína en solución.

Mediante la técnica de diálisis, fueron determinadas las constantes de asociación de enlace mas elevadas, para γ -undecalactona (AB: $K_A= 1.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$; BLG: $K_A= 5.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$).

En la serie de las γ - y δ -lactonas respectivamente, las constantes de asociación decrecían con la disminución del peso molecular de estas.

En la determinación del coeficiente de partición entre proteína-aromático-solución, y espacio de cabeza, se confirmó una reducción de la concentración del aromático en el espacio cabeza (Ej. para δ -decalactona la concentración disminuyó en un factor de dos, en presencia de AB en comparación con solución acuosa sin proteína)

Con el fin de determinar el efecto lipofílico del aromático sobre el comportamiento del enlace, fueron determinados los volares del LogP octanol/agua y ciclohexanol/agua. Los valores más elevados del $\text{LogP}_{\text{Oct}/\text{H}_2\text{O}}$ se encontraron para γ -undecalactona ($\text{LogP}_{\text{Oct}/\text{H}_2\text{O}}= 3.30$) y δ -undecalactona ($\text{LogP}_{\text{Oct}/\text{H}_2\text{O}}= 2.93$).

La aplicación de la “molecular modelling” (AUTODOCK, GRAMM) condujo a la identificación de una posición específica de enlace de una lactona en la proteína BLG, no descrita hasta el momento en la literatura. El descubrimiento de esta posición de enlace fue confirmado mediante pruebas experimentales de enlace competitivo, con ligandos de posiciones de enlace conocidas en BLG. Los resultados experimentales de energía de enlaces fueron comparados con los obtenidos por modelación molecular (interacciones de van der Waals, o electrostáticas del complejo proteína-ligando; energía intramolecular, grados libres de rotación y valores $\text{LogP}_{\text{Oct}/\text{H}_2\text{O}}$ de los ligandos).

Un procedimiento estadístico del análisis Partial Least Square (PLS), indicó un buen coeficiente de correlación entre los resultados obtenidos experimentalmente, y aquellos obtenidos por molecular modelling.: calibración para el coeficiente de correlación de 0.992 y para la calibración cruzada de 0.980.

El método de “molecular modelling” desarrollado para este trabajo, demostró, ser una herramienta apropiada para la predicción de constantes de enlace, de compuestos desconocidos con macromoléculas.

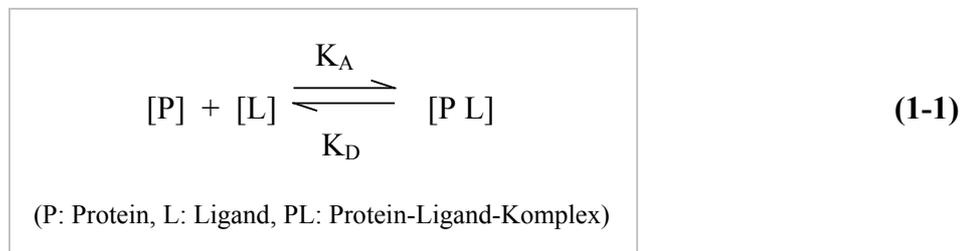
1. Einleitung

1.1 Wechselwirkungen von Geruchstoffen mit Proteinen

Aromastoffe können mit Lebensmittelinhaltsstoffen wie z.B. Proteinen und Kohlenhydraten in Wechselwirkung treten. Dies kann zum einen verbunden sein mit einer chemischen Reaktion zwischen Aromastoff und Makromolekül und führt somit zur Veränderung des Geruchsstoffes und damit zum Verlust der Aromawirksamkeit. Insbesondere vorhandene reaktive funktionelle Gruppen des Aromastoffmoleküls, wie z.B. eine Aldehydfunktion kann mit der Aminofunktion einer Lysyl-Gruppe eines Proteins unter Bildung eines Imins in Reaktion treten.

Zum anderen können auftretende Wechselwirkungen zwischen Aromastoff und Makromolekül auch nicht-kovalenter Art sein, wie z.B. Van-der-Waals-, ionische, Dipol-Dipol- und hydrophobe Wechselwirkungen. Weitere Formen von Wechselwirkungen sind die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Ligand und Makromolekül.

Der Bindungsprozess ist ein dynamisches Gleichgewicht mit der Assoziationskonstante K_A und der Dissoziationskonstanten K_D **(1-1)**:



Die Stabilität eines lose assoziierten Komplexes ist geprägt von den oben erwähnten Einflussgrößen, die unter Umständen voneinander abhängig und additiv sein können. Die Bindungsstärke eines Ligand-Protein-Komplexes wird durch die experimentell zugängliche Assoziationskonstante (K_A ; Mol^{-1}) bzw. durch die zu K_A reziproke, Dissoziationskonstante (K_D ; Mol) charakterisiert (Review von Lindup, 1987). **(1-2)**

$$K_A (\text{Mol}^{-1}) = \frac{1}{K_D} = \frac{[P L]}{[P] \times [L]} \quad (1-2)$$

Folgende Zusammenhänge bestehen zwischen der freien Bindungsenthalpie (ΔG) und der Dissoziationskonstante (K_D) bzw. Assoziationskonstante (K_A) **(1-3)**:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = R T \ln K_D = -R T \ln K_A \quad \text{(1-3)}$$

Das Ausmaß der Bindungsstärke ist somit von Einflussfaktoren wie der Enthalpie (ΔH) und der Entropie (ΔS) abhängig.

Eine Entropiezunahme eines Systems wird durch die Assoziation eines Liganden an einem Makromolekül unter Verdrängung von Wassermolekülen an den Koordinationsstellen des Makromoleküls erklärt. Dieser Vorgang geht einher mit einer Änderung der Freiheitsgrade, wobei die Entropie des Systems erhöht wird. Nach heutigen Vorstellungen liefert die Entropieerhöhung eines Systems einen wesentlichen Beitrag zur Bindungsaffinität eines Protein-Ligand-Komplexes. Diese Feststellung lässt einen Zusammenhang zwischen der Hydrophobität eines Liganden und dem Entropieterm (ΔS) erkennen. Je mehr Wassermoleküle aus der Umgebung des Proteins durch den Liganden freigesetzt werden, um so größer ist der Beitrag zur Bindungsaffinität. Die Zahl der freigesetzten Wassermoleküle ist annähernd proportional zur Größe der hydrophoben Oberfläche, die bei der Bindung des Liganden an das Protein nicht mehr dem Wasser zugänglich ist.

In allen Fällen gehen die oben erwähnten Wechselwirkungen eines Geruchstoffes mit einem Makromolekül einher, mit einer Intensitätsabnahme bzw. mit dem vollständigen Verlust des Aromaeindrucks der Komponente. In Lebensmitteln können solche Wechselwirkungen zur Veränderung des Aromapotentials einzelner Verbindungen und damit zur Verschiebung des Aromaprofils führen. Bedingt dadurch kann die Verbraucherakzeptanz für das Lebensmittel zurückgehen.

Erste Untersuchungen zum Bindungsverhalten von Geruchstoffen an Proteine wurden von Franzen und Kinsella (1974) mittels Headspaceanalyse durchgeführt. Die Autoren untersuchten den Einfluss eines Proteinzusatzes (α -Lactalbumin, Rinderserumalbumin, Hefe-Protein-Isolate und Sojabohnen-Protein-Isolate) zu wässrigen Aromastofflösungen im Hinblick auf die Dampfdruckkonzentrationen der Aldehyde Hexanal, Heptanal und Octanal und der Ketone 2-Hexanon, 2-Heptanon und 2-Octanon. Die Autoren stellten fest, dass die Headspace-Konzentrationen der Aromastoffe über wässrigen Proteinlösungen im Vergleich

zu einer ohne Lösung Proteinzusatz abnehmen. Das Ausmaß der Abnahme variierte abhängig von Protein und Aromastoff. Ein Zusammenhang zwischen dem Verteilungsgleichgewicht des Geruchstoffes (Proteinlsg./Dampfraum) und der Verbindungsklasse und/oder der Art des verwendeten Proteins wurde allerdings nicht gefunden.

Damodaran und Kinsella (1980) führten Bindungsversuche von 2-Heptanon und 2-Nonanon an Rinderserumalbumin durch. Aus den Unterschieden in den Assoziationskonstanten für 2-Heptanon ($2.7 \times 10^2 \text{ Mol}^{-1}$) und für 2-Nonanon ($1.8 \times 10^3 \text{ Mol}^{-1}$) schlossen die Autoren, dass die Bindungsstärke abhängig von der Hydrophobität einer Verbindung ist. Die freie Bindungsenthalpie für 2-Nonanon wurde mit -4.4 kcal/Mol , die für 2-Heptanon mit -3.3 kcal/Mol berechnet. Bei Annahme eines linearen Anstieges der freien Bindungsenthalpie (ΔG) von 2-Heptanon zu 2-Nonanon erhöht eine Methyleinheit die freie Bindungsenthalpie um -0.55 kcal/Mol .

Die Bindungsaffinitäten der Methylketone 2-Heptanon, 2-Octanon und 2-Nonanon wurden auch von O'Neill und Kinsella (1987) an β -Lactoglobulin untersucht. Die Assoziationskonstanten von $1.5 \times 10^2 \text{ Mol}^{-1}$ (2-Heptanon), $4.8 \times 10^2 \text{ Mol}^{-1}$ (2-Octanon) und $2.4 \times 10^3 \text{ Mol}^{-1}$ (2-Nonanon) zeigten entsprechend den oben dargestellten Daten an Rinderserumalbumin einen Anstieg der Bindungsaffinität mit der Hydrophobitätszunahme der untersuchten Verbindung. Die Zunahme der berechneten freien Bindungsenthalpie pro Methyleinheit betrug -0.7 kcal/Mol (2-Heptanon \rightarrow 2-Octanon) bzw. -1.0 kcal/Mol (2-Octanon \rightarrow 2-Nonanon).

Arbeiten zur Aromastoffbindung an Molkenproteinen wurden von Jasinski und Kilara (1985) durchgeführt. Die Autoren bestimmten mittels Gleichgewichtsdialyse die Bindungskonstanten der Modellverbindungen 2-Nonanon und Nonanal an Molkenproteinkonzentrat, Rinderserumalbumin, β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin. Sie fanden für 2-Nonanon und Nonanal an Molkenproteinkonzentrat Bindungskonstanten (K_A) von $1-2 \times 10^6 \text{ Mol}^{-1}$ ($n=61$ und 68). Die Bindungsstärke von 2-Nonanon an Rinderserumalbumin war mit einer Bindungskonstante von $1.41 \times 10^4 \text{ Mol}^{-1}$ und $n=15$ deutlich höher als bei β -Lactoglobulin ($1.21 \times 10^2 \text{ Mol}^{-1}$ und $n=13.6$). Die niedrigste Bindungsaffinität von 2-Nonanon bei den untersuchten Proteinen wurde für α -Lactalbumin mit $1.05 \times 10^2 \text{ Mol}^{-1}$ und $n=33.3$ bestimmt. Die Autoren stellten abschließend fest, dass sich das Molkenproteinkonzentrat als Träger für flüchtige Aromastoffe in Nahrungsmitteln eignet und Anwendung bei der Lebensmittelverarbeitung haben könnte.

Weitere Arbeiten über Struktur-Eigenschaftsbeziehungen von geruchsaktiven Substanzen und deren Bindungsverhalten an Proteine wurden von Landy et al. (1995) mit den fruchtig riechenden Ethylestern der Essigsäure, Buttersäure und Hexansäure und β -Casein durchgeführt. Die Autoren fanden eine Zunahme der Bindungsaffinität mit steigendem Molekulargewicht der Ethylester.

Sostmann et al. (1997) ermittelten an ausgewählten Lactonen und Estern das Bindungsverhalten an β -Lactoglobulin. Sie stellten ebenfalls eine Abhängigkeit zwischen Kohlenstoffanzahl des Geruchstoffes und der Bindungsaffinität fest; mit steigender Lipophilität einer geruchsaktiven Komponente, nahm die Assoziationskonstante an β -Lactoglobulin zu.

Pelletier et al. (1998) bestätigten die Untersuchungen von Sostmann et al. (1997) an einer Vielzahl von Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl- und Hexylestern der C₂-C₇ Fettsäuren die Bindungskonstanten (K_A) nahmen in den einzelnen Klassen mit Verlängerung der Alkylkette um eine Methyleneneinheit zu.

Dufour und Haertle (1990) führten Bindungsexperimente von α - und β -Ionon sowie Geraniol und den beiden Enantiomeren des R- und S-Limonen an native und modifizierte β -Lactoglobulin durch. Mittels Fluoreszenzspektroskopie bestimmten die Autoren für den Protein-Ligand-Komplex aus β -Ionon und β -Lactoglobulin eine Dissoziationskonstante von 6.0×10^{-7} Mol, dagegen fanden sie keine Bindung für α -Ionon, Geraniol und R- und S-Limonen. Aufgrund der Strukturähnlichkeit von α - und β -Ionon (siehe **Abb.1**) vermuteten die Autoren einen Zusammenhang zwischen räumlicher Struktur und Bindungsaffinität einer Verbindung.

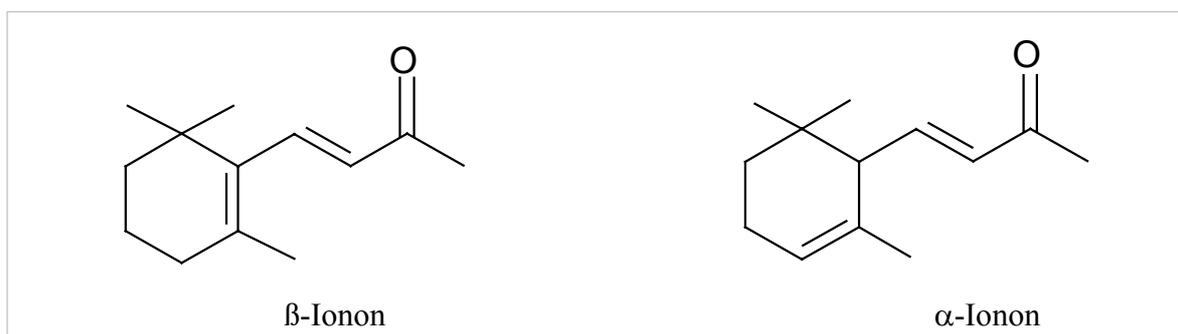


Abb. 1: Struktur der Geruchstoffe β -Ionon und α -Ionon

Eine Gegenüberstellung der dreidimensionalen räumlichen Strukturen zeigte, dass β -Ionon im Gegensatz zu α -Ionon eine weitgehend planare Struktur aufweist. Aufgrund dieser Erkenntnisse schlossen die Autoren, dass nach den Gesetzmäßigkeiten der Biochemie das Schlüssel-Schloß-Prinzip gilt und somit eine genaue räumliche Dimension für den Liganden

vorliegen muss, um so mit dem Protein in Wechselwirkung zu treten. Unterstützt wurden diese Vermutungen durch eine Gegenüberstellung ihrer Ergebnisse mit Daten der räumlichen Struktur und des Bindungsverhaltens von Retinol (Fugate und Song, 1980). Ein Vergleich der Dissoziationskonstante von β -Ionon (6.0×10^{-7} Mol) mit den von Retinol (2.0×10^{-8} Mol; Fugate und Song, 1980) ergab hohe Bindungsaffinitäten beider Verbindungen gegenüber β -Lactoglobulin. Die Autoren konnten zeigen, dass Retinol in Homologität zum Geruchstoff β -Ionon ebenfalls eine weitgehend planare Struktur besitzt. Auf Basis dieser Resultate schlossen die Autoren, dass die dreidimensionale räumliche Struktur einer Verbindung von entscheidender Bedeutung ist für die Affinität eines Liganden zu einem Makromolekül.

Ein Vergleich der experimentell ermittelten Bindungsdaten von Retinol an β -Lactoglobulin mittels Gleichgewichtsdialyse (Puyol et al., 1991; pH 7.2, $K=6.62 \times 10^{-5}$ Mol) und mittels Fluoreszenzspektroskopie (Fugate und Song, 1980; 2.0×10^{-8} Mol) zeigt, dass die einzelnen Bestimmungsmethoden deutlich unterschiedliche Bindungskonstanten liefern. Das Messprinzip der Fluoreszenzmethode beruht auf einer Veränderung der chemischen Umgebung eines im Protein vorhandenen Tryptophans bei Anwesenheit eines Liganden. Die gemessene Fluoreszenzintensität bzw. die daraus abgeleitete Bindungsaffinität hängt somit von der Anwesenheit eines Tryptophans im Protein und von der Entfernung der Ligand-Bindungsposition vom betrachteten Tryptophan ab. Als Referenzmethode zur Bestimmung von Bindungskonstanten dient die Gleichgewichtsdialyse, die von solchen methodisch bedingten Unzulänglichkeiten befreit ist.

Lübke et al. (2000) untersuchten mittels Infrarotspektroskopie die Wechselwirkungen und Konformationsänderungen von β -Lactoglobulin mit kleinen Liganden in wässrigen Lösungen (pH 2.0 und 7.5). Vergleiche der IR-Spektren von β -Lactoglobulin mit und ohne Ligand ermöglichten Aussagen über Konformationsänderungen bei einer stattfindenden Ligand-Protein Komplexbildung. So konnten sie Änderungen der Konformation des Proteins bei der Anwesenheit von relativ kleinen Mengen dieser Liganden beobachten. Basierend auf der beschriebenen Bindung von Fettsäuren in der zentralen Bindungstasche des β -Lactoglobulins (siehe **Abb. 9** Kap. 2), folgerten die Autoren, dass Retinol, Tetradecansäure und β -Ionon die gleiche Bindungsstelle belegen (Bindungsstudien bei pH 2.0 und pH 7.5). Mit α -Ionon wurde eine geringe Konformationsänderung bei pH 7.5 festgestellt und die Autoren schlossen daraus, dass auch α -Ionon in der zentralen Bindetasche von β -Lactoglobulin bindet. Bei den Verbindungen p-Cresol, Eugenol, 2-Nonanon und γ -Decalacton wurden keine Konformations-

änderungen bei pH-Werten von 2.0 und 7.5 beobachtet. Die Autoren vermuten, dass diese Liganden eine unterschiedliche Bindungsstelle am Protein belegen.

Reiners et al. (2000) bestimmten mittels Affinitätschromatographie für die Geruchsstoffe p-Cresol und Eugenol eine Bindungskonstante von $4.40 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ bzw. $1.40 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ an β -Lactoglobulin. Weitere β -Lactoglobulin Bindungskonstanten wurden von Sostmann et al. (1998) mittels Affinitätschromatographie für die Aromastoffe α -Ionon ($1.30 \times 10^4 \text{ Mol}^{-1}$), β -Ionon ($1.90 \times 10^4 \text{ Mol}^{-1}$), 2-Nonanon ($3.60 \times 10^3 \text{ Mol}^{-1}$) und γ -Decalacton ($3.20 \times 10^3 \text{ Mol}^{-1}$) publiziert.

O'Keefe et al. (1991) bestimmten die Bindungskonstante von Hexanal, einem Autooxidationsprodukt der Linolsäure an Proteine, isoliert aus Sojabohnen. Assoziationskonstanten für Hexanal an Glycinin und β -Conglycinin betragen $2.70 \times 10^2 \text{ Mol}^{-1}$ bzw. $3.03 \times 10^2 \text{ Mol}^{-1}$. Die Autoren stellten kooperative (positive) Effekte und eine Veränderungen der Oberflächenhydrophobität an beiden Proteinen nach einer Bindung von Hexanal fest. Auf Basis dieser Resultate vermuteten die Autoren, dass die Bindung von Hexanal an Glycinin und β -Conglycinin einhergeht mit einer Strukturveränderung der Proteine. Bedingt dadurch können neue Bindungsstellen für einen Liganden am Protein freigelegt werden.

1.2 Experimentelle Methoden zur Bestimmung von Bindungskonstanten

Die Methoden, die zur Ermittlung der Bindungskonstanten (Assoziationskonstante (K_A) bzw. Dissoziationskonstante (K_D), Kapazität (R), Anzahl der Bindungsstellen (n)) herangezogen werden, sind in zwei Reviews von Sebille (1990) und Hage und Tweed (1997) zusammengestellt. In der Literatur werden abhängig von Matrix und zu untersuchenden Liganden unterschiedliche Methoden zur Bestimmung der Bindungsparameter vorgeschlagen. Die Standardmethode ist die Gleichgewichtsdialyse, die insbesondere zur Bestimmung von Bindungsparametern pharmakologisch wirksamer Substanzen eingesetzt wird. In der Literatur sind folgende weitere Methoden zur Bestimmung von Bindungskonstanten beschrieben worden:

- **Dynamische Dialyse**
- **Ultrafiltration**
- **Ultrazentrifugation**
- **Fluoreszenzspektroskopie**
- **HPLC-Verfahren**
- **Headspace-Gaschromatographie**

Vor- und Nachteile einzelner Methoden für die Analyse pharmakologisch wirksamer Substanzen wurden in einem Review von Sebille (1990) ausführlich beschrieben. Wesentliche Nachteile der Membranverfahren (Ultrafiltration, Ultrazentrifugation, Gleichgewichtdialyse) sind, abhängig von der zu untersuchenden Verbindungsklasse, adsorptive Effekte von Makromolekülen und Liganden an Membranen und/oder Filtrationseinheiten. Diese Effekte führen zum einen zu einer Störung des thermodynamischen Gleichgewichts des Protein-Ligand-Komplexes und zum anderen zur Entfernung von Reaktionspartnern aus dem Gleichgewicht.

Die dynamische Dialyse zur Bestimmung der Protein-Ligand-Wechselwirkung wurden von Sparrow et al. (1981) und Hashimoto et al. (1983) beschrieben. Sparrow et al. (1981) wendeten eine automatisierte Dialyse mit kontinuierlichem Durchfluss (CFDD, Continuous-Flow Dynamic Dialysis) an. Das Prinzip der Methode basiert auf dem Vergleich der Ligandwanderung (Phenolrot) durch die semipermeable Membran, in Anwesenheit und Abwesenheit von Proteinen (Rinderserumalbumin). Der Ligand fließt dabei aus der Dialysezelle mit einem konstanten Elutions-Fluss ($0,15 \times 10^{-2} - 0,75 \times 10^{-2} \text{ cm}^3/\text{s}$) zu einer Photo-Messzelle (Detektionswellenlänge: 260 nm), die in vorgegebenen Zeitintervallen misst. Kritisch bei der dynamischen Dialyse ist, dass geringe Temperaturschwankungen bei der Versuchsdurchführung entscheidenden Einfluss auf die Diffusionskonstante des Liganden und somit indirekt auf die berechnete Bindungskonstante haben. So stellten Sparrow et al. (1981) fest, dass die Diffusionskonstante des Liganden um durchschnittlich $4\%/^{\circ}\text{C}$, in einer untersuchten Temperaturreihe von 15 und 25 °C schwankt.

Mittels der oben angeführten dynamischen Dialyse untersuchten Macheras et al. (1985) die Bindungsaffinitäten von Sulfonamiden an Rinderserumalbumin. Die Autoren beschreiben den Einfluss der Ionenstärke und der Viskosität in Abhängigkeit von der Dialysegeschwindigkeit. Dabei stellten sie fest, dass durch Änderung der Ionenstärke und Viskosität mittels NaCl- und Saccharose-Zusätze, die Dialysegeschwindigkeit beeinflusst

wird. Die Diffusionsrate des Liganden durch die Membran ist proportional zur freien Ligand-Konzentration in der Proteinphase.

Eine Auswahl der in der Literatur angeführten Beispiele zur Bestimmung von Bindungsparametern von Aromastoffen an Proteine sind im folgenden zusammengestellt:

- Gleichgewichtsdialysen (Fares et al., 1998; O'Neill und Kinsella, 1987; und Jasinski und Kilara 1985)
- HPLC-Verfahren nach Hummel und Dreyer (Pelletier et al. 1998),
- Flüssig-Flüssig-Verteilung nach der Gleichgewichtsmethode (Demodaran & Kinsella, 1980),
- Fluoreszenzspektroskopie (Dufour und Haertle 1990; Halfman und Nishida 1972)
- Affinitätschromatographie mit immobilisiertem Protein (Sostmann et al., 1997 und 1998).
- Infrarotspektroskopie (IR) (Lübke et al., 2000) Klärung der Wechselwirkungen von Aromastoffen mit β -Lactoglobulin.

Das HPLC-Verfahren von Hummel und Dreyer (1962) wurde für UV-aktive Verbindungen beschrieben. Bei ausgewählten chromatographischen Methoden (Gelfiltration, RP-Chromatographie) lässt sich das Wanderungsverhalten von Makromolekül, Ligand und Makromolekül-Ligand-Komplex an der stationären Phase unterscheiden. Auf Basis dieser Tatsache ist es möglich, Bindungsaffinitäten des Liganden am Makromolekül zu bestimmen, unter der Voraussetzung, dass während des gesamten Trennprozesses die Gleichgewichtsbedingungen durch die chromatographischen Bedingungen nicht beeinflusst werden. Für die Bestimmung von Bindungsparametern mittels Gelfiltration wurde die stationäre Phase mit einer Lösung des Liganden äquilibriert und anschließend eine definierte Menge Proteinlösung in das chromatographische System injiziert (Hummel und Dreyer, 1962).

Im Chromatogramm zeigt sich für den Protein-Ligand-Komplex ein positiver *Peak*, gefolgt von einem negativen *Peak*, der aus der Bindung des Liganden am Protein zu Beginn der Gelfiltration resultiert, indem es zu einer Reduktion der Ligandkonzentration im Eluenten kommt. Durch Variation der Konzentration der Proteinlösung und Integration der erhaltenen Flächen lassen sich die Bindungsparameter erfassen. Der Arbeitsaufwand und die Kosten für solche Experimente sind allerdings nicht zu vernachlässigen (Pingoud und Urbanke, 1997).

Weitere HPLC-Verfahren basieren auf der Affinitätschromatographie mit immobilisierten Proteinen oder immobilisierten Liganden auf der stationären Phase (Sostmann et al., 1997 und 1998).

Zur Analyse der Bindungsparameter von Geruchsstoffen wurden auch gaschromatographische Methoden, gekoppelt mit der Headspace-Technik, eingesetzt (Landy et al., 1995; Franzen und Kinsella, 1974). Die statische Headspace-Analyse (SHA) wurde für die Bestimmung der Wechselwirkungen von Lebensmittelproteinen und Liganden von Jouenne et al. (1996) und Charles (1996) eingesetzt. Darüber hinaus wurde mittels SHA Einflüsse unterschiedlicher Proteine auf die Freisetzung von Aromastoffen in Lebensmitteln untersucht (Andriot, et al., 2000).

Die Vorteile der SHA gekoppelt mit der Kapillargaschromatographie (HRGC) sind:

- Schnelle Analysendurchführung, da auf eine Probenaufarbeitung weitgehend verzichtet werden kann.
- Keine adsorptiven Effekte an Membranen.
- Exakte Temperaturkontrolle bei der Versuchsdurchführung.

Eine weitere schnelle und effiziente Methode für die Bestimmung von Bindungsparametern, wurde von Schöpp und Aurich (1974) vorgeschlagen. Diese Methode dient der Ermittlung von hydrophoben Protein-Ligand-Wechselwirkungen durch Messung kinetischer Parameter. Dieses Verfahren eignet sich auch zur Bestimmung von Bindungsparametern bei Substrat-Enzym-Komplexen. Untersucht wurde die Bindung aliphatischer Alkohole und Aldehyde an Rinderserumalbumin. Die Autoren fanden Assoziationskonstanten z.B. für den Albumin-Octanol-Komplex von $3,5 \times 10^3 \text{ Mol}^{-1}$. Ein Methodenvergleich zeigte gute Übereinstimmung der mittels kinetischer Messungen und Gelfiltration bzw. Viskositätsmessung erhaltenen Daten. Mittels Gelfiltration wurde für den oben erwähnten Octanol-Albumin-Komplex eine Bindungskonstante von $2,5 \times 10^3 \text{ Mol}^{-1}$ und bei der Viskositätsmessung (Reynolds et al., 1968) eine Bindungskonstante von $3 \times 10^3 \text{ Mol}^{-1}$ gefunden.

Die Auswertung der experimentell ermittelten Bindungsdaten erfolgt graphisch, z.B. nach Modellen von Klotz et al. (1946), Scatchard (1949) und Klotz und Huston (1979). Die erhaltenen Geraden bzw. Kurven werden mittels linearer bzw. nicht-linearer Regressionsrechnung, unterstützt durch Computer-Programme, ausgewertet. Ein von Munson und Rodbard (1980) beschriebenes Software-Programm (Ligand®) ermöglicht eine weitgehende automatisierte Auswertung von Bindungsstudien.

1.3 Eigenschaften und strukturelle Merkmale von β -Lactoglobulin und Rinderserumalbumin

Rinderserumalbumin (RSA) und β -Lactoglobulin (BLG) sind bedeutende Nahrungsmittelproteine und Gegenstand der hier beschriebenen Arbeiten. Die beiden Proteine besitzen folgende unterschiedliche Eigenschaften bzw. strukturelle Merkmale:

- Unterschiede in strukturellen Merkmalen: Aminosäurezusammensetzung, α -Helixstruktur, β -Faltblattstruktur, ungeordnete Bereiche
- Unterschiede im Molekulargewicht.
- Unterschiede in den physiko-chemischen Eigenschaften: Hydrophobität, Löslichkeit und isoelektrischer Punkt

Die physiko-chemischen Merkmale von Rinderserumalbumin (RSA) und β -Lactoglobulin (BLG) sind in **Tab.1** zusammengefasst.

Tabelle 1. Eigenschaften und strukturelle Merkmale der eingesetzten Proteine

	β-Lactoglobulin (BLG)	Serumalbumin (RSA)
Konz. in Milch (g/L)	3,2	0,4
% in Molkeprotein	10	1
Genetische Variante	A \rightarrow G	-
Molekulargewicht (Dalton)	18000	66000
Aminosäuren (Anzahl)	162	582
Cystein	5	35
S-S Brücken	2	17
Prolin-Moleküle	8	34
Phosphor.-Gruppen	0	0
Nettoladung	-0,04	-0,02
Isoelektrischer Punkt	5,1 - 5,3	4,7 – 5,1
Sekundär-Struktur:		
α -Helix (Anteil %)	10	55
β -Faltblatt (Anteil %)	50	16
Ungeordnete Bereiche (%)	40	29

Die räumlichen Strukturen von Serumalbumin und β -Lactoglobulin sind in **Abb.2** dargestellt. Serumalbumin ist charakterisiert durch seinen hohen α -Helix-Anteil (55%) und β -Lactoglobulin durch hohe Anteile an β -Faltblattstruktur (50%).

β -Lactoglobulin (BLG) und Rinderserumalbumin (RSA) gehören unter anderem zur Fraktion der Molkenproteine. Die beiden Proteine sind in allen Milchsorten, welche zur menschlichen Ernährung verwendet werden, enthalten (z.B. Kuhmilch, Büffelmilch, Ziegenmilch, Schafmilch).

Rinderserumalbumin

Rinderserumalbumin (RSA) ist ein globuläres Protein mit einem Molekulargewicht von 66000 Da. Die weiteren physiko-chemischen Eigenschaften des Proteins sind in **Tab. 1** mit aufgenommen.

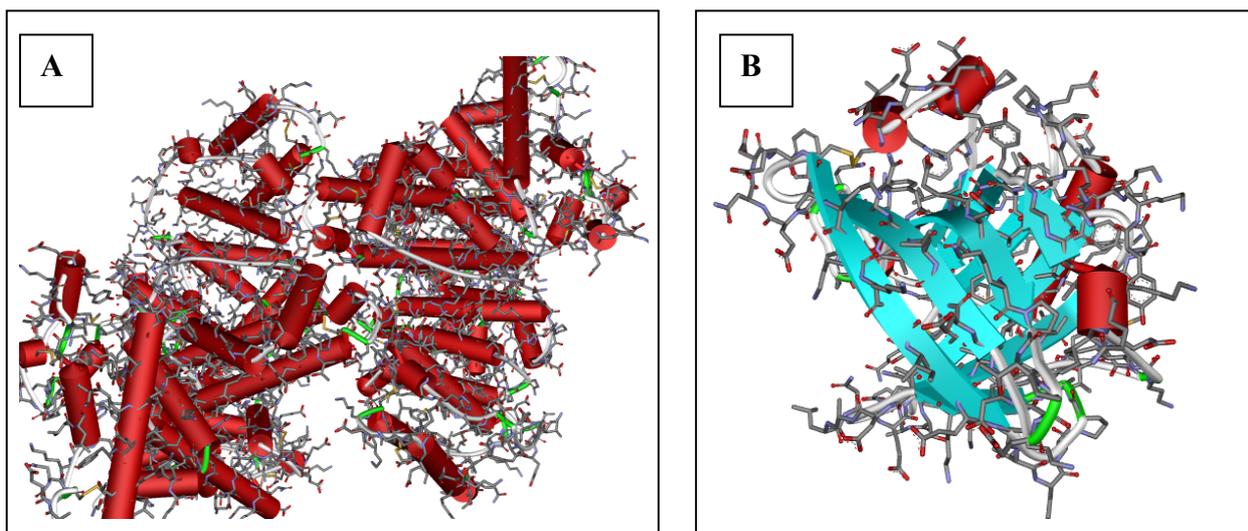


Abb. 2: Tertiärstruktur von Serumalbumin (**A**) und β -Lactoglobulin (**B**) (Brookhaven Proteindatenbank: *1ao6* (**A**) und *1bsy* (**B**); die Proteindaten wurden mittels der Software **WebLab-Viewer** verarbeitet; schematische Darstellung der Kette: α -Helix (rot), β -Faltblattstruktur (cyan), ungeordnete Bereiche (weiß) und Schleifen (grün); Seitenketten in Stabdarstellung, Wasserstoffe wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt).

Rinderserumalbumin (Serumalbumin oder Plasmaalbumin) ist das Protein mit der höchsten Konzentration in Blutplasma (5g/100 ml). Es trägt zu 80% zum kolloidalen osmotischen

Blutdruck bei (Carter und Ho, 1994). Rinderserumalbumin hat in Kuhmilch eine Konzentration von ca. 0,4 g/kg.

Als biologische Funktion des Serumalbumins wird vermutet, dass sie als wasserlösliche Protein (z.B. Lipid-Wechselwirkungen) multifunktionelle Aufgaben des Stofftransportes im Blutkreislauf übernimmt. Die Mechanismen des Stofftransportes sind aber noch nicht vollständig verstanden. So wird z.B. angenommen, dass das Protein die Fähigkeit besitzt freie Fettsäuren und Abbauprodukte des roten Blutfarbstoffes wie z.B. das Bilirubin sowie toxisch wirkende lipophile Substanzen in der Blutbahn zu transportieren (Kragh-Hansen, 1981; Review). Weiterhin wird vermutet, dass Serumalbumin eine wichtige Rolle bei der Lipidoxidation spielt, da in *in vitro* Versuchen festgestellt wurde, dass das Protein die Lipide gegenüber einer Oxidation schützt (Smith et al., 1992).

Die Aufklärung der Tertiärstruktur von Rinderserumalbumin hat in der Literatur zu einigen widersprüchlichen Resultaten und Diskussionen geführt. Auf Basis von hydrodynamischen Experimenten (Hughes, 1954) und Röntgenstrukturanalysen (Bloomfield, 1966), vermuteten die Autoren, dass Rinderserumalbumin eine elliptische Gestalt aufweist und an den Enden geplättet ist (räumliche Dimensionen: 140 x 40 Å). Spätere Untersuchungen unterstützten diese Beobachtungen (Benedouch und Chen, 1983; Feng, et al., 1988). Brown und Schockley (1982) stellten aus Literaturdaten ein Strukturmodell des Rinderserumalbumins in Gestalt einer Zigarrenform vor.

Bos et al. (1989) zeigte mittels NMR Studien, dass eine an den Enden abgeplattete elliptische Struktur des Rinderserumalbumins nicht wahrscheinlich ist und die Autoren vermuteten eine herzförmige Form. Unterstützt wurden diese Aussagen durch Röntgenstrukturanalysen von Carter et al. (1989).

Die Aminosäurezusammensetzung von Rinderserumalbumin ist charakterisiert durch geringe Tryptophan- und Methioningehalte und hohe Gehalte an Cystein (cf. **Tab.1**). Der Glycin- und Isoleucingehalt in Rinderserumalbumin ist niedriger, als der durchschnittliche Gehalt in Proteinen (Peters, 1985). Siebzehn Disulfidbrücken zwischen den Cysteinaminosäuren stabilisieren die Tertiärstruktur des Serumalbumins. Bemerkenswert ist, dass sich keine der Disulfidbindungen mit Reduktionsmitteln im pH Bereich von 5.0 bis 7.0 spalten lässt. Erst bei höherem oder niedrigerem pH-Wert wurde eine Reduktion beobachtet (Katchalski et al., 1957).

β-Lactoglobulin

β-Lactoglobulin ist ein globuläres Protein, welches in Milch von Säugetieren vorkommt und zuerst von Palmer (1934) aus Rindermilch isoliert und kristallisiert wurde. Die Konzentration von β-Lactoglobulin in Kuhmilch beträgt ca. 3,2 g/kg (Walstra et al., 1984).

Palmer fand heraus, dass die kristallisierten Molkenproteine heterogen waren, wenn sie mit verschiedenen physiko-chemischen Verfahren gemessen wurden. Der Grund hierfür besteht darin, dass β-Lactoglobulin einen Polymorphismus zeigte, welcher zuerst von Aschaffenburg (1955) mittels Elektrophorese aufgezeigt wurde. Bei der Elektrophorese wurden zwei Banden detektiert, die mit β1 und β2 bezeichnet wurden. Aschaffenburg und Drewry bezeichneten die beiden genetischen Varianten später, in Abhängigkeit von der elektrophoretischen Mobilität, mit den Buchstaben A und B. Ursache für die unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld sind die isoelektrischen Punkte der Varianten A und B (cf. **Tab.1**).

Weitere genetische Varianten aus unterschiedlichen Milchtypen wurden mittels Gel-Chromatographie und Elektrophoresetechnik erkannt und bestimmt. Fünf genetische Varianten (Variante A-E) wurden z.B. aus Rindern (Liberatori, 1977) und je zwei genetische Varianten aus Schafen, Pferden und Rehen bestimmt (Bell und McKenzie, 1967; Godovac-Zimmerman, et al., 1985).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Mischung der zwei wichtigsten β-Lactoglobulin-Varianten, die genetischen Varianten A und B eingesetzt, die in Kuhmilch vorkommen. Die Aminosäuresequenz wurde von Braunitzer et al. (1973) bestimmt. Die zwei genetischen Varianten unterscheiden sich in den Aminosäurepositionen 64 und 118. In diesen Positionen sind Asparagin (Asp) und Valin (Val) in der Variante A, ersetzt durch Glycin (Gly) und Alanin (Ala) in der Variante B (cf. **Abb.3**). Beiden Varianten sind zwei Disulfidbrücken und ein freies Cystein gemeinsam (McKenzie et al., 1972). Die unterschiedlichen Varianten zeigen unterschiedliche Eigenschaften, welche die Konformationsübergänge, die Assoziations- und Dissoziationsgleichgewichte sowie die Stabilität des Moleküls beeinflussen (Mc Kenzie et al., 1971 und 1972). Die mittels Röntgenstrukturanalysen ermittelten Konformationsunterschiede der genetischen Varianten A und B sind sehr gering (Oliveira et al., 2001), so dass bei den Bindungsstudien mit Geruchsstoffen keine Unterschiede im Bindungsverhalten zu erwarten sind.

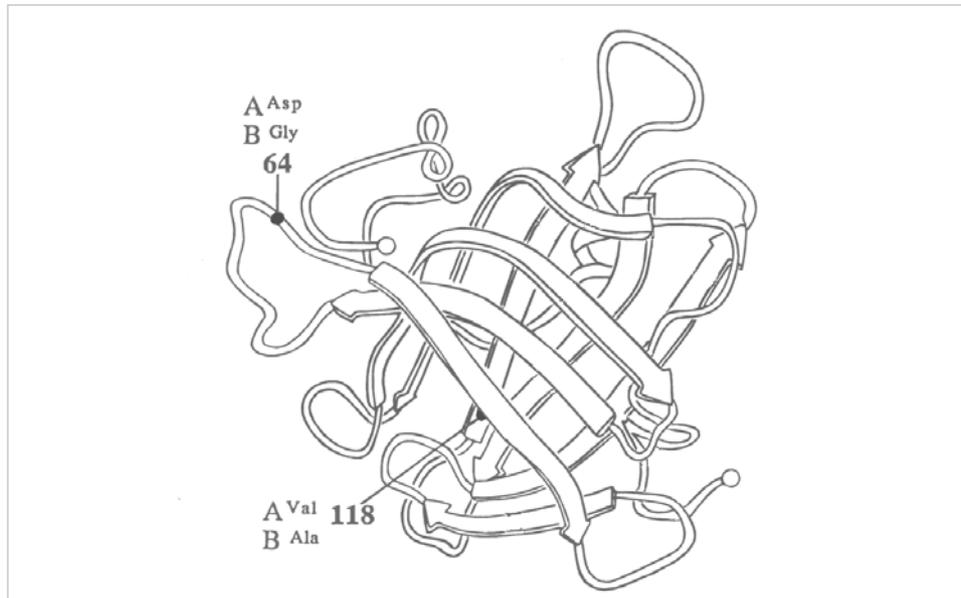


Abb.3: Schematische Darstellung von β -Lactoglobulin und die Unterschiede zwischen den genetischen Varianten A und B (Monaco et al., 1987).

Mittels Röntgenstrukturanalysen von Proteinkristallen wurde die dreidimensionale Struktur von β -Lactoglobulin aufgeklärt, die aus acht antiparallelen β -Faltblattstrukturen (in Kelchform) und einem kurzen α -Helix Segment besteht (cf. **Abb.2** und **3**). Wie bereits erwähnt, ist die Struktur des β -Lactoglobulins der Struktur des so genannten „Retinol-Binding-Proteins (RBP)“ sehr ähnlich. Beide oben angeführten Proteine gehören zur Klasse der Lypocaline. Als biochemische Funktion wird der Transport kleiner hydrophober Substanzen im lebenden Organismus vermutet (Green et al., 1979; Hattori, et al., 1993; Papiz, et al., 1986).

So wird z.B. angenommen, dass bei Säuglingen das β -Lactoglobulin das Vitamin A (Retinol) bindet und dann in der Blutbahn an die unterschiedlichen Wirkungsorte (z.B. Leber, Auge) transportiert (Sawyer et al., 1985). Die physiko-chemischen Eigenschaften und die Stabilität im sauren Milieu sind wichtige Voraussetzungen, die es ermöglichen, β -Lactoglobulin bei der Lebensmittelverarbeitung (Aromafixierung) und vom ernährungsphysiologischen Standpunkt aus, als Transportprotein von Nahrungsmittelinhaltsstoffen einzusetzen (Sawyer et al., 1987).

1.4 Bestimmung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen mittels Molecular Modelling Simulationen und quantitativen Struktur-Aktivitätsbeziehungen (Quantitative Structure Activity Relationships, QSAR)

Molekular Modelling Untersuchungen gewinnen zunehmend an Bedeutung zur Betrachtung und Vorhersage komplexer chemischer Vorgänge auf molekularer Ebene. Unter Molekular Modelling versteht man die Berechnung, Darstellung und Bearbeitung von realistischen dreidimensionalen Molekülstrukturen und ihren physiko-chemischen Eigenschaften. Das Anwendungsspektrum solcher Simulationen erstreckt sich z.B. auf Bereiche der Molekularbiologie, der Medizin und der Pharmakologie zur Entwicklung neuer Wirkstoffe (Wirkstoffdesign). Der Einsatz von Molekular Modelling Simulationen eröffnet somit z.B. die Bestimmung der Stärke und der Bindungsposition von Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen. Dieses Verfahren wird als Molekular-Docking bezeichnet und führt zur Geometrie eines Rezeptor-Ligand-Komplexes und ermöglicht darüberhinaus eine Berechnung von experimentell sehr aufwendig zu ermittelnden Bindungskonstanten zwischen Makromolekül und Ligand. Die Bindungsposition wird z.B. durch einen Algorithmus berechnet der alle Freiheitsgrade des Systems berücksichtigt und die „optimale“ Bindungsposition des Liganden am Rezeptor über die Beiträge der elektrostatischen und der Van der Waals- (Van der Waals, 1908) Wechselwirkungen bestimmt. Unberücksichtigt dabei bleiben entropische Beiträge zur Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung. Ein Lösungsansatz besteht in der Anwendung des sogenannten „Thermodynamischen Zyklus“ der in **Abb.4** dargestellt ist. Die Bindungsenergie des Protein-Ligand-Komplexes (PL) in Lösung lässt sich mittels Molekular Modelling nicht bestimmen. Allerdings lassen sich die Bindungsenergien des Komplexes im Vakuum und die einzelnen Solvatisierungsenergien des Proteins (P), des Liganden (L) und des Protein-Ligand-Komplexes (PL) ermitteln. Da in einem „Thermodynamischen Zyklus“ die Energieänderung Null beträgt, lässt sich auf Basis der oben kalkulierten Energien die unbekannte Bindungsenergie des Protein-Ligand-Komplexes (PL) in Lösung berechnen.

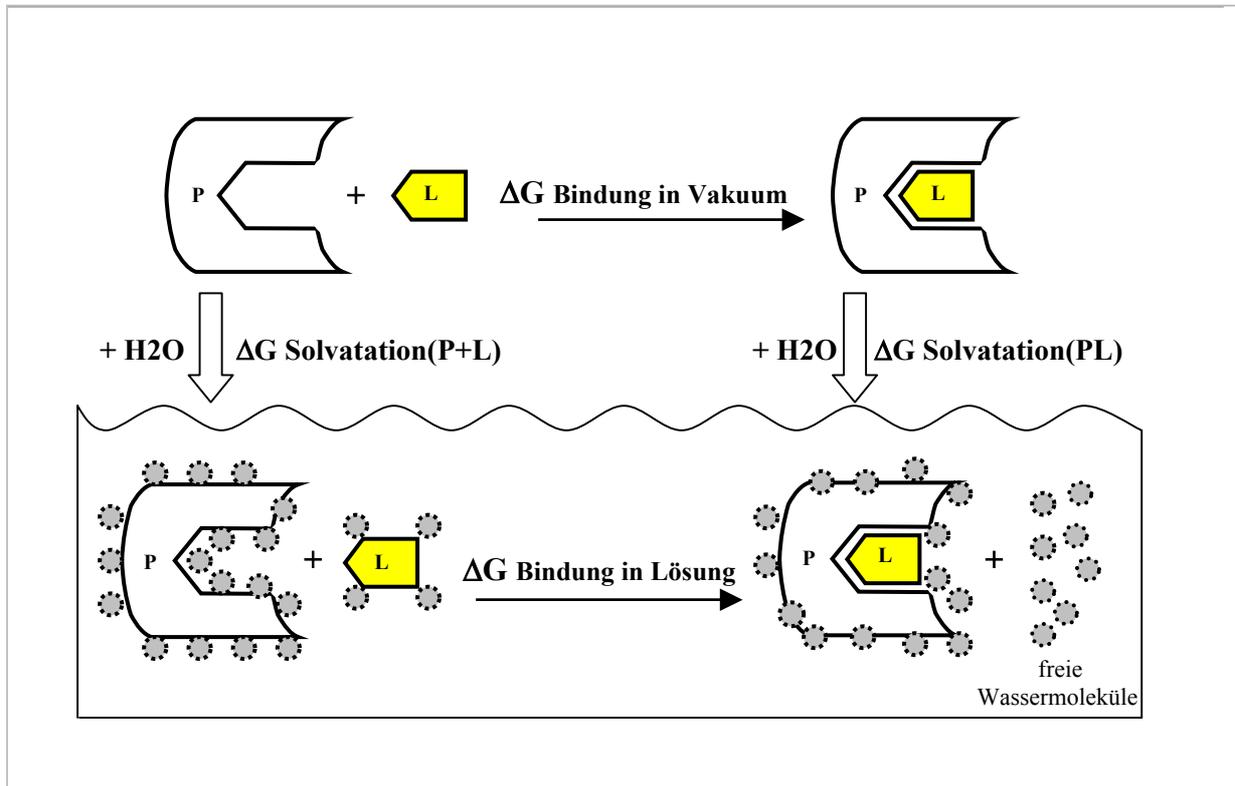


Abb.4 Thermodynamischer Zyklus, Beiträge zur freien Bindungsenthalpie ΔG

Wechselwirkungen können mittels mechanischer Kraftfelder (Molekular Mechanik and Dynamik), quantenmechanischer (*ab initio*) und semi-empirischer Methoden berechnet werden.

Die erste Methode zur Vorhersage der Gleichgewichtskonstanten einer Reaktion wurde von Hammett (1933) beschrieben. Ausgehend von einer definierten Grundstruktur (aromatische Ringstruktur) stellte Hammett einen Zusammenhang zwischen der elektronischen Eigenschaft eines Substituenten und der Reaktionsfähigkeit des betrachteten Moleküls fest. Die relativen Beiträge von Elektronenakzeptor- und Elektronendonator-Substituenten zur Elektronendichte wird durch die Hammett-Konstante (σ) bestimmt. σ zeigt positive Werte für Elektronenakzeptor-Substituenten und negative Werte für Elektronendonator-Substituenten. Abhängig von der betrachteten Reaktion bzw. Wechselwirkung ist die Reaktionskonstante ρ . Mit Hilfe der Hammett-Gleichung lassen sich mittels ρ - und σ -Konstante die Gleichgewichtskonstante K einer Reaktion berechnen (QSAR):

$$\rho\sigma = \log K_{R-X} - \log K_{R-H} \quad (1-4)$$

-X steht für substituierte (X) und R-H für nicht-substituierte (H) aromatische Verbindungen. Akzeptor- und Donor-Substituenten beeinflussen die Elektronendichte der Substanz, so dass z.B. in Abhängigkeit vom Substituenten die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu- bzw. abnimmt.

Hammett's Pionierarbeit war der Anfang zur Vorhersage von quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen (QSAR). In weiteren Arbeiten wurden sterische, elektrostatische und hydrophobe Effekte eines Substituenten zur Bestimmung der biologischen Aktivität einer Substanz mit einbezogen. Z.B. wurde der Lipophilieparameter π , analog zum elektronischen Term σ der Hammett-Gleichung, von Fujita et al. (1964), Hansch et al. (1965) und Selassie et al. (1989) eingeführt. Die π -Konstante erlaubt die Abschätzung der Lipophilie einer Verbindung und in Verbindung mit den elektronischen Einflüssen der Substituenten, die Abschätzung der biologischen Aktivität der Verbindungen bzgl. einer definierten Reaktion.

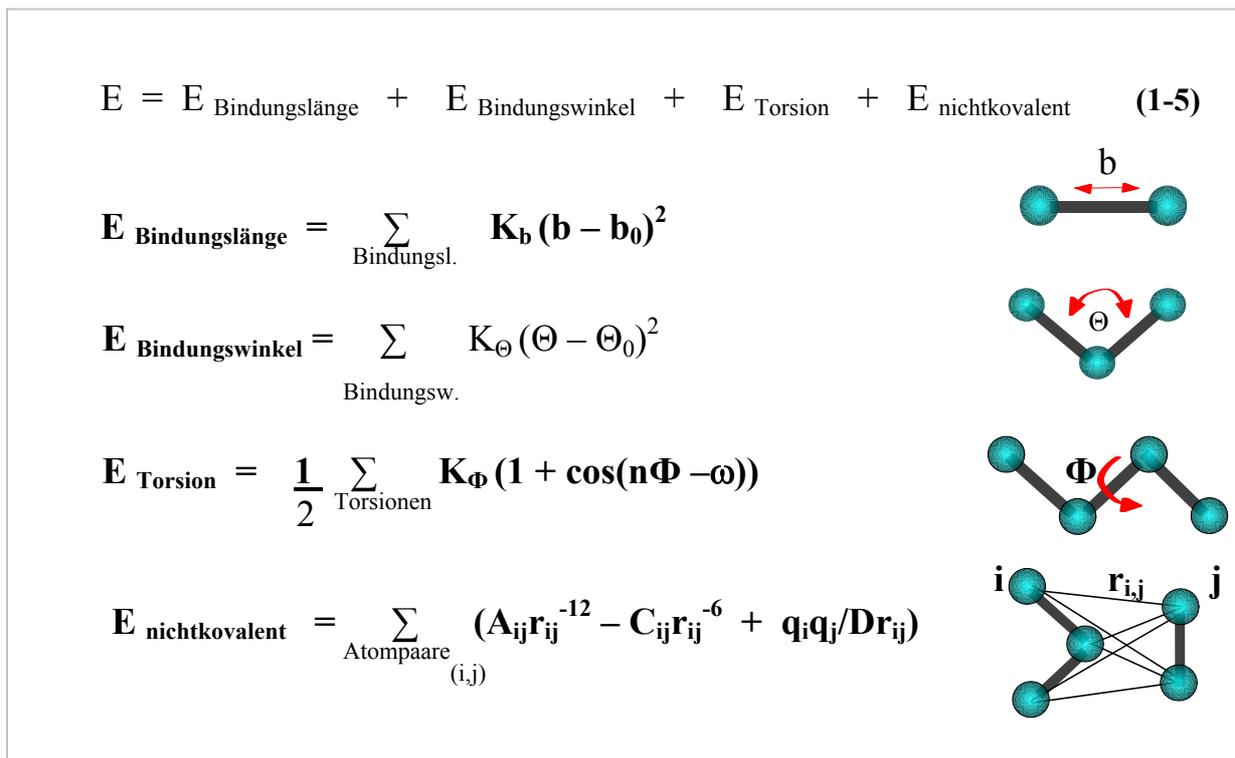
1.4.1 Kraftfeldmethoden

Kraftfeldmethoden (Molekular Mechanik) sind empirische Verfahren zur Berechnung von Molekülgeometrien und Molekülenergien. Ziel der Kraftfeldmethoden ist die Ermittlung einer energetisch günstigen dreidimensionalen Struktur eines Moleküls oder eines Ligand-Rezeptor-Komplexes.

Die Grundlagen von Kraftfeldmethoden zur Optimierung von Molekülgeometrien und Berechnung von Molekülenergien sind die additive Ermittlung von Energiebeiträgen aus Bindungslängen, Bindungswinkeln, Torsionswinkeln, 1-4- van der Waals und 1-4- elektrostatischen Wechselwirkungen von Verbindungen. 1-4- bzw. 1-3-Wechselwirkungen (zwei nicht direkt mit einander verknüpfte Atome) können dazu führen, dass van der Waals und elektrostatische Abstoßungen in einer Verbindung auftreten, so dass bestimmte Bindungslängen, Winkel und Torsionen nicht die „Idealwerte“ einnehmen können.

Die Entwicklung eines Kraftfelds erfolgt durch empirische Anpassung der Kraftfeldparameter an experimentelle Daten, erhalten z.B. aus Röntgenstrukturdaten, aus Raman- und IR-Schwingungsspektren, aus physiko-chemischen Daten und/oder aus Berechnungen mit quantenmechanischen Methoden (z.B. Standard Split-Valenzbasissatz 6-31G*/6-31G**). Die Energie (E) eines Molekülsystems wird z.B. im AMBER-Kraftfeld (Weiner et al., 1984) nach Gleichungen (1-5) berechnet. Die Gesamtenergie E eines Moleküls oder eines Komplexes aus mehreren Molekülen setzt sich dabei aus mehreren Energiebeiträgen zusammen. Der erste

Term in Gleichung **(1-5)** ($E_{\text{Bindungslänge}}$) beschreibt die Energieänderung bei Dehnung oder Stauchung einer chemischen Bindung. Im vorgestellten Beispiel des AMBER-Kraftfeldes handelt es sich um das sogenannte harmonische Potential mit der Kraftkonstante K_b und der Gleichgewichtsbindungslänge b_0 als Kraftfeldparameter und der Bindungslänge b im Molekül. Der zweite Term ($E_{\text{Bindungswinkel}}$) in Gleichung **(1-5)** beschreibt die Energie als Funktion des Bindungswinkels Θ . Auch hier wird ein harmonisches Potential mit einer Kraftkonstanten K_Θ und einem Gleichgewichtswert Θ_0 verwendet. Der dritte Beitrag in Gleichung **(1-5)** beschreibt die Änderung der Energie in Abhängigkeit vom Torsionswinkel (Φ), der Torsionsbarriere (K_Φ), der Periode des Torsionsterms (n) und des Phasenwinkels (ω). Der Term $E_{\text{nichtkovalent}}$ in Gleichung **(1-5)** steht für die nicht-kovalenten van der Waals- und elektrostatischen Wechselwirkungen in einem Molekül (1-3 und/oder 1-4 Wechselwirkungen) und zwischen unterschiedlichen Molekülen (z.B. Ligand-Rezeptor).



Die van der Waals Wechselwirkungen werden durch das Lennard-Jones Potential und die elektrostatischen Wechselwirkungen durch das Coulomb-Potential beschrieben (cf. **Abb.5**). Aus den Potentialkurven (Lennard-Jones- und Coulomb-Potential) in **Abb.5** wird deutlich, wenn der Abstand zweier Atome gegen Null geht, nimmt das Lennard-Jones- und das Coulomb-Potential, bei gleich geladenen Teilchen unendlich große positive Energiewerte an.

Das Coulomb-Potential unterschiedlich geladener Atome nimmt dagegen gegen unendlich gehende negative Potentialwerte an.

Das Lennard-Jones Potential setzt sich aus einem attraktiven ($-C_{ij}/r_{ij}^6$) und einem repulsiven Term ($A_{ij}r_{ij}^{-12}$) zusammen. Das Modell zur Bestimmung der zwischenmolekularen Wechselwirkung zweier Atome (i und j) zeigt für zwei nicht-bindende Atompaaire eine Minimalenergie E^* und einen Gleichgewichts-Atomabstand $r_{i,j}^*$ (cf. **Abb. 5**). Die Energie des ersten Terms in der Gleichung $E_{\text{nichtkovalent}} = A_{ij}r_{ij}^{-12}$ (repulsiver Term) ist immer positiv und steigt mit abnehmendem Atomabstand ($r_{i,j}$) schnell an. Er beschreibt die Abstoßung zweier Atome, die sich zu nahe kommen. Der Parameter $r_{i,j}^*$ ist proportional der Summe der van der Waals Radien der Atome i und j ($r_{i,j}^* = r_i^* + r_j^*$) und A_{ij} wird in Form der van der Waals Radien und der Minimalenergie ausgedrückt ($A_{ij} = E^* \times (r_{i,j}^*)^{12}$ wobei $E^* = (E_i^* \times E_j^*)^{1/2}$). Zur Entwicklung der Kraftfeldparameter $r_{i,j}^*$ und A_{ij} können z.B. die experimentell ermittelte Verdampfungsenthalpie, Dichte und Selbstdiffusionskonstante von Modellverbindungen in einem Lösungsmittelkäfig herangezogen werden (Fox und Kollman, 1996). Die Kraftfeldparameter (r_i^* , r_j^* , E_i^* und E_j^*) werden solange variiert bis die Simulation der Modellverbindung die experimentell ermittelten Daten reproduziert.

Der Energiebeitrag $-C_{ij}/r_{ij}^6$ (attraktiver Term) ist immer negativ und geht mit zunehmendem Abstand r_{ij} gegen Null und beschreibt die anziehende Wechselwirkung, die auch als Dispersionswechselwirkung bezeichnet wird.

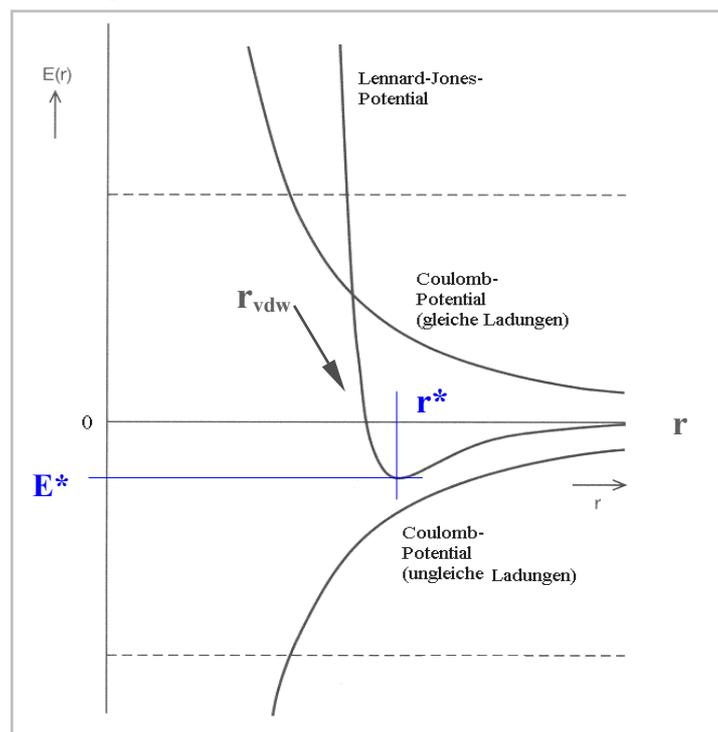


Abb.5: Sterische und elektrostatische Wechselwirkungen mit einem Lennard-Jones- bzw. Coulomb-Potential.

Der Term $q_i q_j / D r_{ij}$ in der Gleichung $E_{\text{nichtkovalent}}$ beschreibt die elektrostatischen Wechselwirkungen mittels des Coulomb-Potentials. Die Formalladungen der Atome werden dabei als Punktladungen betrachtet. Der Potentialverlauf ist in **Abb. 5** dargestellt. D ist die effektive Dielektrizitätskonstante des umgebenden Mediums (z.B. Vakuum $D=1$, Wasser $D=78.5$) und r ist der Abstand zwischen zwei Atome mit den jeweiligen Punktladungen q_i q_j . Die Ladungen der Molekülatome werden mittels *Ab Initio* Methoden (Split-Valenzbasissatz 6-31G*/6-31G**) berechnet.

Molecular Modelling Untersuchungen in der Literatur (Fox und Kollman, 1996) haben gezeigt, dass die Bestimmung der Partialladungen durch Anpassung aus den über quantenmechanischen berechneten molekularen elektrostatischen Potentialen (z.B. RESP- (Cornell, et al., 1993) und CHELPG-Methode, (Chirlian, and Francl., 1987), in der Lage sind, experimentelle Eigenschaften von Molekülen (z.B. Dipolmoment) zu reproduzieren. Dagegen waren die nach Mulliken (Mulliken, 1958) erhaltenen Nettoladungen teilweise nicht in der Lage die experimentellen Daten wiederzugeben.

Weitere in der Literatur zur Verfügung stehende Kraftfelder sind z.B. in der Software **CHARMM-** (Chemistry at Harvard Molecular Mechanics) (Brooks et al., 1983), **GROMOS-** (Berendsen et al., 1984), **MM3** (Lii, und Allinger, 1991) und **UFF** (Rappe'e et al., 1992) eingebettet.

1.4.2 Quantenmechanische Methoden

Quantenmechanische (QM) Verfahren zur Berechnung von Moleküleigenschaften basieren auf der näherungsweise Lösung der Schrödinger-Gleichung **(1-6)** im Rahmen der Born-Oppenheimer-Näherung (Born und Oppenheimer, 1927). Als Lösung erhält man die elektronische Wellenfunktion Ψ des Moleküls und die Potentialenergiefläche in Abhängigkeit von der Kernkonfiguration **(1-6)**. Die Wellenfunktion Ψ wird dabei durch einen vorgegebenen Basis-funktionssatz dargestellt. Der Rechenaufwand von QM-Verfahren wächst dabei mit der Anzahl der Atome in einem Molekül schnell an. Mit parallelisierten Programmen sind derzeit Berechnungen von Molekülen mit weniger als 100 Atomen realistisch (z.B. **GAMESS**, Schmidt et al., 1993).

$$\left[\frac{-\hbar^2}{8\pi^2 m} \nabla^2 - \frac{Ze^2}{r} \right] \Psi(x,y,z) = E \Psi(x,y,z) \quad (1-6)$$

Der Ausdruck in der Klammer stellt die kinetische und Potentialenergie eines Elektrons dar. Dabei ist m die Masse des Elektrons, r ist der Radiusvektor ($r = x_i + y_j + z_k$) mit dem Abstand r von einer Kernladung Z , e ist die Ladung des Elektrons, h ist die Planck'sche Konstante, ∇^2 ist $\partial^2/\partial x^2 + \partial^2/\partial y^2 + \partial^2/\partial z^2$ und E die Energie des Elektrons. Die linke Seite der Schrödinger-Gleichung (1-6) wird durch Einführung des Hamilton-Operator (H) auf $H\Psi$ reduziert (1-7):

$$H\Psi = E\Psi \quad (1-7)$$

Der Hamilton-Operator (H) setzt sich somit aus zwei Teilen zusammen: der kinetischen Energie des Elektrons (1-8a) und der Potentialenergie des Elektrons (elektrostatische Wechselwirkung des Elektrons mit dem Kern, Elektron-Elektron- Wechselwirkungen) (1-8b).

$$-\frac{h^2}{8\pi^2 m} \quad (\text{a}) \quad -\frac{Ze^2}{4\pi\epsilon_0 r} \quad (\text{b}) \quad (1-8)$$

Zur Beschreibung von Systemen mit mehreren Partikeln (Elektronen und Kernen) kann die Schrödinger-Gleichung nicht exakt gelöst werden und man ist auf Näherungsverfahren angewiesen. Bei der Born-Oppenheimer Näherung wird die Kernbewegung von der Elektronenbewegung abgekoppelt. Die Anwendung dieses Näherungsverfahrens ist möglich, da die Kernmasse deutlich höher ist als die Elektronenmasse. Die Kerne erscheinen im molekularen System (Raum) als geometrisch fixierte positive Punktladungen, während die Elektronen mit Wahrscheinlichkeitsverteilung beschrieben werden.

Somit hängt die elektronische Wellenfunktion Ψ nur von der Kernposition ab und es ist, unter Verwendung der Born-Oppenheimer Näherung möglich, die Wellenfunktion Ψ_{Gesamt} mittels Gleichung (1-9) darzustellen.

$$\Psi_{\text{Gesamt}} (\text{Kern, Elektron}) = \Psi (\text{Elektron}) \Psi (\text{Kern}) \quad (1-9)$$

Die Energie E_{Gesamt} ist gleich der Summe der Kern- (elektrostatische Abstoßung) und der elektronischen Energie (1-10).

$$E_{\text{Gesamt}} = E (\text{Elektron}) + E (\text{Kern}) \quad (1-10)$$

Die Lösung der Elektronengleichung kann z.B. mittels des Hartree-Fock (HF) Verfahrens erfolgen. Hierbei werden die Variablen getrennt, d.h. die Vielelektronen-Wellenfunktion, unter Vernachlässigung der Elektron-Elektron Abstoßung, auf eine Ein-Elektronen-Wellenfunktion zurückgeführt und die Summe der Beiträge ermittelt. Eine wesentliche Voraussetzung des Hartree-Fock Modells ist die Born-Oppenheimer Näherung, welche dazu führt, dass die Schrödinger-Gleichung auf eine elektronische Gleichung reduziert wird. Als Beispiel ist die Integral-Differentialgleichung für ein Elektron (Elektron 1) im Feld des Kerns und eines zweiten Elektrons (Elektron 2) nach der Hartree-Fock (HF) Methode dargestellt (**1-11**). Die Energie des Elektrons (1) setzt sich nach Gleichung (**1-11**) aus den Teilbeiträgen der Kern-, Coulomb- und Spinwechsel-Energie zusammen (χ_{ij} Spinorbitale i und j ; ϵ_{ij} Orbitalenergie; A Atomkern; $d\tau_2$ Integration über den Raum)

$$\left[-1/2 \nabla^2 - \sum_{A=1}^M Z_A/r_{iA} \right] \chi_i(1) + \sum_{j \neq i} \left[\int d\tau_2 \chi_j(2) \chi_j(2) 1/r_{12} \right] \chi_i(1) - \sum_{j \neq i} \left[\int d\tau_2 \chi_j(2) \chi_i(2) 1/r_{12} \right] \chi_i(1) = \sum \epsilon_{ij} \chi_j(1) \quad (1-11)$$

Die Lösung der Hartree-Fock Gleichung für Atome ist nicht sehr praktikabel. Slater (1930) hat eine einfachere Lösung für die Bestimmung der Radialfunktion vorgeschlagen (**1-12**).

$$R_{nl}(r) = (2\zeta)^{n+1/2} [(2n)!]^{-1/2} r^{n-1} e^{-\zeta r} \quad (1-12)$$

Diese Gleichung (Orbitalexponent (ζ) = $Z - \delta / n^*$; δ Shielding Konstante, Z Atomnummer, n^* Quantenzahl) ist in der Literatur allgemein unter dem Begriff Slater-Typ-Orbitale (STO's) bekannt.

Zur Lösung der Hartree-Fock Gleichung für Moleküle wurde die LCAO (Linear Combination of Atomic Orbitals) Näherung eingeführt. Hierbei werden die Molekülorbitale als Linearkombination der Atomorbitale mittels Gleichung (**1-13**) beschrieben. Die Überführung der Wellenfunktion in eine Linearkombination von bekannten Basisfunktionen führt die sogenannten Basissätze in die *ab initio* Rechnung ein.

$$\Psi_i = \sum_{v=1}^K c_{vi} \Phi_v \quad (1-13)$$

Das Ein-Elektron Orbital Φ_v wird als Basisfunktion bezeichnet und entspricht in den meisten Fällen dem Atomorbital. Der Koeffizient c_{vi} beschreibt ein System mit minimaler Energie der Wellenfunktion ($\partial E / \partial c_{vi} = 0$) wobei K die Anzahl der Molekülorbitale ist.

Eine weitere Näherungsmethode zur Lösung der Schrödinger-Gleichung ist die sogenannte Roothman-Hall Gleichung. Sie stellt eine Kombination aus der Hartree-Fock und LCAO Näherung dar. Zur numerischen Lösung von Ψ_i wird das Integral-Differentialgleichungssystem in ein Matrixgleichungssystem die sogenannte Roothman-Hall Gleichung überführt (1-14).

$$F C = S C E \Rightarrow F' C' = C' E \quad F' = S^{-1/2} F S^{-1/2}, C' = S^{1/2} C \quad (1-14)$$

In der Gleichung ist F die Fock Matrix, die von den Orbital Koeffizienten c_{vi} abhängt. Zu dessen Lösung wird ein Iterationsverfahren eingesetzt. E ist eine Diagonalmatrix deren Elemente die Orbitalenergien (ϵ_1, \dots) sind und S ist die Orbitalüberlappungs-Matrix.

$$C = \begin{pmatrix} c_{1,1} & c_{1,2} & \dots & c_{1,K} \\ c_{2,1} & c_{2,2} & \dots & c_{2,K} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ c_{K,1} & c_{K,2} & \dots & c_{K,K} \end{pmatrix} \quad E = \begin{pmatrix} \epsilon_1 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & \epsilon_2 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & \epsilon_K \end{pmatrix} \quad S = \begin{pmatrix} 1 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & 1 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & 1 \end{pmatrix}$$

Zur Lösung werden die Integrale für die Fock-Matrix (F) berechnet und die Orbitalüberlappungs-Matrix (S) ermittelt. Durch Diagonalisierung von S und Umformung in $S^{-1/2}$ gefolgt von der Berechnung der Dichte-Matrix erhält man die Fock-Matrix (F). Anschließend werden die Eigenwerte von E und die Eigenvektoren von C' mittels Diagonalisierung von F' berechnet. Die Basissatzkoeffizienten c_{vi} lassen sich mittels Gleichung (1-14) nach Umformung ($C = S^{-1/2} C'$) ermitteln. Aus den erhaltenen Daten wird erneut die Dichte-Matrix berechnet und abhängig vom Konvergenzkriterium der Simulation einer neuen Iteration unterzogen. Das beschriebene Matrix-Gleichungssystem stellt die Grundlage praktisch aller *ab initio* Anwendungen dar.

Die Basisfunktionen die bei *ab initio* Rechnungen von Molekülen eingesetzt werden, sind Gauß-Funktionen ($\Phi_\mu = \sum d_{i\mu} \Phi_i$ ($\alpha_{i\mu}$); α Orbital-Exponent, $d_{i\mu}$ Gauß-Koeffizient), da die Integrale von Slater-Orbital-Typ schwierig bzw. unmöglich zu bestimmen sind. Die Nomenklatur der Basissätze ist dabei wie folgt: Minimalbasissatz STO-nG (z.B. STO-3G), wobei n die Zahl der Gauß-Funktionen für die einzelnen Orbitale ist; Split-Valenzbasissätze n-mIG (z.B. 6-31G), n die Zahl der Gauß-Funktionen der Kern- und der Valenzorbitale, m die Zahl der Gauß-Funktionen der kontraktiven Orbitale und l die Zahl der Gauß-Funktionen der diffusen Orbitale, beschreiben; Polarisations-Basisfunktionen werden mit einem Stern (z.B. 6-31G*, Polarisationsfunktion für schwere Atome) oder zwei Sternen (z.B. 6-31G**, Polarisationsfunktion für schwere Atome und Wasserstoff) gekennzeichnet.

Wie bereits erwähnt erfolgt bei der HF Methode keine Elektronenkorrelation. Hierzu wurden jedoch Post-Hartree-Fock-Methoden in *ab initio* Berechnungen eingeführt, die die Unzulänglichkeiten des HF Verfahrens beseitigen, in dem sie die Elektronenkorrelation berücksichtigen. Die Energiedifferenz zwischen einer HF-Rechnung und einer Post-Hartree-Fock-Modell Rechnung wird normalerweise als Korrelations-Energie bezeichnet. Die Korrelations-Energie kann z.B. mittels des Møller-Plesset- (MP) Verfahrens ermittelt werden (Møller und Plesset, 1934). Abhängig vom Grad der theoretischen Behandlung werden die entsprechenden Korrelationsenergien mit MP2, MP3 u.s.w. bezeichnet. Die ermittelte Hartree-Fock (HF) Energie entspricht prinzipiell einem MP1 Modell.

Quantenmechanische *ab initio* Rechenverfahren erlauben die direkte Berechnung der Molekülstruktur und der Elektronendichteverteilung sowie molekularer Eigenschaften ohne die in 1.4.1 gemachten Annahmen. Für die Berechnung von Molekülgeometrien wie z.B. Bindungswinkel, Bindungslängen und Torsionswinkel einer Verbindung, können quantenmechanische Programme wie z.B. **GAUSSIAN98** (Frisch et al., 1998) und **GAMESS** (Schmidt et al., 1993) eingesetzt werden. Die Programme erlauben die Berechnung der Molekülstruktur und der Elektronendichtenverteilung sowie die Bestimmung von physikochemischen Eigenschaften von Verbindungen. Weitere Vorteile quantenmechanischer Berechnungen sind: Bestimmung des Einflusses von funktionellen Molekülgruppen auf die Elektronendichte einer Verbindung und Bestimmung von Partialladungen und Einsatz zur Parameterentwicklung für Kraftfeldmethoden (z.B. **AMBER**-Kraftfeld).

1.4.3 Molekular Dynamik (MD) und Monte Carlo (MC) Simulationen

Mittels *ab initio* Verfahren und Molekular Mechanischen (MM) Kraftfeldern lassen sich Gleichgewichtsstrukturen von Molekülen und Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen ermitteln. Aufgrund der thermischen Bewegung der Atome bei physiologischen Temperaturen befindet sich jedoch ein Molekül nie wirklich in seiner Gleichgewichtslage, sondern es ist ständigen Konformationsänderungen unterworfen. Ein einfaches Beispiel für die Konformationsdynamik eines Moleküls stellt etwa die thermisch induzierte Torsionsisomerie von Butan um die C(3)–C(4) Bindung dar. Bei Protein-Ligand-Wechselwirkungen spielen die Flexibilitäten der Reaktionspartner eine entscheidende Rolle. Voraussetzung für die Bindung eines Liganden am Rezeptormolekül kann z.B. die Konformationänderung der Makromolekül-Bindetasche oder die Konformationsänderung des Liganden sein. So können bei Proteinen z.B. an der Oberfläche befindliche Seitenketten und/oder ungeordnete Bereiche des Proteins unterschiedliche Konformationen einnehmen.

Zur Beschreibung solcher dynamischen Prozesse eignet sich die Methode der Molekulardynamik (MD), bei der die Bewegung der Atomkerne durch die Newtonschen Bewegungsgleichung (1-15) beschrieben wird. Dabei ist m_i die Masse des i -ten Atoms, F_{xi} ist die Kraft die zu einer bestimmten Zeit t entlang der Koordinaten x_i auf das i -te Atom wirkt.

$$\boxed{\frac{d^2x_i}{dt^2} = \frac{F_{xi}}{m_i}} \quad (1-15)$$

Moleküle diffundieren und sie ändern ihre Gestalt, da sie unterschiedliche Konformationen einnehmen können.

In der Praxis geht man so vor, dass zunächst eine Startgeometrie erzeugt wird. (cf. **Abb.6**)

Diese Startgeometrie ist entweder eine experimentell bestimmte Struktur oder eine durch Kraftfeldrechnung optimierte Geometrie. Zu Beginn der eigentliche Simulation wird jedem Atom eine Startgeschwindigkeit zugewiesen und sie ist so gewählt, dass sie im Mittel der gewünschte Temperatur entspricht. Dann wird für jedes Atom die Kraft ausgerechnet, die durch die umgebenden Atome auf dieses Teilchen einwirkt. Mit diesen Startbedingungen werden dann schrittweise die Bewegungsgleichungen gelöst (Bewegung von Seitenketten und sogar von Proteindomänen) und die Koordinaten periodisch abgespeichert.

Die wichtigste Anwendung der MD ist die Simulation der Bewegung eines oder mehrere Moleküle in Lösung. MD-Simulationen können auch zu Konformationsanalysen d.h. zur Berechnung energetisch günstiger Konformationen eingesetzt werden. Durch den Einfluss der Temperatur ändert ein Molekül häufiger seine räumliche Gestalt und die Suche nach alternativen Konformationen wird effizienter (cf. **Abb.6**)

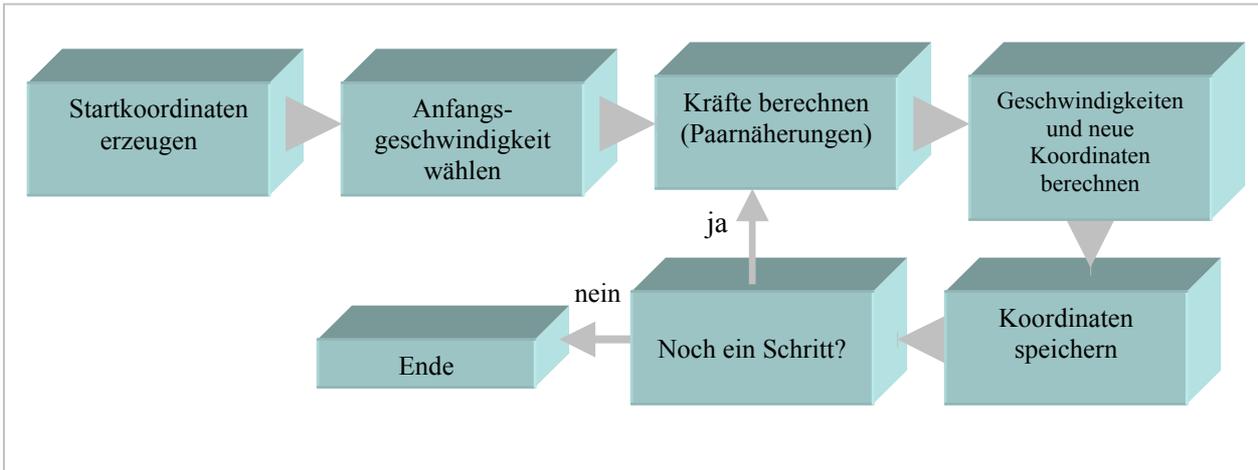


Abb.6: Schematischer Ablauf Moleküldynamiksimulation.

Ein alternatives Verfahren stellt das Monte Carlo (MC) Verfahren dar (Chang et al., 1989). Hier werden die internen Koordinaten der Torsionswinkel durch Zufallszahlen bestimmt und die jeweilige Energie berechnet (d.h. mit etwas Glück findet das Programm das tiefste Tal mit wesentlich geringerem Aufwand). Die MC-Simulation besteht aus einer Serie von Zyklen bei einer bestimmten Temperatur. Normalerweise wird die Konformationsuche nach einem Energieminimum beendet, wenn sich die Statistik nicht mehr verändert (cf. **Abb.7**).

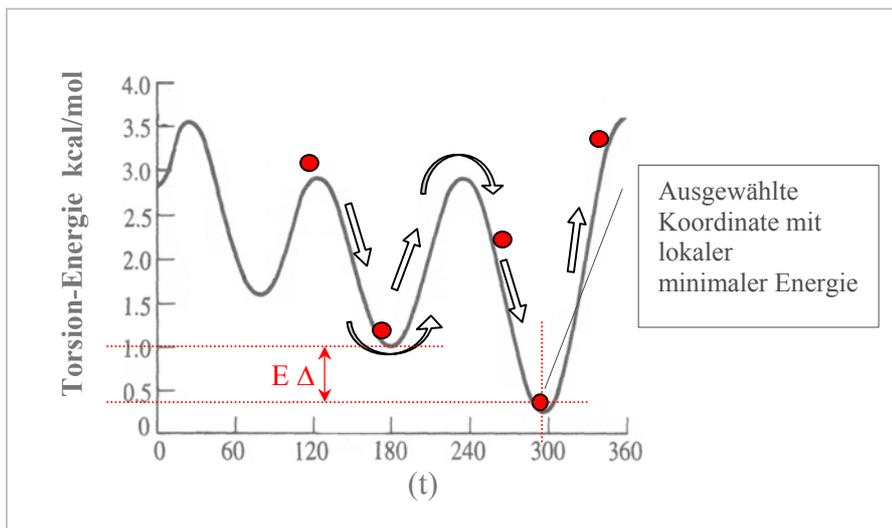


Abb. 7: Darstellung des Monte Carlo Suchverfahrens nach den minimalen Torsionswinkel-Energien.

Koordinatensätze mit tiefer Energie sind Kandidaten für lokale Minima und werden für weitere Energieberechnungen ausgewählt.

Die Wahrscheinlichkeit (P) bzw. der Anteil zum Gesamtmittelwert einer zufällig ausgewählten Struktur einer MD-Simulation bestimmt sich nach der Boltzmannverteilung durch **(1-16)**.

$$P(\Delta E) = e^{-\frac{E \Delta}{k_B T}} \quad \text{(1-16)}$$

ΔE ist die Energiedifferenz der jeweiligen Strukturvorschläge, T ist die definierte Temperatur, und k_B ist die Boltzmann-Konstante. Bei höheren Temperaturen ist es möglich, größere Konformationsräume in kürzeren Zeitabschnitten zu durchsuchen.

Wichtige Unterschiede zwischen MC- und MD-Simulationen sind: MD-Simulationen liefern zeitabhängige Informationen; MC-Simulationen berechnen ihre Totalenergie aus der Potentialenergie, MD-Simulation dagegen aus der kinetischen und der Potentialenergie. Beide Simulationsmethoden ermöglichen Ensemble-Kalkulationen in einem Käfig vom Typ z.B. isotherm-isobar (NPT) oder konstantes Volumen-isotherm (NVT).

In der Literatur sind einige Software-Pakete für Molekular Modelling Simulationen beschrieben: z.B. **TINKER** und **AMBER** (Weiner et al., 1984; Cornell et al., 1995). Die Ladungen der Verbindungen werden mit Hilfe von quantenmechanischen Rechnung vor der eigentlichen Simulation bestimmt (**GAUSSIAN**, **GAMESS**). Das **AMBER**-Kraftfeld eignet sich z.B. zur Simulation der Dynamik gelöster organischer Substanzen, da hierfür optimierte Kraftfeldparametersätze zur Verfügung stehen. Eine Molekül-Dynamische Simulation unter **AMBER** liefert sehr präzise Molekülstrukturen unter Berücksichtigung von Lösungsmittel-einflüssen. Aus den erhaltenen Daten ist es z.B. möglich, Verdampfungsenthalpien und Diffusionskoeffizienten von Substanzen zu berechnen. Weitere Programme für MD Simulation sind z.B. **CHARMM** (Chemistry at Harvard Molecular Mechanics) (Brooks et al. 1983), **DISCOVER** Programm (Hagler et al., 1977), **ECEPP** (Némethy et al., 1983) und **GROMOS** (Berendsen et al., 1984).

1.4.4 Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen (QSAR)

Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen (QSAR, *quantitative structure-activity relationships*) sollen die Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und biologischer Wirkungen erfassen und das Ausmaß quantitativ beschreiben.

Grundlagen für die quantitativen Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und biologischer Wirkung, sind z.B. die physiko-chemischen Eigenschaften von Substanzen, die für die relative Stärke ihrer Wechselwirkungen mit einem biologischen Makromolekül verantwortlich sind. Solche Wechselwirkungen tragen in erster Näherungen additiv zur Affinität eines Wirkstoffs an seinen Rezeptor bei. Mittels QSAR werden biologische Eigenschaften mit substanzspezifischen Parameter korreliert, d.h. Parameter von einer dreidimensionalen-Struktur eines Moleküls werden mit Bindungseigenschaften (z.B. Bindungsaffinitäten) korreliert.

Die Bindungsaffinitäten setzen sich aus einem enthalpischen und einem entropischen Beitrag zusammen. Der enthalpische Anteil setzt sich aus sterischen (van der Waals-Potential) und elektrostatischen Anteilen (Coulomb-Potential) zusammen. Der entropische Beitrag erfasst den Ordnungsgrad und die Verteilung der Energiebeiträge über die verschiedenen Freiheitsgrade des Systems. Sowohl die Liganden wie auch die Bindetaschen eines Proteins sind im unkomplexierten Zustand durch Wassermoleküle solvatisiert. Bei der Ligandbindung ändert sich der Solvatisierungsgrad der Proteine und Liganden, d.h. eine Desolvatation des Liganden und des Rezeptors kann durch Freisetzung von Wassermolekülen die Ordnung eines Gesamtsystems erhöhen oder erniedrigen. Eine Erhöhung führt zur Entropiezunahme und damit zu einem mehr negativen Entropiebeitrag an der Bindungsenergie. Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor können mittels der CoMFA-Methode (*Comparative Molecular Field Analysis*) beschrieben werden. Die CoMFA-Methode (Cramer et al. 1988) kann zum Vergleich von Molekülen und anschließender statistischer Methoden zur Bestimmung freier Bindungsenergien eingesetzt werden. Dabei werden die Verbindungen in einem symmetrischen Gitter eingebettet und dann systematisch mit einer Wechselwirkungs-sonde abgetastet und die Energie an der gewählten Moleküloberfläche bestimmt (Molekülsonden können z.B. CH₄ und H₂O darstellen).

Eine weitere Methode zur Bestimmung relativer Bindungsenergien ist die Free Energy Perturbation (FEP) Methode. Eine Beschreibung des Verfahrens würde allerdings den Rahmen dieser Arbeit sprengen.

Eine weitere Methode zur Bestimmung freier Bindungsenergien sind im Programm **AUTODOCK** (Goodsell und Olson, 1990) eingebettet. Das Autodock-Programm V.3.0 basiert auf dem Lamarckian Genetics Algorithmus (LGA). Das Prinzip der Methode setzt sich aus den folgenden drei Verfahren zusammen: Monte Carlo-Verfahren, Genetischer Algorithmus (GA) und Local Search Methode (LS) (cf. **Abb.8**). Das Monte Carlo-Verfahren das von Autodock angewandt wird, ist ein Zufallsgenerator der die Moleküle zufällig bewegt und die zugehörigen Energiedifferenzen bestimmt. Der Genetische Algorithmus (GA) (Holland et al. 1975) beruht auf dem Grundprinzip der Natur während der Evolution. In Fall des Molekular Modelling wird der Ligand in Bezug auf das Protein durch eine Reihe von Variablen wie Translation, Orientierung und Konformation definiert.

Der GA im Autodock-Programm nutzt das „Global-Local Search“ Modul (Global Search GS, Local Search LS) (Solis und Wets, 1981) und wird als GA-LS Hybridverfahren bezeichnet (Hart., 1994 und Hart et al., 1994). Der GA führt eine anpassungsfähige globale Abtastung des Suchraums durch, wobei das GS-Modul eine zufällige Position des Liganden im Raum erzeugt, gefolgt von einer genauen Abtastung durch das LS-Modul von Autodock. Diese Vorgehensweise ermöglicht eine effiziente und optimale Neudefinition der Daten, die aus dem GS-Modul erzeugt wurden und anschließend durch das LS-Modul hinsichtlich Position und Orientierung des Liganden am Makromolekül optimiert werden.

Die folgenden Termen werden verwendet, um die Reihe von Wechselwirkungen zwischen den GA und LS Logarithmus zu beschreiben. **G** ist der Genotyp und **Ph** ist der Phänotyp. Die Genotyps bilden die Phänotyps durch eine sogenannte Reifungs-Funktion $\delta: G \rightarrow Ph$. Die Erzeugung des Phänotyps erfolgt aus den Information des Genotyps. Die Funktion $f(x)$ ist eine Anpassungsfunktion, d.h. es muss eine Funktion definiert werden, die die Bindungsenergie für jedes Individuum (Protein-Ligand-Komplex) berechnet und ein Maß für die Qualität des Potein-Ligand-Komplex darstellt. $f: Ph \rightarrow R$. Die Übergangsinformation von **G** nach **Ph** wird bewertet und setzt sich aus der Summe der intermolekularen Wechselwirkungsenergien zwischen Ligand und Protein zusammen.

Der LS Algorithmus benutzt Information aus der Anpassungs-Funktion und wird in den Phänotyp übergeführt. Schrittweise Bewegungen des LS-Algorithmus werden mittels ein LS-Operator **L** definiert (**1-17**):

$$ph_0 = \delta(g), \quad ph_1 = L(ph_0), \quad ph_2 = L(ph_1), \dots, \quad ph_n = L(ph_{n-1}) \quad (1-17)$$

Der LS-Operator kann jede Information über die Anpassungs-Funktion $f(x)$ auswerten oder bewerten, (z.B. die Ableitung von f) um eine Lösung mit einem besseren Anpassungs-Wert zu finden. Dies unterscheidet sich vom Mutations-Operator M (auch genetische Operator genannt). Hier ist die Erzeugung neuer Individuen zufällig und unabhängig von Phänotyp so dass die Information nur von g abhängt.

In **Abb.8** ist das Prinzip der Methode dargestellt. M und L bildet aus dem Genotyp g neue Genotyps g' und g'' . Der Mutations-Operator M erzeugt einen anderen Genotyp g' . Der LS-Algorithmus verwendet L , die sogenannte „Matutation map“ eine Art von optimierter Abbildung und erzeugt ein Phänotyp, sobald ein lokales Minimum erreicht wird.

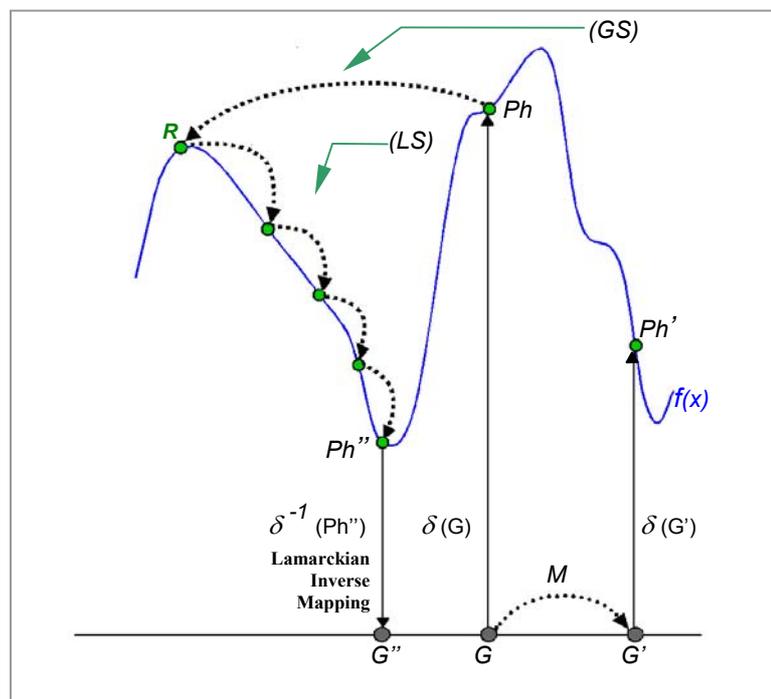


Abb. 8: Darstellung von Genotyp und Phänotyp Suchprozess.

Für die Erzeugung des neuen Phänotyps verwendet das LS-Modul die Informationen aus den Anpassungs-Werten (Energiewerte von den Koordinaten des Liganden), so dass bei den verschiedenen Rechnungstufen eine neue Energieinformation einstellt (adaptive Aktualisierung). Das *Lamarckian Local Search*-Modul ersetzt diese Optimierung durch eine Umkehrfunktion $\delta^{-1}(p_{hm})$ so, dass der Phänotyp in einen Genotyp umgewandelt wird (Inverse mapping).

Der Name ist ein Hinweis auf Jean Batiste de Lamarck, der behauptete, dass (manche) erlangte Phänotyp-Eigenschaften während des Lebens erblichen Ursprungs sein können.

1.4.5 Vorhersage von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen – der Hydrophobizitätsindex (Log P-Wert)

Die Assoziations- bzw. Dissoziationskonstanten eines Liganden und eines Makromoleküls sind unter anderem abhängig von diversen chemischen und physikalischen Faktoren, unter denen die Hydrophobizität bzw. im vorliegenden Fall die Lipophilizität, als physikalische Größe einer Verbindung herangezogen werden kann. Die Lipophilizität einer Substanz lässt sich mittels so genannter Verteilungskoeffizienten (K bzw. P (Englisch: partition) und üblicherweise logarithmisch ausgedrückt als LogK- bzw. LogP-Wert angegeben) bestimmen. Hydrophobizität ist die Zusammenlagerung unpolarer Molekülgruppen oder Moleküle in einem wässrigen Milieu, um unpolare Moleküle aus der Wasserphase auszuschließen. Die Lipophilizität beschreibt die Affinität eines Moleküls oder einer Molekülgruppe gegenüber einem unpolaren Medium. Dies bedeutet, dass der Verteilungskoeffizient Wasser/unpolares Lösungsmittel geeignet ist, um Aussagen zu treffen, wie hydrophil bzw. lipophil eine Substanz ist. Die Konformation wirkt sehr deutlich auf die Lipophilizität einer Verbindung ein.

Der Verteilungskoeffizient (K) wird definiert als das Konzentrationsverhältnis eines Stoffes zwischen zwei nicht mischbaren Phasen, die sich nach einer bestimmten Zeit im Gleichgewicht befinden. Dies kommt im Nernst'schen Verteilungsgesetz zum Ausdruck **(1-18)** (Nernst 1891). Die Nernst'sche Gesetzmäßigkeit gilt für konstanten Druck, konstante Temperatur und für verdünnte Lösungen.

$$K = \frac{C_A \text{ (Org. Phase)}}{C_A \text{ (Wasser. Phase)}} \quad \text{(1-18)}$$

C_A = Konzentration des Stoffes A

Um Verteilungskoeffizienten wie oben genannt zu bestimmen, verwendet man ein mit Wasser nicht mischbares organisches Lösungsmittel. Verteilungskoeffizienten erlauben relative Aussagen über die Bindungsaffinität zwischen Ligand und Rezeptor, wenn lipophile Effekte bei der Komplexbildung dominieren.

Die Ermittlung von Verteilungskoeffizienten haben einen wesentlichen Beitrag im Bereich des pharmakologischen Wirkstoffdesigns zum Verständnis von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen beigetragen. Der sogenannte Log P-Wert einer Verbindung wird zur experimentellen Ermittlung der Lipophilizität einer Verbindung herangezogen (Leo et al.,

1971; Hansch und Leo, 1979). Der Verteilungskoeffizient (K bzw. P) wird gewöhnlich logarithmisch (LogP bzw. LogK) angegeben **(1-19)**.

$$\text{Log } P_X = \log \left[\frac{C_X \text{ in org}}{C_X \text{ in H}_2\text{O}} \right] \quad \text{(1-19)}$$

- Verteilungskoeffizient für die Neutralform X, logarithmisch
Angabe als Log P und ist eine stoffspezifische Konstante.

Folgende vier Modell-Verteilungssysteme werden zur Bestimmung von LogP-Werten herangezogen, die für unterschiedliche Lösungsmittelsysteme charakteristische Merkmale aufweisen (Leahy et al., 1989):

- *n*-Octanol/Wasser (amphile Eigenschaften, d.h. hydrophil und lipophil),
- Propylenglycoldipelargonat/Wasser (Wasserstoffbrücken-Akzeptor).
- Chloroform/Wasser (Wasserstoffbrücken-Donor).
- Cyclohexan/Wasser (rein hydrophobe Eigenschaften).

Die unterschiedlichen Lösungsmittelsysteme besitzen charakteristische Merkmale (Leahy et al., 1989). Im Zweiphasensystem Octanol/Wasser ist ein Molverhältnis von 4:1 erforderlich, um ein Gleichgewicht bis zur Sättigung herzustellen. Octanol besitzt eine spektroskopisch nachweisbare Clusterstruktur, bei der vier zentrale Wassermoleküle von 16 Octanol-Molekülen mit nach innen gerichteten Hydroxylgruppen umgeben sind (Smith et al., 1975; Franks et al., 1993). Das System Octanol/Wasser hat sich als allgemeines Referenzsystem für die Verteilungskoeffizienten in der Medizinischen Chemie und der Pharmakologie durchgesetzt (Hansch und Dunn 1972; Hansch und Leo 1979).

In der vorliegenden Arbeit wurde als Methode zur Bestimmung von Verteilungskoeffizienten die Scheidetrichter-Methode (Leo et al., 1971) angewendet, mit den Phasen-Systemen Octanol/Wasser und Cyclohexan/Wasser.

Der Δ LogP-Wert einer Verbindung berechnet sich aus der Differenz des Octanol/Wasser- und Cyclohexan/Wasser-Verteilungskoeffizienten und ist nach Seiler (1974) ein Maß für die Wasserstoffbrückenbindungs-Stärke einer Verbindung **(1-20)**.

$$\Delta \text{Log P} = \text{Log P}_{\text{oct}} - \text{Log P}_{\text{cyc}} \quad (1-20)$$

Substanzen mit großen ΔlogP -Werten zeigen, dass sie in der Lage sind stärkere Wasserstoffbrücken auszubilden, als solche mit kleinen Differenzen. Die Wasserstoffbrückenbindungsstärke kann einen entscheidenden Einfluss auf die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung besitzen. Die Aussagekraft des ΔlogP -Wertes stützt sich dabei auf folgende Erklärung: der Übergang einer Substanz im Cyclohexan/Wasser-System von der wässrigen Phase in die organische Phase beruht auf reinen hydrophoben Wechselwirkungen, d.h. das Molekül muss beim Übergang von der wässrigen in die Cyclohexanphase die Hydrathülle abstreifen; dies ist um so leichter möglich, je schwächer die Wasserstoffbrückenbindungen zu einem Wassermolekül ausgebildet sind. Dieser Phasenübergang ist ein Maß für die Lipophilie und der Wasserstoffbrückenbindungsstärke einer Verbindung. Dagegen enthält das Zweisystem Octanol/Wasser erhebliche Mengen Wasser. Beim Übertritt einer Substanz aus der Wasserphase in die organische Phase erfolgt kein bzw. nur ein unvollständiges Abstreifen der Hydrathülle. Die treibende Kraft für den Übertritt aus der Wasserphase in die Octanolphase ist somit hauptsächlich von der Lipophilie einer Verbindung abhängig; Wasserstoffbrücken wirken sich nicht aus.

Young et al., (1988) beschrieben für Histamin-Antagonisten eine lineare Abhängigkeit des ΔLogP -Wertes mit der Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Substanzen mit kleinen ΔLogP -Werten (z.B. Imipramin: $\Delta\text{LogP}=0.85$) waren in der Lage die Blut-Hirn-Schranke leichter zu überwinden, als solche mit großen ΔLogP -Werten (z.B. Icotidin: $\Delta\text{LogP}=5.18$).

Auch ein Ligand eines Proteins (z.B. Geruchsstoffrezeptor) muss seine Hydrathülle abstreifen, bevor die Verbindung an die Bindestelle anlagern kann. Die Stärke der anschließenden Wechselwirkung des Liganden mit dem Makromolekül ist dann z.B. von dem Enthalpiebeitrag sich ausbildender Wasserstoffbrückenbindung abhängig. Ausgehend von der Tatsache, dass zum einen die Hydrathülle abgestreift werden muss und zum anderen möglichst feste Wasserstoffbrückenbindungen zum Protein wieder aufgebaut werden müssen, ist zu vermuten, dass es ein „Optimum“ des ΔLogP -Wertes gibt.

2. Protein Ligand-Wechselwirkungen

2.0 Protein-Ligand-Wechselwirkungen bei β -Lactoglobulin und Rinderserumalbumin – Modellvorstellungen und postulierte Bindungsseiten

Proteine in der Klasse der Lipocaline wie z.B. β -Lactoglobulin (BLG), Retinol-Bindende-Proteine (retinol-binding-proteins, RBP's) und Geruchsstoff-Bindende-Proteine (odorant-binding-proteins, ODB's) besitzen hohe Bindungsaffinitäten für hydrophobe Substanzen (cf. **Abschnitt 1.1**).

β -Lactoglobulin (BLG)

Papiz et al. (1986) ermittelten mittels Röntgenstrukturanalyse die dreidimensionale räumliche Struktur von β -Lactoglobulin und modellierten einen Protein-Ligand-Komplex mit Retinol. Die Autoren konnten zeigen, dass Retinol in Analogie zum RBP, in einer zentral liegenden tiefen hydrophoben Tasche des aus acht Faltblattstrukturen aufgebauten Proteinknäuels bindet. (cf. **Abb. 9**).

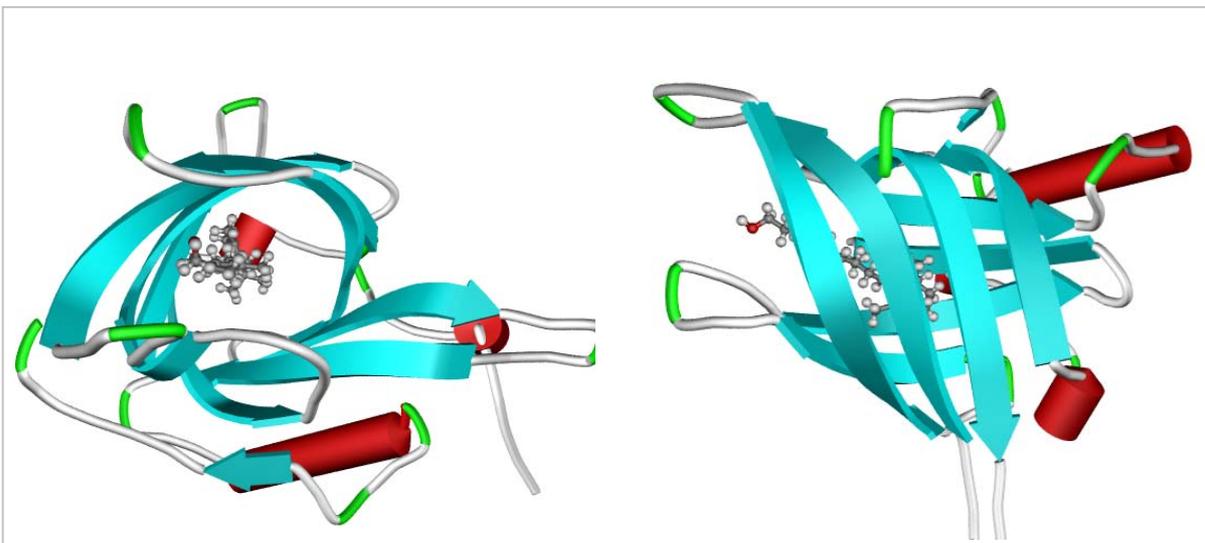


Abb.9: Schematische Darstellung des Protein-Ligand-Komplexes des „Retinol bindenden Proteins (Retinol-binding-protein, RBP isoliert aus Schweineplasma)“: Aufsicht- und Seitenansicht in die Bindetasche des Proteins (α -Helix (rot), β -Faltblattstruktur (cyan), ungeordnete Bereiche (weiß) und Schleifen (grün), Retinol als Stabmodell, Aminosäureseitenketten nicht dargestellt; Brookhaven Datenbank: *1aqb*).

Die hohe Bindungsaffinität von RBP gegenüber der Verbindung Retinol konnte auch für den Komplex aus β -Lactoglobulin und Retinol gezeigt werden (Futterman und Heller, 1972;

Papiz et al., 1986). Für die bisher in der Literatur beschriebenen unterschiedlichen Ligand-Protein-Bindungspositionen von β -Lactoglobulin, schlägt Sawyer et al. (1998) folgende drei Bezeichnungen vor (cf. **Abb.10**):

- **Retinol-Bindungsseite**
- **Fettsäure-Bindungsseite**
- **Polare aromatische Bindungsseite**

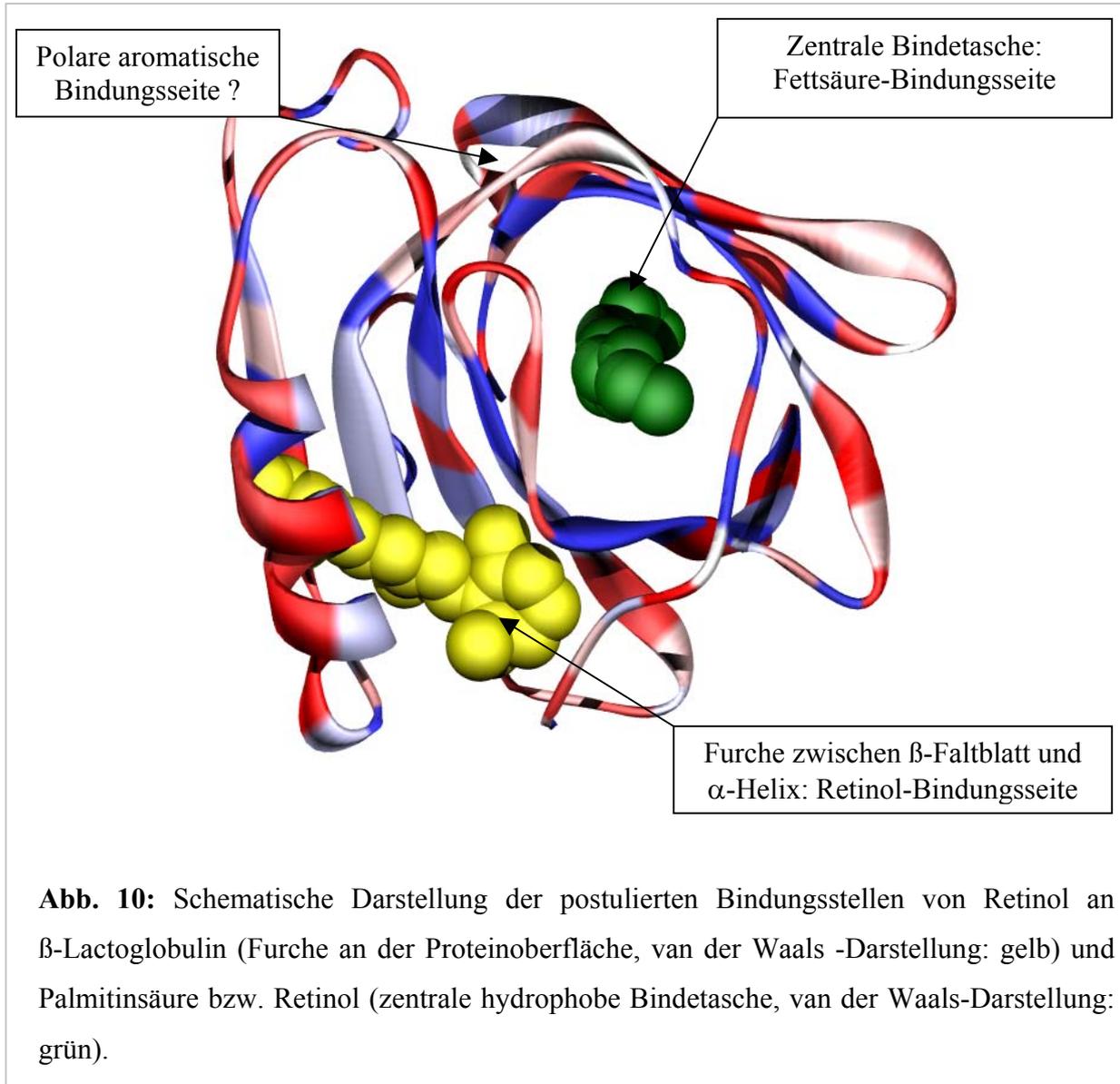
In der Literatur wird die Bindungsposition des Retinols an β -Lactoglobulin jedoch kontrovers diskutiert. Wie bereits erwähnt, modellierten Papiz et al. (1986) ein Protein-Ligand-Komplex mit Retinol in der zentral liegenden tiefen hydrophoben Tasche von β -Lactoglobulin (cf. **Abb.9**).

Studien von Monaco et al. (1987) mittels Röntgenbeugungsanalyse konnten die von Papiz et al. (1986) mittels Molekular Modelling ermittelte Bindungsstelle des Retinols in der zentralen hydrophoben Bindetasche nicht bestätigen. Monaco et al., (1987) verglich die Elektronendichte des β -Lactoglobulin-Retinol Komplexes (pH 7.5) mit nativem Protein. Er konnte zeigen, dass keine signifikanten Unterschiede in der Elektronendichte in der zentralen Bindetasche des nativen Proteins und des Komplexes auftritt. Dagegen stellten die Autoren eine Zunahme der Elektronendichte an der Proteinoberfläche fest. Die vorgeschlagene Bindungsposition befindet sich in einer Furche an der Proteinoberfläche, die durch die α -Helix und der äußeren Seite der β -Faltblattstruktur aufgebaut wird (cf. **Abb. 10**). An der Ausbildung der Bindetasche im β -Lactoglobulin sind folgende Aminosäuren beteiligt: 136 (Phe), 139 bis 143 (Ala-Leu-Lys-Ala-Leu), 3 bis 5 (Val-Thr-Gln), 105 bis 106 (Phe-Cys), 117 bis 119 (Leu-Val-Cys) und Leu 95 . Diese Aminosäuren sind, mit Ausnahme von Lys 141, überwiegend hydrophober Natur.

Neuere Untersuchungen (Kontopidis et al., 2002) des β -Lactoglobulin-Retinol-Komplexes (pH 7.5) mittels Röntgenstrukturanalyse bestätigen die von Papiz et al., (1986) gemachten Annahmen, dass Retinol in der zentral liegenden Proteintasche bindet.

Es wird angenommen, dass auch freie Fettsäuren bzw. deren Derivate in der zentralen hydrophoben Bindetasche des β -Lactoglobulins einen Komplex bilden (Fettsäure-Bindungsseite, cf. **Abb. 10**). Mittels Röntgenstrukturanalysen und NMR-Untersuchungen konnte diese Bindungsposition von mehreren Autoren unabhängig bestätigt werden (Wu et al., 1999; Ragona et al., 2000; Kontopidis et al., 2002).

Kompetitive Bindungsversuche (Kontopidis et al., 2002) mittels Röntgenstrukturanalyse zeigten, dass bei gleichzeitiger Anwesenheit von Retinol und Palmitinsäure nur die Palmitinsäure in der zentralen Proteintasche des β -Lactoglobulins gebunden wird (cf. **Abb.10**).



Ein Vergleich der Bindungsaffinitäten von Retinol und Palmitinsäure (Puyol et al., 1991; Methode Gleichgewichtsdialyse, pH 7.2: Retinol: $1.5 \times 10^4 \text{ Mol}^{-1}$; Palmitat: $5.2 \times 10^5 \text{ Mol}^{-1}$) zeigt für Palmitinsäure eine um den Faktor 35 höhere Bindungskonstante und steht somit in Einklang mit den Befunden von Kontopidis et al., (2002).

Für polare aromatische Verbindungen (Hämin und Protoporphyrin) wurde von Dufour et al., (1990) eine weitere Bindungsseite gefunden. Die Autoren konnten zeigen, dass diese Bindungsseite 25 \AA von der Retinol-Bindungsseite entfernt ist. Sawyer et al., (1998)

vermuten, dass diese Bindungsseite (polar aromatische Bindungsseite) an der Proteinoberfläche entlang den Aminosäuren Trp 19 und Arg 124 lokalisiert ist.

Wie im **Abschnitt 1.1** der vorliegenden Arbeit dargestellt, sind zwar zahlreiche Bindungsstudien von Geruchsstoffen mit β -Lactoglobulin durchgeführt worden, allerdings werden in den meisten Studien keine oder widersprüchliche oder nur unzureichende Aussagen über die Bindungspositionen der Aromastoffe am Protein vorgenommen. Pelletier et al., (1998) vermuteten auf Basis von kompetitiven Hemmversuchen (Untersuchungen durchgeführt bei pH 3), dass z.B. das 2-Nonanon und das Ethylhexanoat in der zentralen hydrophoben Bindetasche von β -Lactoglobulin binden. Für den Geruchsstoff iso-Amylacetat wurde eine unterschiedliche, jedoch nicht näher charakterisierte Bindungsposition am Protein vermutet.

O'Neill und Kinsella (1987) stellten durch kompetitive Hemmversuche (Untersuchungen durchgeführt bei pH 7) fest, dass der Geruchsstoff 2-Nonanon eine andere Bindungsstelle als Retinol einnehmen muss. Sostmann und Guichard (1998) beschreiben für die Verbindungen des γ - und δ -Octalactons (Untersuchungen durchgeführt bei pH 3) eine Bindungsseite, die der Bindeposition des β -Ionons entspricht (hydrophobe zentrale Bindetasche) und für die anderen untersuchten Verbindungen (z.B. 2-Nonanon, 2-Octanon und α -Ionon) eine unspezifische hydrophobe Wechselwirkung mit β -Lactoglobulin. Demgegenüber beschreiben Jouenne und Crouzet (2000) für die beiden Verbindungen α -Ionon und β -Ionon die gleiche Bindungsposition und vermuten die zentrale hydrophobe Bindetasche die von Retinol besetzt wird (bei pH 3). Diese Beobachtung ist im Widerspruch zu den Arbeiten von Dofour und Haertle (1990), die aufgrund von Fluoreszenzspektroskopie-Messungen eine unterschiedliche Bindungsposition der beiden Geruchsstoffe vorschlagen. Jouenne und Crouzet (2000) stellten auch eine deutliche pH-Abhängigkeit der Bindungsaffinitäten fest (Untersuchungen durchgeführt pH 3,0, 6,0, 9,0 und 11,0). Für die meisten der untersuchten Substanzen wurde eine Zunahme der Bindungsaffinität von pH 3-9 festgestellt.

Die hier nur auszugsweise vorgestellten Arbeiten aus der Literatur machen deutlich, dass die molekularen Grundlagen der β -Lactoglobulin Wechselwirkungen mit Geruchsstoffen nicht oder nur unzureichend bekannt sind. Weiterhin werden die grundlegenden Arbeiten von Qin et al., (1998) über die pH-Werte abhängige Zugänglichkeiten der zentralen Bindetasche (cf. **Abb.9**) nicht in die Diskussion mit einbezogen.

Rinderserumalbumin (RSA)

Rinderserumalbumin ist durch die freie SH-Gruppe in Position 34 der Aminosäuresequenz fähig kovalente Bindungen auszubilden (Brown, 1975). Ein interessantes Beispiel von kovalenten Bindungen an das Serumalbumin ist die Reaktion von D-Glucose (Day et al., 1979; Dolhofer, 1979; Guthrow et al., 1979) mit der Aminofunktion einer Lysin-Aminosäure. Eine *in vitro* Inkubation von Albumin mit Glucose im millimolaren Bereich, ergab nach Stunden oder Tagen, ein glycosyliertes Protein.

Aufgrund von Disulfidbrücken und der vorliegenden Aminosäuresequenz lässt sich RSA in drei ähnliche räumliche Regionen aufteilen. (cf. **Abb.11**). Die Region eins reicht von Aminosäure 1-190, Region zwei von Aminosäure 191-382 und Region drei von Aminosäure 383-582. Jede Region oder Domäne besitzt zwei Subdomänen (AB und C). Eine Subdomäne ist in drei Spiralen (Helices) (X, Y und Z) aufgeteilt. Innerhalb der drei Domänen sind die Aminosäuren praktisch identisch.

Um spezifische Bindungsseiten an Serumalbumin zu bestimmen, wurden Versuchsreihen auf Basis von kompetitiven Hemmversuchen von Liganden an Serumalbumin durchgeführt. Aufgrund von Ergebnissen aus zahlreichen Publikationen wird vermutet, dass sechs unterschiedliche Bindungsregionen am RSA vorliegen (Review von Kragh-Hansen, 1981). In den Untersuchungen konnten eine bzw. zwei Bindungsstellen mit hoher Bindungsaffinität festgestellt werden. Die übrigen besitzen deutlich niedrigere Affinitäten.

Bindungsregion 1

Verschiedenen Autoren stellten fest, dass in der Bindungsregion **1** hauptsächlich Fettsäuren mit langen Kohlenstoffketten binden (cf. **Abb.11** und **12**). Wie bereits erwähnt, ist eine der wichtigsten Funktionen des Plasmaalbumins der Transport von freien Fettsäuren im Blut. Ashbrook et al., (1975) bestimmten mittels Gleichgewichtsdialyse (pH 7) Bindungskonstanten für verschiedene Fettsäuren. Die Bindungsaffinitäten nahmen mit der Kettenlänge von Laurinsäure über Myristin-, Palmitin- und Stearinsäure hin zu. Für Stearinsäure wurde z.B. eine Bindungskonstante von $9.14 \times 10^8 \text{ Mol}^{-1}$ und für Laurinsäure von $2.44 \times 10^6 \text{ Mol}^{-1}$ ermittelt.

Zahlreiche Studien (Goodman, 1958; Spector et al., 1973 und 1975; Cunningham et al. 1975; Soltys et al. 1978; Koh et al. 1979; Kragh-Hansen, 1981) lassen vermuten, dass die

kurzkettigen Fettsäuren eine andere Bindungsstelle belegen. Kragh-Hansen (1981) beschreibt in seinem Review Artikel, dass die Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C₁₆-C₁₈ in der Region **1** und die Fettsäuren von C₈-C₁₀ in der Region **2** binden. Neben der primären Bindungsregion **1** werden auch sekundäre Bindungsseiten für die Fettsäuren (n=2) mit niedrigerer Affinität beschrieben (cf. **Abb.12**).

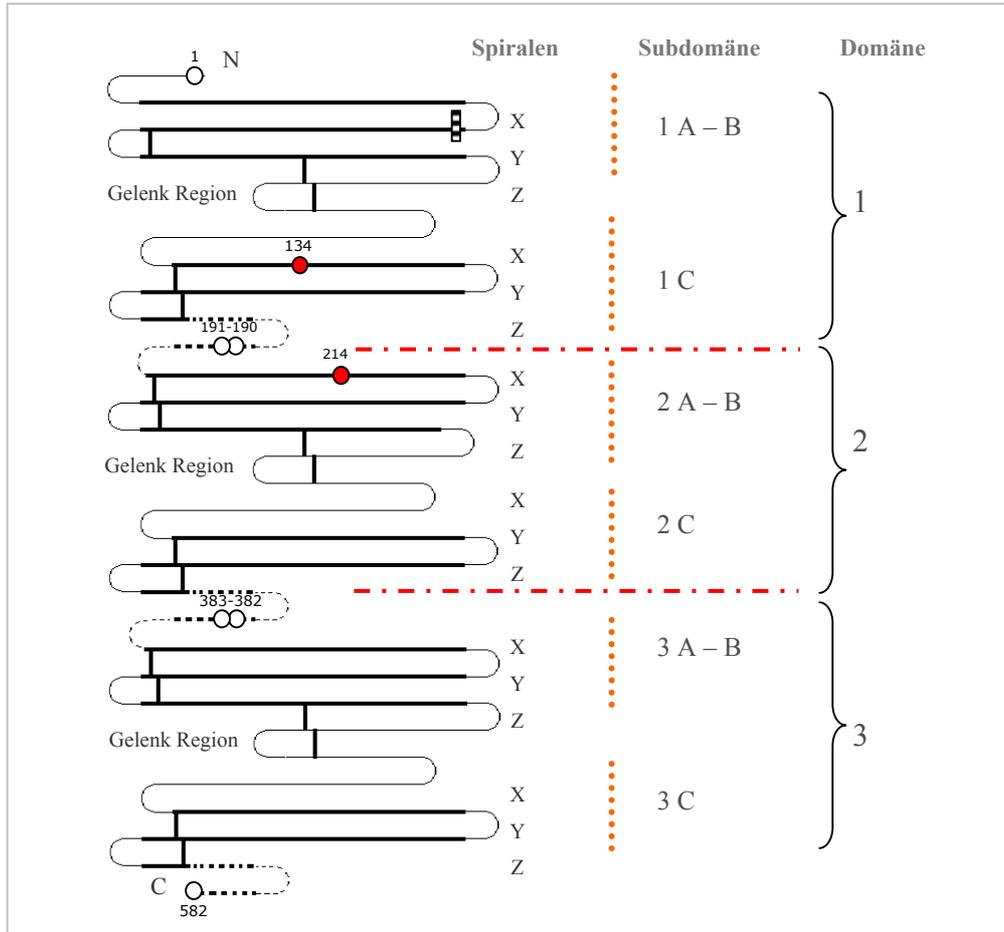


Abb.11: Strukturelle Darstellung von RSA. (●) Tryptophan, (|) Disulfid-brücken., (■) Freie SH-Gruppe. (Kragh-Hansen, 1981).

Bindungsregion 2

Cunningham et al., (1975) untersuchte die Bindung von L-Tryptophan an Serumalbumin in Abhängigkeit von Fettsäuren. Er beobachtete, dass die Tryptophanbindung in Anwesenheit von geringen Laurinsäurekonzentrationen stark abnahm, dagegen wurde kein Effekt bei äquimolaren Mengen an Palmitat und Oleat beobachtet. Die Autoren schlossen daraus, dass L-Tryptophan in der Region **2** bindet. Koh und Means (1979) konnten zeigen, dass in der Bindungsstelle **2** eine Kapazität von neun Methylengruppen vorhanden ist (cf. **Abb.12**).

Kompetitive Experimente mit L-Tryptophan und L-Thyroxin, die beide eine hohe Bindungsaffinität besitzen (L-Thyroxin: $1.6 \times 10^6 \text{ Mol}^{-1}$ und L-Tryptophan: $1.6 \times 10^4 \text{ Mol}^{-1}$) zeigten für beide Substanzen bei neutralen pH-Wert die gleiche Bindungsregion **2** (Tritsch et al., 1963). Eine kompetitive Bindung wird angenommen, wenn mehr als zwei Fettsäuremoleküle an Albumin gebunden sind. So konnte Cunningham et al., (1975) feststellen, dass eine Inhibierung der Tryptophanbindung stattfindet, wenn langkettige Fettsäuren in der Region **2** binden. Tabachnik (1964) stellte fest, dass Salicylsäure an der Thyroxin-Seite der Region **2** mit einer Bindungskonstanten von $4-16 \times 10^3 \text{ Mol}^{-1}$ bindet.

Bindungsregion 3

Die Verbindung Bilirubin bindet in Region **3** des Serumalbumins mit einer Bindungsstelle/Mol Protein ($K=1.4 \times 10^8 \text{ Mol}^{-1}$; $n=1$). Für die Verbindung existieren zwei weitere Bindungsstellen/Mol Protein mit niedrigerer Affinität ($K=5 \times 10^5$; $n=2$). Kragh-Hansen, et al., (1972 und 1974) zeigten mittels Ultrazentrifugations-Technik, dass Bilirubin und Bromphenol/blau durch kompetitive Bindung, die Verbindung des Phenolrot (Region 3) verdrängen. Somit nehmen alle drei erwähnten Verbindungen die Region **3** als primäre Bindeposition ein (cf. **Abb.12**).

Bindungsregion 4

Die Albumine sind befähigt positiv geladene anorganische Ionen in reversibler Form zu binden. Insbesondere mit Cu^{++} und Zn^{++} Ionen wurden starke Komplexe mit Bindungskonstanten von $9 \times 10^6 \text{ Mol}^{-1}$ (Cu^{++} ; Peters, 1975) und $5.7 \times 10^2 \text{ Mol}^{-1}$ (Zn^{++} ; Österberg, 1971) beobachtet. Auch mit anderen Metallen gibt es gute Bindungswerte. Die Bindung der Ionen findet in der Nähe der ersten drei Aminosäuren der Aminosäuresequenz statt (cf. **Abb.12**).

Bindungsregion 5

Hämin bindet an Serumalbumin mit einer hohen Bindungskonstante von $5,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (Beaven et al., 1974) bzw. $1,1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (Adams und Berman, 1980). Beaven stellte fest, dass Hämin kompetitiv nicht beeinflusst wird durch Oleat. Dies steht in Übereinstimmung mit Beobachtungen von Adams und Berman (1980), welche herausfanden, dass die Zugabe von 10 Mol Oleat/Mol Serumalbumin, die Haeminbindung nicht beeinflusst. Beaven et al., (1974) erkannten, dass die Bindungsregion von Bilirubin (**3**) nicht mit der Bindungsregion von Hämin identisch ist. Liem und Müller-Eberhard (1971) und Beaven et al., (1974) vermuten,

dass die Hämin-Bindungsstelle nicht in den Regionen 1 bis 4 vorliegt. Es wird angenommen, dass die Bindungsstelle der sekundären Bindungsseite des Bilirubins identisch ist.

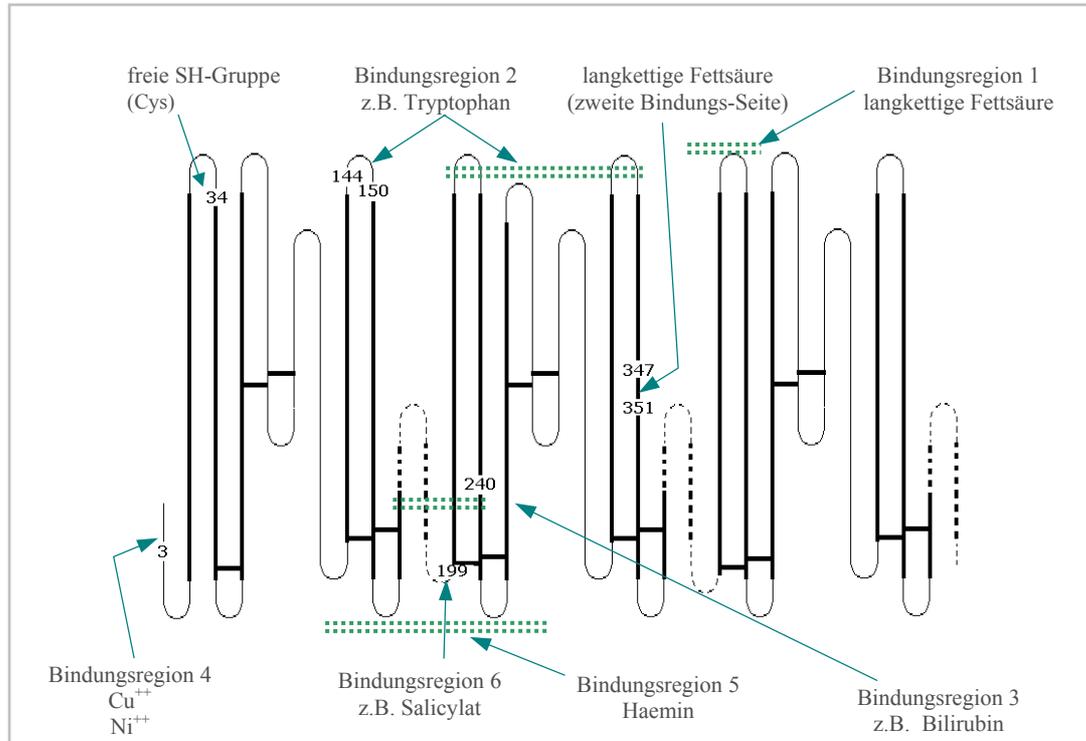


Abb.12: Modell von Rinderserumalbumin und die Darstellung verschiedener Bindungsstelle und -regionen. (Kragh-Hansen, 1981)

2.1 Problemstellung und Zielsetzung

In der Literaturübersicht wurden systematische Untersuchungen des Bindungsverhaltens von Geruchsstoffen an Proteine mit den Verbindungsklassen der Methylketone und Ester vorgestellt. Die Ergebnisse zeigten, dass z.B. die Anzahl der Methylenheiten einer Verbindung von Bedeutung für die Stärke eines Ligand-Protein-Komplexes ist. Allerdings lässt sich das Ausmaß der Bindung eines Liganden an ein Makromolekül nicht in allen Fällen nur mittels dieses einfachen Kriteriums erklären. Weitere wichtige Einflussgrößen auf die Assoziations- bzw. Dissoziationskonstante eines Komplexes scheinen sterische, entropische und thermodynamische Beiträge zu liefern. Aus den Darstellungen in der Einleitung wird die Bedeutung der räumlichen Struktur für eine Protein-Ligand-Wechselwirkung deutlich. Von wenigen Ausnahmen abgesehen wurde in den bisher publizierten Arbeiten der Einfluss der räumlichen Struktur und damit konformative Aspekte eines Geruchsstoffes auf die Bindungsaffinität nicht in Betracht gezogen.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen ist zum einen die systematische Untersuchung von Bindungskonstanten von Verbindungen aus der Klasse der Lactone mittels Gleichgewichtsdialyse und Ultrazentrifugationstechnik an unterschiedlichen Proteinen (β -Lactoglobulin und Rinderserumalbumin) und zum anderen die Entwicklung einer Headspacemethode zur Bestimmung von Verteilungsgleichgewichten Proteinlösung/Luft.

Der Einsatz von Molecular Modelling Methoden soll bei der Untersuchung von Aromastoff-Protein-Komplexen einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis über die Art der beteiligten Wechselwirkungen leisten. Da die räumliche Struktur von β -Lactoglobulin aus Röntgenstrukturdaten bekannt ist, sollen in der vorliegenden Arbeit Docking-Versuche mit Lactonen an β -Lactoglobulin durchgeführt werden. Dazu müssen für die Molecular Modelling Simulationen der Lactone neue Kraftfeldparameter entwickelt werden. Eine Gegenüberstellung der experimentell bestimmten Bindungskonstanten und der über Molecular Modelling erhaltenen Bindungsenergien soll dazu beitragen, Bindungsstellen zu erkennen und ein vorgeschlagenes Bindungsmodell zu stützen. Darüber hinaus soll ein QSAR-Modell zur Vorhersage von Bindungskonstanten bei Lactonen entwickelt werden.

Die Hydrophobität bzw. im vorliegenden Fall die Lipophilie einer Verbindung ist eine weitere Kenngröße. Um den Einfluss der Lipophilie auf das Bindungsverhalten zu bewerten, sollen die Log P-Werte der Verbindungen experimentell ermittelt werden.

3. Bestimmung von Bindungskonstanten.

3.1 Ultrazentrifugation (UCF)

Zur Bestimmung der Bindungskonstanten wurde eine Methode für Geruchsstoffe entwickelt, die zur Ermittlung von Protein-gebundenem Aromastoff und freier Aromastoffkonzentration geeignet ist. Aufgrund der hohen Flüchtigkeit und Instabilität von Geruchsstoffen wurde eine Methode gewählt, die eine möglichst schnelle Durchführung der Experimente erlaubt. Als Methode der Wahl wurde eine Ultrafiltrationstechnik, die sogenannte Ultrazentrifugation eingesetzt (cf. **Abb.13**). Die Methode wurde erstmalig von Whitlam und Brown (1981) für die Bestimmung von Bindungskonstanten von pharmakologisch wirksamen Substanzen an Serumalbumin eingesetzt. Die Durchführung der Methode ist im Kapitel 4 im Methodenteil der vorliegenden Arbeit beschrieben.

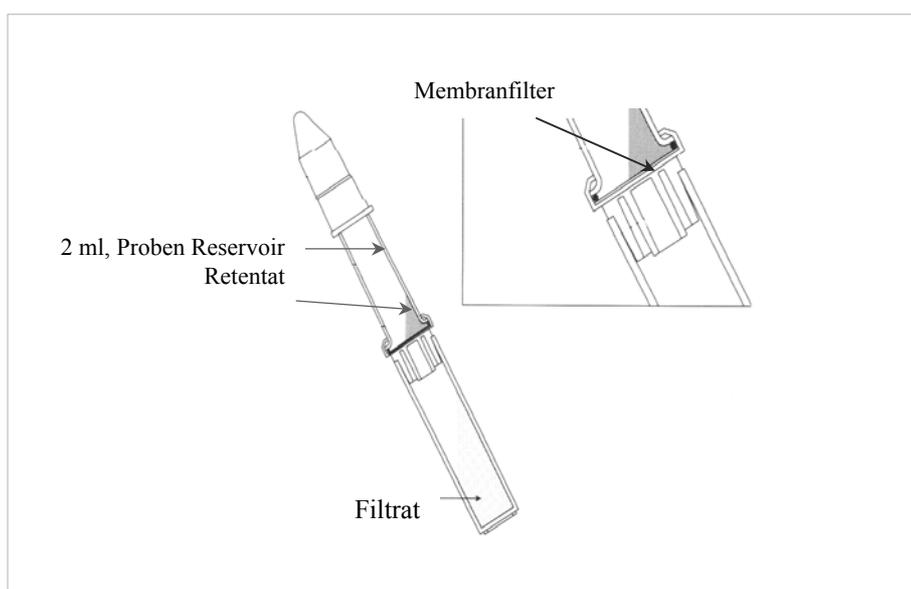


Abb.13: Ultrazentrifugationseinheiten (Millipore®)

Bewertung der Methode

Zur Bewertung, der erstmalig bei Geruchsstoffen eingesetzten Ultrazentrifugationstechnik, wurden Untersuchungen zu Adsorptionseffekten der Geruchsstoffe an der Filtrationseinheit bzw. an deren Membran, sowie Wiederfindungsversuche von Protein-gebundenem Aromastoff in Abhängigkeit vom eingesetzten Lösungsmittel durchgeführt. Die erhaltenen Daten sind in der **Tab. 2** zusammengestellt.

Verluste bei der Ultrazentrifugation infolge der Flüchtigkeit der Substanzen bzw. durch adsorptive Effekte, lagen z.B. für γ -Nonalacton bei 20%, für γ -Undecalacton bei 36% (**Tab. 2**).

Die Wiederfindungen lagen bei der Isolierung von Protein-gebundenem Aromastoff mit Diethylether-Extraktion niedriger (78 - 91%), als bei einer Extraktion mittels Pentan (100%). Somit wurden für die Bindungsversuche (cf. **Tab. 2**) der Substanzen an den unterschiedlichen Proteinen, eine Isolierung des gebunden vorliegenden Aromastoffes mittels Pentan durchgeführt.

In der Methode von Whitlam und Brown (1981) wurde zur Berechnung der Bindungskonstanten die eingesetzte Gesamtkonzentration des Geruchsstoffs herangezogen. Infolge der in der vorliegenden Arbeit festgestellten Aromastoffverluste würden sich hier falsche Werte ergeben. Um diesen Einfluss der adsorptiven Effekte auf die Berechnung der Bindungskonstanten zu vermeiden, wurden daher in der vorliegenden Arbeit die Geruchsstoffkonzentrationen sowohl im Eluat (nicht-gebundener bzw. freier Anteil der Substanz) als auch im Retentat (freier und gebundener Anteil der Substanz) bestimmt. Darüberhinaus war es nötig den ersten Anteil des Ultrafiltrates (~0.2 – 0.3 ml) zu verwerfen, da dieser Anteil durch Geruchsstoff-Adsorptionen an der Membran niedrigere Konzentration aufwies, als das folgende Eluat. Zur Berechnung der freien bzw. am Protein gebundenen Aromastoffkonzentration wurde die Ultrazentrifugationseinheit nach Zentrifugation zurückgewogen und daraus die filtrierte Menge Eluat und Retentat errechnet. Die Aromastoff-Gesamtkonzentration im Ansatz (2 ml) ergab sich aus der Summe von Geruchsstoff (μg)/Filtrat und Geruchsstoff (μg)/Retentat unter Berücksichtigung der vorliegenden Volumenverhältnisse von Eluat und Retentat. Die Kalkulation von Protein-gebundenem Aromastoff erfolgte aus Differenzrechnung der beiden Fraktionen nach folgender Gleichung:

$$\text{Aromastoff gebunden } (\mu\text{g/Ansatz}) = [\text{Aromastoff Retentat } (\mu\text{g/ml}) \times \text{Vol. Retentat (ml)}] - [\text{Aromastoff Filtrat } (\mu\text{g/ml}) \times \text{Vol. Retentat (ml)}]$$

Tab. 2 Modellversuche zur Ermittlung von adsorptiven Effekten von Geruchsstoffen an Filtrationseinheiten, sowie Wiederfindungen von Protein-gebundenem Aromastoff.

Verbindung	Eingesetzte Aromastoffkonzentration (μg)/Ansatz (2 ml)	Rinderserumalbumin Konzentration (mg) Ansatz	Extraktionsmittel 2ml	Wiederfindung μg (%) ^{a)}
γ -Undecalacton	90	ohne	Diethylether. bzw. Pentan	58 (64%)
γ -Nonalacton	112	ohne	Diethylether. bzw. Pentan	88 (80 %)
γ -Undecalacton	90	59	Diethylether	75 (83%)
γ -Undecalacton	111	5.9	Diethylether	96 (86%)
γ -Undecalacton	11	5.9	Diethylether	10.2 (91%)
γ -Undecalacton	1.1	5.9	Diethylether	0.87 (78%)
γ -Undecalacton	1.1	5.9	Pentan	1.1 (100%)
γ -Undecalacton	0.11	5.9	Pentan	0.11 (100%)

a) Mittelwert aus drei Bestimmungen.

Zur Erfassung der Wiederfindung von Protein-gebundenem Aromastoff wurden Extraktionsversuche mit unterschiedlichen Lösungsmitteln durchgeführt. Die Ausbeuten lagen bei der Isolierung von Protein-gebundenem Aromastoff (cf. **Tab. 2**) mit Diethylether-Extraktion niedriger (78 - 91%), als bei einer Extraktion mittels Pentan (100%). Somit wurden für die weiteren Bindungsversuche der Substanzen an den unterschiedlichen Proteinen eine Isolierung des gebunden vorliegenden Aromastoffes mittels Pentan durchgeführt.

3.2 Mikrodialyse (MDA)

Als Standardmethode zur Bestimmung der Bindungsparameter von Geruchsstoffen an Rinderserumalbumin und β -Lactoglobulin wurde die Gleichgewichtsdialyse (Fares et al., 1998; O'Neill und Kinsella, 1987) eingesetzt. In **Abb.14** ist die verwendete Apparatur und das Prinzip dargestellt. Die Dialysedauer der Proben betrug 24 Stunden. Entsprechend den Versuchen der Ultrazentrifugation (cf. **3.1**) wurden zur Berücksichtigung des Einflusses der adsorptiven Effekte der Geruchsstoffe an der Membran bzw. Gefäßwandungen, die Geruchsstoffkonzentrationen sowohl in der Aromaphase (nicht-gebundener bzw. freier Anteil der Substanz) als auch in der Proteinphase (freier und gebundener Anteil der Substanz) bestimmt.

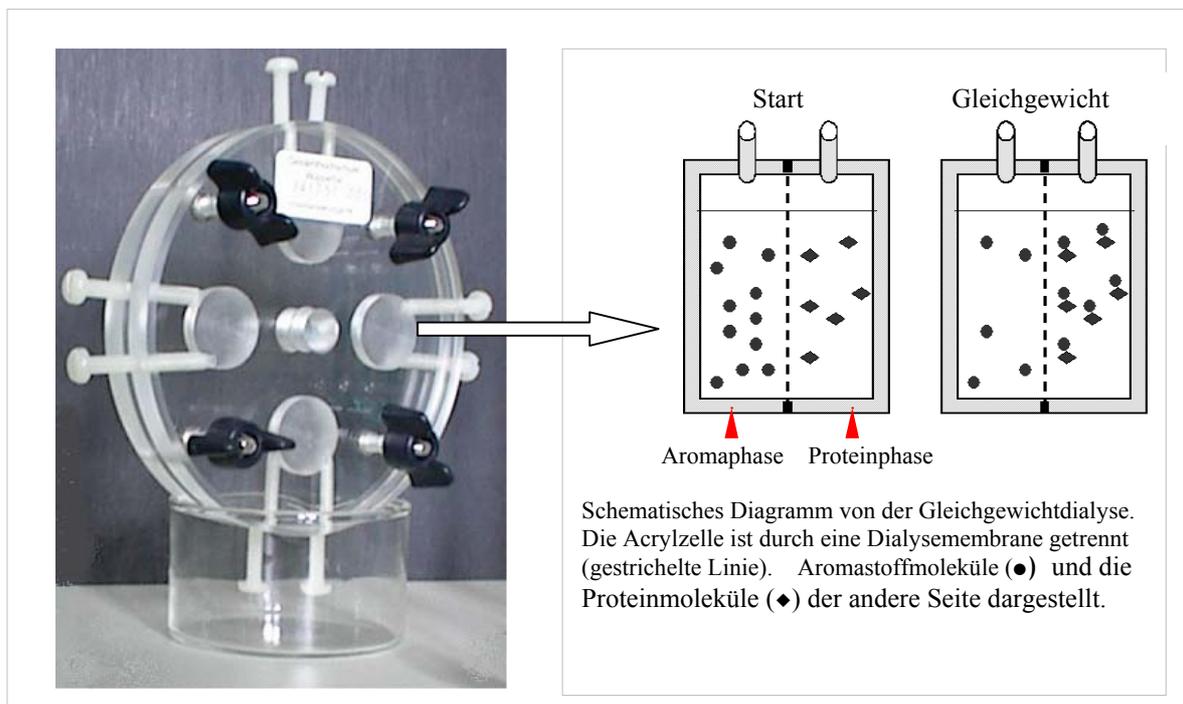


Abb.14: Gleichgewichtsdialysezelle mit vier unabhängigen Mikrodialysezellen (Thomaphor®)

Die Durchführung der Methode ist im Kapitel 4 im Methodenteil der vorliegenden Arbeit beschrieben.

3.3 Statische Headspace Analyse (SHA)

Weiterhin wurde eine statische Headspace-Methode zur Bestimmung des Einflusses wässriger Proteinlösungen auf die Headspacekonzentrationen der Lactone und des Verteilungsgleichgewichtes von wässrigen Geruchsstoff/Luft und Protein-Geruchsstoff-Mischungen/Luft entwickelt. Das Prinzip und die Durchführung der Methode ist im Kapitel 4 beschrieben. Die verwendete Apparatur ist in **Abb.15** dargestellt. Die Reduktion der Geruchsstoffe im Gasraum in Anwesenheit von Protein wurde aus der Differenz der Gasraumkonzentrationen der beiden Modellösungen ermittelt:

$$\% \text{ Aromastoff Reduktion} = \frac{[\text{Aromastoff o. Protein (ng/ml Luft)} - \text{Aromastoff m. Protein (ng/ml Luft)}]}{100}$$

Um Adsorptionseffekte von Lactonen an Glaswandungen der gasdichten Spritze festzustellen, wurde in der **Abb.15** die Vorgehensweise schematisch dargestellt. Die ermittelten Adsorptionen ausgewählter Lactone sind in **Tab. 3** zusammengefasst.

Tab. 3 Adsorption der Lactone an Glaswandungen

Verbindung	Adsorption (%)
γ-Octalacton	80.9
γ-Nonalacton	87.2
γ-Decalacton	91.7
δ-Octalacton	87.7
δ-Nonalacton	92.4
δ-Decalacton	94.8

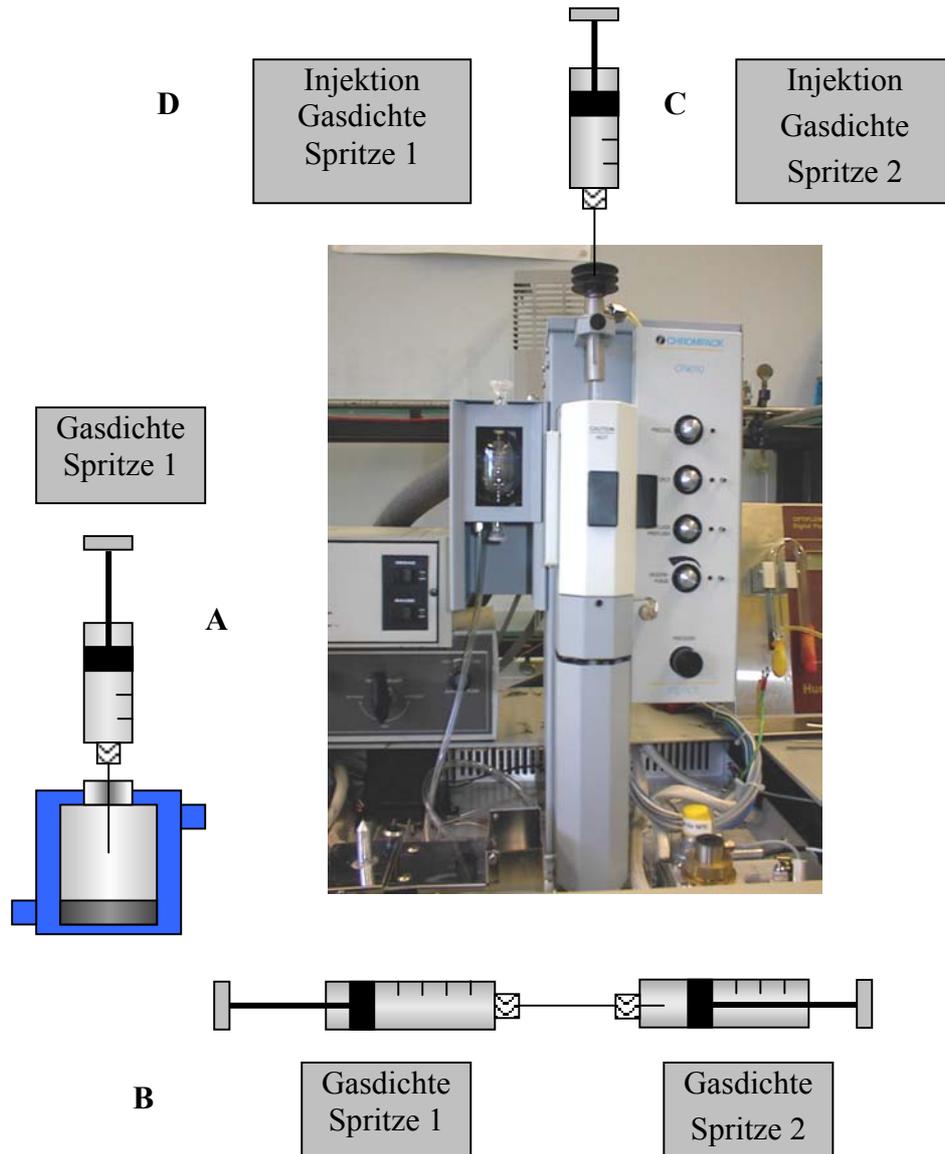


Abb.15: Schematische Darstellung zur Bestimmung von Wasser/Luft-Verteilungskoeffizienten, sowie von Aromastoff-Adsorptionen an der gasdichten Spritze mittels statischer Headspaceanalyse. **A:** Headspace-Probennahme (10 ml gasdichte Spritze), **B:** Gasdichte Kopplung von Spritze 1 (SGE, Spritzenvolumen 10 ml) und Spritze 2 (SGE, Spritzenvolumen 10 ml). Überführung eines definierten Gasvolumens aus Spritze 1 in Spritze 2, **C:** Headspace-Injektion mit Spritze 2, **D:** direkte Headspace-Injektion aus Probengefäß mit Spritze 1. Berechnung der absoluten Adsorption (%) aus 5 Bestimmungen:

$$\text{Adsorption (\%)} = (100 \times \text{Aromastoffkonzentration (ng/ml) Spritze 2}) / \text{Aromastoffkonzentration (ng/ml) Spritze 1}.$$

Die Adsorptionen liegen in einem Bereich von 81 – 95%, abhängig von der Hydrophobität bzw. Lipophilie der Verbindung. So wurde z.B. für das δ -Decalacton eine Adsorption von 94,8% und für γ -Decalacton eine Adsorption von 91,7% an der gasdichten Spritze festgestellt.

Die ermittelten Adsorptionen wurden bei der Berechnungen der Headspacekonzentrationen berücksichtigt.

In weiteren Untersuchungen (Rusu und Guth, persönliche Mitteilung) zeigte sich, dass das Ausmaß der Adsorptionseffekte stark von der verwendeten Spritze (Hersteller und Spritzenvolumen) abhängig ist. Die Durchführung der Methode ist im Kapitel 4 im Methodenteil der vorliegenden Arbeit beschrieben.

3.4 Modelle zur Ermittlung von Bindungskonstanten aus den experimentellen Daten (Bindungsisotherme)

Die Bindungsisothermen der Geruchstoffe wurden mittels nicht-linearer-Regression (Statistiksoftware **ORIGIN 6.0**) durch ein Einseiten- bzw. durch ein Zweiseiten-Bindungsmodell beschrieben (Klotz und Hunston, 1979):

$$v_1 = \frac{n_1 \times F}{K_{D1} + F} \quad v_{1,2} = \frac{n_1 \times F}{K_{D1} + F} + \frac{n_2 \times F}{K_{D2} + F} \quad K_A = 1/ K_D$$

(v : Aromastoff gebundenen/Mol Protein; F : Konzentration Aromastoff frei, n_i : Bindungsseite)

Das oben beschriebene Zweiseiten-Bindungsmodell besitzt nur Gültigkeit, wenn die beiden Bindungsseiten unabhängig von einander sind, d.h. eine Ligandbindung an einer Bindungsseite verursacht keine Veränderung an der zweiten Bindungsseite (nicht-kooperative Bindung). In Fällen bei denen eine Ligandbindung an einer Bindungsstelle zu einer Veränderung der Bindungseigenschaften einer nicht-äquivalenten bzw. abhängigen Bindungsstelle verursacht, kann z.B. nach der von Hill (1910) beschriebenen Methode ausgewertet bzw. erkannt werden. Der sogenannte Hill-Koeffizient (h) zeigt solche Wechselwirkungen von Bindungsseiten am Protein an ($h > 1$). In der vorliegenden Arbeit wurden keine kooperativen Effekte bei den Bindungsversuchen an β -Lactoglobulin und Rinderserumalbumin festgestellt. Kritisch bei der Auswertung von Bindungskurven ist die Bestimmung der Anzahl der Bindungsseiten eines Proteins. In diesem Zusammenhang muss auf eine Publikation von Klotz (1982) hingewiesen werden, die die Unzulänglichkeiten der Auswertung über den Scatchard Plot (Scatchard, 1949) beschreibt. Aus diesem Grunde wurde

in Anlehnung an Klotz (1982) die Auswertung, nach graphischer Auftragung des Logarithmus der freien Konzentration des Aromastoffes (log Frei, X-Achse) gegenüber der gebundenen Aromastoffkonzentration/Protein (ν , Y-Achse), gewählt. Exemplarisch wurden 3 Bindungskurven in **Abb.16** dargestellt. Für die Verbindungen des Undecalactons konnte, auf Grund seiner schlechten Wasserlöslichkeit (cf. **Tab.6**) im Gegensatz zum Heptalacton, die Absättigung der Bindungsseiten nicht erreicht werden. Die Berechnung der Bindungsseiten erfolgte hier durch Extrapolation der Kurve mittels Software (**ORIGIN 6.0**) und anschließender nicht-linearer Kurvenanpassung. Auf einen Zusatz von organischen Lösungsmitteln zur Erhöhung der Löslichkeit der Lactone wurde verzichtet, da dies zu Veränderungen des Bindungsverhaltens führen kann.

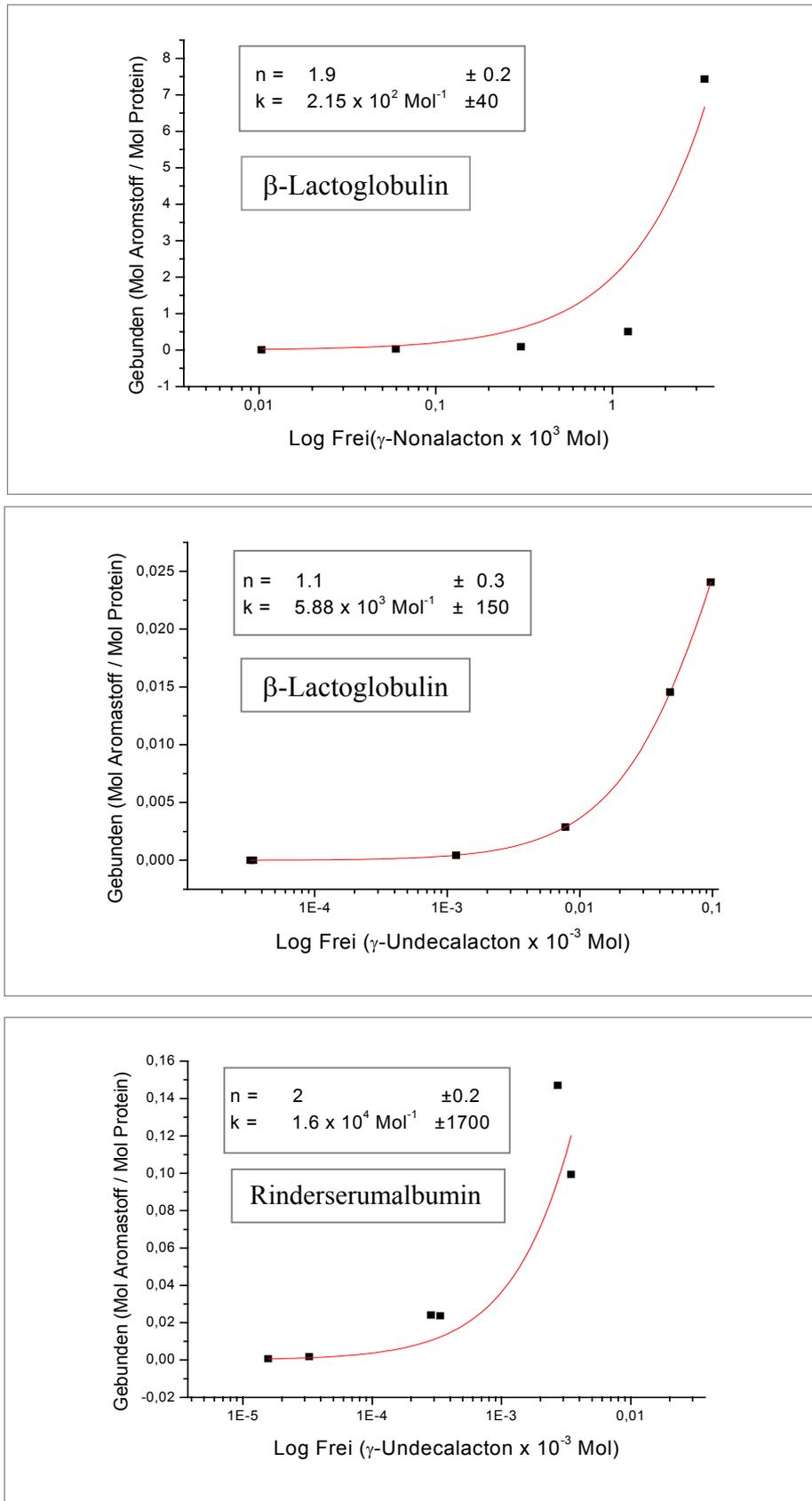


Abb. 16: Bindungskurven von ausgewählten Geruchsstoffen an β -Lactoglobulin

3.5 Bindungskonstanten von Lactonen an Rinderserumalbumin (RSA) und β -Lactoglobulin (BLG)

Die Ergebnisse der Bindungsstudien sind in der **Tab. 4** für das Rinderserumalbumin (RSA) und in der **Tab. 5** für das β -Lactoglobulin (BLG) zusammengefasst. Die in dieser Studie erhaltenen Bindungskonstanten an BLG wurden mit Literaturdaten verglichen und in die **Tab. 5** mit aufgenommen.

Bei den untersuchten Lactonen wurden die höchsten Assoziationskonstanten (K_A) an Rinderserumalbumin (**Tab. 4**) für γ -Undecalacton ($1,6 \times 10^4 \text{ Mol}^{-1}$, $n=2$) und δ -Undecalacton ($6,25 \times 10^3 \text{ Mol}^{-1}$, $n = 0,9$) gefunden.

Für die Assoziationskonstanten von γ - und δ -Undecalacton an BLG (**Tab. 5**) wurden Werte von $5,88 \times 10^3 \text{ Mol}^{-1}$ ($n=1,1$) für γ -Undecalacton und $1,64 \times 10^3 \text{ Mol}^{-1}$ ($n=1$) für δ -Undecalacton bestimmt. Somit liegen die globalen Assoziationskonstanten ($n \times K_A$, **Tab.4** und **5**) für die Bindung an RSA deutlich höher als für die Bindung an BLG.

In der homologen Reihe der γ - und δ -Lactone nehmen die Bindungsaffinitäten an RSA bzw. BLG mit abnehmender Kohlenstoffzahl des Lactons ab. So wird z.B. für die Assoziationskonstante von γ -Nonalacton an BLG im Vergleich zu γ -Undecalacton an BLG eine um den Faktor 27 niedrigere Bindungskonstante ermittelt (**Tab. 5**).

Auch bei den entsprechenden δ -Lactonen zeigt das höhere Homologe, die höhere Assoziationskonstante; die Konstanten unterscheiden sich hier um den Faktor 8 (**Tab. 4**) bei der Bindung an RSA, um einen Faktor 11 bei der Bindung an BLG.

Die berechneten Bindungsenergien (ΔG) der Verbindungen an RSA (**Tab. 4**) betragen für die Bindungsstudien im untersuchten Konzentrationsbereich von 0 – 100 mg/L: -6,16 kcal/Mol (γ -Undecalacton), -5,11 kcal/Mol (δ -Undecalacton), -4,86 kcal/Mol (γ -Nonalacton) und -4,07 kcal/Mol (δ -Nonalacton). Für den Anstieg der Bindungsenergie (ΔG) von δ -Nonalacton zu δ -Undecalacton ergibt sich für zwei Methyleneinheiten ein Betrag von 1,04 kcal/Mol und somit ein gemittelter Betrag für eine Methyleneinheit zur Bindungsenergie (ΔG) von ca. -0,52 kcal/Mol; für γ -Nonalacton zu γ -Undecalacton von ca. -0,65 kcal/Mol.

Tabelle 4: Bindungskonstanten (Assoziationskonstante K_A , Bindungsseiten n , Freie Bindungsenergie (ΔG) von γ - und δ -Lactonen an Rinderserumalbumin (RSA)

Verbindung	K_A (M^{-1}) ^{a)}	n	Globale K_A ($n \times K_A$)	ΔG (kcal/mol) ($n \times K_A$)	ΔG (kcal/mol) (K_A) ^{b)}
γ-Heptalacton (9b)					
0 – 100 mg/L	5263 \pm 1052	0.1 \pm 0.0	526	-3.71	-
100 – 1000 mg/L	230 \pm 20	1.3 \pm 0.1	299	-3.37	
γ-Octalacton (9c)					
0 – 100 mg/L	950 \pm 100	1.0 \pm 0.1	950	-4.05	-4.05
100 – 1000 mg/L	277 \pm 50	2.7 \pm 0.3	748	-3.91	
γ-Nonalacton (9d)					
0 – 100 mg/L	2080 \pm 300 ^{c)}	1.8 \pm 0.3	3744	-4.86	-4.52
100 – 1000 mg/L	606 \pm 300	5.6 \pm 1.8	3394	-4.81	
γ-Decalacton (9e)					
0 – 100 mg/L	6290 \pm 700 ^{c)}	1.8 \pm 0.3	11322	-5.52	-5.17
γ-Undecalacton (9f)					
0 – 50 mg/L	16700 \pm 1700 ^{c)}	2.0 \pm 0.2	33400	-6.16	-5.75
δ-Heptalacton (10b)					
0 – 100 mg/L	650 \pm 300	0.3 \pm 0.1	195	-3.12	-
δ-Nonalacton (10d)					
0 – 100 mg/L	813 \pm 300	1.2 \pm 0.4	976	-4.07	-3.96
100 – 2000 mg/L	30 \pm 6	25.0 \pm 3.0	750	-3.91	
δ-Decalacton (10e)					
0 – 100 mg/L	2000 \pm 500	1.4 \pm 0.4	2800	-4.69	-4.49
100 – 1000 mg/L	83 \pm 10	31.0 \pm 1.0	2573	-4.64	
δ-Undecalacton (10f)					
0 – 50 mg/L	6250 \pm 2000	0.9 \pm 0.3	5625	-5.11	-5.17

- a) Bindungskonstanten bestimmt mittels Ultrazentrifugation (8.9×10^{-3} mol/L RSA, Phosphatpuffer pH 7, 0.08 mol/L, KH_2PO_4/Na_2HPO_4). Die Bindungs-konstanten (Assoziationskonstante K_A und Bindungsseiten n) wurden über die Bindungsisothermen (Sättigungskurven) mittels des Statistikprogramms ORIGIN[®] 6.0 nach einem einseitigem bzw. zweiseitigem Bindungsmodell ($v = n \times F / (K_D + F)$ bzw. $v = [n_1 \times F / (K_{D1} + F)] + [n_2 \times F / (K_{D2} + F)]$, $K_A = 1 / K_D$); Aromastoff gebunden/Mol Protein (v), Aromastoff frei (F), Bindungsseite (n), Assoziationskonstante ($K_{A1,2}$) ermittelt.
- b) Freie Bindungsenthalpie der Bindungsseite mit der höchsten Assoziationskonstante.
- c) Das Zweiseitige Bindungsmodell zeigt, dass $K_{A1} = K_{ass2}$ ($n_1 = 1$ und $n_2 = 1$).

Tabelle 5: Bindungskonstanten (Assoziationskonstante K_A , Bindungsseiten n , Freie Bindungsenergie ΔG) von γ -/ δ -Lactonen und Methyl-/Ethylestern an β -Lactoglobulin (BLG)

Verbindung	Methode ^{a)}	PH-Wert	K_A (M^{-1})	n	ΔG (kcal/mol)
γ -Heptalacton (9b)	UCF	7	< 50	-	< 2.3
γ -Octalacton (9c)	UCF	7	77 ± 35	3.0 ± 1.0	-2.57
γ -Octalacton (9c)	AC	3	$450^b)$	-	-
γ -Nonalacton (9d)	UCF	7	215 ± 40	1.9 ± 0.2	-3.18
γ -Decalacton (9e)	UCF	7	910 ± 200	0.9 ± 0.3	-4.03
γ -Decalacton (9e)	MDA	7	1020 ± 200	1.0 ± 0.3	-4.09
γ -Decalacton (9e)	MDA	6.5	2050 ± 100	1.1 ± 0.1	-4.51
γ -Decalacton (9e)	AC	3	$3230^b)$	-	-
γ -Undecalacton (9f)	UCF	7	5880 ± 150	1.1 ± 0.3	-5.13
γ -Undecalacton (9f)	AC	3	$9924^b)$	-	-
δ -Heptalacton (10b)	UCF	7	< 50	-	< 2.3
δ -Octalacton (10c)	UCF	7	< 50	-	< 2.3
δ -Octalacton (10c)	AC	3	$231^b)$	-	-
δ -Nonalacton (10d)	UCF	7	145 ± 10	1.0 ± 0.1	-2.94
δ -Decalacton (10e)	UCF	7	625 ± 120	1.3 ± 0.1	-3.81
δ -Undecalacton (10f)	UCF	7	1640 ± 370	1.0 ± 0.2	-4.38
Buttersäureethylester	UCF	7	1400 ± 250	1.1 ± 0.1	-4.28
Buttersäureethylester	AC	3	$55^c)$	-	-
Hexansäuremethylester	UCF	7	1770 ± 150	2.4 ± 0.1	-4.42
Hexansäuremethylester	AC	3	$244^c)$	-	-

a) UCF: Ultrazentrifugation (4.45×10^{-3} mol/L BLG, Phosphatpuffer pH 7, 0.08 mol/L, KH_2PO_4/Na_2HPO_4); MDA: Mikrodialyse (4.45×10^{-3} mol/L BLG, Phosphatpuffer pH 7 und pH 6.5, 0.08 mol/L, KH_2PO_4/Na_2HPO_4); AC: Affinitätschromatographie (Immobilisiertes BLG ($1.69 - 5.20 \times 10^{-3}$ mol/L) auf einer HPLC Säule); Angegeben ist die globale Bindungskonstante ($n \times K_A$).

b) Werte von: Sostmann, K., Guichard, E. (1998) Immobilized β -lactoglobulin on a HPLC-column: a rapid way to determine protein-flavour interactions. Food Chem. **62**: 509-513.

c) Werte von: Pelletier, E., Sostmann, K., Guichard, E. (1998) Measurement of interactions between β -lactoglobulin and flavor compounds (esters, acids and pyrazines) by affinity and exclusion size chromatography. J. Agric. Food Chem. **46**: 1506-1509.

Untersuchungen zur Enantioselektivität der Lacton-Bindung an BLG und RSA zeigten, dass die einzelnen Enantiomere der Lactone (R und S) mit gleicher Affinität an BLG bzw. RSA binden. Mittels enantioselektiver Gaschromatographie (Säule: BGB 174; Phase: 2,3-Diacetyl-6-tert-butyldimethylsilyl- β -cyclodextrin) wurde die Enantiomerenverteilung von R- γ - und S- γ -Decalacton bzw. R- δ - und S- δ -Decalacton sowie der Enantiomeren von γ - und δ -Undecalacton nach einer Bindung an BLG bzw. RSA aus dem Komplex isoliert und mittels chiraler Gaschromatographie untersucht. In allen untersuchten Proben wurde eine Enantiomerenverteilung von 1:1 gefunden. In **Abb.17** sind die Ergebnisse der gaschromatographischen Untersuchungen am Beispiel der Bindung von R- γ - bzw. S- γ -Decalacton an RSA bzw. BLG dargestellt.

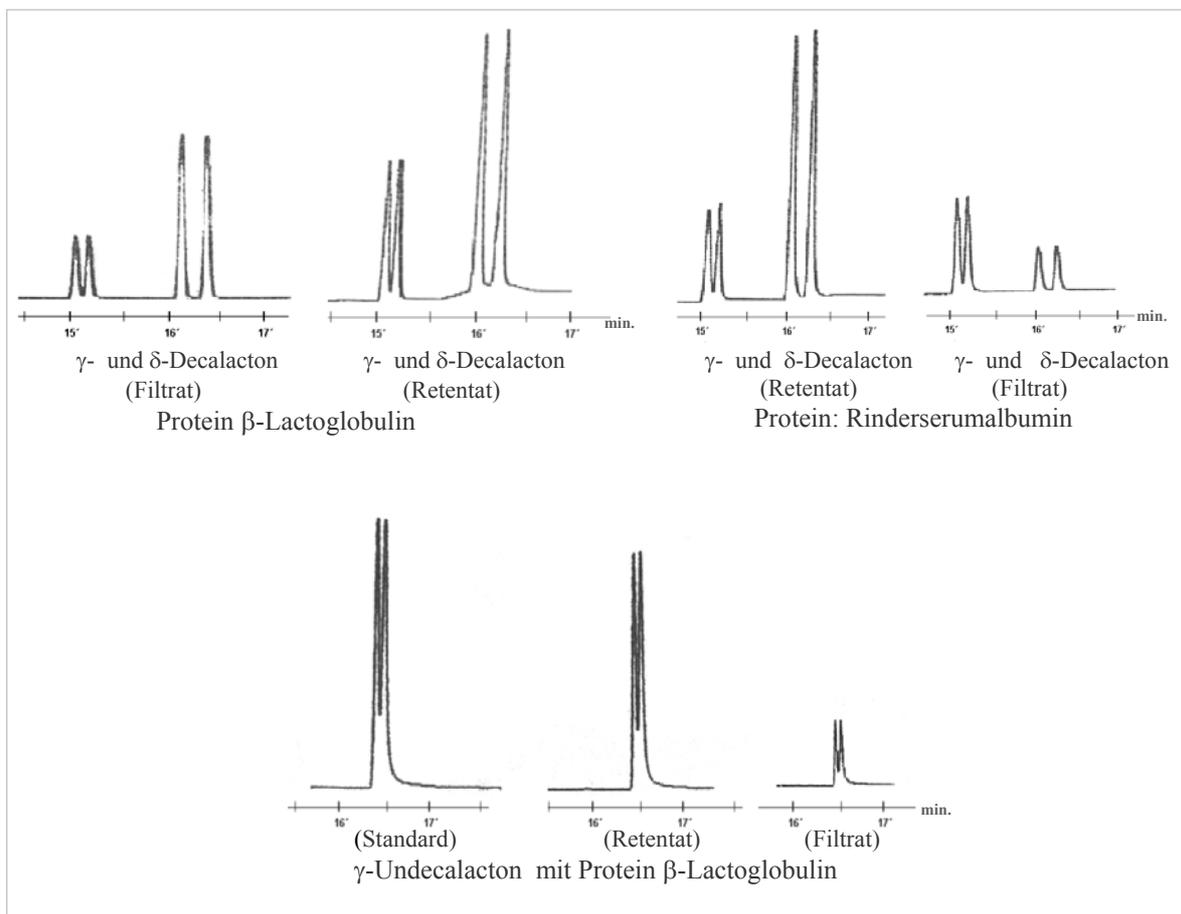


Abb.17: Gaschromatographische Untersuchungen zur Enantioselektivität der Lacton-Bindung an BLG und RSA (Ligand: R- γ - bzw. S- γ -Decalacton) nach Ultrazentrifugation (Retentat und Filtrat).

Ein Vergleich der hier gefundenen Bindungsdaten von γ -Nonalacton und δ -Decalacton ($\Delta G = -4.86$ kcal/Mol und -4.69 kcal/Mol) mit denen von Damodaran und Kinsella (1980) für 2-Nonanon an Rinderserumalbumin ($\Delta G = -4.4$ kcal/Mol) zeigt für die beiden oben erwähnten Verbindungen in dieser Studie ähnliche Bindungsenergien.

Die Autoren stellten einen Anstieg der Bindungsenergie (ΔG) von 2-Heptanon zu 2-Nonanon von $-1,1$ kcal/Mol fest. Dies entspricht bei Annahme eines linearen Anstiegs der Bindungsenergie von 2-Heptanon zu 2-Nonanon einem Beitrag von -0.55 kcal/Mol für eine Methyleneinheit zur Bindungsenergie (ΔG). Dieser Wert steht im Einklang mit den in dieser Studie gefundenen Unterschieden von -0.65 und -0.52 kcal/Mol pro Methyleneinheit.

3.6 Gegenüberstellung von Protein-Bindungskonstanten und physiko-chemischen Eigenschaften der γ - und δ -Lactone - Verteilungskoeffizient (Log P-Wert) und Löslichkeit

Die Assoziations- bzw. Dissoziationskonstanten eines Liganden und eines Makromoleküls können unter anderem abhängig sein von diversen chemischen und physikalischen Faktoren, unter denen die Hydrophobizität bzw. im vorliegendem Fall die Lipophilizität als physikalische Größe einer Verbindung herangezogen werden kann. Damodaran und Kinsella (1980) führten z.B. die Steigerung der Bindungsaffinität auf die Lipophilizität einer Verbindung zurück.

Die Lipophilizitäten von Substanzen lässt sich durch Bestimmung der Verteilungskoeffizienten (LogK bzw. LogP) von Substanzen in unterschiedlichen, mit Wasser nicht mischbaren Zweiphasen-Lösungsmittelsystemen abschätzen. In der vorliegenden Arbeit wurde als Methode zur Bestimmung von Verteilungskoeffizienten die Scheidetrichter-Methode (Leo et al. 1971), mit den Phasen-Systemen Octanol/Wasser und Cyclohexan/Wasser, angewendet. Der LogP Wert wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{LogP} = \log \frac{C_A (\text{Org. Phase})}{C_A (\text{Wasser. Phase})}$$

C_A = Konzentration des Stoffes A

In der **Tab. 6** sind die ermittelten LogP Werte der untersuchten Verbindungen in den Lösungsmittelsystemen Octanol/Wasser ($\text{LogP}_{\text{Oct}/\text{H}_2\text{O}}$) und Cyclohexan/Wasser ($\text{LogP}_{\text{Cyc}/\text{H}_2\text{O}}$) aufgeführt.

Die Verteilungskoeffizienten $\text{LogP}_{\text{Oct}/\text{H}_2\text{O}}$ der untersuchten Verbindungen lagen im Bereich von 0.27 (δ -Heptalacton) und 3.30 (γ -Undecalacton) und die Verteilungskoeffizienten $\text{LogP}_{\text{Cyc}/\text{H}_2\text{O}}$ der Lactone im Bereich von -0.51 (δ -Heptalacton) und 2.37 (γ -Undecalacton). Aus den Daten in **Tab. 6** wird deutlich, dass bei gleicher Kohlenstoffzahl im Molekül, γ -Lactone deutlich lipophiler als δ -Lactone sind. Daraus lässt sich ableiten, dass eine Methyleninheit im Lactonringsystem einen geringeren Beitrag zur Lipophilizität leistet als, eine Methyleninheit in der Alkylseitenkette des Lactons. Diese Differenzen sind auf die unterschiedlichen apolaren, für Lösungsmittel zugänglichen Oberflächen der einzelnen Verbindungen zurückzuführen. Die

Daten zur Löslichkeit der Verbindungen in Wasser bzw. Phosphatpuffer (**Tab. 6**) bestätigen die Vermutung: γ -Lactone haben im Vergleich zu δ -Lactonen mit gleicher Kohlenstoffzahl einen höheren Log P-Wert und eine geringere Löslichkeit in Wasser bzw. Phosphatpuffer.

In den Verbindungsklassen der γ - und δ -Lactone führt eine Verlängerung der Alkylseitenkette am Lactonring um eine Methyleinheit zu einem Anstieg des Log P_{oct} - und Log P_{cyc} -Wertes. Im Mittel beträgt dieser Anstieg für die beiden Verbindungsklassen im Zweiphasensystem Octanol/Wasser, 0.66 Log P-Einheiten, im System Cyclohexan/Wasser, 0.63 Log P-Einheiten.

Die Differenz des Log P-Wertes einer Verbindung berechnet aus den Zweiphasensystemen Octanol/Wasser und Cyclohexan/Wasser ist nach Seiler (1974) ein Maß für die Wasserstoffbrücken-Bindungsstärke einer Verbindung. Substanzen mit großen Differenzen ($\Delta \text{LogP} = \text{Log } P_{\text{oct}} - \text{Log } P_{\text{cyc}}$) sind in der Lage stärkere Wasserstoffbrücken auszubilden, als solche mit kleinen Differenzen.

Auch ein Ligand eines Proteins (im vorliegenden Fall ein Lacton) muss seine Hydrathülle abstreifen, bevor die Verbindung an die Bindestelle anlagern kann, um dann neue Bindungen mit dem Protein eingehen zu können. Die Stärke der anschließenden Wechselwirkung des Liganden mit dem Makromolekül ist dann abhängig von z.B. dem Enthalpiebeitrag sich ausbildender Wasserstoffbrückenbindung. Ausgehend von der Tatsache, dass zum einen die Hydrathülle abgestreift werden muss und zum anderen möglichst feste Wasserstoffbrücken-Bindungen zum Protein wieder aufgebaut werden müssen, ist zu vermuten, dass es ein Optimum des ΔLogP -Wertes gibt.

Aus diesen Darstellungen wird die Bedeutung des ΔLogP -Wertes für eine Protein-Ligand-Wechselwirkung deutlich. Aus diesem Grunde wurden die ΔLogP -Werte berechnet und in die **Tab. 6** mit aufgenommen. Für das γ -Undecalacton resultiert ein ΔLogP von 0.93 gefolgt von δ -Decalacton mit 0.87. Basierend auf den Vorstellungen von Seiler (1974) bilden die beiden Substanzen in der Klasse der untersuchten Verbindungen die stärksten Wasserstoffbrücken zu Wasserstoffdonator-Gruppen aus. Als Wasserstoffakzeptor-Gruppen der Lactone kommen der Carbonylsauerstoff und die Etherfunktion des Lactonringes in Betracht. Ein Vergleich der Wasserstoffbrücken-Bindungsstärke einer Esterfunktion am Beispiel von Buttersäureethylester ($\Delta \text{LogP} = 0.23$; cf. **Tab. 6**) mit den von Lactonen zeigt, dass die funktionelle Estergruppe deutlich schwächere Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden vermag.

Die beobachteten Differenzen der LogP Werte (Δ LogP) in den einzelnen Verbindungsklassen der Lactone (Δ LogP Bereich: 0.66 – 0.93) sind allerdings zu gering um die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Unterschiede in der Protein-Bindungsaffinität zu erklären. Vielmehr ist davon auszugehen, dass der enthalpische Energiebeitrag zur Protein-Ligand-Bindung bei den untersuchten Lactonen ähnlich zu bewerten ist.

Innerhalb einer Verbindungsklasse ist der Anstieg der Bindungsaffinität abhängig von der Lipophilität, d.h. bei Lipophilitätszunahme, z.B. von γ -Nonalacton, (Log P=1.95) zu γ -Undecalacton (Log P=3.30) nimmt die Bindungsenergie an RSA mit steigendem Log P-Wert um -1.3 kcal/Mol zu. Für die beiden um zwei Methyleinheiten unterschiedlichen γ -Lactone ergab sich in den vorliegenden Untersuchungen ein Δ Log P-Wert von 1.35 (cf. **Tab. 6**), dies entspricht einem Δ G von -1.8 kcal/Mol. Eine Korrelation des $\text{LogP}_{\text{Octanol/Wasser}}$ mit den Bindungsaffinitäten der Lactone an BLG (**Abb.18**) und RSA (**Abb.19**) bestätigt den gefundenen Zusammenhang zwischen Lipophilität einer Verbindung und der Bindungsaffinität.

Aus den linearen Regressionsanalysen (**Abb.18** und **Abb.19**) lassen sich die gezeigten Zusammenhänge in Form einer Regressionsgleichung ausdrücken. Diese ermöglichen die Berechnung von Bindungsenergien von Lactonen an BLG und RSA. Allerdings bleiben strukturelle Einflüsse der Verbindungen unberücksichtigt, so dass die Bindungsenergie anderer Verbindungsklassen (z.B. Ethyl- und Methylester, siehe **Tab.5**) damit nicht beschrieben werden können. Unterstützt wird diese Aussage durch einen Vergleich der hier gefundenen Bindungsdaten von γ -Nonalacton (Δ G=-4.52 kcal/Mol) mit denen von Damodaran und Kinsella (1980) für 2-Nonanon an Rinderserumalbumin (Δ G=-4.4 kcal/Mol). Beide Verbindungen zeigen annähernd übereinstimmende freie Bindungsenthalpien an Rinderserumalbumin. Ein Vergleich des LogP_{Oct} Wertes von γ -Nonalacton (log P=1.95, cf. **Tab.6**) mit dem des 2-Nonanons (Exp. $\text{LogP}_{\text{Oct}} = 3.14$; Hansch et al., 1995) zeigt jedoch einen deutlichen Unterschied der Lipophilität beider Verbindungen. Dies lässt vermuten, dass neben der Lipophilität einer Verbindung weitere Einflussgrößen bei einer Protein-Ligand-Wechselwirkung wirksam sind.

Damodaran und Kinsella (1980) stellten einen Anstieg der freien Bindungsenthalpie (Δ G) von 2-Heptanon zu 2-Nonanon von -1,1 kcal/Mol fest und führten diese Steigerung der Bindungsaffinität auf die Lipophilität einer Verbindung zurück.

Tabelle. 6: Verteilungskoeffizienten (Log P-Werte), Bindungsaffinitäten und Löslichkeiten (S) von Lactonen

Verbindung	Log P _{Oct/H₂O} ^{a)}	Log P _{Cyc/H₂O} ^{a)}	Δ Log P _{Oct-Cyc} ^{b)}	K _A (M ⁻¹) ^{c)}		S _{H₂O} ^{d)} (mol/L)	S _{Phos} ^{d)} (mol/L)
				RSA	BLG		
γ-Heptalacton	0.65	-0.10	0.75	2,3 x 10 ²	<50	3.2 x 10 ⁻¹	2.1 x 10 ⁻¹
γ-Octalacton	1.22	0.56	0.66	2,7 x 10 ²	77	5.9 x 10 ⁻²	3.9 x 10 ⁻²
γ-Nonalacton	1.95	1.22	0.73	6,1 x 10 ²	2,15 x 10 ²	1.5 x 10 ⁻²	1.2 x 10 ⁻²
γ-Decalacton	2.72	1.87	0.85	6,3 x 10 ³	9,10 x 10 ²	5.0 x 10 ⁻³	2.8 x 10 ⁻³
γ-Undecalacton	3.30	2.37	0.93	1,6x 10 ⁴	5,8 x 10 ³	1.0 x 10 ⁻³	5.9 x 10 ⁻⁴
δ-Heptalacton	0.27	-0.51	0.78	6,5 x 10 ²	<50	n.b.	n.b.
δ-Octalacton	0.97	0.13	0.84	--	<50	8.1 x 10 ⁻²	5.0 x 10 ⁻²
δ-Nonalacton	1.54	0.76	0.78	30	1,4 x 10 ²	5.6 x 10 ⁻²	3.6 x 10 ⁻²
δ-Decalacton	2.34	1.47	0.87	2,0 x 10 ³	6,2 x 10 ²	1.4 x 10 ⁻²	8.5 x 10 ⁻³
δ-Undecalacton	2.93	2.10	0.83	6,2 x 10 ³	1,6 x 10 ³	3.8 x 10 ⁻³	2.8 x 10 ⁻³
Buttesäureethylester	2.00	1.76	0.24	n.b	1.4 x 10 ³	n.b	n.b
Hexansäuremethylester	2.53	n.b	--	n.b	1.7 x 10 ³	n.b	n.b

n.b. nicht bestimmt

- a) Verteilungskoeffizienten (P) von Geruchstoffen, berechnet als LogP, in Octanol/Wasser und Cyclohexan/Wasser (Methode: Scheidetrichter).
- b) $\Delta \text{Log P}_{\text{Oct-Cyc}} = \text{Log P}_{\text{Oct}} (\text{Octanol/Wasser}) - \text{Log P}_{\text{Cyc}} (\text{Cyclohexan/Wasser})$.
- c) Bindungskonstanten bestimmt mittels Ultrazentrifugation (Phosphatpuffer pH 7.0, 0.08 mol/L, KH₂PO₄/ Na₂HPO₄).
- d) Löslichkeiten der Lactone in reinem Wasser (S_{H₂O}) und Phosphatpuffer pH7 (S_{Phos}, KH₂PO₄ 0.066 mol/L, Na₂HPO₄ 0.083 mol/L).

Wie die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen, ist innerhalb einer Verbindungsklasse der Anstieg der Bindungsaffinität abhängig von der Lipophilität, d.h. bei Lipophilitätszunahme, z.B. von γ -Nonalacton, (Log P=1.95) zu γ -Undecalacton (Log P=3.30) nimmt die freie Bindungsenthalpie mit steigendem Log P-Wert um -1.23 kcal/Mol zu.

Für die beiden um zwei Methylenheiten unterschiedlichen γ -Lactone ergab sich in unseren Untersuchungen ein Δ Log P-Wert von 1.35 Einheiten (cf. **Tab. 6**) sowie ein Unterschied in der freien Bindungsenthalpie von -1.23 kcal/Mol. Überträgt man diese Resultate, nach denen ein Δ G von -1.0 kcal/Mol einem Δ Log P-Wert von 1.1 Einheiten entspricht, auf die beiden Verbindungen 2-Nonanon und 2-Heptanon, für die Damodaran und Kinsella (1980) ein Δ G von -1.1 kcal/Mol publizierten, so errechnet sich für diese beiden Ketone ein Δ Log P-Wert von 1.21 Einheiten. Der tatsächliche, experimentell ermittelte Δ Log P-Wert, für die beiden homologen Ketone wurde aus der Literatur (Hansch et al., 1995) entnommen und ein Δ LogP Wert von 1.16 ermittelt. Damit decken sich der tatsächliche und errechnete Wert und bestätigt somit den gefundenen Zusammenhang zwischen Bindungsaffinität und LogP Wert.

Ein linearer Zusammenhang zwischen dem Anstieg der freien Bindungsenthalpie und der Löslichkeit der Lactone in Wasser bzw. Phosphatpuffer (cf. **Tab. 6**) wurde nicht gefunden. Die Löslichkeiten der entsprechenden Lactone im Phosphatpuffer sind im Vergleich zu reinem Wasser niedriger (**Tab. 6**). Dieses Verhalten lässt sich mit dem sogenannten ‚Aussalzeffekt‘ erklären. Die höchste Löslichkeit in reinem Wasser wurde für das γ -Heptalacton mit 3.2×10^{-1} Mol/L gefunden. Demgegenüber zeigte die Löslichkeit von γ -Undecalacton in Wasser einen Wert von 1.0×10^{-3} Mol/L .

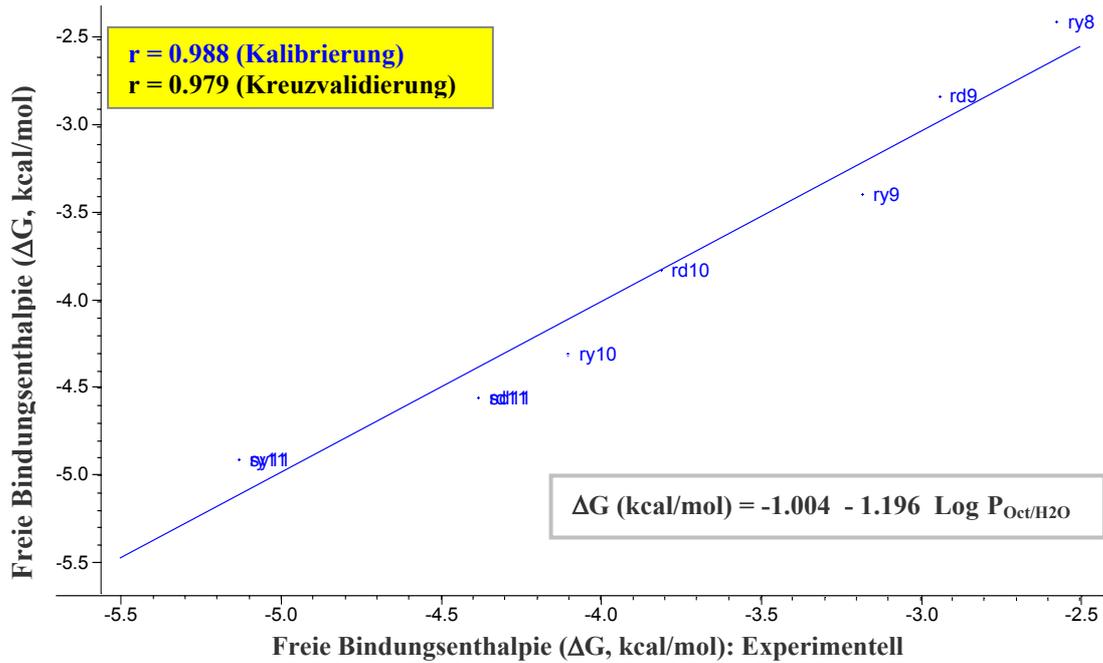


Abbildung 18: Korrelation von $\text{Log}P_{\text{Octanol/Wasser}}$ und experimentell bestimmten Bindungsenergien von Lactonen an β -Lactoglobulin (BLG) mittels Linearer Regressionsanalyse (LR) (ry8: R- γ -Octalacton ry9: R- γ -Nonalacton, ry10: R- γ -Decalacton, ry11/sy11: R- γ -S- γ -Undecalacton, rd9: R- δ -Nonalacton rd10: R- δ -Decalacton, rd11/sd11: R- δ -S- δ -Undecalacton).

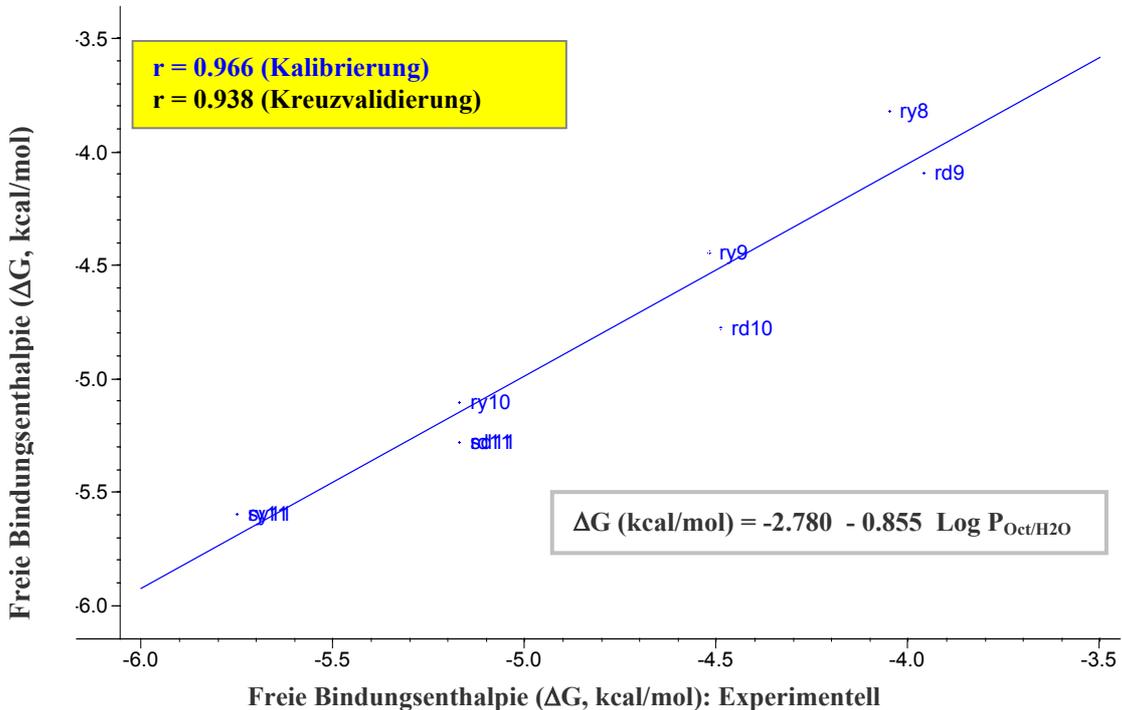


Abbildung 19: Korrelation von $\text{Log}P_{\text{Octanol/Wasser}}$ und experimentell bestimmten Bindungsenergien von Lactonen an Rinderserumalbumin (RSA) mittels Linearer Regressionsanalyse (LR) (ry8: R- γ -Octalacton ry9: R- γ -Nonalacton, ry10: R- γ -Decalacton, ry11/sy11: R- γ -S- γ -Undecalacton, rd9: R- δ -Nonalacton rd10: R- δ -Decalacton, rd11/sd11: R- δ -S- δ -Undecalacton)

3.7 Einfluss von Rinderserumalbumin (RSA) und β -Lactoglobulin (BLG) auf die Headspacekonzentrationen ausgewählter Lactone

In weiteren Arbeiten wurde der Einfluss wässriger Proteinlösungen auf die Headspacekonzentrationen der Lactone untersucht. Hierzu wurde eine statische Headspace Methode entwickelt. Das Prinzip und die Durchführung der Methode ist bereits unter 3.3 bzw. 5.3.3, *Statische Headspace Analyse (SHA)*, beschrieben. Die Ergebnisse sind in der **Abb. 20a** dargestellt.

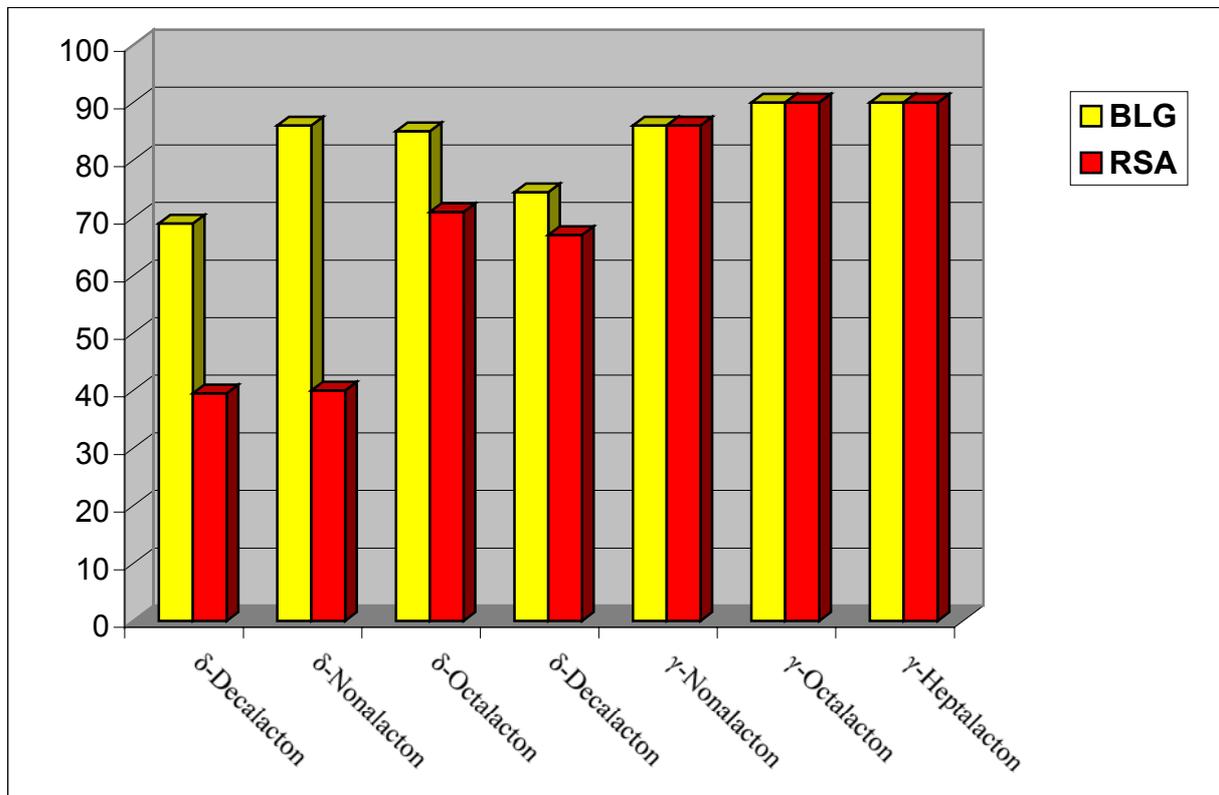


Abb. 20a: Reduzierung der Lactone im Gasraum (%) in Anwesenheit von RSA und BLG. Die Konzentration der entsprechenden Lactone im Gasraum ohne Protein wurde 100% gesetzt (Bedingungen: 4.45×10^{-3} mol/L BLG bzw. RSA, 20 mg/L Lacton, Phosphatpuffer pH 7, 0.08 mol/L, $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$).

In der Reihe der δ - und γ -Lactone in Gegenwart von RSA nimmt mit steigender Kohlenstoffzahl die Headspacekonzentration der Lactone über der Puffer-Protein-Lösung ab. Für δ -Decalacton wurde eine Reduzierung der Gasraumkonzentration um 60 % im Vergleich zu einer reinen Puffer-Lösung festgestellt. Die Reduzierung ist in der Serie der δ -Lactone deutlicher ausgeprägt als bei den entsprechenden γ -Lactonen. Dies steht im Widerspruch zu

den Bindungsaffinitäten in der **Tab. 4**, die in der Verbindungsklasse der γ -Lactone höher liegen, und somit einer besseren Bindung entsprechen. Die stärkere Reduktion der δ -Lactone im Vergleich zu der γ -Lactone im Gasraum lässt sich auf das Vorhandensein weiterer Bindungsseiten, die mit der Ultrazentrifugationsmethode nicht erkannt worden sind, die aber gleichzeitig mit höheren globalen Assoziationskonstanten (cf.**Tab.4**) verknüpft sind, zurückführen.

In **Abb. 20b** sind die absoluten Gasraumkonzentrationen (ng/L) ausgewählter Lactone über Wasser, Pufferlösung, RSA-Pufferlösung und BLG-Pufferlösungen dargestellt. Die eingesetzten Aromastoffkonzentrationen für alle untersuchten Lactone betragen ca. 20 mg/L.

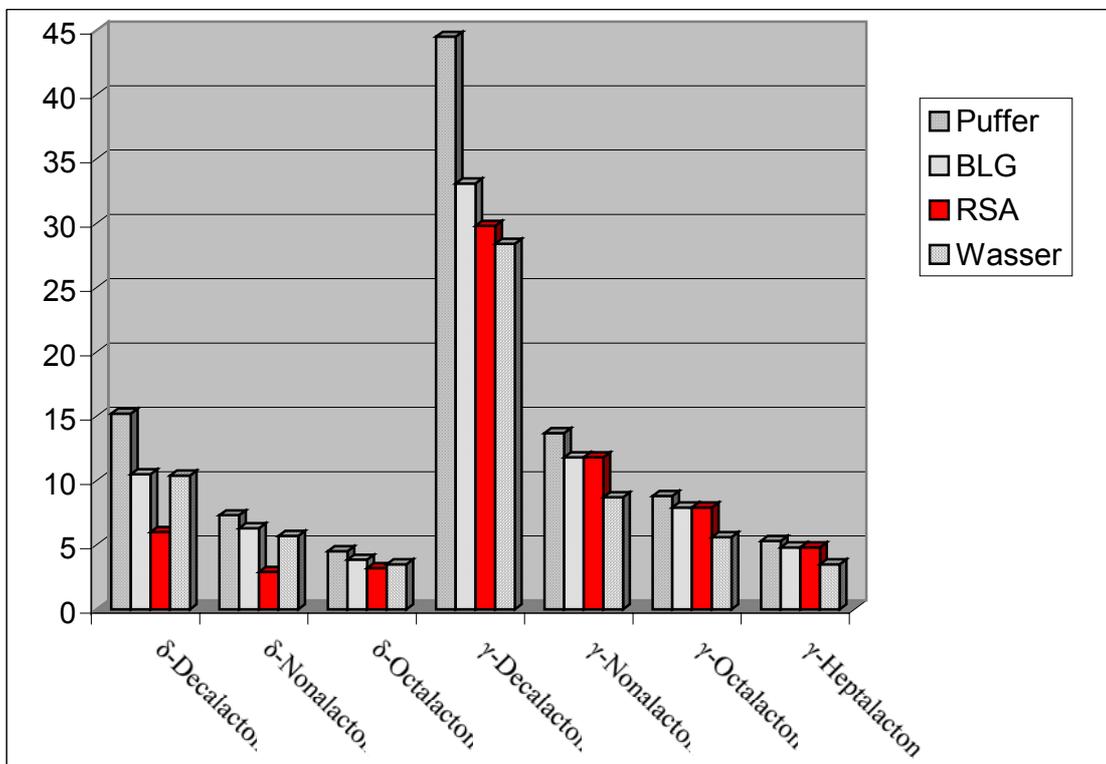


Abbildung 20b: Absolute Gasraumkonzentrationen (ng/L Luft) von verschiedenen Lactonen (20 mg/L) gelöst in Wasser, in Pufferlösung, in RSA-Pufferlösung und in BLG-Pufferlösungen. Die Adsorptionen an der Spritzenwandung (cf. **Abb.15**) wurden bei der Konzentrationsberechnung berücksichtigt. (Bedingungen: 4.45×10^3 mol/L BLG bzw. RSA, Phosphatpuffer pH 7, 0.08 mol/L, $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$)

γ -Decalacton zeigte mit 44 ng/L Luft über der Phosphatpufferlösung die höchste Konzentration im Gasraum. Im Vergleich zu reinem Wasser (27 ng/L Luft) wird durch die Anwesenheit von Puffersalzen ein deutlicher „Aussalzeffekt“ beobachtet. Dieser Aussalzeffekt in der Lösung

wird bei gleichzeitiger Anwesenheit von RSA (29 ng/L Luft) bzw. BLG (33 ng/L Luft) durch Bindung von γ -Decalacton an die Makromoleküle reduziert.

Die anderen untersuchten Lactone zeigen ein ähnliches Verhalten für das Luft/Lösungs-Verteilungsgleichgewicht wie γ -Decalacton. Die ermittelten Konzentrationen im Gasraum sind jedoch unterschiedlich zu γ -Decalacton. So wurde z.B. für das δ -Decalacton im Gasraum über der Pufferlösung 15 ng/L Luft bzw. im Gasraum über Wasser 10 ng/L Luft bestimmt. δ -Decalacton Pufferlösungen die die Proteine RSA bzw. BLG enthielten zeigten Gasraumkonzentrationen von 6 ng/L bzw. 10 ng/L Luft.

4. Molecular Modelling Experimente

4.1 Strukturelle Merkmale von β -Lactoglobulin (BLG)

β -Lactoglobulin liegt in Abhängigkeit vom pH-Wert in unterschiedlichen Konformationen und Polymerisationsgraden vor (Tandford et al., 1959; Townend und Timascheff 1957 und 1964; Zimmerman et al., 1970; Qin et al., 1998). Unter physiologischen Bedingungen (pH 6.5 – 7.0, niedrige Proteinkonzentrationen) liegt β -Lactoglobulin als Dimer vor. Bei sauren (pH < 3.5) und alkalischen pH-Werten (pH>7.5) wird eine Dissoziation des β -Lactoglobulin-Dimer-Komplexes (MW: ~36000 Da) in die beiden Monomereinheiten (MW: 18350 Da) beobachtet (McKenzie und Sawyer, 1967). Abhängig vom pH-Wert und der Proteinkonzentration wurden weitere Oligomere von β -Lactoglobulin beschrieben (octamere Form). Bei pH-Werten von > 8.5 erfolgt eine irreversible Denaturierung des Proteins.

Für die Molekular Modelling Untersuchungen wurde die Kristallstruktur von BLG aus der Brookhaven Proteindatenbank (<http://www.rcsb.org>) entnommen. Um einen Vergleich der experimentellen Daten (cf. 3.5) mit den hier vorgestellten Molekular Modelling Experimenten zu ermöglichen wurde die Kristallstruktur der gemischten genetischen Varianten AB des BLG's aus der Proteindatenbank (Brownlow et al., 1997) entnommen und modelliert. Die dimere Struktur (gemischtes Dimer aus der genetischen Variante A und B) des BLG's ist in **Abb. 21** dargestellt.

Die Kontaktstellen des β -Lactoglobulin-Dimers (Variante A und B) sind die beiden AB-Loop's (Schleifen) und die beiden β -Faltblattstrukturen I (cf. **Abb.21**). An den Berührungspunkten fanden Brownlow et al. (1997) Wasserstoffbrückenbindungen (Anzahl 12) zwischen folgenden Aminosäuren: **His 146** (Variante B)→**Ser 150** (Variante A), **His 146** (Variante A)→**Ser 150** (Variante B), **Asp 33** (Variante B) →**Arg 40** (Variante A), **Asp 33** (Variante A) →**Arg 40** (Variante B), **Arg 148** (Variante A) → **Arg 148** (Variante B), **Asp 33** (Variante B) →**Ala 34** (Variante A) und **Asp 33** (Variante A) →**Ala 34** (Variante B).

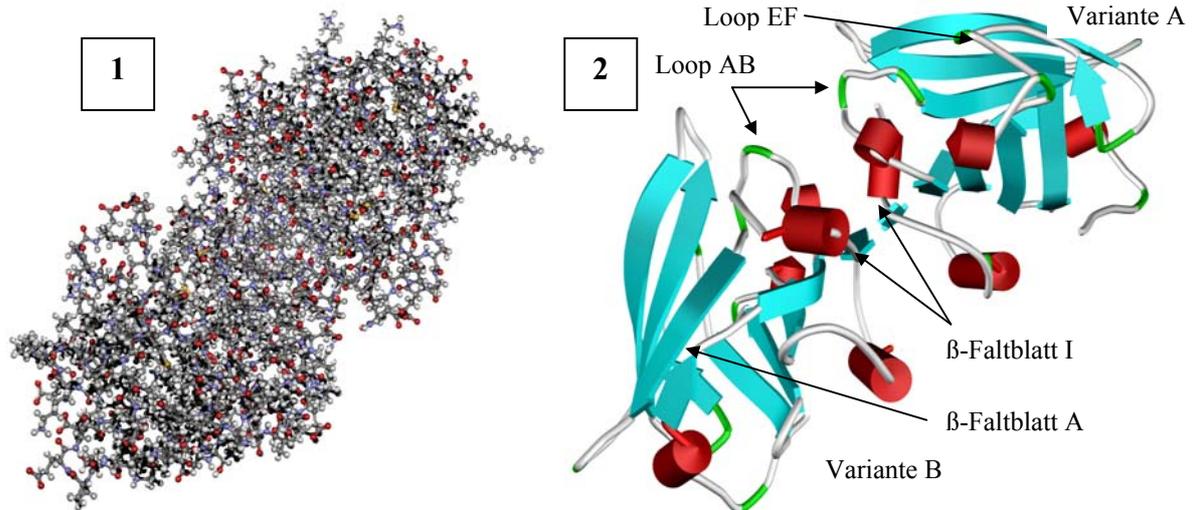


Abb.21: Dimere Struktur von β -Lactoglobulin (Brookhaven Proteindatenbank: *Ibeb*; Röntgenstrukturanalyse: Variante A und B, Auflösung 1.8 Å, pH 6.5; Brownlow et al., 1997; **1** Stabmodell-Darstellung und **2** schematische Darstellung).

Weitere Kontaktstellen die für eine Oligomerisierung von β -Lactoglobulin verantwortlich sind wurden von Qin et al. (1998) beschrieben. Die Autoren fanden eine nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip aufgebaute Verknüpfungsstelle. Der Schlüssel stellte dabei die Aminosäure Lys 8 des einen Monomers dar und das Schloss wurde aus den Aminosäuren Tyr 20, Ser 21 (Aminosäuren der β -Faltblattstruktur A, cf. **Abb. 22**), Val 41, Tyr 42, Val 43, Leu 156, Glu 157 und Glu 158 des zweiten Monomers gebildet. Die Autoren machten diese Dimerisierungsstelle für das Gelbildungsvermögen von β -Lactoglobulin verantwortlich.

Neben den oben beschriebenen Oligomerisierungsreaktionen werden bei β -Lactoglobulin pH-Werts abhängige Konformationsveränderungen beschrieben. Qin et al. (1998) untersuchten mittels Röntgenstrukturanalyse die strukturellen Veränderungen von β -Lactoglobulin (Variante A) bei drei verschiedenen pH-Werten (6.2, 7.1 und 8.2). Die Autoren beobachteten, in Abhängigkeit vom pH-Wert, Konformationsänderungen der Loop EF (Aminosäurereste 85-90; cf. **Abb. 21**). Die in der Proteindatenbank publizierten Strukturen, wurden in der vorliegenden Arbeit mittels Molekular Modelling untersucht. Bei einem pH-Wert von 6.2 legt sich die Loop EF über die zentrale Bindetasche, so dass die Bindestelle des β -Lactoglobulins nicht mehr zugänglich ist (cf. **Abb. 22**). Mit steigendem

pH-Wert (7.1 und 8.2) findet eine Verschiebung der Loop EF statt, so dass der Zugang zur zentralen Bindetasche wieder frei gegeben wird ist (cf. **Abb. 22**). Diese beschriebenen Beobachtungen können entscheidenden Einfluss auf die Protein-Ligand-Wechselwirkungen haben. Der pH Wert bei der Bestimmung der Bindungsaffinitäten der Lactone an BLG lag in der vorliegenden Arbeit (cf. 3.5) bei pH 7.0 und pH 3.0. Aus den durchgeführten Modelling Studien zeigte sich, dass bei einem pH Wert von 7.0, die zentrale Bindetasche zugänglich ist, dagegen bei einem pH Wert von 3.0, für Liganden nicht zugänglich ist.

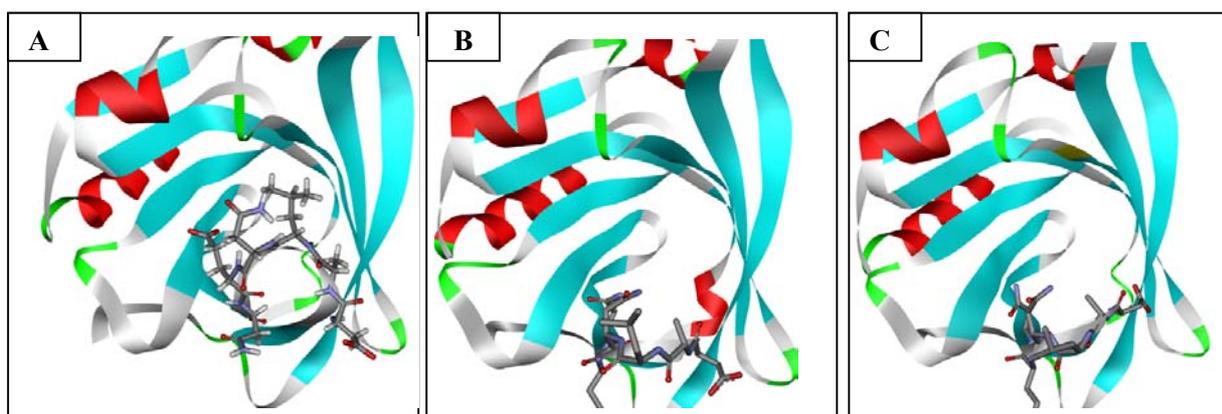
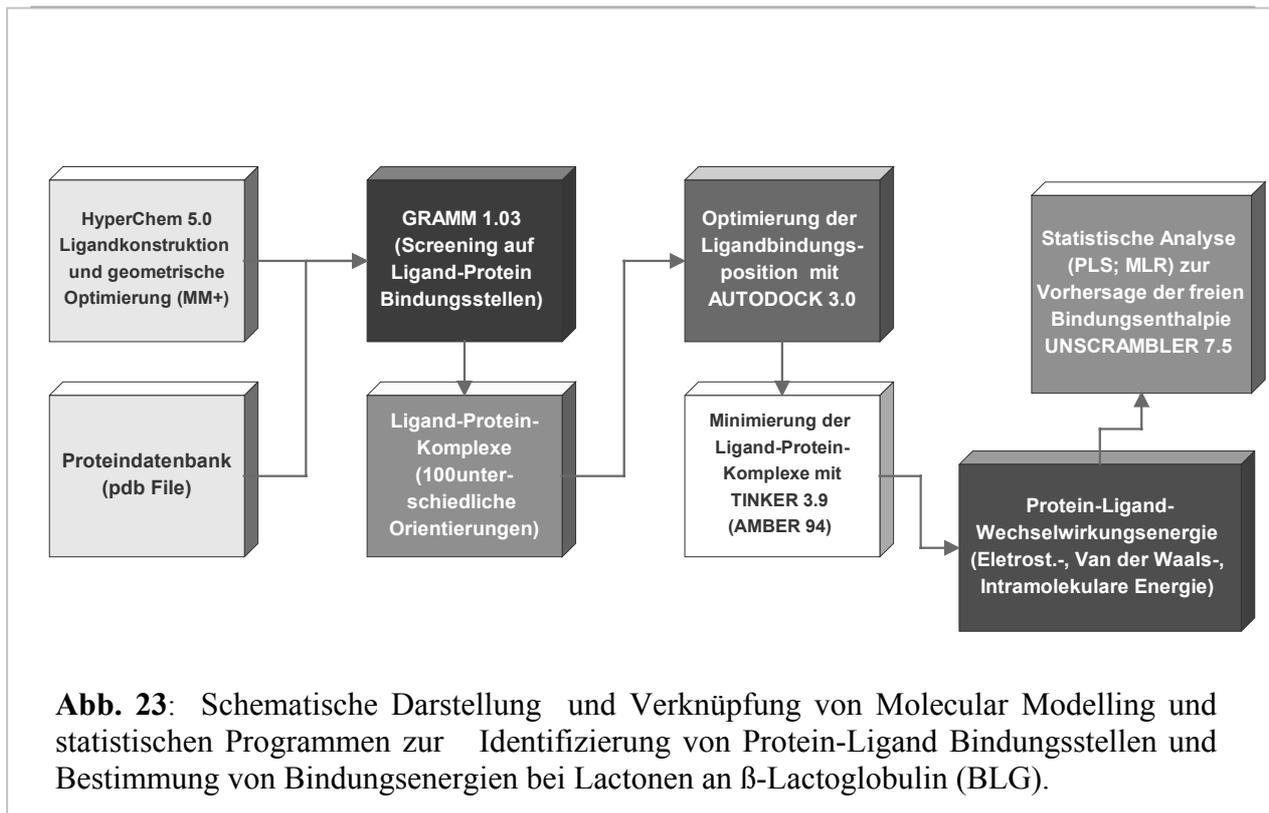


Abb.22: Schematische Struktur der zentralen Bindetasche von β -Lactoglobulin bei unterschiedlichen pH-Werten (Brookhaven Proteindatenbank: *3blg* (A), *1bsy* (B), und *2blg* (C); Röntgenstrukturanalyse: Variante A, Auflösung 2.56 Å, A: pH 6.2, B: pH 7.1, C: pH 8.2; Aminosäurereste 85-90 als Molekülstrukturen dargestellt; Qin et al., 1998).

4.2 Ermittlung der Bindungsposition der Lactone an β -Lactoglobulin (BLG)

In weiteren Arbeiten wurde der Einfluß der Protein- und Ligandstruktur auf das Bindungsverhalten von δ - und γ -Lactonen untersucht. Zur Klärung des unterschiedlichen Bindungsverhaltens der einzelnen Lactone an BLG, wurden die Ligand-Protein-Komplexe mittels Molecular Modelling untersucht. Die Vorgehensweise und die verwendeten Programme sind in der **Abb. 23** gezeigt. Für die Verbindungsklasse der Lactone, bei denen keine experimentellen Daten zur räumlichen Ausrichtung des Moleküls vorlagen, erfolgte die Berechnung der energetisch günstigen Molekülgeometrien mittels der empirischen Kraftfeldmethode MM+ in **HYPERCHEM V.5.0**. Die Konformationsanalysen der Verbindungen wurden mittels des Monte-Carlo-Verfahrens und mittels Moleküldynamik-Simulationen durchgeführt. Für die sich anschließenden Docking Studien wurde das energetisch stabilste Konformer des jeweiligen Lactons als Ausgangsstruktur eingesetzt.



Zur Erkennung von möglichen Bindungspositionen der Lactone an BLG wurde als erste Screening Methode das Softwarepaket **GRAMM** (siehe **Abb.23**) eingesetzt.

GRAMM (Global Range Molecular Matching) ist ein Programm, das in der Literatur für Protein-Docking-Simulationen beschrieben wurde (Katchalski-Katzir et al., 1992 und Vakser et al., 1994). Das Programm kann zum Auffinden von Protein-Ligand-Bindungsstellen eingesetzt werden. **GRAMM** führt eine 6-dimensionale Suche über die entsprechenden Translations- und Rotationsfreiheitsgrade der Moleküle durch. Als Molekülpaare können zwei Proteine oder ein Protein und ein kleineres Molekül eingegeben werden. Das Programm erlaubt keine intramolekulare bzw. konformationsabhängige Änderung von Ligand- und Proteinstruktur. Gramm eignet sich somit für die Lokalisierung von möglichen Bindungsstellen am Protein (Screening-Methode), jedoch nicht zur exakten Bestimmung der Wechselwirkungsenergie von Ligand und Protein. Katchalski-Katzir et al. (1992) und Vakser et al. (1994) wendeten das Programm auf bekannte Protein-Protein Komplexe von z.B. Deoxyhemoglobin und Methemoglobin mit Asparagin- und Trypsin-Trypsin Proteinasen an. Zum Docking von Proteinen mit kleinen Molekülen liegen bisher keine Erfahrungen vor. Das Programm wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig für das Docking von kleinen Molekülen mit Makromolekülen eingesetzt.

Am Beispiel von δ -Decalacton sind die mittels **GRAMM** erhaltenen möglichen Bindungspositionen am BLG in der **Abb. 24** dargestellt.

Im weiteren wurden die 100 stabilsten Komplexe aus **GRAMM** mit dem Software Packet **AUTODOCK** weiter verarbeitet. Hier erfolgte eine Optimierung der Bindungspositionen und eine Berechnung der freien Bindungsenergie (ΔG) des Protein-Ligand-Komplexes.

Das Programm **AUTODOCK 3.0** berechnet die freie Bindungsenergie nach folgender empirischen Gleichung **(4-1)**:

$$\Delta G = \Delta G_{\text{vdW}} + \Delta G_{\text{Hbind.}} + \Delta G_{\text{Elekt.}} + \Delta G_{\text{Konform.}} + \Delta G_{\text{Tor.}} + \Delta G_{\text{Lösung}} \quad \text{(4-1)}$$

Die ersten vier Terme der Gleichung berücksichtigen die Dispersion-Repulsion-, Wasserstoffbindungs-, elektrostatische- und intramolekulare Bindungsenergie. ΔG_{Tor} bestimmt die Translations- und Rotations-Energie (positiver (ungünstiger) Beitrag zur freien Bindungsenergie). $\Delta G_{\text{Lösung}}$ ist die freie Solvatisierungs- bzw. Desolvatisierungsenergie, die negativ (günstig) zur Bindungsenergie durch Entropieerhöhung beiträgt. Die Berechnung erfolgt auf Basis von Moleküloberflächen.

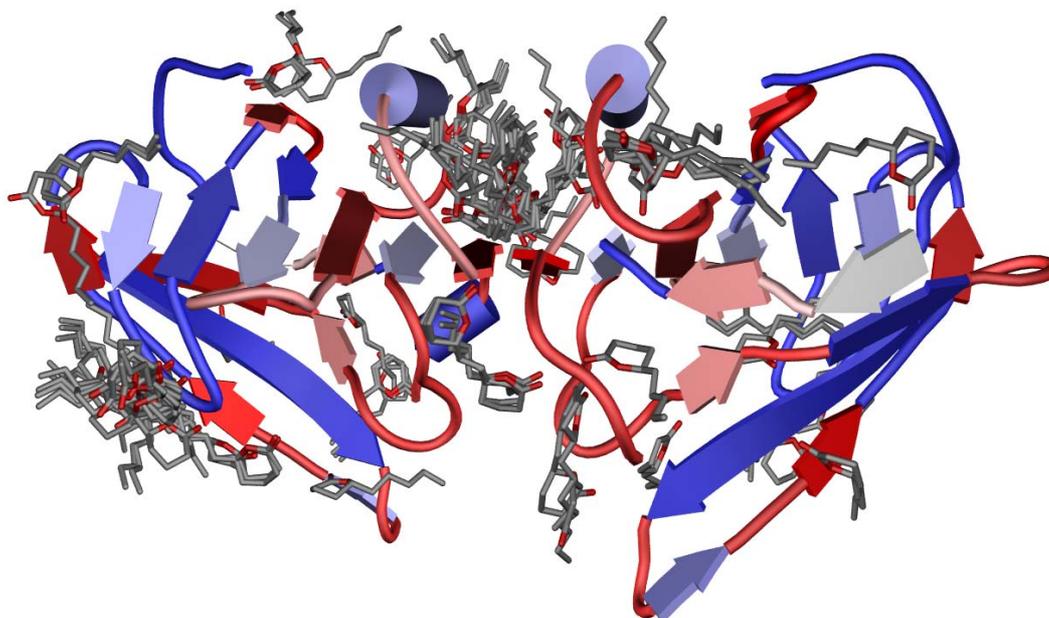


Abb. 24: Darstellung der 100 günstigsten Bindungspositionen von R- δ -Decalacton an β -Lactoglobulin ermittelt durch das Modellierungsprogramm GRAMM (Docking-Parameter: Proteinstruktur fixiert; Ligand minimiert (HyperChem 5.0, MM+) und flexibel (Translation und Rotation, keine Torsionsänderung) Docking-Modus: generic, Grid Step Size: 1.7 Å, Repulsion: 30, Inkrement für Rotationswinkel: 10, Cumulative Projektion, Potential range typ: Van der Waals Radius (high resolution docking).

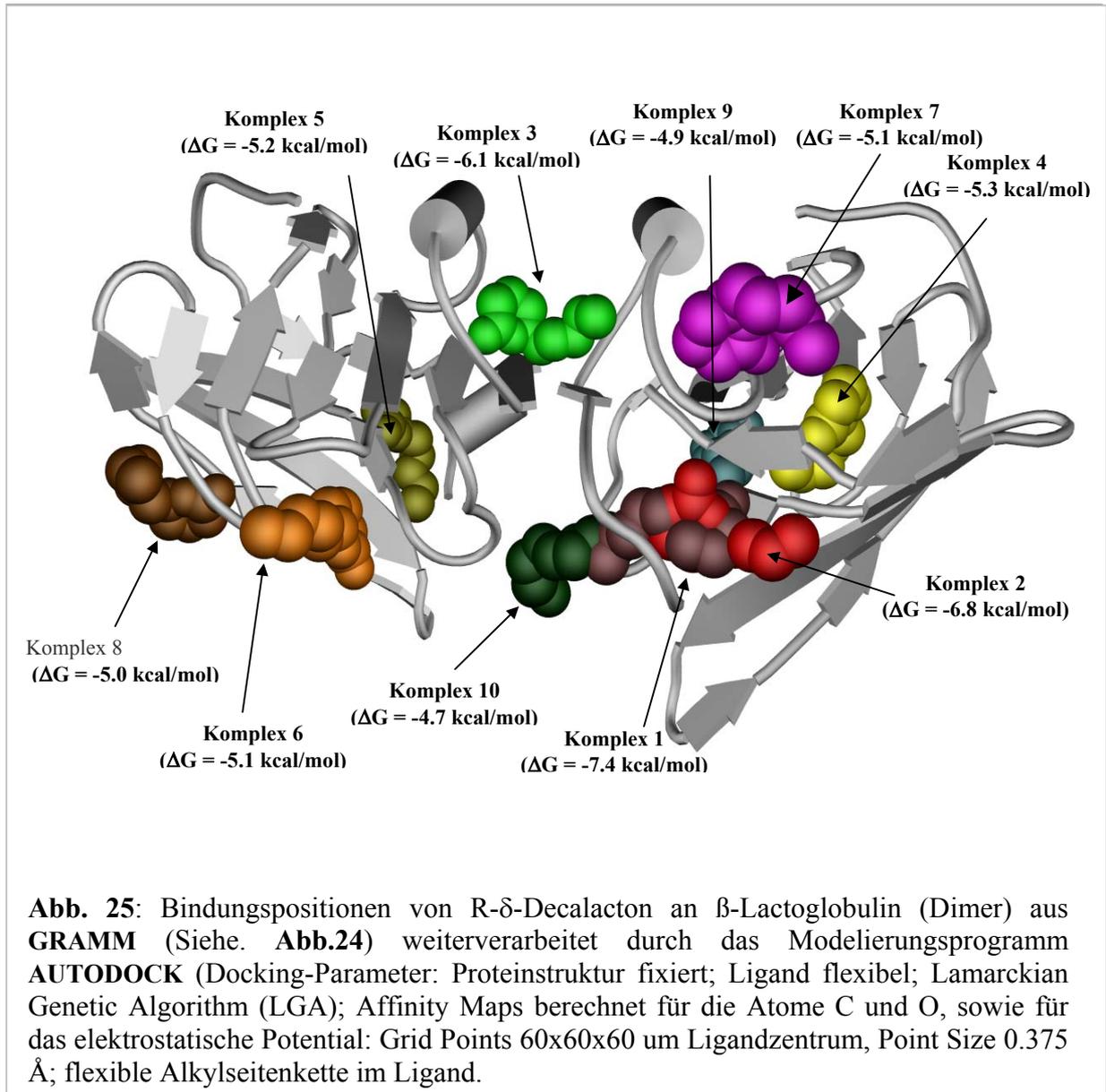
Die Parameter von AUTODOCK (Morris et al., 1998) zur Berechnung der freien Bindungsenergie sind nachfolgend dargestellt (4-2):

$$\begin{aligned}
 \Delta G = & \Delta G_{\text{vdw}} \sum_{ij} \left[\frac{A_{(12)ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{(6)ij}}{r_{ij}^6} \right] & (4-2) \\
 + \Delta G_{\text{H Bond.}} \sum_{ij} & E(t) \left[\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right] \\
 + \Delta G_{\text{elec}} \sum_{ij} & \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} \\
 + \Delta G_{\text{Tor.}} & N_{\text{Tor.}} \\
 + \Delta G_{\text{Lösung}} \sum_{ij} & (S_i V_j + S_j V_i) e^{(-r_{ij}^2 / 2\rho^2)}
 \end{aligned}$$

Die einzelnen ΔG Terme sind empirisch oder semi-empirisch durch Vergleich mit experimentellen Ergebnisse von Protein-Ligand Komplexen bzgl. der Bindungsenergie optimiert worden. ΔG_{vdW} beschreibt die van der Waals Wechselwirkungen und wird mittels des Lennard-Jones 12-6 Potential berechnet (cf. **1.4.1**). $\Delta G_{\text{H Bond}}$ berücksichtigt die Wasserstoffbrückenbindungsenergie und wird durch das Lennard-Jones 12-10 Potential berechnet. $E(t)$ ist eine Energie-Funktion und vom Bindungswinkel t zwischen Donator-H und Akzeptor-Heteroatom abhängig. ΔG_{elec} beschreibt die elektrostatische Wechselwirkungen mittels Coulomb Potential (cf. **1.4.1**). Das elektrostatische Potential, wird mittels des **AUTOGRID**-Modules berechnet. Die hydrophoben Protein-Ligand-Wechselwirkungen sind in wesentlichen entropischer Natur. Wassermoleküle werden aus der Bindetasche verdrängt und in das Lösungsmittel entlassen. Je mehr Wassermoleküle aus der hydrophoben Umgebung freigesetzt werden, um so größer ist der Beitrag zur Bindungsaffinität. Die Zahl der freigesetzten Wassermoleküle ist proportional zur Größe der hydrophoben Oberfläche des Liganden. In der von **AUTODOCK** verwendeten Gleichung ($\Delta G_{\text{Lösung}}$) ist S_i ist die hydrophobe Oberfläche des Liganden, S_j die Oberfläche des Proteins, V_j und V_i sind die berücksichtigten Änderungen des Volumens der Kohlenstoffatome von Protein und Ligand. Der Term $(-r_{ij}^2 / 2\rho^2)$ beschreibt das elektrostatische Feld des Komplexes und die Ladungsdichte der Lösung.

Neben der Freisetzung von Wassermolekülen tragen noch die Translations- und Rotations-Freiheitsgrade (ΔG_{Tor}) von Ligand und Protein an der Entropieänderung und damit zu der Bindungsenergie bei. Durch Bindung des Liganden am Protein werden Translations- und Rotations-Freiheitsgrade eingefroren und es kommt zu einem Entropieverlust. Der gebundene Ligand kann dann nur noch die Konformation einnehmen, die der Form der Proteinbindetasche entspricht. **AUTODOCK** berücksichtigt die Änderung der Translations- und Rotations-Freiheitsgrade (ΔG_{Tor}) des Liganden in Bezug auf die Anzahl der frei drehbaren sp^3 Bindungen im Molekül ($N =$ Anzahl frei drehbarer C-C Bindungen).

Die mittels **AUTODOCK** erhaltenen 10 stabilsten Komplexe sind am Beispiel von δ -Decalacton und BLG in der **Abb.25** graphisch dargestellt. Der stabilste Protein-Ligand-Komplex hatte hier eine freie Bindungsenergie von -7.4 kcal/Mol (Komplex 1). Nach den Ergebnissen des Molecular Modellings wird somit für die Verbindungsklasse der monocyclischen Lactone die in der vorliegenden Arbeit erkannte Lacton-Bindestelle (Komplex 1) vorgeschlagen.



Die ermittelte Bindungsposition entspricht keiner der in der Literatur bekannten Bindungsstellen. In der Literatur wurden für BLG bzw. in der Proteinklasse der Lipocaline im wesentlichen 4 Bindungspositionen für die unterschiedlichen Liganden diskutiert (Monaco und Zanotti, 1992). Papiz et al. (1986) ermittelten mittels Röntgenstrukturanalyse die dreidimensionale räumliche Struktur von β -Lactoglobulin und modellierten einen Protein-Ligand-Komplex mit Retinol. Die Autoren vermuteten, dass Retinol in einer zentral liegenden tiefen hydrophoben Tasche des aus acht Faltblattstrukturen aufgebauten Proteinknäuels bindet. Diese Vorstellung ist allerdings durch zahlreiche weitere Untersuchung anderer Arbeitsgruppen in Frage gestellt worden. Nach heutigen Vorstellungen geht man davon aus, dass Retinol in einer an der Proteinoberfläche

liegenden Vertiefung, die aus dem helicalen Proteinanteil und dem β -Faltblatt gebildet wird, bindet.

Die Bindungsenergie für einen solchen δ -Decalacton–BLG-Komplex beträgt -5.1 kcal/Mol (Komplex 7 in **Abb. 25**).

Unter den in dieser Arbeit gegebenen Bedingungen (pH 7.0 und kleine Proteinkonzentrationen) liegt BLG als Dimer vor. Hier kommt die zwischen den beiden Monomeren gebildete Tasche als weitere Koordinationsstelle in Frage. Die mittels Autodock ermittelte Energie für diesen Protein-Ligand-Komplex beträgt -6.1 kcal/Mol (Komplex 3 in **Abb. 25**).

4.3 Kompetitive Bindungsstudien

Zur Bestätigung bzw. Absicherung der hier vorgeschlagenen Bindungsposition der Lactone, wurden kompetitive Hemmungsversuche durchgeführt. Dabei wurden Liganden, von denen die Bindeposition am BLG bekannt sind, als Konkurrenten eingesetzt. Als Liganden wurden Palmitat und Retinol verwendet. Die Ergebnisse der Bindungsstudien sind in der **Tab.7** zusammengefasst. Die Daten in der **Tab.7** zeigen, dass für Retinol und Palmitat keine oder nur eine geringfügige Hemmung für die Bindung von γ - bzw. δ -Decalacton an BLG festgestellt werden konnte. Aufgrund der publizierten (Puyol et al., 1991) Assoziationskonstanten der beiden Verbindungen (Methode Gleichgewichtsdialyse; Retinol: 1.5×10^4 Mol $^{-1}$; Palmitat: 5.2×10^5 Mol $^{-1}$), die im Vergleich zu den beiden Decalactonen deutlich höher liegen, ist bei einer Konkurrenz um die jeweilige Bindeposition eine vollständige Hemmung der Lactone zu erwarten. Somit lassen sich die beiden Bindestellen für die untersuchten Lactone ausschließen.

Weiterhin ausschließen lässt sich die Bindestelle, die sich zwischen den beiden Monomeren (A und B-Einheit von BLG in **Abb. 31**) als Tasche ausbildet (Komplex 3 in **Abb. 25**), da die Assoziationskonstante und damit die freie Bindungsenergie der Lactone, mit fallendem pH-Wert (cf. **Tab.5** Kap.3: γ -Decalacton K_A pH 3.0 = 3230, γ -Decalacton K_A pH 7.0 = 1020) zunimmt. Bei stark sauren pH-Werten (pH 3) wird eine Dissoziation des BLG-Dimer-Komplexes in die beiden Monomereinheiten beobachtet (McKenzie und Sawyer, 1967) und somit liegt diese mögliche Bindestelle nicht mehr vor.

Die hier beschriebenen Untersuchungen geben weitere Anhaltspunkte dafür, dass die vorgeschlagene BLG-Lacton-Bindestelle (**Abb.25**, Komplex 1) zutreffend ist. Interessant anzumerken ist, dass Qin et al. (1998) u.a. genau die hier vorgeschlagene Bindungsposition für das Bindungsvermögen (Assoziation weiterer BLG Monomerunterheiten an diese Bindestelle) von BLG mitverantwortlich macht. Unabhängig davon wurde in der vorliegenden Studie diese Bindestelle mittels Molecular Modelling als mögliche Docking Position für ‚hydrophobe‘ Moleküle erkannt.

Die gefundenen Ergebnisse von Qin et al., (1998) sind im Einklang mit der hier postulierten Bindestelle der Lactone an BLG. Die vorangegangenen Bindungsstudien mittels Molecular Modelling und der experimentellen Bestimmung der Bindungskonstanten zeigten, dass pro Mol BLG-Dimer nur ein Mol γ -Decalacton gebunden wird (cf. **Tab.5 Kap.3**). Betrachtet man sich den Röntgenstrukturkomplex des dimeren BLG's genauer, so fällt auf, dass in der BLG-B-Einheit (cf. **Abb. 31**) die zur A-Einheit homologe Lacton-Bindestelle (Komplex 1 in **Abb.25**) nicht mehr zugänglich ist. Vermutlich ist diese Bindungsposition durch die Anlagerung einer weiteren BLG-Einheit blockiert.

Somit stehen die Molecular Modelling- und experimentellen Ergebnisse in dieser Studie im Einklang mit den Beobachtungen von Qin et al., (1998) und bestätigen ein weiteres mal die Ergebnisse der Molecular Modelling Studien.

In diesem Zusammenhang wären Röntgenstruktur- und/oder NMR-Untersuchungen des BLG-Lacton-Komplexes und Molecular Modelling Bindungsstudien an BLG mit weiteren Verbindungsklassen (z.B. Ester und Ketone) interessant.

Tabelle 7: Einfluss eines Palmitat- bzw. Retinol-Zusatzes auf die Bindungsaffinität von δ - und γ -Decalacton an β -Lactoglobulin (Kompetitive Hemmung)

Zusatz	Konzentration (mmol)	pH	Konzentration γ -Decalacton (mmol)	Gebunden γ -Decalacton (%)
ohne	-	7.0	0.10	29
Palmitat	0.22	7.0	0.10	24
Retinol	0.21	7.0	0.10	25
ohne	-	6.5	0.12	27
Palmitat	0.22	6.5	0.12	28
Retinol	0.21	6.5	0.12	24
ohne	-	7.0	0.87	23
Palmitat	0.22	7.0	0.87	20
Retinol	0.21	7.0	0.95	16
ohne	-	7.0	1.30	18
Palmitat	0.44	7.0	1.30	17
ohne	-	6.5	0.92	21
Palmitat	0.44	6.5	0.92	16
Zusatz	Konzentration (mmol)	pH	Konzentration δ -Decalacton (mmol)	Gebunden δ -Decalacton (%)
ohne	-	7.0	1.1	20
Palmitat	0.22	7.0	1.1	14
Retinol	0.21	7.0	1.1	23

4.4 Quantitative Struktur-Aktivitätsbeziehungen (QSAR) von γ - und δ -Lactonen an β -Lactoglobulin (BLG)

Vergleicht man die mittels AUTODOCK gefundene Bindungsenergie (cf. **Abb. 25**) von z.B. δ -Decalacton (-7.4 kcal/Mol) mit dem experimentell ermittelten Wert von -3.8 kcal/Mol (cf. **Tab.5 Kap.3**), so wird mit AUTODOCK eine um -3.6 kcal/Mol niedrigere freie Bindungsenergie vorhergesagt. Ähnliche Beobachtungen wurden für die anderen Lactone gemacht. Aus diesem Grunde wurde ein thermodynamischer Cyclus, in Anlehnung an den thermodynamischen Cyclus, der in AUTODOCK eingebunden ist, entwickelt, welcher in der Lage ist, die freie Bindungsenergie von Lactonen an BLG vorherzusagen.

Zur Bestimmung der intermolekularen Wechselwirkungsenergie von BLG und Lacton wurde die Software TINKER mit dem Kraftfeld AMBER eingesetzt. Zur Modellierung der Protein-Ligand-Komplexe mussten für das verwendete AMBER Kraftfeld die Parameter (cf. **1.4.3**) für die Verbindungsklasse der Lactone entwickelt werden. So wurden z.B. die

Torsionsinkremente ($20\text{-}30^0$) für ausgewählte Strukturelemente, die den Lactonen bzw. der Esterstruktur entsprechen, mittels **Gaussian98** (Basissatz: 6-31G*) erzeugt und die relative Energie berechnet. Die so erhaltenen Potentialkurven der Strukturelemente wurden dann in Fourierserien überführt (Beispiele ausgewählter Torsionen in **Abb.26**). Die entwickelten Parameter (Torsionen, Bindungswinkel, Bindungslänge und Partialladungen) für die Verbindungsklasse der Lactone sind in der **Tab.8** zusammengestellt.

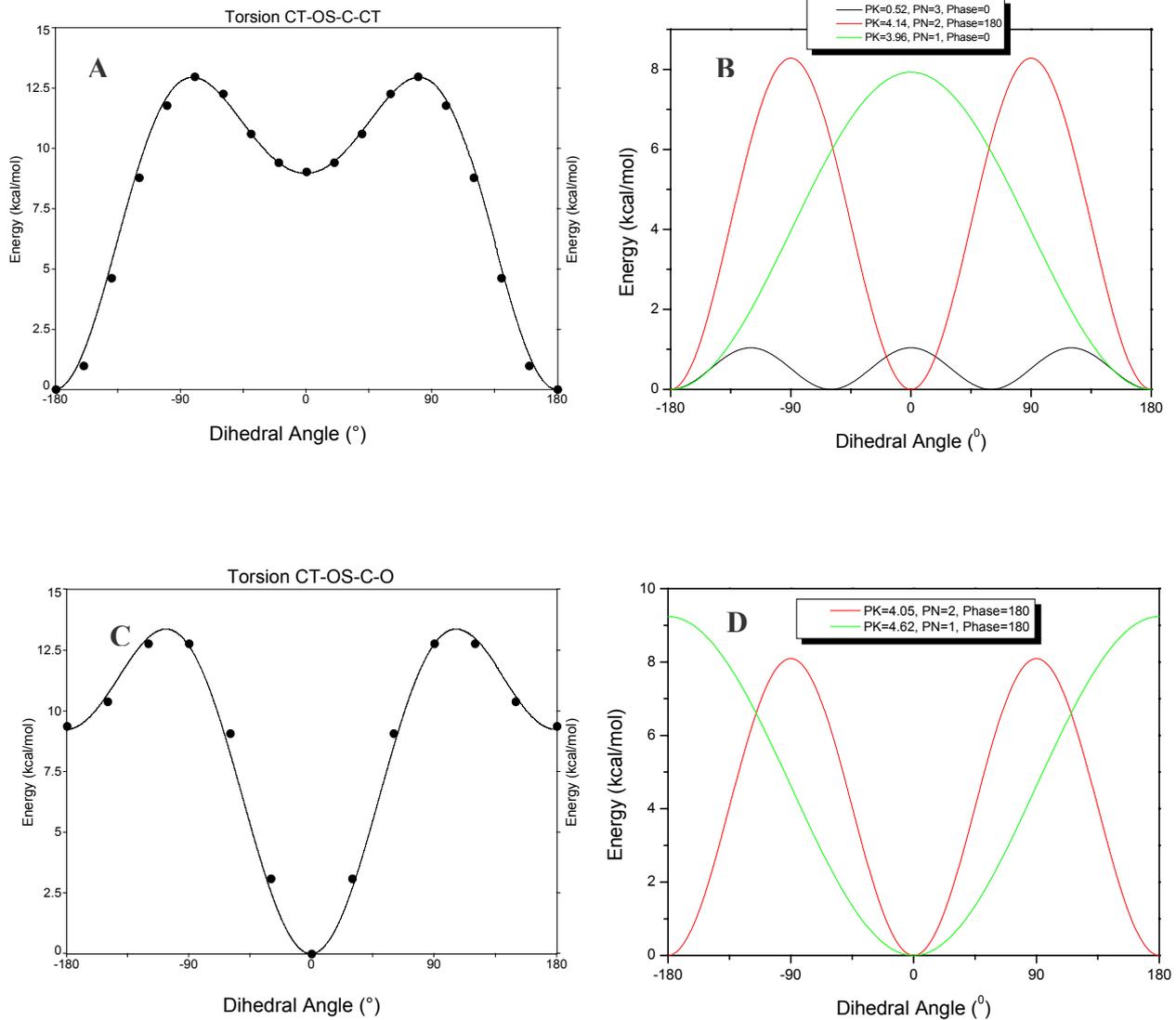
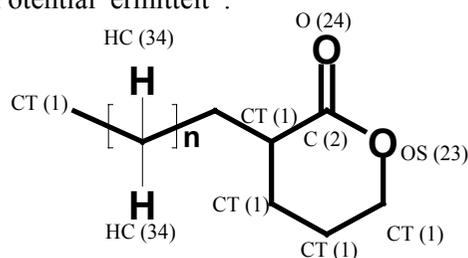


Abb. 26: Entwicklung von Torsionsparametern für das **AMBER 94** Kraftfeld. Ausgewählte Torsions-Potentialkurven (**A** und **C**, relative Energien, kcal/mol) ermittelt durch **Gaussian98** (Basissatz: 6-31G*). Die Potentialkurven von **A** und **C** wurden mittels **TABLE CURVE 2D** [implementierte Funktionen (F_n , $n = 1-9$, X-Variable: Torsionswinkel, Y-Variable: Energie, kcal/mol):
 $F1=DTOR(X)$, $F2=DTOR(A2)$, $F3=(A0)*(1+COS((F1)*A1-F2))$,
 $F4=(A3)*(1+COS((F5)*A4-F6))$, $F5=DTOR(X)$, $F6=DTOR(A5)$,
 $F7=(A6)*(1+COS((F8)*A7-F9))$, $F8=DTOR(X)$, $F9=DTOR(A8)$, Fit: $Y=F3+F4+F7$]
in die jeweiligen Fourierserien überführt (**B** und **D**).

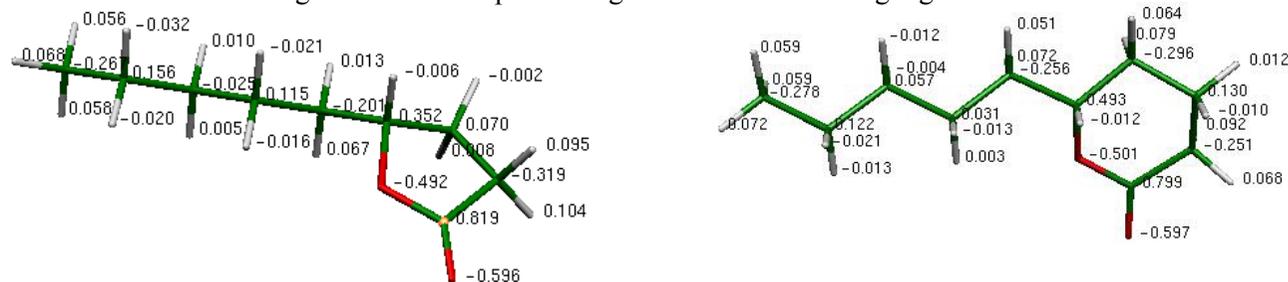
Tabelle 8: Ladungs-, Bond-Stretching-, Angle-, Torsions-, Improper Torsions-Parameter und Atomladungen von Lactonen zur Implementierung in das AMBER 94 Kraftfeld^{a)}

Atomtyp ^{b)} (Tinker Numerierung)	Bond- Stretching Parameter	Angle Parameter	Dihedral Angle IDIVF, PK, Phase, PN	Improper Torsion
O (24)	C (2) - OS (23) 450, 1.333	O (24) - C (2) - OS (23) 80, 119.7	CT (1) - C (2) - OS (23) - CT (1) 1, 0.52, 0, -3 1, 4.14, 180, -2 1, 3.96, 0, 1	CT (1) - O (24) - C (2) - OS (23) 10.500, 180.0, 2
OS (23)		OS (23) - C (2) - CT (1) 80, 118.1	OS (23) - C (2) - CT (1) - HC (34) 1, 0.26, 0, 3	HC (34) - CT (1) - CT (1) - OS (23) 10.500, 180.0, 3 (United Atom FF)
C (2)	C (2) - OS (23) - CT (1) 80, 124.3	OS (23) - C (2) - CT (1) - CT (1) 1, 0.33, 0, -3 1, 0.14, 180, -2 1, 0.50, 0, 1		
CT (1)		OS (23) - CT (1) - HC (34) 50, 106.8	C (2) - OS (23) - CT (1) - CT (1) 1, 1.21, 0, 1	
HC (34)			C (2) - OS (23) - CT (1) - HC (34) 1, 0.68, 0, 3 O (24) - C (2) - OS (23) - CT (1) 1, 4.05, 180, -2 1, 4.62, 180, 1	

a) Die Parameter Entwicklung für die Verbindungsklasse der Lactone erfolgte nach Vorgaben der **AMBER** Homepage (s. Parameter Development). Die Torsionsenergien wurden mittels Gaussian98W berechnet (HF/6-31G*, opt=modredundant, scan, 20 - 30° Inkremente) und die erhaltene Potentialkurve mittels **TABLE CURVE 2D** in Fourier Serien überführt (cf. **Abb. 26**). Die Bindungslänge C (2)-OS (23) in Lactonen wurde mittels **Gaussian98** (HF/6-31G*) ermittelt. Die Atomladungen wurden mittels Gaussian98 nach geometrischer Optimierung unter Vakuumbedingungen aus dem elektrostatischen Potential ermittelt^{c)}.



b) Atomtyp


 c) Atomladungen z.B. für R- γ -Nonalacton und R- δ -Decalacton (**Gaussian98**, Parameter: HF/6-31G*, Prop=fitcharge, opt)

Die Parameter van der Waals- (ΔG_{vdW}) und elektrostatische Wechselwirkungsenergie ($\Delta G_{\text{Elekt.}}$), intramolekulare Ligandenergie, Anzahl frei drehbarer Ligandbindungen ($\Delta G_{\text{Konform.}}$) und Hydrophobizitätsindex (ΔG_{LogP}), die zur Berechnung der freien Bindungsenergie verwendet wurden, sind in der **Tab.9** aufgeführt.

Die quantitative Struktur-Aktivitätsbeziehung der freien Bindungsenthalpie der Lactonkomplexierung an BLG wurde nach folgender Gleichung (**4-3**) mittels statistischer Methoden entwickelt:

$$\Delta G = \Delta G_{\text{vdW}} + \Delta G_{\text{Elekt.}} + \Delta G_{\text{Konform.}} + \Delta G_{\text{LogP}} \quad (4-3)$$

Die ersten vier Terme der Gleichung berücksichtigen die Dispersion-Repulsion-, Wasserstoffbindungs-, elektrostatische- und intramolekulare Bindungsenergie. ΔG_{Tor} bestimmt die Translations- und Rotations-Energie (positiver Beitrag (ungünstiger) zur freien Bindungsenergie). $\Delta G_{\text{Lösung}}$ ist die freie Solvatisierungs- bzw. Desolvatisierungsenergie, die negativ (günstig) zur Bindungsenergie durch Entropieerhöhung beiträgt. Die Berechnung erfolgte auf Basis von Moleküloberflächen.

Der aus **AUTODOCK** erhaltene Ligand-Proteinkomplex mit der niedrigsten freien Bindungsenergie (**Abb. 25**, Komplex 1) wurde in **TINKER** mittels Molekular Dynamik-Simulationen weiter untersucht. Der minimierte R- γ -Decalacton- BLG-Komplex ist in der **Abb. 30** und der minimierte R- δ -Decalacton- BLG-Komplex in der **Abb. 31** dargestellt. Die oben beschriebenen Untersuchungen wurden für alle in der **Tab.9** aufgeführten Verbindungen durchgeführt.

Eine Detaildarstellung der Bindungsposition von monocyclischen γ - und δ -Lactonen an BLG nach Molecular-Dynamic und Minimierung der Komplexe mittels **AMBER** ist am Beispiel von δ -Decalacton in der **Abb. 27** dargestellt. Eine schematische Darstellung (**Abb. 28**) zeigt die an der Bindung der Lactone beteiligten Aminosäuren im Überblick (max. Lacton-Aminosäure-Abstand 4Å).

Die mittels **AMBER** ermittelten Wechselwirkungsenergien der untersuchten Lacton-BLG-Komplexe sind in der **Tab. 9** aufgeführt.

Tabelle 9: Energiebeiträge (E_{vdW} , E_{Elek} , E_{Intra} , E_{Tors} , E_{LogP}) zur Freien Bindungsenthalpie (ΔG , kcal/mol) von Lactonen an β -Lactoglobulin (Dimer)

Ligand	Intermolekulare Van der Waals Wechselwirkungsenergie Protein-Ligand ^{a)} (E_{vdW} , kcal/mol)	Intermolekulare elektrostatische Wechselwirkungs-Energie Protein-Ligand ^{b)} (E_{Elek} , kcal/mol)	Intramolekulare Energie Ligand ^{c)} (E_{Intra} , kcal/mol)	Anzahl (n) frei rotierbarer Ligand Bindungen ^{d)} (E_{Tors})	Verteilungs-Koeffizient Ligand Octanol/Wasser ^{e)} (E_{LogP} , kcal/mol)	Freie Bindungsenthalpie Protein-Ligand ^{f)} (ΔG , kcal/mol)
R-γ-Undecalacton	-36.68	-18.76	2.20	6	-4.50	-5.13
S-γ-Undecalacton	-37.19	-18.62	2.33	6	-4.50	-5.13
R-γ-Decalacton	-34.86	-18.99	2.56	5	-3.71	-4.10
R-γ-Nonalacton	-32.53	-19.39	2.38	4	-2.66	-3.18
R-γ-Heptalacton	-29.30	-19.47	1.70	2	-0.88	-1.43 \pm 0.19 ^{g)}
R-δ-Undecalacton	-35.93	-18.91	2.57	5	-3.99	-4.38
S-δ-Undecalacton	-34.65	-21.36	4.12	5	-3.99	-4.38
R-δ-Decalacton	-34.98	-18.15	2.40	4	-3.19	-3.81

a)- Molecular Modeling Programm **TINKER** (Linux): Lennard-Jones Potential Funktion, **AMBER 94** Parameter für Protein, Lacton Parameter siehe **Tab. 8**.

b)- Molecular Modeling Programm **TINKER** (Linux): Coulomb's Ladungs-Potential Funktion, **AMBER-94** Parameter für Protein, Lacton Parameter:

Atomladung kalkuliert mit Gaussian98W (Basissatz HF/6- 31G*, Prop=fitcharge, Opt) aus dem elektrostatischen Potential an der Van der Waals Oberfläche.

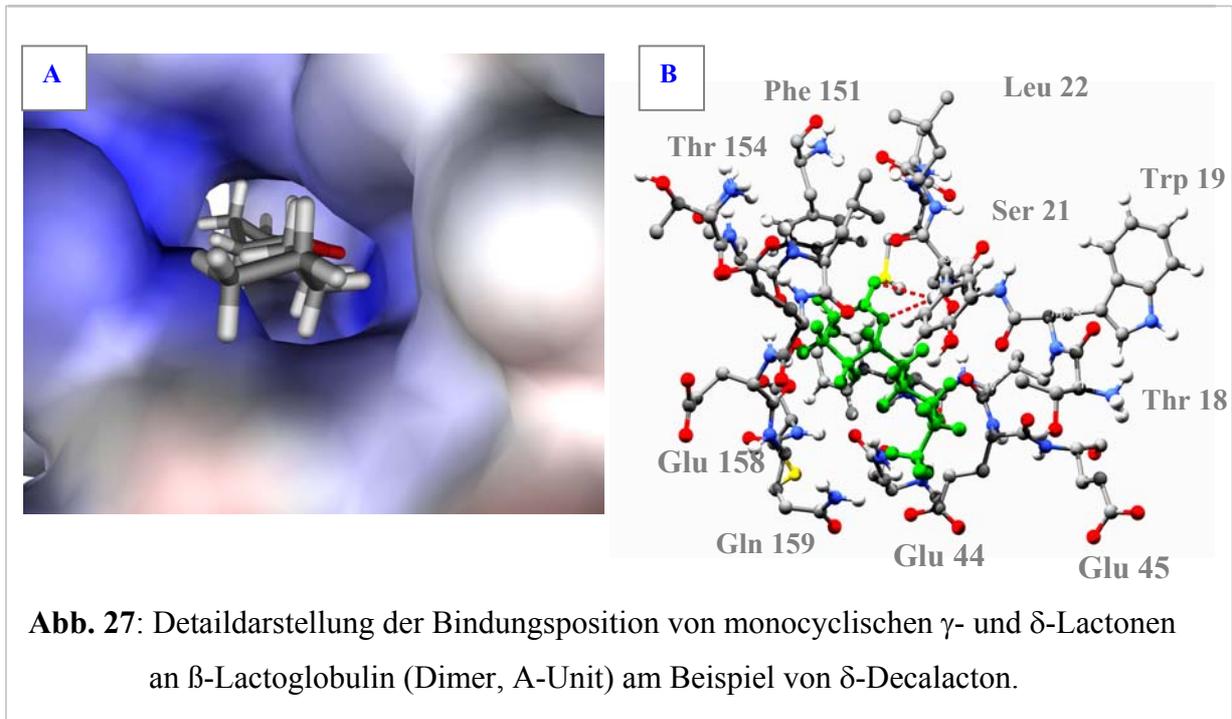
c)- Molecular Modeling Programm **TINKER** (Linux): E_{Intra} (kcal/mol) = ΔE | Intramolekulare Energie (Ligand_{min}) – Intramolekulare Energie (Ligand_{Komplex}) | ; intramolekulare Van der Waals 1-4- (Scaling-Faktor: 2.0) und intramolekulare Ladungs- 1-4- (Scaling-Faktor: 1.2) Wechselwirkungen wurden miteinbezogen.

d)- E_{Tors} : Anzahl (n) frei rotierbarer C-C Bindungen (nicht C-CH₃) im Ligand, die bei einer Protein-Ligand-Wechselwirkung eingefroren werden.

e)- Experimentell bestimmter Ligand-Hydrophobizitätsparameter (LogP_{Octanol/Wasser}): E_{LogP} (kcal/mol) = ΔG (kcal/mol) = - RT ln K (T = 298.15⁰K, K: Gleichgewichts-Verteilungskonstante Octanol/Wasser, siehe **Tab. 6**)

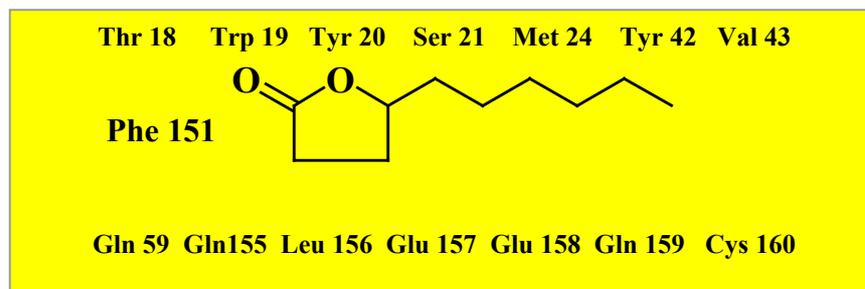
f)- Experimentell bestimmte Bindungsenergie (ΔG , kcal/mol) = - RT ln K (T = 298K, K= Assoziationskonstante Ligand-Protein, siehe **Tab.5** Kap.3)

Bindungsenergie berechnet. ΔG = -1.43 kcal/mol entspricht einer Bindungskonstante von 11 M⁻¹ \pm 1.5 (Exp.: < 50 M⁻¹)



A: VdW-Oberfläche und Hydrophobität der Lacton-Bindetasche (Farbkodierung: blau = hydrophob, rot = hydrophil, Ligand: R- δ -Decalacton).

B: R- δ -Decalacton in der Lacton-Bindetasche des β -Lactoglobulin-Dimers (an der Bindung beteiligte Aminosäuren mit einem maximalen Abstand von 6 Å zu R- δ -Decalacton (Farbkodierung: grün) sind dargestellt; Wasserstoffbrückenbindung (----) zwischen **Ser 21** (β -Lactoglobulin, A-Unit, N-H) und R- δ -Decalacton (CO, -O-).



Es wurden starke van der Waals Wechselwirkungen festgestellt, die mit steigender Kohlenstoffzahl des Lactons zunehmen. Die Ergebnisse der Korrelation der freien Bindungsenergie gegenüber den in der **Tab. 9** aufgeführten Variablen (Van der Waals-, elektrostatische Wechselwirkungsenergie, Differenz der intramolekularen Ligandenergie vor und nach der Bindung an BLG, frei rotierbare Bindungen im Ligand und Verteilungskoeffizient in Octanol/Wasser) ist in **Abb. 29** gezeigt.

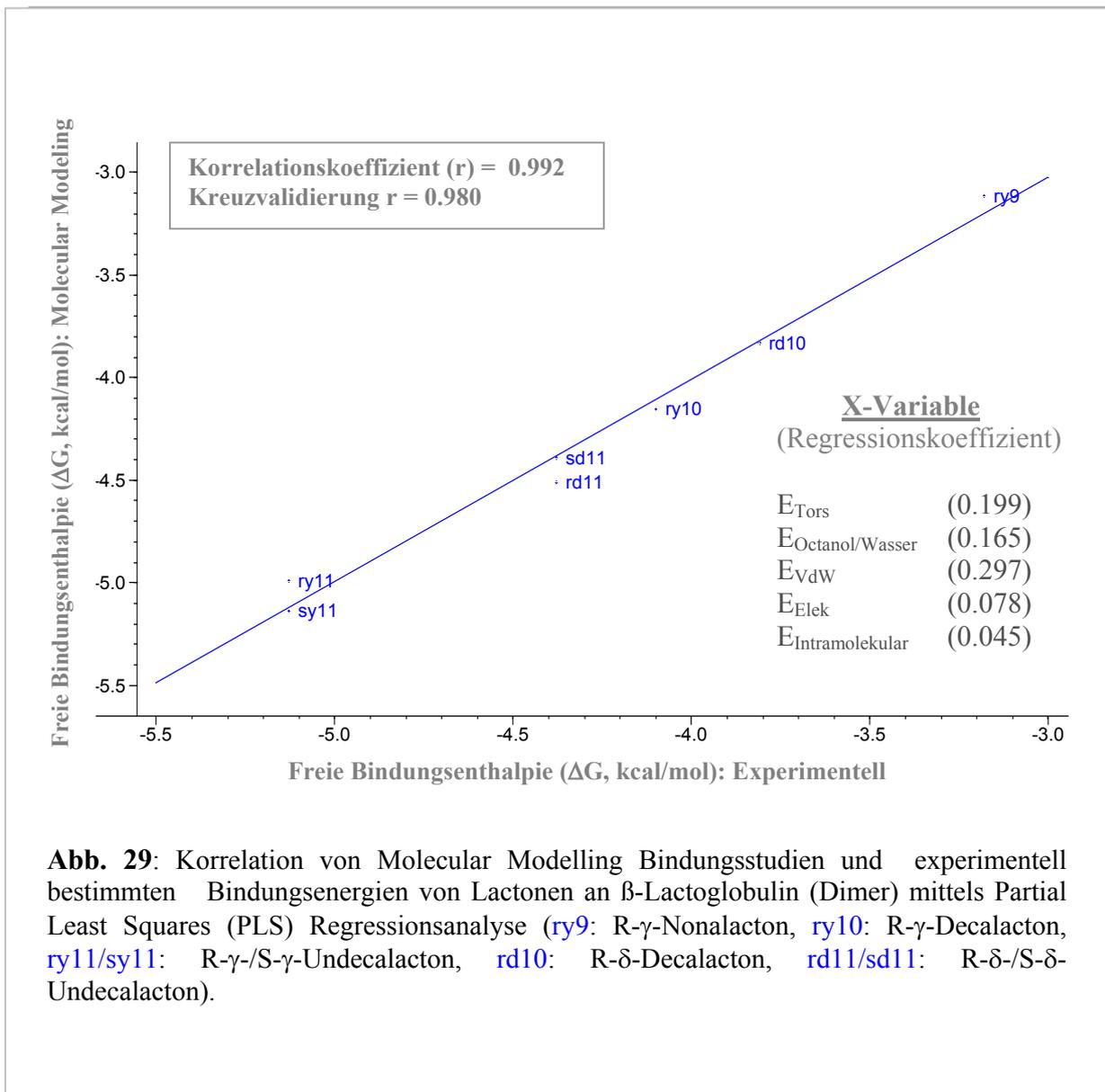


Abb. 29: Korrelation von Molecular Modelling Bindungsstudien und experimentell bestimmten Bindungsenergien von Lactonen an β -Lactoglobulin (Dimer) mittels Partial Least Squares (PLS) Regressionsanalyse (ry9: R- γ -Nonalacton, ry10: R- γ -Decalacton, ry11/sy11: R- γ -/S- γ -Undecalacton, rd10: R- δ -Decalacton, rd11/sd11: R- δ -/S- δ -Undecalacton).

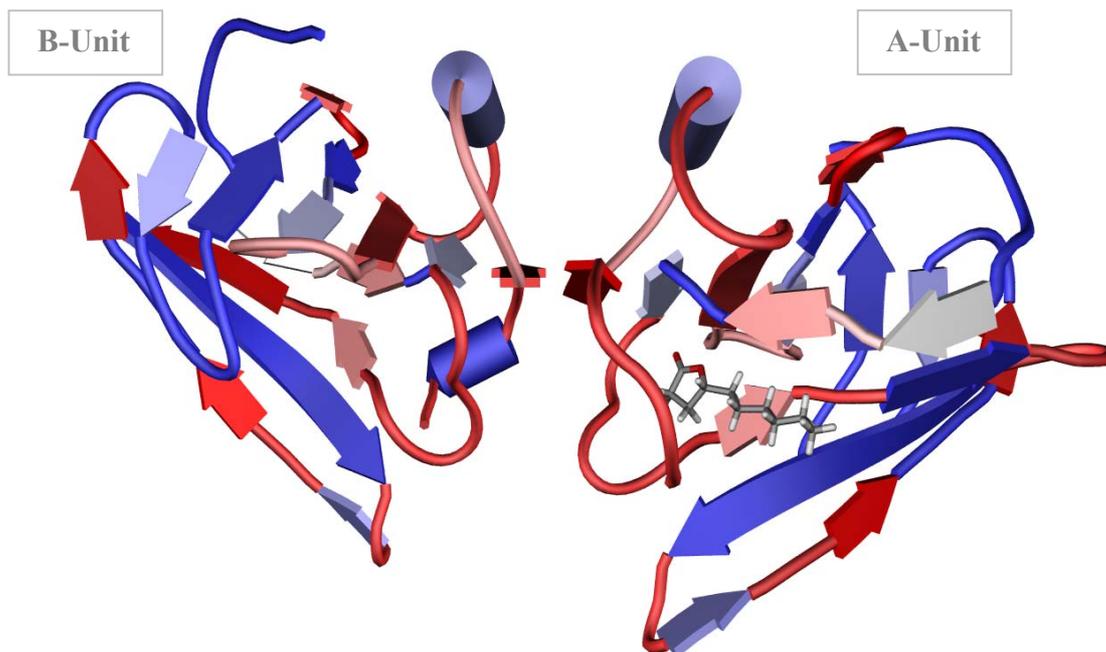


Abb. 30: Bindungsposition von R- γ -Decalacton an β -Lactoglobulin (Dimer, A-Unit) ermittelt durch **AUTODOCK**. Energieminimierte Struktur des stabilsten Protein-Ligand-Komplexes ermittelt durch **TINKER** (Parameter: **AMBER 94** und Tab.; Molecular **Dynamic**- (Simulationsdauer: 10 ps, Zeitschritte: 1fs, statistisches mechanisches Ensemble:NPT [$T = 300^0\text{K}$, 1 atm], Velocity Verlet Algorithmus, Schnappschuss jeweils nach 1 ps) und **Minimize**- (10 Strukturen aus MD-Simulation, L-BFGS, RMSD: 0.01kcal/mol) Modul; Allg. Bedingungen: flexibler Ligand und Aminosäuren-Seitenketten in der Lacton-Bindetasche von β -Lg: Thr 18, Trp 19, Tyr 20, Ser 21, Leu 22, Met 24, Tyr 42, Val 43, Glu 44, Gln 59, Phe 151, Gln 155, Leu 156, Glu 157, Gln 159 und Cys 160).

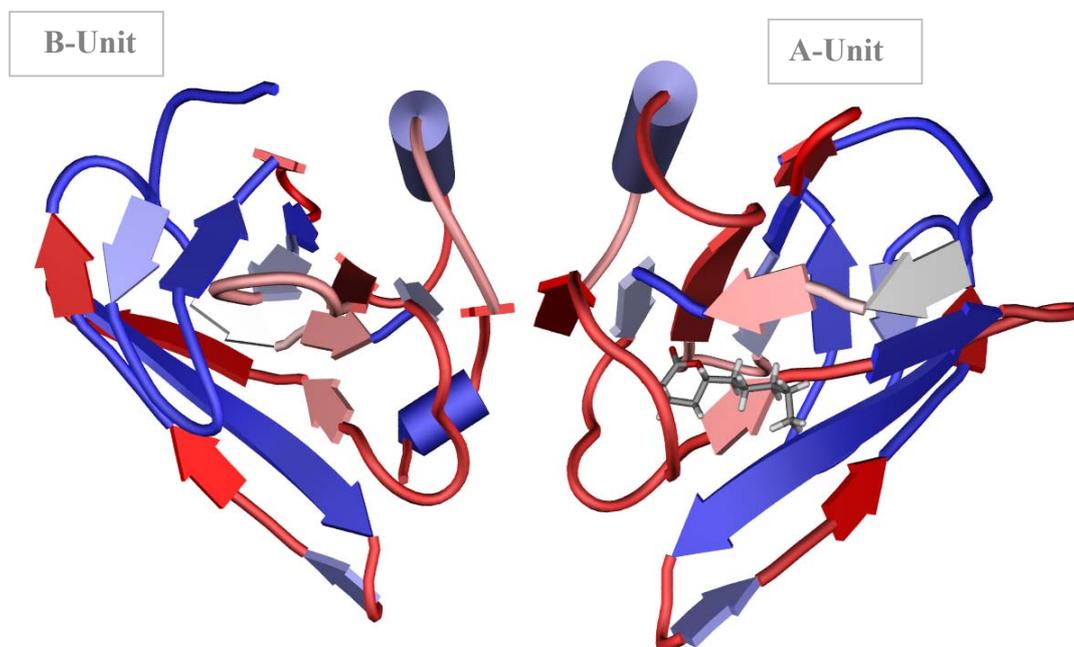


Abb. 31: Bindungsposition von R- δ -Decalacton an β -Lactoglobulin (Dimer, A-Unit) aus **AUTODOCK**. Energieminimierte Struktur des stabilsten Protein-Ligand-Komplexes ermittelt durch **TINKER** (Bedingungen siehe **Abb.30**).

Die experimentell ermittelten freien Bindungsenergien wurden gegenüber den über Molecular Modelling ermittelten Daten aufgetragen. Die Regressionsanalyse wurde mittels PLS (Partial-Least-Square Regression) durchgeführt. PLS ist ein Regressionsverfahren der multivariaten Datenanalyse zur Interpretation einer oder mehrerer abhängiger Aktivitätsvariablen durch unabhängige Strukturvariablen und eine verbreitete Rechenmethode, die mit solchen in der Dreidimensionalen QSAR-Analitik gebräuchlichen X-Matrizen (gesamte Deskriptorbeträge pro Verbindung) umgehen kann (Wold et al., 1993). So wird eine sogenannte Faktoranalyse bzw. Zusammenhang versucht zu finden, um den vielen gemessenen Daten wenige gemeinsame Faktoren zuzuordnen. Der erhaltene Korrelationskoeffizient von 0.992 (Kalibrierung) und der Koeffizient der Kreuzvalidierung von 0.98 zeigt die Güte des Modells. Bemerkenswert ist auch die richtige Vorhersage der S/R-Enantiomeren der Lactone, die gleiche bzw. eine ähnliche Bindungsenergie aufweisen. Die eigenen Untersuchungen zur Enantioselektivität der Lacton-Bindung an BLG und RSA haben gezeigt, dass die einzelnen Enantiomere mit gleicher Affinität an BLG bzw. RSA binden (mittels enantioselektiver Gaschromatographie wurde die Enantiomerenverteilung von R- γ - und S- γ -Decalacton bzw. R- δ - und S- δ -Decalacton nach einer Bindung an BLG und Isolierung aus dem Komplex untersucht; Enantiomerenverteilung in beiden Fällen 50:50 (cf. **Abb. 17**).

In **Abb. 32** ist der Einfluss ausgewählter Parameter (van der Waals- und elektrostatische Wechselwirkung; Log P und intramolekulare Energie) auf die freie Bindungsenergie von Lactonen an BLG dargestellt. So tragen fallende van der Waals- und elektrostatische Energien (stark negative Werte) zu einer höheren Bindungsaffinität bei.

Eine Regressionsanalyse mit der MLR Methode unter Einbeziehung von nur zwei Variablen, wie der van der Waals- und der elektrostatischen Wechselwirkungsenergie (**Abb. 33**), zeigt einen schlechteren, aber immer noch akzeptablen Korrelationskoeffizient von 0.976, allerdings ist die Kreuzvalidierung mit einem Wert von $r = 0.893$ deutlich schlechter als das PLS-Modell.

Somit scheinen nicht nur die van der Waals- und elektrostatischen Wechselwirkungen für die Bindungsaffinität von Bedeutung zu sein, sondern weitere Faktoren wie Rotationsfreiheitsgrade und Lipophilität (kodiert im LogP Wert). Die Bedeutung der Lipophilität wurde bereits im vorangegangenen Abschnitt erkannt.

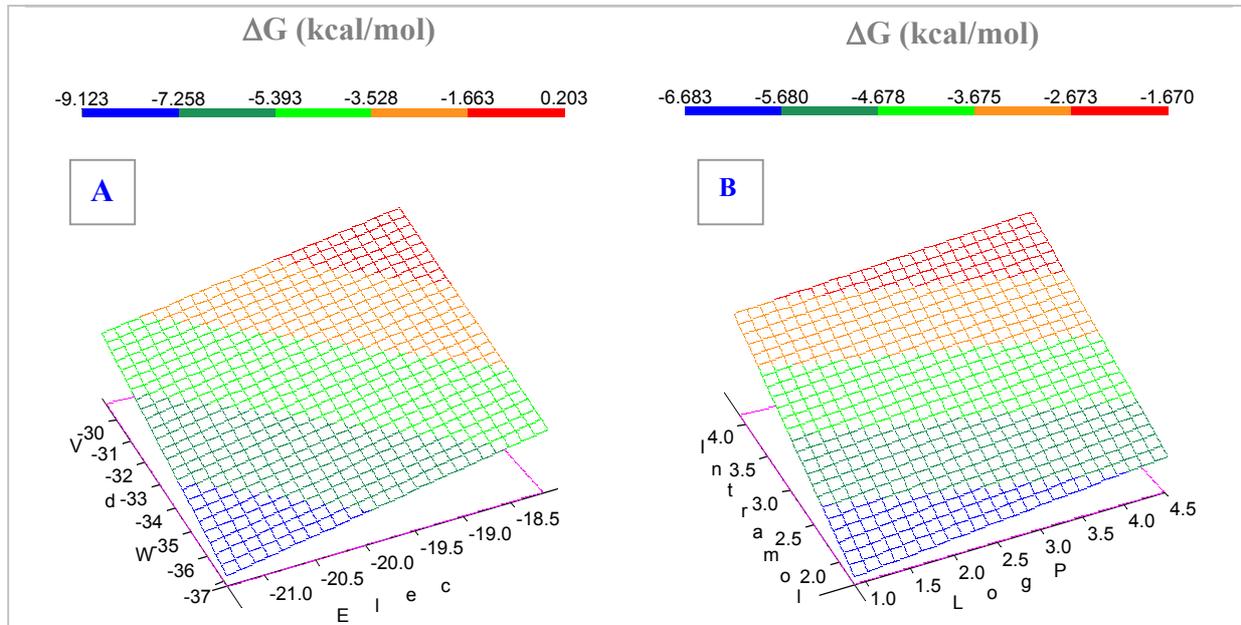


Abb. 32: Einfluss ausgewählter Variablen (kcal/mol, **A:** $E_{\text{Van der Waals}}$, $E_{\text{Elektrostatisch}}$; **B:** E_{LogP} (Octanol/Wasser), $E_{\text{Intramolekular}}$) auf die Bindungsenergie ΔG (kcal/mol) von Lactonen an β -Lactoglobulin (Kontur Darstellung, Partial Least Square Regression).

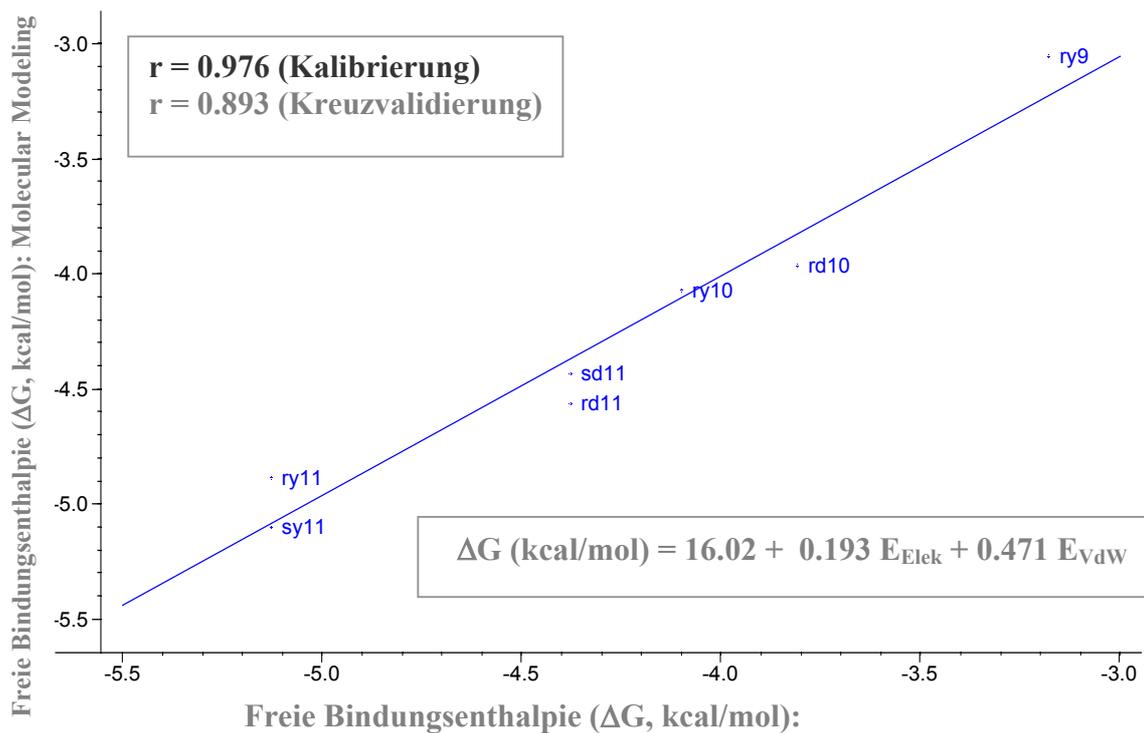


Abb. 33: Korrelation von Molecular Modeling Bindungsstudien (Software Tinker) und experimentell bestimmten Bindungsenergien von Lactonen an β -Lactoglobulin (Dimer) mittels Multipler Linearer Regressionsanalyse (MLR, Variablen: E_{Elek} und E_{VdW}) (ry9: R- γ -Nonalacton, ry10: R- γ -Decalacton, ry11/sy11: R- γ -/S- γ -Undecalacton, rd10: R- δ -Decalacton, rd11/sd11: R- δ -/S- δ -Undecalacton).

4.5 Quantitative Struktur-Aktivität-Beziehungen (QSAR): Vergleich von Literaturdaten und mit eigenen Studien.

Bindungskonstanten verschiedener Liganden an BLG und RSA wurden aus der Literatur in der **Tab.10** bzw. **Tab. 11** zusammengefasst.

Ein Vergleich der Bindungskonstanten der Lactone an BLG (cf. **Tab. 5**) aus eigenen Studien mit den in **Tab. 10** aufgeführten Verbindungen zeigt, dass Liganden mit gleicher Kohlenstoffzahl ähnliche Bindungskonstanten besitzen: γ -Heptalacton mit 7 Kohlenstoffatomen besitzt eine Assoziationskonstante von $K_A = 5.1 \times 10^1 \text{ M}^{-1}$, Ethylfuraneol mit gleicher Kohlenstoffzahl eine Assoziationskonstante von $K_A = 4 \times 10^1 \text{ M}^{-1}$. Propylacetat, Ethylpropionat und Methylbutyrat mit jeweils 5 Kohlenstoffatomen zeigen Assoziationskonstanten von $K_A = 1.3 \times 10^1 \text{ M}^{-1}$ bzw. $K_A = 1.4 \times 10^1 \text{ M}^{-1}$. Für γ -Decalacton mit 10 Kohlenstoffatomen ergab sich aus eigenen Studien eine K_A von 1.0 bzw. $2.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (cf. **Tab.5**). Ähnliche Bindungskonstanten wurden auch für Eugenol ($K_A = 1.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$), Limonen ($K_A = 2.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) und α -Menthon ($K_A = 1.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$), die gleiche Kohlenstoffzahlen wie γ -Decalacton besitzen, beschrieben.

Die Bindungskonstanten unterschiedlicher Liganden an RSA (**Tab.11**) zeigen deutlich, dass die Fettsäuren Ölsäure ($K_A = 2.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) und Stearinsäure ($K_A = 1.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) die höchsten Assoziationskonstanten besitzen. Die Bindungskonstanten in der Verbindungsklasse der Fettsäuren steigen mit zunehmender Kohlenstoffzahl an. Dies macht ein weiteres mal deutlich, dass die Bindungsstärke abhängig von der Hydrophobität einer Verbindung ist. Die Stearinsäure zeigt eine um ca. den Faktor 10000 höhere Bindungsaffinität als z.B. das δ -Undecalacton ($K_A = 1.6 \times 10^4$).

Ein Vergleich der Bindungskonstanten von Verbindungen an RSA mit ähnlicher Kohlenstoffzahl (z.B. 2-Heptanon mit einer $K_A = 2.7 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, γ -Heptalacton mit einer $K_A = 2.3 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ und δ -Heptalacton mit einer $K_A = 6.5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$) zeigt auch für RSA die für BLG beobachtete Abhängigkeit von der Hydrophobität.

Allerdings lassen sich die oben beschriebenen Zusammenhänge zwischen Bindungskonstante und Hydrophobität nicht für alle Verbindungen beobachten. L-Tryptophan ($K_A = 0.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) und D-Tryptophan ($K_A = 0.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) besitzen die gleiche Hydrophobität jedoch deutlich unterschiedliche Bindungskonstanten. Im Vergleich mit eigenen Studien zeigen z.B. δ -Nonalacton und γ -Octalacton ($K_A = 0.81 \times 10^3$ bzw. $0.95 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) ähnliche Bindungskonstanten wie L- und D-Tryptophan.

Zur Erkennung von quantitativen Zusammenhängen zwischen Struktur und Bindungsaffinität wurden QSAR Studien durchgeführt. Hierzu wurden die strukturellen Eigenschaften verschiedener Liganden (90 Liganden) mit **DRAGON-3.0** (Todeschini und Consonni, 2000) berechnet und anschließend mittels statistischer Methoden (PLS- und PCA-Analyse) mit ihren Bindungsaffinitäten an BLG (cf. **Tab. 10**) korreliert. Die Liganden, die zur statistischen Analyse eingesetzt wurden, sind in der **Tab 10** (Verbindung Nr.: 1-5; 7-24; 26-55; 57; 59-76 und 78-89) und **Tab. 5** aufgeführt.

Die molekularen Eigenschaften von Verbindungen sind chemische Information, die verschlüsselt innerhalb einer molekularen (symbolischen) Darstellung vorliegen. Für die Bestimmung der QSAR Eigenschaften, der in der **Tab. 10** und **Tab. 5** aufgeführten Verbindungen wurde das Softwarepaket **DRAGON** eingesetzt. Die Berechnung der Deskriptoren (Anzahl: 1497), erfolgte aus den generierten dreidimensionalen Raumstrukturen der Moleküle. Die zur Berechnung herangezogenen Molekülparameter lassen sich in folgende 18 Hauptgruppen einteilen:

- Konstitutions- Deskriptoren (47 Deskriptoren)
- Topologie Deskriptoren (266 Deskriptoren)
- Molekular Walk Counts (21 Deskriptoren)
- BCUT (B=Frank Burden C= Chemical Abstracts Service UT=University of Texas (Bob Pearlman)) ist eine Art topologischer Index, basierend auf dreidimensionalen Strukturen der Moleküle (64 Deskriptoren)
- Galvez topologischer Ladungsindex (21 Deskriptoren)
- 2D Autokorrelation (96 Deskriptoren)
- Ladungs-Deskriptoren (14 Deskriptoren)
- Aromatizität Index (4 Deskriptoren)
- Random Molekular Profil, welche die Londonkräfte in Ligand Fragmenten in Bezug auf die molekulare Refraktivität sowie der strukturellen Eigenschaften der Moleküle berechnet (41 Deskriptoren)
- Geometrische Deskriptoren (70 Deskriptoren)
- RDF radiale Verteilungsfunktion - Radial Distribution Funktion (150 Deskriptoren)
- 3D-MoRSE - **3D-M**olecule **R**epresentation of **S**tructures based on **E**lectron diffraction (160 Deskriptoren)

- WHIM - Weighted Holistic Invariant Molecular, ein geometrischer Deskriptor wie der Gravitationsindex, welcher die Molekularfläche und das Volumen darstellt (99 Deskriptoren)
- GETAWAY-Geometry, Topology and Atoms-Weighted Assembly (197 Deskriptoren)
- Funktionelle Gruppe (121 Deskriptoren)
- Atom-Centered (120 Deskriptoren)
- Empirische (3 Deskriptoren)
- Molekular Eigenschaften (3 Deskriptoren)

Mittels PCA-Analyse wurden diejenigen Deskriptoren erkannt, die den Datensatz am besten beschreiben. Anschließend wurden die verbleibenden Deskriptoren und die Bindungsaffinitäten der Liganden mittels PLS-Analyse weiter verarbeitet. Die Berechnungen zeigten, dass der Datensatz mit den folgenden 4 molekularen Eigenschaften am besten beschrieben werden kann:

- Topologischer Deskriptor: **HyDp** (hyper-distance-path index; Diudea, 1996)
- Deskriptor aus der Hauptgruppe RDF (radiale Verteilungsfunktion): **RDF115e** (Hemmer et al., 1999) (weighted by atomic Sanderson electronegativities)
- Deskriptor aus der Hauptgruppe der molekularen Eigenschaften: **MR** (molare Refraktivität; Viswanadhan et al., 1998)
- Wiener Index: **W3D**

Die molar Refraktivität **MR** ist ein Deskriptor der nach Gleichung (4-4) berechnet wird.

$$\text{MR} = \text{M}/\rho \left[\frac{(n^2 - 1)}{(n^2 + 2)} \right] \quad (4-4)$$

M ist die Molekülmasse, **ρ** ist die Dichte und **n** ist der Brechungsindex. Aus der Gleichung geht hervor, dass die molare Refraktivität sich aus der Größe des Molvolumens **MV = M/ρ** und des Brechungsindex **n** zusammensetzt und somit eine Aussage über räumliche Dimensionen des Moleküls (Ausdehnung) zulässt.

Der Radiale Verteilungsfunktion Deskriptor (RDF) ist eine statistische Funktion, die die Atomverteilung um die Lage eines Atoms in einer Struktur berechnet (oft verwendet in Molekularsimulationen zur Bestimmung von Atomabständen benachbarter Moleküle). Die

RDF gibt somit an, in welcher Position sich ein bestimmtes Atom befindet und wie viele Atome man mit dem Radius r um das betrachtete Atom findet (siehe **Abb. 34**)

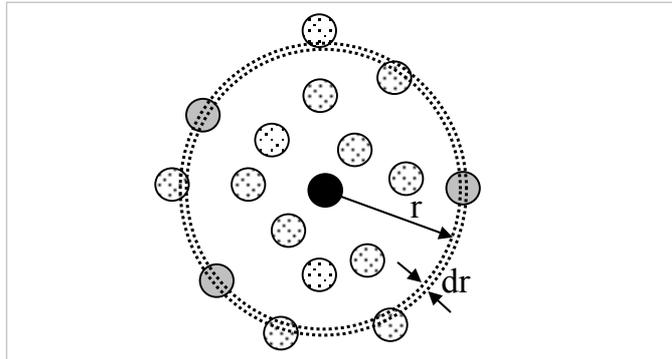


Abb. 34: Schematische Darstellung des Radius der Atome bezogen auf das Referenzatom (schwarze Kugel)

Die radiale Verteilungsfunktion erlaubt Aussagen über Translationen und berechnet mit einer Integralgleichung (gemittelte Struktur) die thermodynamischen Eigenschaften wie Druck und Energie.

Die Gleichung für die Radiale Verteilungsfunktion ist nachfolgend dargestellt:

$$g(r) = \sum_j^N \sum_i^{N-1} a_i a_j \exp \left[-b (r - r_{ij})^2 \right] \quad (4-5)$$

Dabei ist a_i eine bestimmte Eigenschaft von Atom i (z.B. Elektronegativität); r_{ij} ist der Abstand zwischen Atom i und j ; b ist der Glättungsparameter oder Smoothing Parameter und N die Atomzahl des Moleküls.

Mittels zwei PC's (principle components) konnten mit den oben beschriebenen 4 molekularen Eigenschaften 84% der Bindungsdaten nach Kalibrierung und 67% nach Kreuzvalidierung erklärt werden.

Für die 90 Liganden ergab die Kalibrierung und Validierung aus vorhergesagten (predicted) gegenüber den gemessenen Bindungskonstanten eine Korrelation (Kalibrierung) von $r^2 = 0.848$ und die Kreuzvalidierung von $r^2 = 0.656$. Diese Werte zeigen, dass das statistische Modell nur eine mäßige Vorhersage von Bindungsdaten anhand von molekularen Deskriptoren zulässt. Allerdings lässt sich mittels der oben beschriebenen PLS-Analyse eine Abschätzung der Bindungsdaten unbekannter Verbindungen sehr einfach und schnell durchführen. Zur exakten Vorhersage von Bindungskonstanten unbekannter Verbindungen muss die in dieser Arbeit entwickelte und beschriebene Methode (cf. Abschnitt 4.4) eingesetzt werden.

Tabelle 10: Bindungskonstanten (Assoziationskonstante K_A) und Bindungsseiten n ausgewählter Verbindungen an β -Lactoglobulin (BLG)

Nr.	Verbindung	K_A (M^{-1})	Globale K_A ($n \times K_A$)	n	pH-Wert	Methode	Autor
01	Abhexon		8.2×10^1		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
02	Benzaldehyd (Bittermandelöl)	3.4×10^2 6.2×10^6		1	3.0 6.0	Affinitätschromatographie Spectrofluorimetrie	Sostmann und Guichard (1998) Marin und Relkin (2000)
03	Butylacetat (Essigsäurebutylester)		8.1×10^1		3.0	Affinitätschromatographie	Pelletier et al., (1998)
04	Butylbutyrat		4.7×10^2	0.78	3.0	Affinitätschromatographie	Pelletier et al., (1998)
05	Butylformiat		5.3×10^1		3.0	Affinitätschromatographie	Pelletier et al., (1998)
06	Butylpentanoat		5.3×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Pelletier et al., (1998)
07	Butylpropionat		1.9×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Pelletier et al., (1998)
08	(-)-Carveol		5.4×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
09	(-)-Carvon		7.5×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
10	p-Cresol		4.4×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
11	γ -Decalacton	3.2×10^3			3.0	Affinitätschromatographie	Sostmann und Guichard (1998)
12	β -Damascenon	6.1×10^3			3.0	Affinitätschromatographie	Sostmann und Guichard (1998)
13	Ethylbenzoat		6.7×10^2 1.1×10^3	1.1 0.9	3.0 3.0	Affinitätschromatographie Hummel und Dreyer Methode	Pelletier et al., (1998) Pelletier et al., (1998)
14	Ethylbutyrat		5.5×10^1 1.4×10^2	1.1	3.0 3.0	Affinitätschromatographie Affinitätschromatographie	Pelletier et al., (1998) Reiners et al., (2000)
15	Ethylfuraneol		3.9×10^1		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
16	4-Ethylguajakol		8.3×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
17	Ethylheptanoat		1.4×10^3	1.1	3.0	Affinitätschromatographie	Pelletier et al., (1998)
18	Ethylhexanoat		5.4×10^2	1.1	3.0	Affinitätschromatographie	Pelletier et al., (1998)
19	Ethylisobutytrat		1.3×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
20	Ethylpentanoat		1.9×10^2 3.7×10^2	1.1	3.0 3.0	Affinitätschromatographie Affinitätschromatographie	Pelletier et al., (1998) Reiners et al., (2000)
21	4-Ethylphenol		8.9×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
22	Ethylpropionat		1.4×10^1	1.1	3.0	Affinitätschromatographie	Pelletier et al., (1998)
23	Ethyl-2-Methylbutyrat		2.9×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
24	Ethyl-3-Methylbutyrat		2.8×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
25	3-Ethyl-2-methoxypyrazin		1.7×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
26	Ethylvanillin		4.7×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)

Kapitel 4: Ergebnisse und Diskussion

27	2-Methoxypyrazin		4.7×10^1		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
28	3-Methyl-2-Methoxypyrazin		6.2×10^1		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
29	Eugenol		1.4×10^3		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
30	Furaneol		1.6×10^1		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
31	Guajakol		2.4×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
32	2-Heptenal	5.8×10^2			3.0	Affinitätschromatographie	Sostmann und Guichard (1998)
33	2-Heptanon	4.6×10^2			3.0	Affinitätschromatographie	Sostmann und Guichard (1998)
			3.3×10^2		3.0	Statische-Headspace	Andriot et al., (2000)
34	1-Hepten-3-Ol	2.5×10^2			3.0	Affinitätschromatographie	Sostmann und Guichard (1998)
35	2-Hexenal	2.2×10^2			3.0	Affinitätschromatographie	Sostmann und Guichard (1998)
36	2-Hexanon	1.6×10^2			3.0	Affinitätschromatographie	Sostmann und Guichard (1998)
37	1-Hexen-3-Ol	7.0×10^1			3.0	Affinitätschromatographie	Sostmann und Guichard (1998)
38	Hexylacetat		5.7×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Pelletier et al., (1998)
39	Hexylpropionat		1.1×10^3		3.0	Affinitätschromatographie	Pelletier et al., (1998)
40	Iodobutan	2.8×10^3		1		Mikrodialyse	Wishnia und Pinder (1966)
41	α-Ionon	1.3×10^4			3.0	Affinitätschromatographie	Sostmann und Guichard (1998)
		Keine Bindung			6.7	Fluoreszenz	Dufour und Haertlé (1990)
42	β-Ionon	1.7×10^6		1	3.0	Fluoreszenz	Dufour et al., (1994)
		1.9×10^6		0.8	7.0	Fluoreszenz	Muresan et al., (2001)
		1.9×10^6		0.8	7.0	Fluoreszenz	Cogan et al., (1976)
		1.7×10^6		1.1	7.0	Fluoreszenz	Dufour und Haertlé (1990)
		1.5×10^4		0.85	7.0	Mikrodialyse	Muresan et al., (2001)
		1.9×10^4			3.0	Affinitätschromatographie	Sostmann und Guichard (1998)
		5.1×10^2			3.0	Fluoreszenz	Jouene und Crouzet (2000)
43	Isobutylacetat		6.3×10^1		3.0	Affinitätschromatographie	Pelletier et al., (1998)
44	3-Isobutyl-2-Methoxypyrazin		7.9×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
45	Isopentylacetat		1.5×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Pelletier et al., (1998)
46	Isopropylacetat		1.7×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Pelletier et al., (1998)
47	3-Isopropyl-2-Methoxypyrazin		4.5×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
48	3-sec-Butyl-2-Methoxypyrazin		9.1×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
49	Limonen	2.1×10^3			3.0	Fluoreszenz	Jouene und Crouzet (2000)
50	Linalool		5.6×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)

Kapitel 4: Ergebnisse und Diskussion

51	α-Menthon		1.1×10^3		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
52	Methylbenzoat	1.0×10^3			3.0	Affinitätschromatographie	Sostmann und Guichard (1998)
		1.0×10^3			6.7	Mikrodialyse	O'Neill und Kinsella (1987)
			2.9×10^2	1.3	3.0	Affinitätschromatographie	Pelletier et al., (1998)
		2.8×10^2	2.5×10^2	0.9	3.0	Hummel und Dreyer Methode	Pelletier et al., (1998)
53	Methylbutyrat		1.4×10^1	1.3	3.0	Affinitätschromatographie	Pelletier et al., (1998)
54	Methylheptanoat		6.7×10^2	1.3	3.0	Affinitätschromatographie	Pelletier et al., (1998)
55	Methylhexanoat		2.4×10^2	1.3	3.0	Affinitätschromatographie	Pelletier et al., (1998)
56	Natriumdodecylsulfat (SDS)	3.1×10^5		1	5.4		Ray und Chatterjee (1967)
		1.25×10^6		1	7.0	Elektronen-Spin-Resonanz	Narayan und Berliner (1997)
		2.5×10^6		1	7.0	Fluoreszenz	Narayan und Berliner (1997)
57	Nerol (Bergamotte-Öl)		1.1×10^3		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
58	p-Nitrophenylphosphat (PNP)	3.2×10^4		1	6.0	Fluoreszenz	Farrel et al., (1987)
59	Nonanal	Keine Bindung			7.0	Mikrodialyse	Jasinski und Kilara (1985)
		4.4×10^3			3.0	Affinitätschromatographie	Sostmann und Guichard (1998)
60	2-Nonanon	2.4×10^3		1	6.7	Mikrodialyse	O'Neill und Kinsella (1987)
		1.2×10^2		13.6	7.0	Mikrodialyse	Jasinski und Kilara (1985)
			2.4×10^3		3.0	Statische-Headspace	Andriot et al., (2000)
61	1-Nonen-3-ol	2.0×10^3			3.0	Affinitätschromatographie	Sostmann und Guichard (1998)
62	Norfuraneol		4.0		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
63	δ-Octalacton	2.3×10^2			3.0	Affinitätschromatographie	Sostmann und Guichard (1998)
64	2-Octenal	1.5×10^3			3.0	Affinitätschromatographie	Sostmann und Guichard (1998)
65	2-Octanon	1.3×10^3			3.0	Affinitätschromatographie	Sostmann und Guichard (1998)
		5.0×10^2			6.7	Mikrodialyse	O'Neill und Kinsella (1987)
			9.5×10^2		3.0	Statische-Headspace	Andriot et al., (2000)
66	γ-Octalacton	4.5×10^2			3.0	Affinitätschromatographie	Sostmann und Guichard (1998)
67	1-Octen-3-Ol	6.9×10^2			3.0	Affinitätschromatographie	Sostmann und Guichard (1998)
68	Palmitinsäure	1.0×10^7			0.9	Fluoreszenz	Frapin et al., (1993)
		6.7×10^5		1	7.4	Mikrodialyse	Fletcher und Spector (1970)
		1.7×10^6		1	7.0	Fluoreszenz	Narayan und Berliner (1998)
		5.2×10^5			7.2	Mikrodialyse	Puyol et al., (1991)
		1.0×10^6			7.5	Ultrafiltration	Wang et al., (1998)
		2.6×10^6		1.17	7.5	Fluoreszenz	Wang et al., (1998)

Kapitel 4: Ergebnisse und Diskussion

69	Pentanon	4.2×10^1			3.0	Affinitätschromatographie	Sostmann und Guichard (1998)
70	2-Pentalol	6.1×10^1			3.0	Affinitätschromatographie	Sostmann und Guichard (1998)
71	1-Penten-3-Ol	2.3×10^1			3.0	Affinitätschromatographie	Sostmann und Guichard (1998)
72	Pentylacetat		2.1×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Pelletier et al., (1998)
73	2-Phenylethanol		1.3×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
74	Propylacetat		1.3×10^1		3.0	Affinitätschromatographie	Pelletier et al., (1998)
75	Propylbutyrat		1.8×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Pelletier et al., (1998)
76	Propylhexanoat		1.2×10^3		3.0	Affinitätschromatographie	Pelletier et al., (1998)
77	Propylpentanoat		4.5×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Pelletier et al., (1998)
78	Propylpropionat		7.0×10^1	1.09	3.0	Affinitätschromatographie	Pelletier et al., (1998)
79	Protoporphyrin	2.5×10^6		0.8	7.0	Fluoreszenz	Dufour et al., (1990)
80	Pulegon		8.5×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
81	Retinol	6.7×10^6		0.85	7.5	Fluoreszenz	Laligent et al., (1991)
		1.7×10^6		0.63	7.4	Fluoreszenz	Futterman and Heller (1974)
		5.0×10^6		1	7.5	Fluoreszenz	Fugate and Song (1980)
		2.8×10^7		1	7.5	Affinitätschromatographie	Jang und Swaisgood (1990)
		1.5×10^4		1	7.2	Mikrodialyse	Puyol et al., (1991)
		2.6×10^6		1	8.0	Mikrodialyse	Cho et al., (1994)
		2.1×10^7		1	7.0	Fluoreszenz	Cogan et al., (1976)
		2.2×10^7			7.0	Fluoreszenz	Dufour und Haertlé (1990)
		1.0×10^5				Fluoreszenz	Muresan et al., (2001)
		1.5×10^7		1	7.0	Fluoreszenz	Narayan und Berliner (1998)
		2.1×10^7			7.0	Fluoreszenz	Cho et al., (1994)
82	Retinolsäure (Träger-Protein)	5.0×10^6		1	7.0	Fluoreszenz	Macleod et al., (1996)
		2.6×10^7		0.81	8.0	Fluoreszenz	Cho et al., (1994)
83	Sotolon		3.1×10^1		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
84	Stearinsäure (Octadecansäure)	8.3×10^6		1	1.0	Fluoreszenz	Frapin et al., (1992)
		3.6×10^3			3.0	Affinitätschromatographie	Sostmann und Guichard (1998)
85	α -Terpineol		4.8×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
86	Toluol (Toluol)	4.5×10^2		2		Mikrodialyse	Robillard und Wishnia (1972)
87	γ -Undecalacton	9.9×10^3			3.0	Affinitätschromatographie	Sostmann und Guichard (1998)
		8.9×10^3			7.0	Fluoreszenz	Muresan et al., (2001)
		8.9×10^3			7.0	Fluoreszenz	Farrel et al., (1987)
		8.8×10^3		0.99	7.0	Mikrodialyse	Muresan et al., (2001)
		1.0×10^4			7.0	Mikrodialyse	Sostmann und Guichard (1998)
88	Vanillin		3.2×10^2		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)
89	4-Vinylguajakol		1.2×10^3		3.0	Affinitätschromatographie	Reiners et al., (2000)

Tabelle 11: Bindungskonstanten (Assoziationskonstante K_A) und Bindungsseiten n ausgewählter Verbindungen an Rinderserumalbumin (RSA) und Humanserumalbumin (HSA)

Verbindung		K_A (M^{-1})	Globale K_A ($n \times K_A$)	n	PH-Wert	Methode	Autor
Acenocoumarin (Antikoagulanz)	HSA	1.9×10^5		1	7.4	Mikrodialyse + Ultrafiltration	
	RSA						
Anilin	RSA	1.5×10^4	0.5×10^4	1	3.0	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)
	RSA		0.1×10^4		4.5	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)
	RSA		0.1×10^4		7.0	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)
Benoxapofen (Propionsäurederivate)	HSA				7.4	Fluoreszenz	Wanwimolruk et al., (1983)
Benzaldehyd	RSA	4.4×10^6	1.4×10^{-3}	1	3.0	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)
	RSA		0.1×10^3		4.5	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)
	RSA		0.1×10^3		7.0	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)
Benzoessäure	RSA	5.0×10^5	0.7×10^3	2	3.0	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)
	RSA		1.1×10^3		4.5	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)
	RSA		0.3×10^3		7.0	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)
Bilirubin	HSA			1	7.4	Mikrodialyse	Brodersen, R. (1979)
	HSA			2	7.4	Ultrafiltration	Kragh-Hansen, et al., (1972)
1-Butanol	RSA	1.3×10^3	0.3×10^3	17	3.0	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)
	RSA		0.4×10^3		4.5	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)
	RSA		0.4×10^3		7.0	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)
2-Butanon	RSA		0.2×10^3		3.0	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)
	RSA		0.2×10^3		4.5	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)
	RSA		0.2×10^3		7.0	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)
Buttersäure	RSA		Keine Bindung		3.0	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)
	RSA		Keine Bindung		4.5	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)
	RSA		Keine Bindung		7.0	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)
Butyraldehyde	RSA		0.1×10^3		3.0	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)
	RSA		0.1×10^3		4.5	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)
	RSA		0.1×10^3		7.0	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)
Cadmium (Cd^{++})	RSA			17	5.9	Zone-Elektrophorese	Waldmann-Weyer (1960)
	RSA						

Camptothecin-Alkaloide	HSA	8.0×10^6		1	7.4	Fluoreszenz	Chignell, C., (1969)	
	RSA	1.3×10^5		1	7.4	Mikrodialyse		Spector, A.A. et al., (1973)
	RSA	3.1×10^4		2	7.4	Mikrodialyse		Breckenridge und Rosen (1971)
Cicloprofen	RSA	1.9×10^4		1.1	7.4	Fluoreszenz	Wanwimolruk et al., (1983)	
	HSA	2.5×10^4		2	7.4	Mikrodialyse		Nazareth, R.I. et al., (1974)
Clofibrate (Cholesterin-Senkung)	HSA	2.5×10^4		2	7.4	Mikrodialyse	Nazareth, R.I. et al., (1974)	
γ-Decalacton	RSA	8.6×10^2		6-7	5.3	Mikrodialyse	Druaux, C. et al., (1995)	
γ-Decalacton (mit 10% Ethanol)	RSA	$\sim 1.6 \times 10^2$		9-10	5.3	Mikrodialyse	Druaux, C. et al., (1995)	
Decanal	RSA	2.0×10^4			8.0	Kinestische Messungen (Doppelstrahlphotometer)	Schöpp und Aurich (1974)	
Decanoat	RSA	6.0×10^4		6-7	6.8	Fluoreszenz	Reynolds et al., (1968)	
	RSA	7.3×10^2						8.0
1,10-Decandiol	RSA	7.0×10^4		4-5	5.6	Fluoreszenz	Reynolds et al., (1968)	
	HSA	1.0×10^4						8.0
Decansäure (Caprinsäure)	HSA	0.2×10^2	Keine Bindung	1	7.4	Fluoreszenz	Wanwimolruk et al., (1983)	
	RSA	4.9×10^5		1	7.4	Gelfiltration		Müller und Wollert, (1973)
	RSA			3.0	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)		
	RSA			4.5	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)		
	RSA			7.0	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)		
2,5-Dimethylpirazine	RSA		Keine Bindung	2	7.4	Mikrodialyse	Garten und Wosilait (1972)	
	RSA	2.2×10^6		7.4	Mikrodialyse	Chignell (1970)		
	RSA	7.7×10^5		7.4	Mikrodialyse	Chignell (1970)		
Dicoumarol (Antikoagulans)	RSA	2.2×10^6		2	7.4	Mikrodialyse	Garten und Wosilait (1972)	
	RSA	7.7×10^5			7.4	Mikrodialyse		Chignell (1970)
	RSA	2.9×10^6		1	7.4	Circulardichroismus		Perrin et al., (1973)
Digitoxin	RSA	4.3×10^4		1	7.4	Mikrodialyse	Brock (1975)	
	RSA	6.9×10^4			7.4	Mikrodialyse		Lukas und Martino (1969)
Dodecanal	RSA	2.0×10^4			8.0	Kinestische Messungen (Doppelstrahlphotometer)	Schöpp und Aurich (1974)	
Dodecanoat/ Laurat	RSA	2.3×10^5		6-7	6.8	Fluoreszenz	Reynolds et al., (1968)	
	HSA	$(K_1) 2.4 \times 10^6 - (K_{12}) 3.5 \times 10^3$			7.4	Schrittweisen-Gleichgewichts Methode		Ashbrook et al., (1974)
Dodecanol	RSA	1.5×10^5		4-5	6.8	Fluoreszenz	Reynolds et al., (1968)	
	RSA	9.2×10^4						5
Farbstoff Coomassie Blau	RSA	9.2×10^4		5		Spektrophotometrie	Sohl, J.L. und Splittgerber (1991)	

Flurbiprofen	RSA	3.3×10^4		0.9	7.4	Fluoreszenz	Wanwimolruk et al., (1983)
Glibenclamide	HSA	7.7×10^5		2	7.4	Mikrodialyse	Crooks und Brown (1974)
Halofenat (p-Chlorphenylelessigsäure)	RSA	1.6×10^5		3	7.4	Mikrodialyse	Spector, A.A. et al., (1973)
2-Heptanon	RSA	2.7×10^2			7.0	Mikrodialyse	Damodaran und Kinsella (1980)
Ibuprofen	RSA	2.7×10^6		1	7.4	Mikrodialyse	Whitlam, J.B. et al., (1979)
	RSA	8.6×10^4		1.1	7.4	Fluoreszenz	Wanwimolruk et al., (1983)
Indomethacin	RSA	1.0×10^6		1	7.4	Mikrodialyse	Hultmark, D., (1975)
Iopanoat	RSA	6.7×10^6		1	7.4	Ultrafiltration	Mudge et al., (1978)
	RSA	7.0×10^5		3	7.4	Mikrodialyse	Lang und Lasser (1967)
Ketoprofen	HSA	1.3×10^5		0.9	7.4	Fluoreszenz	Wanwimolruk et al., (1983)
Kupfer (Cu⁺⁺)	HSA	9.0×10^6		1	7.0		
Lidocaine	RSA	1.3×10^5		2	7.4	Mikrodialyse	Sawinski und Rapp (1963)
Linoleat	RSA	$(K_1) 7.9 \times 10^7 - (K_{11}) 6.8 \times 10^4$			7.4	Schrittweisen-Gleichgewichts Methode	Ashbrook et al., (1974)
Mepivacaine (lokales Betäubungsmittel)	RSA	2.5×10^5		2	7.4	Mikrodialyse	Sawinski und Rapp (1963)
Myristat	RSA	$(K_1) 2.11 \times 10^7 - (K_{12}) 4.71 \times 10^4$			7.4	Schrittweisen-Gleichgewichts Methode	Ashbrook et al., (1974)
Naproxen	RSA	2.5×10^4		1	7.4	Fluoreszenz	Wanwimolruk et al., (1983)
Natrium-Decylsulfat	RSA	1.4×10^6			6.8	Fluoreszenz	Reynolds et al., (1968)
Natrium-Decylsulfonat	RSA	9.0×10^5		5	6.8	Fluoreszenz	Reynolds et al., (1968)
Natriumdodecylsulfat	RSA	1.2×10^6		8-9	6.8	Fluoreszenz	Reynolds et al., (1968)
	RSA	2.8×10^6		3.9	7.5	Fluoreszenz	Halfman und Nishida (1972)
	RSA	4.5×10^6		4.0	6.0	Fluoreszenz	Halfman und Nishida (1972)
Natriumdodecylsulfonate	RSA	3.0×10^5		6	6.8	Fluoreszenz	Reynolds et al., (1968)
Natriumoctanoat	RSA	5.0×10^4		4-5	6.8	Fluoreszenz	Reynolds et al., (1968)
Natrium-OctylSulfat	RSA	6.0×10^5		4-5	6.8	Fluoreszenz	Reynolds et al., (1968)
Natrium-OctylSulfonat	RSA	1.0×10^5		3	6.8	Fluoreszenz	Reynolds et al., (1968)
Nonanal	RSA		6.7×10^5	21.5	7.0	Mikrodialyse	Jasinski und Kilara (1985)
2-Nonanon	RSA		1.4×10^4	15.0	7.0	Mikrodialyse	Jasinski und Kilara (1985)
	RSA	1.9×10^3			7.0	Mikrodialyse	Damodaran und Kinsella (1980)

Novobiocin	HSA	5.5×10^5		1	7.4	Mikrodialyse	Brand und Toribara (1975)
	RSA	3.8×10^2					
1,8-Octandiol	RSA	3.0×10^3		4-5	6.8	Fluoreszenz	Reynolds et al., (1968)
	RSA	2.5×10^3					
1-Octanol	RSA	2.5×10^3		10	8.0	Gelfiltration (Sephadex G 50)	Schöpp und Aurich (1974)
	HSA	3.5×10^3					
2-Octanol	RSA	5.2×10^2			8.0	Kinestische Messungen (Doppelstrahlphotometer)	Schöpp und Aurich (1974)
	RSA	5.2×10^2					
Oleat	RSA	$(K_1) 2.5 \times 10^8 - (K_{12}) 3.8 \times 10^5$			7.4	Schrittweisen-Gleichgewichts Methode	Ashbrook et al., (1974)
Palmitinsäure	RSA	$(K_1) 6.1 \times 10^7 - (K_{12}) 2.5 \times 10^4$			7.4	Schrittweisen-Gleichgewichts Methode	Ashbrook et al., (1974)
Pamaquine	RSA	6.4×10^7		1	7.4	Mikrodialyse	Naik, D.V. et al., (1975)
	RSA						
Phenol	RSA		2.1×10^{-3}		3.0	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)
	RSA						
Phenylbutazone	HSA	1.0×10^5		1	7.4	Mikrodialyse	Ghignell (1969)
	RSA	2.5×10^5					
Phenylalanin	RSA		Keine Bindung	3	7.4	Dynamische Dialyse	Brown und Crooks (1976)
	RSA						
Procaine (Betäubungsmittel)	RSA		Keine Bindung	2	7.7	Mikrodialyse	Sawinski und Rapp (1963)
	RSA	3.1×10^3					
Chinidin	RSA	1.4×10^3		2	7.4	Mikrodialyse	Nilsen und Jacobsen (1976)
	RSA	1.3×10^5					
Salicylat	RSA	2.2×10^5		1	7.4	Dynamische Dialyse	Brown und Crooks (1976)
	RSA	$(K_1) 1.5 \times 10^8 - (K_9) 2.4 \times 10^4$					
Stearinsäure (Octadecansäure)	RSA	$(K_1) 1.5 \times 10^8 - (K_9) 2.4 \times 10^4$			7.4	Schrittweisen-Gleichgewichts Methode	Ashbrook et al., (1974)
Sulfaethidol	RSA	1.5×10^5		1	7.4	Mikrodialyse	Janssen und Nelen (1979)
Sulfamethizol	RSA	1.1×10^1			7.4	Mikrodialyse	Macheras et al., (1986)
Sulfamethoxazol	RSA	8.5			7.4	Mikrodialyse	Macheras et al., (1986)

Sulfisoxazol	RSA	7.2			7.4	Mikrodialyse	Macheras et al., (1986)
Phenolrot	HSA	0.6×10^5		1	7.0	Dynamische Dialyse	Sparrow et al., (1982)
	RSA	0.6×10^5		1	7.0	Dynamische Dialyse	Kanfer et al., (1976)
Tetradecylsulfat	RSA	1.0×10^6		10-11	6.8	Fluoreszenz	Reynolds et al., (1968)
D-Tryptophan	RSA	0.9×10^3			~ 7	Mikrodialyse	Phuong-Nguyen et al., (1982)
L-Tryptophan	HSA	0.9×10^4			~ 7	Mikrodialyse	Phuong-Nguyen et al., (1982)
Vanillin	RSA		0.7×10^3		3.0	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)
	RSA		0.4×10^3		4.5	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)
	RSA		0.4×10^3		7.0	Mikrodialyse	Beyeler und Solms (1974)
Warfarin (Antikoagulans)	RSA	2.5×10^5		1	7.4	Fluoreszenz	Sudlow et al., (1975)
	RSA	8.9×10^4		2	7.4	Mikrodialyse	Garten und Wosilait (1972)
	RSA	1.5×10^5		2	7.4	Dynamische Dialyse	Brown und Krooks (1976)
	HSA	2.3×10^5		1	7.4	Mikrodialyse + Ultrafiltration	Tillement et al., (1974)

Kapitel 4: Ergebnisse und Diskussion

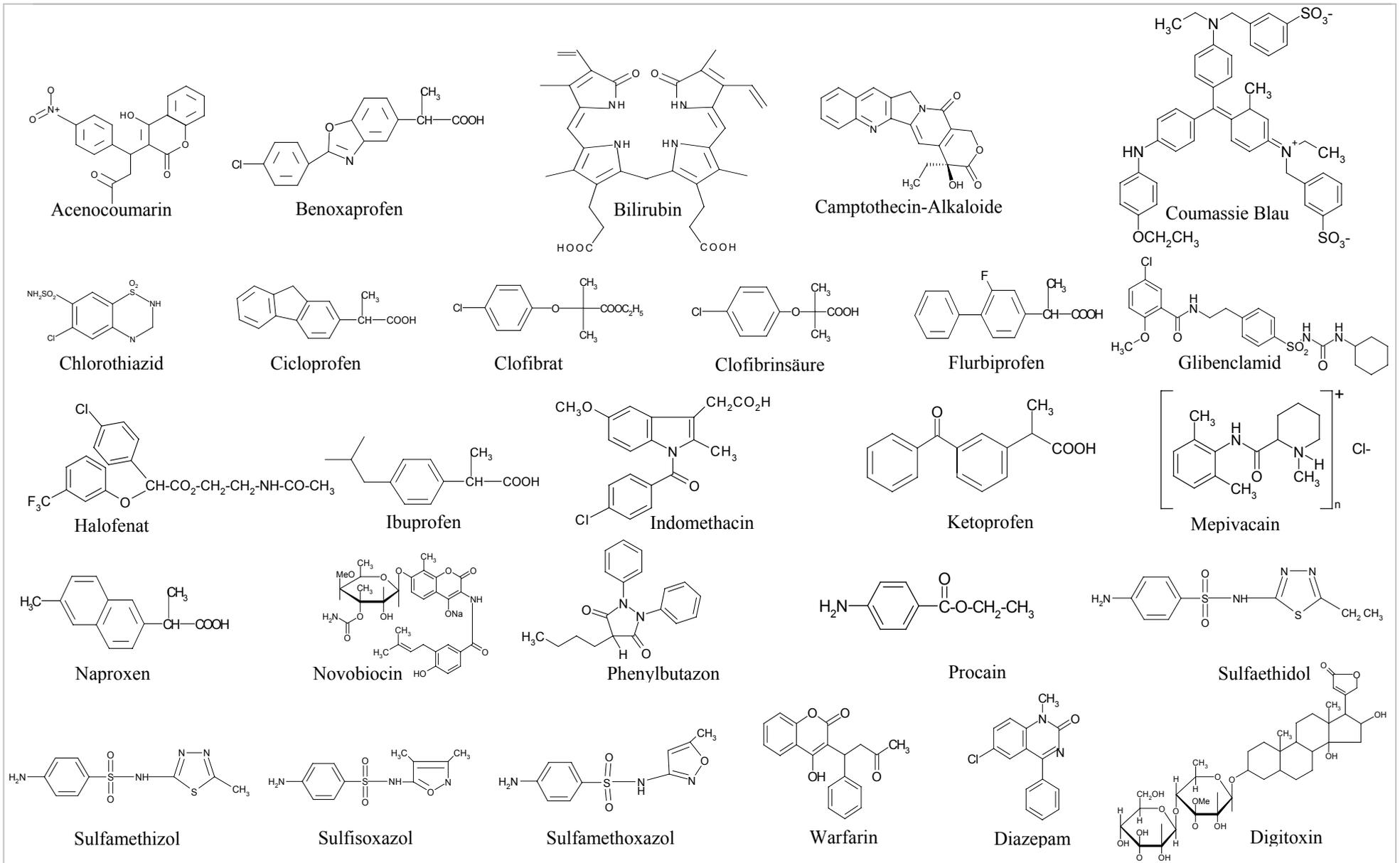


Abb. 35: Darstellung ausgewählter Ligandenstrukturen (Tab. 11) für Rinderserumalbumin.

5 Experimenteller Teil

5.1 Referenzsubstanzen, Materialien und Software

Referenzsubstanzen

Die Aromastoffe γ -Heptalacton, γ -Octalacton, γ -Nonalacton, γ -Decalacton, γ -Undecalacton, δ -Nonalacton, δ -Decalacton, δ -Undecalacton, Buttersäureethylester, Hexansäuremethylester sowie die Proteine β -Lactoglobulin (Kuhmilch, genetische Variante A + B) Bestellnummer L-3908 und Rinderserumalbumin (frei von Lipiden) Bestellnummer A-7511 wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), δ -Heptalacton und δ -Octalacton von der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Für die Ultrazentrifugation wurden Ultrazentrifugationsröhrchen Centricon-10 (MW cut off: 10000) von Millipore (Eschborn, Deutschland) bezogen.

Für die Gleichgewichtsdialyse wurde eine Gleichgewichtsdialysezelle für Mikroproben aus Acrylglas (4 Mikro-Kammer, Kammer-Volumen 1,0 ml) von Thomaphor® Reichelt Chemietechnik (Heidelberg, Deutschland) verwendet.

Die Gleichgewichts-Dialysemembran ((RC), Regenerierte Cellulose, MW cut off: 10000) wurde von Diachema Dianorm GmbH (München, Deutschland) bezogen.

Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)

Die Konzentrationsbestimmung der Geruchsstoffe bei den in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsversuche, erfolgte mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) durch Elektronenstoßionisation (GC/MS(EI)).

Gaschromatographie

Gaschromatograph: Hewlett-Packard HP 5890 Serie II.

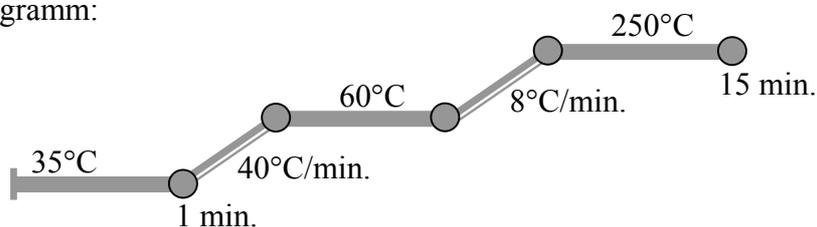
Massenspektrometrie

Massenspektrometer Detektor (MDS): Hewlett-Packard HP 5971 A EI, 70 eV; Temperatur der Ionenquelle 220°C und der Transferline 280°C.

Säule: 30 m x 0,32 mm, 0,25 μ m d_f DB-FFAP (Free Fatty Acid Phase) Phase: Nitroterephthalic acid modified polyethylen glycol, von J&W-Scientific (Agilent, Böblingen,

Deutschland). Injektion: on-column (Vorsäule: 3m x 0.53 mm Innendurchmesser, Methyl-desaktiviert). Trägergas: Helium, Säulenvordruck: 0,88 bar, Fluss: 1,0 ml/min = 24.1 cm/s.

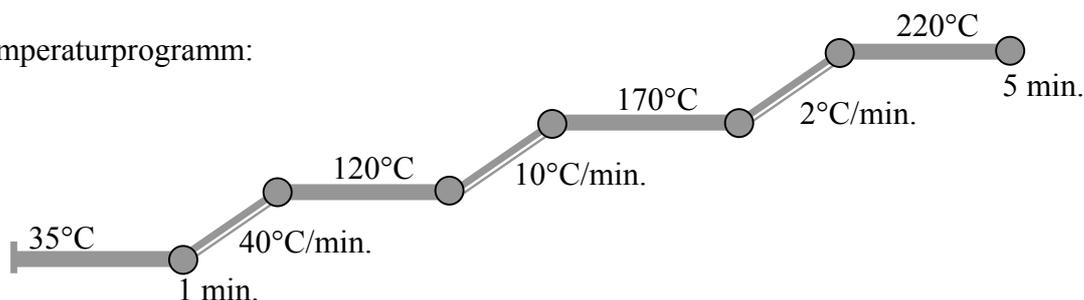
Temperaturprogramm:



Enantioselektive Gaschromatographie

Für die Untersuchungen zur Enantioselektivität der Lacton-Bindung an BLG und RSA wurde die chirale Säule BGB-174 (2,3-Diacetyl-6-tert-butyldimethylsilyl- β -cyclodextrin) eingesetzt (BGB-Analytik Schloßböckelheim, Deutschland).

Temperaturprogramm:



Software

Molecular Modelling Berechnungen wurde mit den Softwareprogrammen **Hyperchem 5.01** (Hypercube, Ganesville, Florida, USA), **WinMopac 97**, Fujitsu, Chiba, Japan) und **WebLab Viewer 2.0** (Molecular Simulations, San Diego, USA) durchgeführt.

Für die Entwicklung der Torsionsparameter wurde das Software Packet **Gaussian98** (Gaussian, Inc. Carnegie, USA) angewendet. Als Kraftfeld-Programm für die Moleküldynamik wurde **AMBER 94** (Department of Pharmaceutical Chemistry Univ. California, San Francisco, USA) eingesetzt.

Zur Erkennung von möglichen Bindungspositionen wurde das Softwarepaket **GRAMM** (Bioinformatics Lab. Dep. of Applied Mathematics and Statistics, SUNY at Stony Brook, NY) eingesetzt. Für die Optimierung der Bindungspositionen wurde das Modellierungsprogramm **AUTODOCK** (The Scripps Research Ins. MB-5 Dep. of Molecular Biology, La Jolla, CA, USA) angewendet und zur exakten Bestimmung der intermolekularen Wechselwirkungen wurde **TINKER** (Dep. of Biochemistry and Molecular Biophysics, Washington Univ. School of Medicine, Saint Louis, Missouri, U.S.A.) eingesetzt.

Die Bindungskonstanten wurden mittels des Statistikprogrammes **Origin[®] 6.0** (Microcal Software Inc.) und **TableCurve 2D 4.0** von SPSS Science (Erkrath, Deutschland) berechnet.

Für die Vorhersage von Bindungskonstanten verschiedener Liganden an Proteine aus der Literatur und eigenen Studien, wurde das Programm **DRAGON-3.0** (Milano Chemometrics and QSAR Research Group, Milano, Italien) eingesetzt.

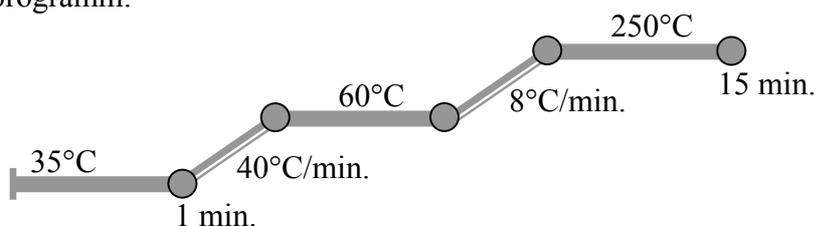
5.2 Bestimmung der physiko-chemischen Eigenschaften von ausgewählten Lactonen.

5.2.1 Bestimmung der Verteilungskoeffizienten (LogP-Werte) Octanol/Wasser und Cyclohexan /Wasser.

Die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten (LogP-Werte) erfolgte in den Lösungsmittelmischungen Octanol/Wasser ($\text{Log } P_{\text{Oct}}$) und Cyclohexan/Wasser ($\text{Log } P_{\text{Cyc}}$) mittels der Scheidetrichter-Methode (Leo et al. 1971). Eine bekannte Konzentration des Aromastoffes (5 - 10 μg) wird in einem Sovirelglas (Volumen 10 ml) in Octanol bzw. Cyclohexan (4 ml) gelöst, mit Wasser (4 ml) überschichtet und 30 min bei Raumtemperatur (20°C) kräftig gerührt. Danach 15 min stehen lassen und 5 min in einer Ultrazentrifuge zur vollständigen Trennung der beiden Phasen bei 4700 U/min ($g = 2270$ Rel. Zentrifugalbeschleunigung, Zentrifuge Hermle Z200A, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland) zentrifugieren. Von der Wasserphase und der organischen Phase, Aliquote (2 ml) abnehmen und mit einer bekannten Konzentration an internem Standard versetzen. Die Wasserphase mit Pentan/Diethylether (50 + 50m v/v, 2 x 2 ml) extrahieren und über Natriumsulfat trocknen. Die Konzentrationsbestimmung der Verbindung in der wässrigen und organischen Phase erfolgt mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie durch Elektronenstoßionisation (GC/MS(EI), cf. 5.1).

Säule: 30 m x 0,32 mm, 0,25 μm d_f DB-FFAP (Free Fatty Acid Phase) Phase: Nitroterephthalic acid modified polyethylen glycol, von J&W-Scientific (Agilent, Böblingen, Deutschland). Injektion: on-column (Vorsäule: 3m x 0.53 mm Innendurchmesser, Methyldeaktiviert). Trägergas: Helium, Säulenvordruck: 0,88 bar, Fluss: 1,0 ml/min = 24.1 cm/s.

Temperaturprogramm:



Die Bestimmung der γ -Lactone (C_7 - C_{11}) bzw. der δ -Lactone (C_7 - C_{11}) erfolgte unter Verwendung der entsprechenden δ - bzw. γ -Lactone als internem Standard. Die Auswertung erfolgte über die Peakflächenverhältnisse der Massen m/z 85 (γ -Lactone) und m/z 99 (δ -Lactone) unter Berücksichtigung des MS(EI)-Korrekturfaktors (cf. **Tab.12**).

Tab. 12 Korrekturfaktoren

Verbindung	Korrekturfaktor
γ -Heptalacton	0.33
γ -Octalacton	0.32
γ -Nonalacton	0.44
γ -Decalacton	0.44
γ -Undecalacton	0.48
δ -Heptalacton	2.96
δ -Octalacton	2.19
δ -Nonalacton	2.28
δ -Decalacton	2.26
δ -Undecalacton	2.12
Hexansäuremethylester	0.98
Buttersäuremethylester	1.01

5.2.2 Bestimmung der Löslichkeit in Wasser und in Phosphatpuffer.

Die Bestimmung der Löslichkeit der ausgewählten Lactone erfolgte durch Sättigung der Pufferlösung (Phosphatpuffer pH 7,0, KH_2PO_4 0,066 mol/L ; Na_2HPO_4 0,083 mol/L) bzw. durch Sättigung des bidestillierten Wassers bei Raumtemperatur (20°C) mit dem jeweiligen Aromastoff im Sovirelglas (Volumen 10 ml). Zur vollständigen Trennung der beiden Phasen wurde bei 4700 U/min ($g = 2270$ Rel. Zentrifugal Beschleunigung, Zentrifuge Hermle Z200A, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland) 10 Minuten zentrifugiert. Danach 100 μl der gesättigten Lösung abnehmen und mit einer bekannten Konzentration an internem Standard versetzen und mit Pentan/Diethylether (50 + 50, v/v) extrahieren und über Natriumsulfat trocknen.

Die Bestimmung der γ -Lactone bzw. der δ -Lactone erfolgte unter Verwendung der entsprechenden δ - bzw. γ -Lactone als internem Standard. Die Auswertung erfolgte über die Peakflächenverhältnisse der Massen m/z 85 (γ -Lactone) und m/z 99 (δ -Lactone) unter Berücksichtigung des MS(EI)-Korrekturfaktors (cf. **Tab. 12**). Die gaschromatographischen Bedingungen und das Temperaturprogramm sind unter **5.2.1** beschrieben.

5.3 Bestimmung der Bindungskonstanten

5.3.1 Bestimmung der Bindungskonstanten mittels Ultrazentrifugation (UCF)

Die Bindung von Lactonen an Rinderserumalbumin und β -Lactoglobulin wurde mittels einer Ultrafiltrationsmethode (Whitlam und Brown, 1981), der so genannten Ultrazentrifugation, bei Raumtemperatur in konventionellen Ultrazentrifugationseinheiten (cf. **Abb.13**) mit einem Proteinausschluss von 10000 untersucht.

Die Proteine Rinderserumalbumin und β -Lactoglobulin (0,45 mmol/L) wurden mit 2 ml Aromastofflösung (0,24 $\mu\text{mol/l}$ – 3 mmol/l) pH 7 bzw. pH 6,5 (KH_2PO_4 0,066 mol/l ; Na_2HPO_4 0,083 mol/l) versetzt und für 30 min inkubiert. Danach wurden die Lösungen für 3 min ultrazentrifugiert (4700 U/min, $g = 2270$ Rel. Zentrifugal Beschleunigung), das erhaltene Filtrat (ca. 0,2 ml) verworfen und anschließend für weitere 20 min zentrifugiert (Zentrifuge Hermle Z200A, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland). Von dem erhaltenen zweiten Eluat (ca. 0,6 ml) sowie von der Retentatlösung wurden jeweils 0,5 ml zur quantitativen Bestimmung der Geruchsstoffe eingesetzt. Retentatlösung, die an Protein gebundenen und frei vorliegenden Geruchsstoff enthält, sowie das Eluat, das

ungebundenen Aromastoff enthält, wurden nach Zugabe eines internen Standards (cf. Bestimmung der LogP-Werte) mit Pentan (2 x 2 ml) extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und mittels Destillation an einer Vigreux-Kolonne (50 x 1 cm) und Mikrodestillation (Bemelmans, 1979) konzentriert und durch GC/MS(EI) unter Berücksichtigung des Korrekturfaktors analysiert (cf. **Tab. 12**). Die gaschromatographischen Bedingungen und das Temperaturprogramm sind unter **5.2.1** beschrieben.

Zur Aufnahme der Bindungsisotherme einer Verbindung wurden unterschiedliche Aromastoffkonzentrationen (Konzentrationsbereich $1 \times 10^2 \mu\text{g/L}$ – $1 \times 10^6 \mu\text{g/L}$) bei gleichbleibender Proteinkonzentration ($8.9 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ RSA ; $4.45 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ BLG) untersucht.

5.3.2 Bestimmung der Bindungskonstanten mittels Mikrodialyse (MDA)

Als Standardmethode zur Bestimmung der Bindungsparameter von Lactonen an Rinderserumalbumin und β -Lactoglobulin wurde die Gleichgewichtsdialyse (Fares et al., 1998; O'Neill & Kinsella, 1987) eingesetzt. Es wurde eine Gleichgewichtsdialysezelle (cf. **Abb.14**), die aus Acrylglas mit 4 Mikrokammern besteht, (Volumen: 1 ml, zwei Teile fest zusammengeschaubt, Zellkammern durch eine Dialysemembrane aus regenerierte Cellulose getrennt mit einem Proteinausschluß von 10000) eingesetzt.

Die Proteine Rinderserumalbumin und β -Lactoglobulin (0.45 mmol/L) wurden in 0,5 ml Pufferlösung (KH_2PO_4 0,066 mol/l ; Na_2HPO_4 0,083 mol/l) pH 7 bzw. pH 6,5 gelöst und in einer der Seiten der Zellkammer gegeben (Proteinphase). Die andere Seite der Zellkammer (Aromaphase) wird mit Aromastoff ($0,24 \mu\text{mol/L}$ – 3 mmol/L) in Pufferlösung pH 7.0 bzw. pH 6.5 befüllt und für 12 Stunde inkubiert.

Danach werden jeweils 200 μl Aromaphase bzw. Proteinphase zur quantitativen Bestimmung der Geruchsstoffe eingesetzt. Die Proteinphase, die gebundenen und frei vorliegenden Geruchsstoff enthält, sowie die Aromaphase, die den freien Geruchsstoff enthält, wurden nach Zugabe eines internen Standards (cf. Bestimmung der LogP-Werte) mit Pentan extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und je nach Konzentrationsverhältnissen mittels Destillation an einer Vigreux-Kolonne (50 x 1 cm) und Mikrodestillation (Bemelmans, 1979) konzentriert und durch GC/MS(EI) unter Berücksichtigung des Korrekturfaktors analysiert (cf. **Tab. 12**). Die gaschromatographischen Bedingungen und das Temperaturprogramm sind unter **5.2.1** beschrieben.

5.3.3 Konzentrationsbestimmung der Lactone im Gasraum in Anwesenheit von Proteinen: Statische-Headspace-Analyse (SHA)

Die Analyse der γ - und δ -Lactone im Gasraum in An- und Abwesenheit von Protein (Rinderserumalbumin (RSA) und β -Lactoglobulin (BLG), $4,5 \times 10^{-4}$ mol/L BLG bzw. RSA, 20 mg/L Geruchsstoff, Phosphatpuffer pH 7 0.08 mol/L, $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) erfolgte mittels einer Headspace-Methode mit statischer Probenahme Technik.

Die Statische-Headspace wurde mit einem Chrompack CP 9001 mit TCT /PTI 4001 Headspace-Injektor (cf. **Abb.15**) (Varian-Chrompack, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Proben (Lacton/Pufferlösung und Lacton/Protein/Pufferlösung, 10 ml) wurden in ein gasdichtes Gefäß (200 ml) gegeben und temperiert (3 Stunden, 30°C). Die Probenahme erfolgte mit einer gasdichten Spritze (SGE, Volumen: 10 ml). Anschließend wurde der Gasraum in das TCT/PTI-Gerätesystem injiziert (3-10 ml, Injektions-Geschwindigkeit 10 ml/min) und dann mittels GC/MS (Hewlett-Packard MSD 5971, Agilent, Waldbronn, Deutschland) bzw. GC/FID analysiert (cf. schematische Darstellung **Abb. 36**). Die gaschromatographischen Bedingungen und das Temperaturprogramm sind unter **5.2.1** beschrieben.

Das TCT/PTI 4001 System wurde im Desorptions-Modus für 15 min bei 200°C mit einem Fluss von 20 ml Helium betrieben. Die Kühlfalle, eine Fused-Silica-Trap (40 cm x 0,53 mm, mit CP-Sil8CP beschichtet, 5 μm Filmdicke), wird mit flüssigem Stickstoff auf -110°C gekühlt und nach 15 min wird die Kühlfalle (Trap) innerhalb weniger Sekunden auf 200°C aufgeheizt und für 1 min gehalten. Dabei werden die auf der Fused-Silica-Trap kondensierten Verbindungen auf die Kapillarsäule injiziert.

Die Quantifizierung des Aromastoffes erfolgte nach folgenden Methoden:

1. Durch Injektion eines Standards in Pentanlösung (1 μl) direkt nach der Headspace-Proben einspritzung (interne Kalibrierung). Die quantitative Bestimmung der γ -Lactone bzw. der δ -Lactone im Gasraum erfolgte unter Verwendung der entsprechenden δ - bzw. γ -Lactone als internem Standard. Die Auswertung erfolgte über die Peakflächenverhältnisse der Massen m/z 85 (γ -Lactone) und m/z 99 (δ -Lactone) unter Berücksichtigung des MS(EI)-Korrekturfaktors (cf. **Tab. 12**)

2. Durch Injektion des entsprechenden Standards in Pentan (1 μ l) in einem getrennten Lauf (externe Kalibrierung).

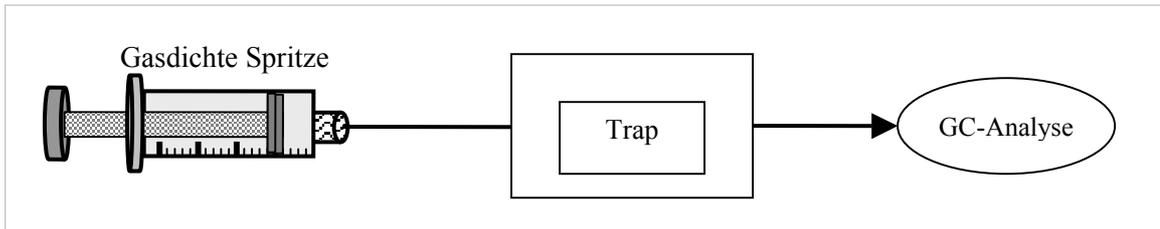


Abb. 36: Schematische Darstellung der statischen Headspace-Methode (SHA)

6 Zusammenfassung

Aromastoffe können mit Lebensmittelinhaltsstoffen wie z.B. Proteinen in Wechselwirkungen treten. Dies kann zum einen verbunden sein mit einer chemischen Reaktion zwischen Aromastoffen und dem Makromolekül oder zum anderen mit nicht kovalenten Wechselwirkungen zwischen Aromastoff und Protein. Die freie Bindungsenthalpie eines lose assoziierten Komplexes ist geprägt von sterischen, entropischen und thermodynamischen Beiträgen. Die Bindungsstärke eines Ligand-Protein-Komplexes wird durch die experimentell zugängliche Assoziationskonstante (K_A) bzw. durch die Dissoziationskonstante (K_D) charakterisiert.

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die systematische Untersuchung von Bindungskonstanten ausgewählter Geruchsstoffe (γ - und δ -Lactone von C₇-C₁₁ sowie einige aliphatische Ester) an bedeutende Nahrungsmittelproteine (β -Lactoglobulin, BLG und Rinderserumalbumin, RSA). Hierzu wurde zum einen die Ultrazentrifugations- und Mikrodiälysetechnik eingesetzt und zum anderen wurde eine Headspace-Methode zur Bestimmung der Verteilungsgleichgewichte von Geruchsstoffen zwischen einer wässrigen Protein-Aromastoff-Lösung und dem darüber befindlichen Gasraum entwickelt. Mittels Diälysetechnik wurde in den Verbindungsklassen der γ - und δ -Lactone für das γ -Undecalacton an Rinderserumalbumin (RSA, $K_A=1.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) und an β -Lactoglobulin (BLG, $K_A=5.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) die höchsten Assoziationskonstanten ermittelt. In der Reihe der γ - bzw. δ -Lactone nahm die Assoziationskonstante mit kleiner werdenden Molekulargewichten ab. Bei der Bestimmung der Verteilungsgleichgewichte zwischen Protein-Aromastoff-Lösung und Gasraum wurde eine Reduzierung des Geruchsstoffes im Gasraum von z.B. 60 % für δ -Decalacton bei Anwesenheit von RSA im Vergleich zur Lösung ohne Protein festgestellt.

Die Einflussgrößen auf die Stärke der Protein-Ligand-Wechselwirkung wurden mittels Molecular Modelling Untersuchungen (Molecular Dynamik- und Molecular Mechanik Simulationen) sowie unter Einbeziehung der physiko-chemischen Eigenschaften (Lipophilität, Löslichkeit) der Verbindungen ermittelt.

Um den Einfluss der Lipophilität auf das Bindungsverhalten zu bewerten, wurden die Verteilungskoeffizienten (LogP-Werte) der Verbindungen in Octanol/Wasser und Cyclohexan/Wasser untersucht. Der Einfluss dieser Größe auf die Bindungsstärke in der

Klasse der γ - und δ -Lactone an β -Lactoglobulin und Rinderserumalbumin zeigte, dass die Lipophilität einer Verbindung einen wesentlichen Beitrag zur Bindungsaffinität leistet. Liganden wie γ -Undecalacton und δ -Undecalacton mit den höchsten Bindungsaffinitäten an den untersuchten Proteinen, zeigten auch die höchste Lipophiliten bzw. $\text{LogP}_{\text{Oct}/\text{H}_2\text{O}}$ Werte von 3.30 bzw. 2.93. Bisher sind dies die ersten umfassenden physiko-chemischen Daten (Löslichkeit und $\text{LogP}_{\text{Oct}/\text{H}_2\text{O}}$ Werte), die über Lactone in der Literatur zur Verfügung stehen.

Der Einsatz von Molecular Modelling führte zur Identifizierung einer bisher in der Literatur nicht beschriebenen „Lacton-Bindungsstelle“ am Protein β -Lactoglobulin (BLG). Gestützt wurden diese Untersuchungen durch kompetitive Hemmungsversuche bei Liganden mit bekannten Bindungspositionen an β -Lactoglobulin (BLG).

Bestehende Molecular Modelling Programme und statistische Methoden mussten entscheidend weiterentwickelt und modifiziert werden, um sie für die Vorhersage von Struktur-Wirkungsbeziehungen bei Lactonen nutzen zu können. Die experimentell ermittelten Bindungsenergien wurden mit den durch Molecular Modelling berechneten Daten (van der Waals- und elektrostatische Wechselwirkungen des Protein-Ligand-Komplexes; intramolekulare Energie-, Rotationsfreiheitsgrade- und $\text{LogP}_{\text{Oct}/\text{H}_2\text{O}}$ Werte des Liganden) verglichen. Eine statistische Untersuchung mittels Partial Least Square (PLS) Analyse zeigte einen Korrelationskoeffizienten für die Kalibrierung von 0.992 und für die Kreuzvalidierung von 0.98. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Molecular Modelling Methode ist ein geeignetes Verfahren zur Vorhersage von Bindungskonstanten unbekannter Verbindungen an Makromoleküle.

Quantitative Struktur-Aktivitätsbeziehungen (QSAR) mit nur zwei Variablen (van der Waals- und elektrostatische Wechselwirkungen des Protein-Ligand-Komplexes) ergab einen Korrelationskoeffizient von 0.976 und eine Kreuzvalidierung von 0.893. Diese Untersuchungen zeigen, dass auch andere Faktoren wie Rotationsfreiheitsgrade und Lipophilität eine große Rolle bzgl. der Bindungsaffinität spielen.

Weiterhin wurden QSAR Studien mit Bindungsdaten, die aus der Literatur entnommen worden sind (90 Verbindungen), durchgeführt. Aus 1497 molekularen berechneten Eigenschaften der Verbindungen konnten 4 Deskriptoren mittels PLS Analyse erkannt werden, die eine Vorhersage der Bindungsaffinität ermöglichen. Für die 90 Liganden ergab die Kalibrierung und Validierung aus vorhergesagten gegenüber den gemessenen

Bindungskonstanten eine Korrelation (Kalibrierung) von $r^2 = 0.848$ und die Kreuzvalidierung eine Korrelation von $r^2 = 0.656$. Diese Werte zeigen, dass das statistische Modell nur eine mäßige Vorhersage von Bindungsdaten anhand von molekularen Deskriptoren zulässt. Allerdings lässt sich mittels der oben beschriebenen PLS-Analyse eine Abschätzung der Bindungsdaten unbekannter Verbindungen sehr einfach und schnell durchführen.

7. Literatur

Adams, P.A. and Berman, M.C. (1980). Kinetics and mechanism of the interaction between human serum albumin and monomeric haemin. *Biochemical Journal*. **191**: 95-102.

Anderson, L.O. (1966). The heterogeneity of bovine serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta*. **117**: 115-133.

Andriot, I.; Harrison, M.; Fournier, N. and Guichard, E. (2000). Interaction between Methyl Ketones and β -Lactoglobulin: Sensory Analysis, Headspace Analysis, and Mathematical Modeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**: 4246-4251.

Aschaffenburg, R. & Drewry, J. (1955). Occurrence of different β -lactoglobulins in cow's milk. *Nature* **176**: 218-219.

Ashbrook, J.D.; Spector, A.A.; Santos, E.C. und Fletcher J.E.; (1975). Long Chain Fatty Acid Binding to Human Plasma Albumin. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol.**250**, N° **6**: 2333-2338.

Beaven, G.H.; Chen, S.H.; D'Albis, A. and Gratzer, W.D. (1974). A spectroscopic study of the haemin-human-serum-albumin system. *European Journal of Biochemistry*. **41**: 539-546.

Bell K. y McKenzie H.A. (1967) The whey proteins of ovine milk: β -lactoglobulins A and B. *Biochim. Biophys. Acta* **147**, 123-134.

Bendedouch, D., and Chen, S.H. (1983). Structure and Interparticle Interactions of Bovine Serum Albumin in solution Studied by Small-Angle Neutron Scattering. *J. Phys. Chem.* **87**: 1473-1477.

Berendsen, H.J.; Postma, J.P.; van Gunsteren, W.; diNola, A.; Hakk, J. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *Journ Chem. Phys.* **81**: 3684-3690.

Beyeler M., Solms J. (1974). Interaction of flavor model compounds with soy protein and bovine serum albumine. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, **7** (4): 217-219.

Bloomfield, V.(1966). The Structure of Bovine Serum albumin at Low pH. *Biochemistry*. **5**: 684-689.

Born, M. und Oppenheimer, R. (1927). Zur Quantumtheorie der Moleküle. *Annalen der Physik (Leipzig)*. **84**: 457-484.

Bos, O. J. M., Labro, J. F. A., Fischer, M. J. E., Witling, J., and Janssen, L. H. M. (1989). The molecular mechanism of the Neutral-to-Base Transition of Human Serum Albumin. *Journal of Biological Chemistry*. **264**: 953-959.

Braunitzer, G.; Chen, R.; Schrank, B. and Stangl, A. (1972). Automatische sequenz analyse eines proteins (β -lactoglobulin AB). "Hoppe-Seyler's Zeitung für Physiologie und Chemie", **353**:832-834.

Brodersen, R.; (1974). Competitive Binding of Bilirubin and Drugs to Human Serum Albumin by Enzymatic Oxidation. *The Journal of Clinical Investigation*, **54**:1353-1364

Brodersen R.; (1979). Bilirubin: solubility and interaction with albumin and phospholipid. *Journal of Biological Chemistry*. **254**:2364-2369

Brooks, B.R.; Bruccoleri, B.D. et al. (1983).CHARMM: A programm for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of Comput. Chem.* **4**: 187-217.

Brown, J. R., and Shockley, P. (1982). In "Lipid-Protein Interactions" (P. Jost and O. H. Griffith, eds.), Wiley, New York. Vol **1**: 25-68.

Brown, J.R. (1975). Structure of bovine serum albumin (Abstract). *Fed. Proc.* **34**: 591.

Brownlow, S.; Cabral, J.H.M.; Cooper, R.; Flower, D.R.; Yewdall, S.J.; Polikarpov, I.; North, A.C.T.; Sawyer, L. (1997). Bovine Beta-Lactoglobulin at 1.8 Angstrom Resolution - Still an Enigmatic Lipocalin. *Structure*. **5**: 481-495.

Cogan, U.; Kopelma, M.; Mokady, S.; Shinitzki, M.(1976). Binding affinities of retinol and related compounds to retinol binding proteins. *Eur. Journal Biochemistry*. **65**:71-78

Fujita, T.; Iwasa, J.; Hansch, C. (1964). A New Substituent Constant, $[\pi]$, Derived from Partition Coefficients. *Journal Am. Chem. Soc.* **86**: 5175.

Carter, D. C.; He, X. M.; Munson, S. H.; Twigg, P.D.; Gernert, K.M.; Broom, M. B.; and Miller, T. Y. (1989). Three-Dimensional Structure of Human Serum Albumin. *Science*. **244**: 1195-1198.

Carter, D. C. and Ho, J. X. (1994). Structure of Serum Albumin. *Advances in Protein Chemistry*. **45**: 153-203

Chakrabarti, S.K. (1978). Cooperativity of warfarin binding with human serum albumin induced by free fatty acid anion. *Biochemical Pharmacology*. **27**: 739-743.

Chakrabarti, S.K.; Laliberte, R. and Brodeur, J. (1976). Influence of long chain free fatty acids on the binding of warfarin to bovine serum albumin. *Biochemical Pharmacology*. **25**: 2515-2521.

Chang, G.; Guida, W.C.; and Still, W.C. (1989). An Internal Coordinate Monte Carlo Method for Searching Conformational Space. *J. Am. Chem. Soc.* **111**: 4379-4386

Charles, M.; Bernal, B. and Guichard, E. (1996). 8th Weurman Flavor Research Symposium; Reading (UK), 23-26 July. Royal Society of Chemistry. pp. 433-436.

Chirlian, L. E. and Francl, M. M. (1987). Atomic Charges Derived from Electrostatic Potentials: A Detailed Study. *J. Comp. Chem.* **8**: 894-905.

Cho, Y.; Batt, C.A.; Sawyer, L. (1994). Probing the retinol-binding site of bovine β -lactoglobulin. *Journal of Biological Chemistry*. **269**:11102-11107.

Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. E. & Kollman, P. A. (1993). Application of RESP Charges to Calculate Conformational Energies, Hydrogen Bond Energies, and Free Energies of Solvation. *J. Am. Chem. Soc.* **115**: 9620.

Cornell, W.P.; Cieplak, C.I.; et al. (1995). A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids and Organic Molecules. *Journal of Am. Chem.* **117**: 5179-5197.

Cramer, R.; Peterson, D. und Bunce, J. (1988). Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). 1. Effect of Shape on Binding of Steroids to Carrier Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **110**: 5959-5967.

Cunningham, V.J.; Hay, L. and Stoner, H.B. (1975). The binding of L-tryptophan to serum albumins in the presence of non esterified fatty acids. *Biochemical Journal.* **146**:653-658.

Damodaran, S.; Kinsella, J.E. (1980) Flavor protein interactions. Binding of carbonyls to bovine serum albumin: thermodynamic and conformational effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **28**: 567-571.

Day, J.F.; Thorpes, S.R. and Baynes, J.W. (1979). Non-enzymatically glycosylated albumin. In vitro preparation and isolation from normal human serum. *Journal of Biological Chemistry.* **254**: 595-597.

Diudea, M V. (1999). Valencies of Property. *Croatica Chemica Acta.* **72** (4):835-851.

Dolhofer, R. and Wieland, O.H. (1979). Glycosilation of serum albumin: Elevated glycosyl-albumin in diabetic patients. *F.E.B.S (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Letters.* **106**: 282-286.

Dufour, E.; Heartle, T. (1990) Binding affinities of β -ionone and related flavor compounds to β -lactoglobulin: Effects of chemical modifications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **38**: 1691-1695.

Dufour, E.; Heartle, T. (1990). Alcohol-induced changes of β -lactoglobulin-retinol binding stoichiometry. *Protein Engineering.* **4**:185-190.

Dufour, W.E.; Marden, C.M. and Haertle, T. (1990). β -Lactoglobulin binds retinol and protoporphyrin IX at two different binding sites. *Federation of European Biochemical Societies.* Vol. **277**, N°1,2: 223-226.

Eigel, W. N.; Butler, J.E.; Ernstron, C.A.; Farrel, J.H.; Harwalkar, V.R.; Jenness, R.; Whitney, R. (1984). *Dairy Sci.* **67**: 1599.

Fares, K.; Landy, P.; Guillard, R.; Voilley, A. (1998) Physicochemical interactions between aroma compounds and milk proteins: effect of water and protein modification. *J. Dairy Sci.* **81**:82-91.

Farrel, H. M.; Behe, M.J.; Enyeart, J.A. (1987). Binding of p-nitrophenolphosphate and other aromatic compounds by β -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* **70**:252-258.

Feng, L., Hu, C. Z., and Andrade, J. D. (1988). Scanning Tunneling microscopic Images of Adsorbed Serum Albumin on Highly Oriented Pyrolytic Graphite. *J. Colloid Interface Sci.* **126**: 650-653.

Flanagan, M.T. and Ainsworth, S. (1948). The binding of aromatic sulphonic acids to bovine serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta* **168**: 16-26.

Fox, T. and Kollman, P. A. (1996). The application of different solvation and electrostatic models in molecular dynamics simulations of ubiquitin: how well is the X-ray structure “maintained”?. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **25**:315-334.

Franks, N.P.; Abraham, M.H.; Lieb, W.R. (1993). Molecular organisation of liquid n-octanol: an X-ray diffraction analysis. *J. Pharm. Sci.*, **82**, 466-470

Franzen, K.L.; Kinsella, J.E.(1974). Parameters affecting the binding of volatile flavor compounds in model food systems. I. Proteins. *J. Agric. Food Chem.* **22**:675-678

Frapin, D.; Dufour, E. und Haertlé, T. (1993). Probing the fatty acid binding site of β -lactoglobulin. *Journal of Protein Chemistry.* **12**:443-449.

Fugate, R.D.; Song, P.S. (1980) Spectroscopic Characterization of β -Lactoglobulin-Retinol complex. *Biochim. Biophys. Acta* **625**: 28-42.

Futterman, S., and J. Heller. (1972). The enhancement of fluorescence and the decreased susceptibility to enzymatic oxidation of retinol complexed with bovine serum albumin, β -lactoglobulin and the retinol-binding protein of human plasma. *J. Biol. Chem.* **247**: 5168.

Frisch, A.; Frisch, M. J.; (1998). Gaussian 98 User's Reference, Gaussian Inc., Pittsburgh.

Godovac-Zimmermann J., Conti A., Liberatori J. y Braunitzer G. (1985) The aminoacid sequence of β -lactoglobulin II from horse colostrum (*Equus caballus*, *Perisodactyla*): β -lactoglobulins are retinol-binding proteins. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **366**: 601-608

Goodman, D.S. The interaction of human serum albumin with long-chain fatty acid anions. (1958). *Journal of Americal Chemical Society*.**80**: 3892-3898

Goodsell, D. S. and A. J. Olson. (1990). Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **8**:195-202.

Green, D.W.R.; Aschaffenburg, A.; Camerman, J.C.; Coppola, P.; Dunnill, R.M.; Simmons, E.S.; Komorowski, L.; Sawyer, E.M.; Turner.; Woods, K.F. (1979). Structure of bovine β -lactoglobulin at 6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **131**: 375

Guthrow, C.E.; Morris, M.A.; Day, J.F.; Thorpe, S.R. and Baynes, J.W. (1979). Enhanced nonenzymatic glucosylation of human serum albumin in diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 4258-4261.

Hage, D.S.; Tweed, S.A. (1997). Recent advances in chromatographic and electrophoretic methods for the study of drug-protein interactions. *J. Chromatogr. B* **699**: 499-525.

Hagler, AT.; Huler, E.; Lifson, S. (1974). Energy functions for peptides and proteins. I. Derivation of a consistent force field including the hydrogen bond from amide crystals. *J. Am. Chem. Soc.* **96**: 5319- 5327.

Halfman, C.J. and Nishida, T. (1972). Method for Measuring the Binding of Small Molecules to Proteins from Binding-Induced Alterations of Physical-Chemical Properties. *Biochemistry*, Vol. 11 N°. **18**: 3493-3498.

Hammett, L.P. and Pfluger, H.L. (1933). The rate of addition of methyl esters to trimethylamine. *Journal of Americal Chemical Society.* **55**:4079.

Hansch, C. and Dunn, W.J. (1972). Linear Relationships Between Lipophilic Character and Biological Activity of Drugs. *J. Pharm. Sci.* **61**:1-19.

Hansch, C.; Leo, A.J. (1979).; In: Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology, J.Wiley & Sons: New York.

Hansch, C.; Steward, A.R.; Iwasa, J.; Deutsch, E.W. (1965). The Use of a Hydrophobic Bonding Constant for Structure-Activity Correlations. *Mol Pharmacol.* **1**: 205-213.

Hart, W.E. (1994). Adaptive global optimization with local search. Ph.D. Thesis, University of California, San Diego.

Hart, W.E.; Kammeyer, T. E. and Belew R.K. (1994). The Role of Development in Genetic Algorithms. Technical Report Nr. CS94-394. Computer Science and Engineering. University of California.

Hashimoto, M.; Higashi, T.; Isomoto, A.; Uozumi, M. and Okumura, A. (1983). A Dynamic Dialysis Method for Studying Protein-Ligand Binding Using Chromatographic Theory. *Analytical Biochemistry* **137**: 344-350.

Hattori, M.; Ametani, A.; Katakura, Y.; Shimizu, M.; Kaminogawa, S. (1993). Unfolding/Refolding Studies on Bovine β -Lactoglobulin with Monoclonal Antibodies as Probes: Does a Renatured Protein Completely Refold. *J. Biol. Chem.*, **268**, 22414-22419.

Hemmer, M.C., Steinhauer, V. and Gasteiger, J. (1999). The Prediction of the 3D Structure of Organic Molecules from Their Infrared Spectra. *Vibrational Spectroscopy.* **19**:151-164.

Hill, A. V. (1910). The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on the dissociation curves. *J. Physiol. (Lond.)*. **40**:iv–vii.

Holland, J.H.; (1975). *Adaptation in Natural und Artificial Systems*. University of Michigan Press. Ann Arbor. MI.

Hughes, W. L. (1954). In "The Proteins". H. Neurath and K. Biley, eds.). Academic Press, New York. Vol. **2b**: 663-755.

Hull, H.H.; Chang, R. and Kaplan, L.J. (1975). On the location of the sulfhydryl group in bovine plasma albumin. *Biochimica et Biophysica Acta*. **400**:132-136.

Hummel, J.P.; Dreyer, W. J. (1962) Measurement of protein-binding phenomena by gel filtration. *Biochim. Biophys. Acta*. **63**: 530-532

Jasinski, E. & Kilara, A. (1985). Flavor binding by whey proteins. *Milchwissenschaft*. **40** (10): 596-599

Jouenne, E. and Crouzet, J. (COST-1996) Interaction of Food Matrix with Small Ligands Influencing Flavour and Texture. Valencia (Spain), 14 and 16 November, European Commission, p.p 28-31.

Kamisaka, K.; Listowsky, I. And Arias, I.M. (1974). Competitive binding of bilirubin, sulfobromophthalein, indocynine green and other organic anions to human and bovine serum albumin, *Biochim. Biophys. Acta* 365: 169-180.

Katchalski, E.; Benjamin, G. S.; and Gross, V. (1957). The Availability of the Disulfide Bonds of Human and Bovine Serum Albumin and of Bovine gamma-Globulin to Reduction by Thioglycolic Acid. *J. Am. Chem. Soc.***79**: 4096-4099.

Katchalski-Katzir, E.; Shariv, I.; Eisenstein, M.; Friesem, AA.; Aflalo, C. and Vakser, IA. (1992). Molecular Surface Recognition: Determination of Geometric Fit Between Proteins and Their Ligands by Correlation Techniques. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**:2195-2199.

Koh, S.W. and Means, G.E. (1979). Characterization of a small apolar anion binding site of human serum albumin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **192**: 73-79.

Klotz, I.M. (1982). Numbers of receptor sites from Scatchard graphs: Facts and fantasies. *Science*. **217**: 1247-1249

Klotz, I. M.; Huston, D.L. (1979) Protein affinities for small molecules: conceptions and misconceptions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **193**: 314-328.

Klotz, I. M.; Walker, F. M.; Pivan, R.B. (1946) The binding of organic Ions by proteins. *Journal of American Chemical Society* **68**: 1486-1490.

Kontopidis, G.; Holt, C.; Sawyer, L. (2002). The Ligand-binding site of bovine β -Lactoglobulin: evidence for a function?. *Journal of Molecular Biology*. **318**: 1043-1055.

Kragh-Hansen, U.; Moeller, J.V. and Sheikh, M.I. (1972). Spectrophotometric micromethod for the determination of binding of phenol red to plasma proteins of various species. *Eur. J. Physiol.* **337**:163-176.

Kragh-Hansen, U.; Moeller, J.V. and Lind, K.E. (1974). Protein binding of small molecules. IV. Relation between binding of phenolsulfophthalein dyes and other ligands with a high affinity for human serum albumin. *Biochem. Biophys. Acta* **365**:360-371.

Kragh-Hansen, U. (1981). Molecular Aspects of Ligand Binding to Serum Albumin. *Pharmacological Reviews*, by The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. Vol. **33**. N°1: 17-53.

Lakusta, H.; Deber, C.M. and Sarkar, B. (1980). Complexation of Zn (II) to a native sequence tripeptide of human serum albumin studied by ^{13}C nuclear magnetic resonance. *Canadian Journal of Biochemistry*. **58**: 757-766.

Lakusta, H.; Deber, C.M. and Sarkar, B. (1979). Equilibrium studies of Zn (II) and cobalt (II) binding to tripeptide analogues of the amino terminus of human serum albumin. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **11**: 303-315.

Landy, P.; Druaux, C.; Voilley, A. (1995) Retention of aroma compounds by proteins in aqueous solution. *Food Chemistry*, **54**:387-392.

Leahy, D.E.; Tayler, P.J.; Wait, A.R. (1989).; Model solvent systems for QSAR part I. Propyleneglycol dipelargonate (PGDP). A new standard solvent for use in partition coefficientdetermination. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, **(8)**, 17-31.

Leo, A.; Hansch, C.; Elkins, D. (1971) Partition coefficients and their uses. *Chemical Reviews*. **71**: 525-616.

Liberatori, J. (1977). *Folia Vet. Lat.* **7**:205-222.

Liem, H.M. and Müller-Eberhard, U. (1971). Do heme and bilirubin have identical binding sites on the albumin molecule? *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **42**:634-639.

Lii, J.-L. and Allinger, N. L. (1991). The MM3 Force Field for Amides, Polypeptides and Proteins. *J. Comp. Chem.* **12**: 186-199.

Lindup, W.E. (1987) Plasma protein binding of drugs - some basic and clinical aspects. In: *Progress in drug metabolism* (Eds. Bridges, J.W.; Chasseaud, L.F.; Gibson, G.G.), Taylor & Francis Ltd, Vol **10**: 141-185.

Lübke, M.; Guichard, E. and Le Quéré J. (2000). Infrared Spectroscopic Study of β -Lactoglobulin Interactions with Flavor Compounds. *American Chemical Society*. Chapter **23**:282-292.

Lübke, M.; Guichard, E.; Tromelin, A. and Le Quéré J. (2002). Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Study of β -Lactoglobulin Interactions with Two Flavor Compounds, γ -Decalactone and β -Ionone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**:7094-7099.

Macheras, P.; Koupparis, M. and Tsaprounis, C. (1985). An automated flow injection-serial dynamics dialysis technique for drug-protein binding studies. *International Journal of Pharmaceutics*. **30**:123-132.

Marin, I. and Relkin, P. (2000). Interaction properties of β -lactoglobulin and benzaldehyde and effect on foaming properties of β -lactoglobulin. *Food Chemistry*. **71**:401-406.

McKenzie, H.A.; (1971/1972). *Milk Proteins*, Vol. I und Vol. II; Academic Press, N York and London.

McKenzie, H. A., Ralston, G. B. and Shaw, D. C. (1972). Location of sulfhydryl and disulfide groups in bovine-lactoglobulins and effects of urea. *Biochemistry* **11(24)**: 4539–4547

McKenzie, H.A.; Sawyer, W.H. (1967) Effect of pH on β -lactoglobulins. *Nature* **214**: 1101 – 1104.

McMenamy, R.H. (1977). Albumin binding sites. In *Albumin Structure, Function and Uses*. Ed. By V. M. Rosenoer, M. Oratz, and M.A. Rothschild, pp. 143-158, Pergamon Press, Oxford.

Møller, C. and Plesset, M. S. (1934). Note on an Approximation Treatment for Many-Electron Systems. *Physical Review*. **46**: 618-622

Monaco, H.L.; Zanotti, G. (1992) Three-dimensional structure and active site of three hydrophobic molecule-binding proteins with significant amino acid sequence similarity. *Biopolymers* **32**: 457 – 465.

Morris, G.M.; Goodsell, D.S.; Halliday, R.S.; Huey, R.; Hart, W.E.; Bellew, R.K.; Olson, A.J. (1998). Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *J. of Computational Chemistry*. Vol.**19** N°.14. 1639-1662.

Mulliken, R. S. (1958)."The lower excited states of some simple molecules," *Can. J. Chem.* **36**: 10-23

Munson, P.J.; Rodbard, D. (1980) Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Analytical Biochemistry*. **107**:220-39.

Muresan, S. and Leguijt, T. (1997). Fluorimetric analysis of interactions between β -Lactoglobulin and flavor compounds. In *Cost96: Interaction of Food Matrix with Small Ligands Influencing Flavor and Texture*; Zacharoff, A.B., Ed.; European Commission: Luxembourg, 1997; **2**:45-51

Nemethy, G., Pottle, M. S., and Scheraga, H. A. (1983). Energy Parameters in Polypeptides, 9. Updating of Geometrical Parameters, Non-bonding Interactions and Hydrogen Bonding Interactions for Naturally Occurring Amino Acids. *J. Phys. Chem.* **87**:1883-1887

W. Nernst. (1891). Über das Henry'sche Gesetz. *Nachr. Kgl. Ges. Wiss. Gött.*, (1):1-14. Sitzung 7. Februar 1891.

Noel, J.K.F. and Hunter, M.J. (1972). Bovine mercaptalbumin and non mercaptalbumin monomers. Interconversions and structural differences. *Journal of Biological Chemistry.* **247**: 7391-7406.

Odell, G.B.; Cukier, J.O.; Ostrea, E.M. Jr.; Maglalang, A.C. and Poland, R.L. (1977). The influence of fatty acids on the binding of bilirubin to albumin. *J. Lab. Clin. Med.* **89**: 295-307.

O'Keefe, S.F.; Wilson, L.A.; Resurreccion, A.P.; Murphy, P.A. (1991) Determination of the binding of hexanal to soy glycin and β -conglycin in aqueous system using a headspace technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **39**: 1022-1028.

Oliveira, K. M., Valente-Mesquita, V. L., Botelho, M. M., Sawyer, L., Ferreira, S. T., Polikarpov, I. (2001) Crystal Structures of Bovine Beta-Lactoglobulin in the Orthorhombic Space Group C222(1). Structural Differences between Genetic Variants A and B and Features of the Tanford Transition. *Eur.J.Biochem.* **268**: pp 477.

O'Neill, E.T.; Kinsella, J.E. (1987) Binding of alkanone flavors to β -Lactoglobulin: effect of conformational and chemical modification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **35**:770-774.

Österberg, R. (1971). The initial equilibrium steps in the interaction of bovine plasma albumin and zinc (II) ions. A potentiostatic study. *Acta Chemica Scandinavica.* **25**: 3827-3840.

Palmer, A.H.; (1934). The preparation of crystalline globulin from the albumin fraction of cow's milk. *Journal of Biological Chemistry.* **104**: 359-372.

Papiz, M.Z.; Sawyer, L.; Eliopoulos, E.E.; North, A.C.T.; Findlay, J.B.C.; Sivaprasadarao, R.; Jones, T.A.; Newcomer, M.E.; Kraulis, P.J. (1986). The structure of β -Lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding proteins. *Nature* **324**: 383-385.

Pelletier, E.; Sostmann, K.; Guichard, E. (1998) Measurement of interactions between β -Lactoglobulin and flavour compounds (ester, acids and pyrazines) by affinity and exclusion size chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **46**:1506-1509.

Peters, T., Jr. (1975). Serum Albumin. *Advances in Protein Chemistry*. **37**: 161-245.

Pingoud, A. & Urbanke, C. (1997). *Arbeitsmethoden der Biochemie*. Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York.

Ponder, J. W. and Richards, F. M. (1987). An Efficient Newton-like Method for Molecular Mechanics Energy Minimization of Large Molecules. *J. Comput. Chem.* **8** :1016-1024.

Puyol, P.; Perez, M.D.; Ena, J.M.; Calvo, M. (1991) Interaction of bovine β -lactoglobulin and other bovine and human whey proteins with retinol and fatty acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **55**: 2515 – 2520.

Qin F, B.Y.; Bewley, M.C.; Creamer, L.K.; Baker, H.M.; Baker, E.N.; Jameson, G.B. (1998) Structural basis of the tanford transition of bovine β -lactoglobulin. *Biochemistry*. **37**: 14014 - 14023.

Ragona, L., Fogolari, F., Zetta, L., Perez, D..M., Puyol, P., De Kruijff, K., Löhr, F., Rüterjans, H., Molinari, H. (2000) Bovine β -lactoglobulin: interaction studies with palmitic acid. *Protein Science*. **9**: 1347-1356.

Rapp'e, A. K.; Casewit, C. J.; Colwell, K. S.; Goddard III, W. A.; and Skiff. W. M. (1992) UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **114**: 10024-10035.

Reiners, J.; Nicklaus, S. and Guichard, E. (2000) Interactions between β -lactoglobulin and flavour compounds of different chemical classes. Impact of the protein on the odour perception of vanillin and eugenol. *Lait*. **80**:347-360

Reynolds, J.; Herbert, S. and Steihardt, J. (1968). The Binding of Some Long-Chain Fatty Acid Anions and Alcohols by Bovine Serum Albumin. *Biochemistry*. Vol.7 N°4:1357-1361.

Robillard, K. and Wishnia, A. (1972). Aromatic hydrophobes and β -lactoglobulin. A: thermodynamics and binding. *Biochemistry*. **21**:3835-3840.

Rudman, D.; Bixler, T.J. and Del Rio, A.E. (1971). Effect of free fatty acids on binding of drugs by bovine serum albumin, by human serum albumin and by rabbit serum. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **176**: 261-272

Sawyer, L., Brownow, S., Polikarpov, I., Wu, S.-Y. (1998). β -Lactoglobulin: structural studies, biological clues. *Int. Dairy J.* **8**: 65-72.

Sawyer, L. (1987). One fold among many. *Nature*. **327**: 659

Sawyer L, Papiz MZ, North ACT, Eliopoulos EE. (1985). Structure and function of bovine β -lactoglobulin. *Biochemical Society Transactions*. **13**:265-266.

Scatchard, C. (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **51**: 660-672.

Schmidt, M.W.; Baldrige, K.K.; Boatz, J.A.; Elbert, S.T.; Gordon, M.S.; Jensen, J.J.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K.A.; Su, S.; Windus, T.L.; Dupuis, M.; Montgomery, J.A. (1993). „GAMESS, General Atomic and Molecular Electronic Structure System“. *J.Comput.Chem.* **14**: 1347-1363.

Schöpp, W. und Aurich, H. (1974). Eine Einfache Methode zu Ermittlung von Daten der hydrophoben Protein-Ligand-Wechselwirkung aus kinetischen Parametern. *Acta Biologica et Medica Germica*. Band **32**: 585-591.

Sebille, B. (1990) Separation procedures used to reveal and follow drug-protein binding. *Journal of Chromatography*. **531**: 51-77

Seiler, P. (1974) Interconversion of lipophilicities from hydrocarbon/water systems into the octanol/water system. *European Journal of Medical Chemistry*. **9**: 473-479.

Selassie, C.D.; Fang, Z.X.; Hansch, C.; Debnat, G. et al. (1989). On the structure-selectivity problem in drug design. A comparative study of benzylpyrimidine inhibition of vertebrate and bacterial dihydrofolate reductase via molecular graphics and QSAR. *J. Med. Chem.* **32**: 1895-1905.

Slater J. C. (1930). Atomic Shielding Constants. *Physical Review*. **36**:57–64.

Smith, R.N.; Hansch, C.A.; Ames, M.M. (1975). Selection of a reference partitioning system for design work. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **64**: 599-606

Smith, C.; Mitchinson, M.J.; Aruoma, O. and Halliwell, B. (1992). Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions. *Biochemical Journal*. **286**:901–905.

Soltys, B.J. and Hsia, J.C. (1978). Human serum albumin. II. Binding specificity and mechanisms a dianionic spin label study. *Journal of Biological Chemistry*. **253**: 3029-30234.

Solis, F J.; Wets, R.; (1981). Minimization By Random Search Techniques. *Mathematics of Operations Research*. Vol. **6** N°1:19-30.

Sostmann, K.; Bernal, B.; Andriot, I.; Guichard, E.(1997). Flavour binding by β -Lactoglobulin: different approaches. In: Flavour reception, Aroma evaluation, 5th Wartburg symposium, Eisenach (Eds. Kruse, H.-P.; Rothe, M.), Eigenverlag Universität Potsdam, pp. 425-434.

Sostmann, K.; Guichard, E. (1998). Immobilized β -lactoglobulin on a HPLC-column: a rapid way to determine protein-flavour interactions. *Food Chemistry*. **62**: 509-513.

Sparrow, N.A.; Russel, A.E. and Glasser, L. (1981). An Automated Continuous-Flow Dynamic Technique for Investigating Protein-Ligand Binding. *Analytical Biochemistry*. **123**: 255-264

Spector, A.A. und Fletcher, J.E. (1970). Binding of long chain fatty acids to β -lactoglobulin. *Lipids*. **5**:403-411.

Spector, A. Fletcher, J.E and Ashbrook, J.D. (1971) Analysis fo long chain free fatty acid binding to bovine serum albumin by determination of stepwise equilibrium constants. *Biochemistry*. **10**: 3229-3232.

Spector, A.; Santos, A.; Ashbrook, J.D. and Fletcher, J.E. (1973). Influence of free tatty acid concentration on drug binding to plasma albumin. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **226**: 247-258.

Spector, A. Fatty acid binding to plasma albumin. (1975). *Journal of Lipid Research*. **16**:165-179

Starinsky, R. and Shafrir, E. (1970). Displacement of albumin-bound bilirubin by free fatty acids. Implications for neonatal hyperbilirubinemia. *Clinica Chimica Acta*. **29**:311-318.

Tabachnik, M. (1964). Thyroxine-Protein interactions. III. Effect of fatty acids 2,4-dinitrophenol and other anionic compounds on the binding of thyroxine by human serum albumin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **106**: 415-421.

Tanford C, Bunville LG, Nozaki Y. (1959). The reversible transformation of beta-lactoglobulin at pH 7.5. *Journal of the American Chemical Society*. **81**:4032-4036.

Thiessen, H.; Jacobsen, J. and Brodersen, R. (1972). Displacement of albumin bound bilirubin by fatty acids. *Acta Paediat. Scand*. **61**: 285-288.

Todeschini, R. und Consonni, V. (2000). *Handbook of Molekular Descriptors*. Wiley-VCH, Weinheim.

Townend, R. and Timasheff, S.N. (1957). The molecular weight of b-lactoglobulin. *Journal of the American Chemical Society* **79**: 3613-3614.

Tritsch, G.L. und Tritsch, N.E. (1963). Thyroxine binding. II. The nature of the binding site of human serum albumin. *Journal of Biological Chemistry*. **238**: 138-142.

Vakser, I.A., Aflalo, C. (1994). Hydrophobic docking: A proposed enhancement to molecular recognition techniques. *Proteins*. **20**:320-329.

Viswanadhan, V.N., Ghose, A.K., Revankar, G.R and Robins, R.K. (1989). Atomic Physicochemical Parameters for Three Dimensional Structure Directed Quantitative Structure-Activity Relationships. 4. Additional Parameters for Hydrophobic and Dispersive Interactions and Their Application for an Automated Superposition of Certain Naturally Occurring Nucleoside Antibiotics. *Journal of Chemical Information and Computer Science*. **29**:163-172.

van der Waals, J. H. (1908). *Lehrbuch der Thermodynamik*, Mass and Van Suchtelen, Leipzig, Part 1

Waldmann-Meyer, H. (1960). Thermodynamic proton-, cadmium-, and zinc-binding constants of serum albumin determined by zone electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*. **235**: 3337-3345.

Walstra, P.; Jenness, R., Salts, in:Walstra P., Jenness R. (1984). Eds., "Dairy Chemistry and Physics". John Wiley & Sons, New York, pp. 42-57.

Wang, Q.; Allen, J.C. und Swaisgood, H.E. (1998). Protein concentration dependence of palmitate binding to β -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* **81**: 76-81.

Wang, Q., J. C. Allen, and H. E. Swaisgood. (1998). Binding of retinol and palmitate moieties of retinyl-palmitate at separate sites on B-lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* **81**(Suppl. 1):19.

Wanwimolruk, S.; Birkett, D.J. and Brooks, P.M. (1983). Structural Requirements for Drug Binding to Site II on Human Serum Albumin. *Molecular Pharmacology*. **24**:458-463.

Weiner, S.J.; Kollman, D.A.; Case, U.C.; Singh, C.;Ghio, G.; Alagona, S.; Profeta, Jr. Und Weiner, J.; (1984). A New Force Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic Acids and Proteins. *Chem. Soc.* **106**: 765.

Wilding, G.; Felhoff, R.C. and Vessel, E.S. (1977). Concentration-dependent effects of fatty acids on warfarin binding to albumin. *Biochemical Pharmacology*. **26**:1143-1146.

Wishnia P. and Pinder T. (1966). Hydrophobic interaction in proteins. The alkane binding site of β -lactoglobulins A and B. *Biochemistry*. Vol. **5**, No.5, pp.1534-1542.

Whitlam, J.B. and Brown, K.F. (1981). Ultrafiltration in Serum-Protein Binding Determinations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **70**(2):146-150.

Wold, S.; Johansson, E.; Cocchi, M. (1993). PLS - partial least-squares projections to latent Structures. In: *3D-QSAR in Drug Design - Theory, Methods and Applications*. Kubinyi, H.:Ed.; ESCOM: Leiden, Page: 523-564.

Woolley, P.V. III and Hunter, M.J. (1970). Binding and circular dichroism data on bilirubin-albumin in the presence of oleate and salicylate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **140**:197-209.

Wu, S.Y.; Perez, M.D.; Puyol, P.; Sawyer, L. (1999). β -Lactoglobulin binds palmitate within its central cavity. *Journal of Biological Chemistry*. **274**: 170–174.

Young, R.C.; Mitchell, R.C.; Brown, T.H.; Ganellin, C.R.; Griffith, R.; Jones, M.; Rana, K. K.; Saunders, D.; Smith, I. R.; Sore, N. E.; Wilks, T. J. (1988). Development of a New Physicochemical Model for Brain Penetration and Its Application to the Design of Centrally acting H₂ Receptor Histamine Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry*. **31**:656-671.

Zimmermann, KD.; Barlow, GH and Klotz, IM. (1970). Dissociation of β -lactoglobulin near neutral pH. *Arch Biochem Biophys*. **138**:101-109.