

Ribonuclease T1: Struktur, Funktion und Stabilität

Von C. Nick Pace, Udo Heinemann, Ulrich Hahn und Wolfram Saenger*

In lebenden Organismen erfüllen Proteine die wichtigsten und schwierigsten Aufgaben. Hierfür müssen sie oft spezifisch mit weiteren kleinen oder großen Molekülen zusammenwirken. Dies erfordert, daß sie sich in eine globuläre Struktur falten, in der sie ihre jeweilige Funktion erfüllen können; bei Enzymen z.B. wird durch die Faltung das aktive Zentrum konstituiert. Dieser enge Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion führte dazu, daß Faltungsweise und Faltungsstruktur der Proteine als das „Geheimnis des Lebens“ angesehen werden. Biochemiker und Chemiker haben ein großes Interesse an der Aufklärung des Mechanismus der Proteinfaltung. Wäre das „Proteinfaltungsproblem“ gelöst, könnte man aus der Aminosäuresequenz eines Proteins die bei der Faltung entstehende Struktur und ihre Stabilität voraussagen. Es ist heute möglich, Proteine herzustellen, die sich in einer oder mehreren Aminosäuren unterscheiden. Die Aufklärung ihrer dreidimensionalen Struktur durch Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie trägt wesentlich zum Verständnis der Faltung und der Stabilität der Struktur von Proteinen bei. Aus diesem Grund werden gegenwärtig mehrere Proteine mit dieser Methodik eingehend untersucht. Eines davon ist das Enzym Ribonuclease T1.

1. Einleitung

Untersuchungen von Ribonucleasen haben einen bedeutenden Beitrag zu unserem Verständnis der Struktur, Funktion und Stabilität von Enzymen geleistet^[1–5]. Ribonuclease A (RNase A), das am besten untersuchte Enzym aus Säugetieren, und Ribonuclease T1 (RNase T1), das am besten untersuchte mikrobielle Enzym, haben sehr ähnliche Funktion und Größe, unterscheiden sich aber in Aminosäuresequenz und dreidimensionaler Struktur sehr^[1, 4]. Ergebnisse detaillierter kristallographischer Untersuchungen an RNase A sowie an Derivaten und Komplexen wurden von mehr als einem Dutzend Forschungsgruppen veröffentlicht^[2]. Von RNase T1 wurden bisher neun Kristallstrukturen bestimmt. Dieser Reichtum an Strukturinformation und

die überschaubare Größe der Enzyme gewährleisten, daß Studien an Ribonucleasen auch weiterhin unser Verständnis der Enzyme vertiefen werden.

Das aktive Zentrum der Ribonucleasen läßt sich eindeutig unterteilen in eine Substraterkennungsstelle, die bestimmte Nucleinsäurebasen spezifisch bindet, und in eine katalytisch aktive Stelle, wo die Spaltung der Phosphodiesterbindung stattfindet^[2, 5]. RNase A erkennt in einzelsträngiger RNA die Pyrimidinbasen Uracil und Cytidin, die mikrobiellen RNasen der T1-Familie dagegen sind spezifisch für Guanin oder für Guanin und Adenin, oder sie sind unspezifisch. Wegen ihrer hohen Spezifität für Guanin wird RNase T1 häufig für RNA-Sequenzierungen und -Kartierungen verwendet^[6–8].

RNase A und die mikrobiellen RNasen der T1-Familie reagieren mit RNA nach einem ähnlichen, Säure/Base-katalysierten zweistufigen Mechanismus, wobei zuerst eine Umesterung der 3',5'-Phosphodiesterbindung zu 2',3'-cyclischem Phosphat erfolgt, welches anschließend zu terminalem 3'-Phosphat hydrolysiert wird.

RNase T1 wurde ursprünglich aus Takadiastase, einer industriell produzierten Fraktion aus dem Kulturmedium des

[*] Prof. Dr. W. Saenger, Priv.-Doz. Dr. U. Heinemann,
Priv.-Doz. Dr. U. Hahn
Institut für Kristallographie der Freien Universität Berlin
Takustraße 6, W-1000 Berlin 33
Prof. Dr. C. N. Pace
Biochemistry Department
Texas A&M University
College Station, TX 77843 (USA)

Schimmelpilzes *Aspergillus oryzae*, in zwei isomeren Formen isoliert, die entweder Gln oder Lys an Position 25 enthalten (Gln25- oder Lys25-RNase T1, Abb. 1)^[5,9]. Kürzlich wurden für RNase T1 codierende, synthetisch hergestellte Gene mit drei verschiedenen Ansätzen gentechnologisch in *Escherichia coli* kloniert^[10-13]. Einmal wurde ein Fusionsprotein exprimiert, aus dem anschließend durch Bromcyan-Spaltung RNase T1 in geringen Mengen gewonnen wurde. In den anderen beiden Arbeiten wurde das Gen der RNase T1 mit dem eines Transmembran-Signalpeptids kloniert. Aktive RNase T1 wird in das Periplasma ausgeschieden, aus dem es in Mengen bis 50 mg pro Liter Kulturmedium isoliert werden kann^[11-13]. Durch ortsgerichtete Mutagenese kann nun an jeder beliebigen Stelle spezifisch modifizierte RNase T1 hergestellt werden. Im folgenden werden RNase-T1-Mutanten, an denen die Aminosäure X in der Position n durch die Aminosäure Y ersetzt wurde, als XnY bezeichnet.

In diesem Beitrag stellen wir zunächst die Struktur der RNase T1 im Komplex mit verschiedenen Liganden und Inhibitoren vor. Dann fassen wir die Ergebnisse einer Reihe von experimentellen Studien zur Konformationsstabilität zusammen, und schließlich betrachten wir den Zusammenhang von dreidimensionaler Struktur und Stabilität. Die neuen Erkenntnisse tragen zu einem besseren Verständnis der Faktoren bei, die die gefaltete, biologisch aktive Konformation der Proteine bestimmen, und bringen uns möglicherweise der Lösung des Proteinfaltungsproblems näher.

2. Die dreidimensionale Struktur der RNase T1 im Komplex mit Liganden

Mehrere Kristallstrukturen der RNase T1 wurden bei mittlerer bis hoher Auflösung bestimmt (Tabelle 1). Meist



C. Nick Pace, geboren 1940 in Delta, UT, USA, studierte an der University of Utah und der Duke University, Ph.D. in Biochemie 1966. Nach einer Postdoktorandenzeit im Chemistry Department der Cornell University ging er 1968 als Professor ans Biochemistry Department der Texas A&M University in College Station, TX, USA. Konformationsstabilität und Faltungsmechanismen globulärer Proteine stehen im Mittelpunkt seines Interesses.



Udo Heinemann, geboren 1953 in Bebra-Iba, Hessen, studierte Chemie an der Universität Göttingen (Promotion 1982 mit Arbeiten, die am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen ausgeführt wurden). Nach einer Postdoktorandenzeit am Molecular Biology Institute der University of California at Los Angeles war er von 1985 bis 1991 Hochschulassistent; seit 1989 ist er Privatdozent und seit 1991 Heisenberg-Stipendiat der Deutschen Forschungsgesellschaft am Institut für Kristallographie der Freien Universität Berlin. Kristallographische und biochemische Arbeiten zur Struktur von Nucleinsäuren und Proteinen stehen im Mittelpunkt seines Interesses.



Ulrich Hahn, geboren 1950 in Kassel, studierte Agrarwissenschaften und Biologie an der Universität Göttingen (Promotion 1980 mit einer Arbeit, die am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen ausgeführt wurde). Nach einer Postdoktorandenzeit an diesem Institut wurde er 1982 Akademischer Rat und 1989 Privatdozent am Institut für Kristallographie der Freien Universität Berlin. Gentechnologie und Protein-Engineering von Nucleinsäure-bindenden Proteinen stehen im Mittelpunkt seines Interesses.



Wolfram Saenger, geboren 1939 in Höchst am Main, studierte Chemie in Darmstadt und Heidelberg und promovierte 1965 in Darmstadt mit einer Arbeit, die am Max-Planck-Institut (MPI) für experimentelle Medizin in Göttingen ausgeführt wurde. Nach einer Postdoktorandenzeit an der Harvard University war er von 1967 bis 1981 Leiter der Röntgenstrukturanalyse-Gruppe am MPI für experimentelle Medizin; von 1971 bis 1977 war er zugleich Privatdozent und von 1977 bis 1981 außerplanmäßiger Professor an der Universität Göttingen. Seit 1981 ist er ordentlicher Professor am Institut für Kristallographie der Freien Universität Berlin. 1987 erhielt er den Leibniz-Preis der Deutschen Forschungsgemeinschaft und 1988 den Humboldt-Preis für deutsch-französische Zusammenarbeit. Strukturchemie und die Beziehungen zwischen Struktur und Funktion biologischer Makromoleküle stehen im Mittelpunkt seines Interesses.

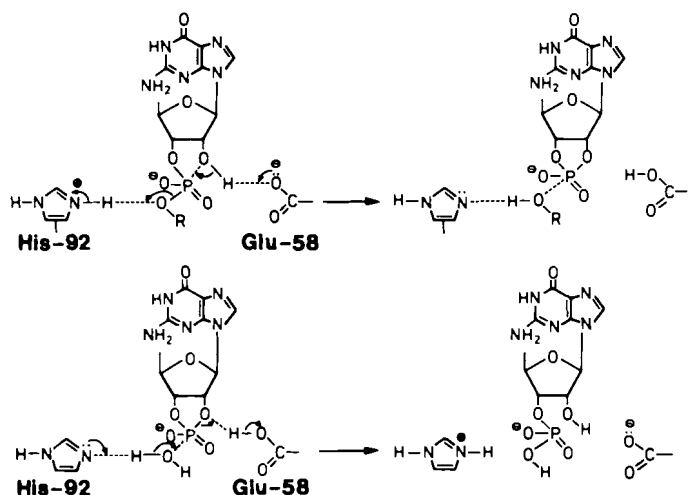
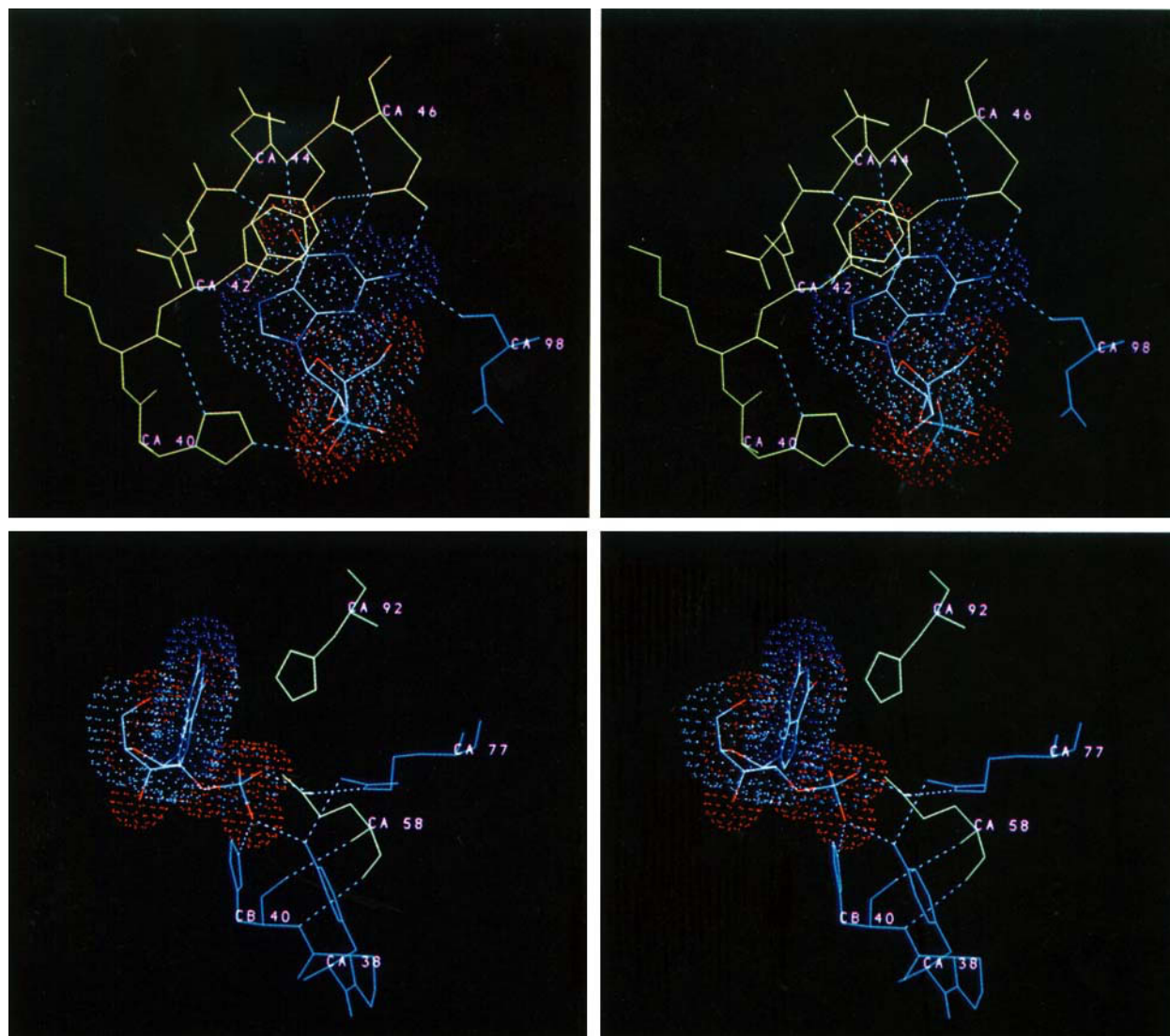


Abb. 4. Oben und Mitte: Zwei Stereobilder des aktiven Zentrums von RNase T1. Der gebundene Inhibitor 2'-Guanosinmonophosphat ist mit seiner van-der-Waals-Oberfläche dargestellt; die verschiedenen Atomsorten haben dabei die Farben weiß für Kohlenstoff, blau für Stickstoff, rot für Sauerstoff und hellblau für Phosphor; die Proteinatome sind hellblau und gelb dargestellt. Die C_α-Kohlenstoffatome sind beschriftet, die Wasserstoffbrücken als gestrichelte Linien gezeichnet. Oben: Basen-Erkennungsstelle: His40 bis Glu46 in gelb und Asn98 in hellblau. Mitte: Katalytisches Zentrum: Glu58 und His92, die vermutlich an der Katalyse beteiligt sind, sind gelb, andere Aminosäuren, die mit der Phosphatgruppe wechselwirken, sind hellblau gezeichnet. Unten: Schema des Reaktionsmechanismus der Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung durch RNase T1 [31].

Die Sekundärstruktur wird durch 51 N-H...O=C-Wasserstoffbrücken stabilisiert (Abb. 3). Das Protein enthält ein kurzes doppelsträngiges, antiparalleles Faltblatt, auf das eine viereinhalb Windungen lange α -Helix folgt, und ein zweites antiparalleles β -Faltblatt, das aus fünf Strängen zusammengesetzt ist.

Die Verbindungen zwischen den Sekundärstrukturelementen bilden mehr oder weniger lange Schleifen, die „ β -Turns“ enthalten. Das fünfsträngige Faltblatt ist stark verdreht und bildet eine faßähnliche Struktur. Durch Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes wird das „Faß“ vervollständigt, indem der gebundene RNA-Strang den fehlenden sechsten Strang ersetzt.

Die Tertiärstruktur wird dadurch stabilisiert, daß 80 % der unpolaren Seitenketten einen hydrophoben Kern bilden und so Kontakten mit Wassermolekülen entzogen werden. Neben den Wasserstoffbrücken in α -Helix und β -Faltblatt gibt es 31 Wasserstoffbrücken zwischen Hauptkette und Seitenketten und 14 zwischen Seitenketten, die zusätzlich zur Stabilität der Konformation von RNase T1 beitragen^[16].

2.1. Die Guaninbindungsstelle von RNase T1

Guanin wird spezifisch über das Polypeptidsegment Tyr42 bis Glu46 und durch das Peptid-C=O von Asn98 gebunden

(Abb. 4). Guanin-N(7) und -O(6) sind Wasserstoffbrücken-Acceptoren für die Peptid-NH-Gruppen von Asn43, Asn44 und Tyr45. Guanin-N(1)-H und -N(2)-H sind Wasserstoffbrücken-Donoren zur Carboxylat-Seitenkette von Glu46. Das zweite N(2)-H-Wasserstoffatom nimmt an einer Wasserstoffbrücke zum Carbonyl-Sauerstoffatom von Asn98 teil. Eine weitere Stabilisierung bietet die Carbonylfunktion an Position 6 des Guanins, die zwischen den phenolischen Seitengruppen von Tyr42 und Tyr45 eingeschlossen ist (sandwichartig), so daß die Wasserstoffbrückenbindungen abgeschirmt sind und nicht in Konkurrenz mit Wasser treten.

In den Kristallstrukturen von RNase T1 mit Guanosin-2'-phosphat, Guanylyl-2',5'-guanosin und Guanosin^[14–18, 20, 22] ist das Guanosin in *syn*-Konformation in der Erkennungsstelle gebunden, womit bei freiem Guanosin-O(5') die Bildung einer intramolekularen O(5')-H...N(3)-Wasserstoffbrücke möglich ist. In keinem röntgenkristallographisch untersuchten Komplex der RNase T1 mit Substratanaloga läßt sich eine Wasserstoffbrücke zwischen Ribose und Enzym lokalisieren. In Guanosin-2'-phosphat ist die Phosphatgruppe mit Wasserstoffbrücken an Tyr38 (O_n), His40 (N_i) und Glu58 (O_{e1}) gebunden (siehe Abb. 4), aber nicht an die Seitenkette von Arg77. Vergleichbare Wechselwirkungen wurden auch bei der Phosphatgruppe im Guanylyl-2',5'-Guanosin-Komplex festgestellt, in dem die Phosphatgruppe und das 3'-terminale Guanosin zweifach fehlgeordnet sind^[20]. Der Grund dafür sind wohl die geringe Zahl der Wechselwirkungen zwischen RNase T1 und dem 3'-terminalen Guanosin, sowie zusätzliche Kontakte zu einem symmetrier verwandten RNase-T1-Molekül im Kristall.

Im Komplex von RNase T1 mit Vanadat wird das [H₂VO₄]³⁻-Ion an gleicher Stelle gebunden wie die Phosphatgruppe im Guanosin-2'-phosphat-Komplex^[21]. In der Basen-Erkennungsstelle ist ein Wassermolekül nahe der Position gebunden, wo sonst das O(6) eines Guanosins wäre. Die Glu46-Seitenkette ist von der Guanosin-Bindungsstelle weggedreht, die Seitenkette von Tyr45 liegt in einer anderen Position, und die Asn43-Asn44-Peptidbindung ist im Vergleich zu der in anderen Kristallstrukturen, die ein gebundenes Guanin enthalten, um etwa 180° gedreht. Daraus folgt, daß die Guanin-Bindungsstelle bis zu einem gewissen Maße flexibel ist, um die Bindung des Substrats und die Verdrängung des Produktes zu erleichtern.

Die Spezifität von RNase T1 für Guanosin wurde mit einer „free energy perturbation“-Rechnung untersucht^[29], die nahezu die gleichen Unterschiede zwischen der freien Bindungsenthalpie von Guanosin und Adenosin ergab wie experimentelle Bestimmungen. Die Simulation läßt annehmen, daß eine Mutation der Glu46-Carboxylatgruppe die RNase T1 in eine adenosinspezifische Ribonuclease umwandeln müßte. Diese Schlußfolgerung konnte jedoch durch biochemische Untersuchungen an der RNase-T1-Mutante Glu46Ala nur zum Teil bestätigt werden^[30].

2.2. Das katalytische Zentrum der RNase T1

Das katalytische Zentrum wurde als die Umgebung der Phosphatgruppe in den Komplexen mit Guanosin-2'-phosphat und Guanylyl-2',5'-Guanosin bestimmt (Abb. 4). Die 2',5'-Phosphodiesterbindung des Dinucleotids kann von RNase T1 nicht hydrolysiert werden. Um den Inhibitor in

ein Substrat zu verwandeln, wurde das entsprechende 3'-Phosphat konstruiert. Aus dessen Struktur wurde gefolgert, daß sich bei Substratbindung ein anderes Wasserstoffbrückenschema bildet. Es entsteht nun möglicherweise eine Wasserstoffbrücke zwischen dem O(5')-Phosphatsauerstoffatom und dem Imidazol-N_i-H von His92 sowie zwischen dem O(2')-H der Ribose und dem Carboxylat O_{e1} von Glu58. Die Imidazolgruppe von His40 ist zwar in der Nähe, bildet aber wahrscheinlich keine Wasserstoffbrücke zur Ribose.

In Kenntnis dieser Struktur und aufgrund von Informationen aus zahlreichen biochemischen Studien^[4, 32, 33] wurde ein Reaktionsmechanismus für RNase T1 vorgeschlagen (Abb. 4 unten), in dem Glu58, möglicherweise von His40 aktiviert, das Proton von O(2')-H als Base abstrahiert. Das O(2')^o greift die Phosphodiesterbindung an, und das O(5') des nächsten Nucleotids erhält ein Proton vom protonierten His92. Das neue cyclische Guanylyl-2',3'-Phosphat wird von einem Wassermolekül hydrolysiert, das von His92 aktiviert ist und an dieses ein Proton abgibt. Das abgehende O(2') erhält ein Proton von Glu58 (O_e-H) unter Bildung des Endproduktes Guanosin-3'-phosphat^[14, 31].

Während die Stereochemie dieser Reaktion^[33] und die vorgeschlagene Rolle von His92 in der Katalyse nahezu unumstritten sind, haben die Resultate von ortsgerechter Mutagenese von Aminosäuren des aktiven Zentrums einen Disput über die Funktion von Glu58 und His40 entfacht, da bei Austausch der einen wie der anderen Aminosäure eine beträchtliche Restaktivität des Enzyms verbleibt^[34–36]. Der vorgeschlagene Angriff von Glu58 (und nicht von His40) auf Guanosin-O(2')-H stützt sich hauptsächlich auf Analysen der pH-Profile der Dinucleotid-Hydrolyse des Wildtyp-Enzyms und verschiedener Punktmutanten^[36]: Mutanten, denen His40 fehlt, liefern die gleichen pH-Profile wie der Wildtyp, während Austausch von Glu58 die pH-Abhängigkeit verändert.

Bisher wurden zwei Mutanten von RNase T1 kristallographisch untersucht: His92Ala und His40Lys^[23, 24]. Die erste ist inaktiv, da das für die Katalyse wichtige His92 durch Alanin ersetzt worden ist^[34, 35]. His40Lys zeigt im Vergleich zum Wildtyp-Enzym noch 13 % Aktivität^[13, 36]. Bei der Mutante His92Ala führt die Substitution der Imidazolgruppe durch ein Wasserstoffatom zu einigen größeren Strukturänderungen in diesem Bereich, da zwischen der Histidin-Seitengruppe und der Asn99-C=O-Hauptkette keine Wasserstoffbrücke mehr möglich ist. Dies destabilisiert die Schleife von Ile90 bis Asn99. Ebenso zeigt die Mutante His40Lys lokale Strukturänderungen in dieser Schleifenregion, die aber nicht so stark sind wie im Falle der His92Ala-Mutante.

2.3. Die Verteilung der Temperaturfaktoren weist auf Flexibilität einzelner Molekülteile hin

Während einer röntgenkristallographischen Strukturanalyse werden neben den Atomkoordinaten auch die Temperaturfaktoren der Atome verfeinert. Sie sind durch die Schwingungen der Atome im Kristallgitter bestimmt. Die Temperaturfaktoren für Hauptkette und Seitengruppen sind in Abbildung 5 gegen die Aminosäurenummer in der Sequenz aufgetragen. Aminosäuren in β -Faltblättern sind starrer als die Aminosäuren der α -Helix und die in den Schleifen schwingen am meisten. Das steht in Einklang mit unserem Wissen über

die Stabilisierung der Sekundärstruktur durch N-H...O=C-Wasserstoffbrücken zwischen Peptidgruppen der Hauptkette, die auch die thermische Schwingung der assoziierten Seitenkette beeinflusst. In diesem Zusammenhang wurden Moleküldynamik-Simulationsstudien auf der Grundlage der Kristallkoordinaten durchgeführt^[37]. Diese ergeben die gleiche Tendenz der Schwingung von Hauptketten- und Seitengruppenatomen, wie in Abbildung 5 gezeigt.

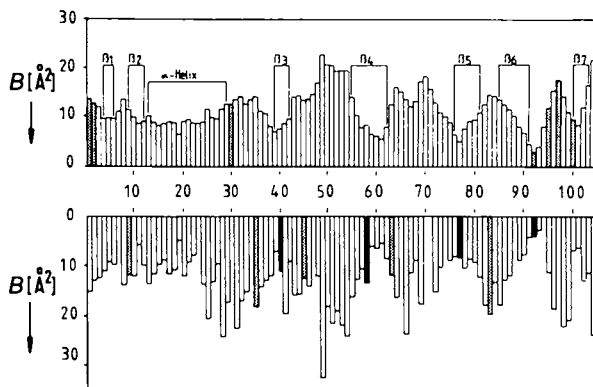


Abb. 5. Die lokale Mobilität innerhalb des RNase-T1-Moleküls, dargestellt durch die kristallographischen Temperaturfaktoren B der Hauptkettenatome (oben) und der Atome der Seitengruppen (unten). Die dunkel gezeichneten Balken des Histogramms kennzeichnen die für die Katalyse wichtigen Aminosäuren His40, Glu58, Arg77 und His92, die sich in Bereichen kleinster Mobilität befinden. Die an Kristallgitterkontakten beteiligten Seitengruppen und Hauptkettenanteile sind durch schattierte Balken gekennzeichnet.

Die Struktur von RNase T1 in Lösung wurde durch 2D-NMR-Spektroskopie von Rüterjans et al. untersucht^[38]. Es gibt beim Wildtyp-Enzym keinen deutlichen Unterschied zwischen der Struktur im Kristall und in Lösung. Weiterhin sind die NMR-spektroskopischen Ergebnisse mit denen der Röntgenstrukturanalyse hinsichtlich der Mutante His92Ala konsistent. In der mit niedriger Auflösung durch NMR-Spektroskopie bestimmten Tertiärstruktur stimmt vor allem die Sekundärstruktur von RNase T1 gut mit den kristallographisch gewonnenen Ergebnissen überein. Da die Auswertung der NMR-Daten stark auf Moleküldynamik-Simulationsrechnungen zurückgreift, sind auch die thermisch mehr oder weniger starren und flexiblen Regionen der RNase-T1-Struktur in Einklang mit den in Abbildung 5 wiedergegebenen Daten.

2.4. Konservierte Wassermoleküle und ein gebundenes Metall-Ion sind wesentliche Teile der RNase-T1-Struktur

Im RNase-T1 · 2'-GMP-Komplex wurden rund 90 Wassermoleküle in der asymmetrischen Einheit lokalisiert. Unter Einbeziehung symmetrisch verwandter Positionen ist jedes RNase-T1-Molekül von etwa 150 Wassermolekülen umgeben^[16]. In einem Vergleich von hydratisierten RNase-T1-Molekülen aus vier verschiedenen Kristallstrukturen wurden etwa 30 Wassermoleküle in gleicher Position gefunden, d.h. jeweils höchstens 1 Å von einer einmal definierten Stelle entfernt. Diese Wassermoleküle können als konservierte und integrierte Bestandteile der RNase-T1-Molekülstruktur angesehen werden^[39].

Einige dieser konservierten Wassermoleküle verbinden verschiedene Teile der RNase-T1-Polypeptidkette und unterstützen somit die Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur. Ein Wassermolekül ist über Wasserstoffbrücken gleichzeitig mit Tyr68 (O_η) und den Peptid-NHs von Ser35 und Asn36 verbunden; eines koordiniert Cys6 (O), Ser8 (N), Asn9 (N_δ), Asp76 (O_δ) und Thr93 (O_γ); eines verbindet das C-terminale Carboxylat von Thr104 mit dem N-terminalen Cys2 (O); drei Wassermoleküle stabilisieren die Schleife am C-Terminus der α -Helix. Besonders erwähnenswert ist eine Kette von zehn über Wasserstoffbrücken gebundenen Wassermolekülen. Wassermolekül 1 bis 5 dieser Kette sind am Indol-N-Atom von Trp59 verankert und mit der Haarnadelschleife der Aminosäuren 60 bis 68 zusammengeheftet (Abb. 2). Sie sind zwischen dieser Schleife und der α -Helix eingeschlossen und für weiteres Lösungsmittel unzugänglich. Die Wassermoleküle 5 bis 8 der Kette koordinieren mit einem Metall-Ion (in den untersuchten Strukturen mit Ca^{2+}), und die Wassermoleküle 9 und 10 bilden Wasserstoffbrücken zu Seitengruppen am N-Terminus der α -Helix.

Das Ca^{2+} -Ion ist in der Form eines Dodecaeders mit trigonalen Flächen achtfach koordiniert^[20, 21] (Abb. 6). Seine Liganden sind die beiden Carboxylat-Sauerstoffatome von Asp15 und sechs Wassermoleküle, von denen vier zu der erwähnten Kette aus zehn Wassermolekülen gehören. Die Wassermoleküle dieses Dodecaeders bilden zusätzlich Wasserstoffbrücken zu den Hauptketten-Carbonylsauerstoffatomen der Aminosäuren 10, 12 und 63. Die räumliche Anord-

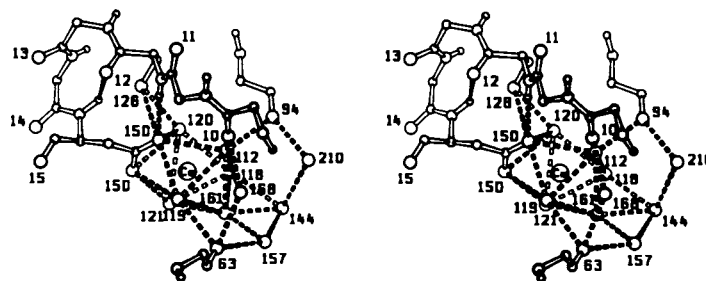


Abb. 6. Stereobild der Calciumbindungsstelle von RNase T1.

nung dieser Carbonylsauerstoffatome und der Kette aus den Wassermolekülen scheint günstig für die Bildung einer Koordinationsstelle für Kationen zu sein, da außer Ca^{2+} auch andere Kationen an RNase T1 binden und ihre Struktur stabilisieren (siehe Abschnitt 3.5).

3. Experimentelle Untersuchungen zur Konformationsstabilität

Die Konformationsstabilität eines globulären Proteins in Wasser, $\Delta G(H_2O)$, wird als Differenz zwischen freier Enthalpie von gefalteter und entfalteter Konformation unter physiologischen Bedingungen definiert. Zunächst beschreiben wir kurz, wie diese Konformationsstabilität gemessen wird^[40, 41], anschließend diskutieren wir die Ergebnisse einiger experimenteller Untersuchungen über die Konformationsstabilität von RNase T1 als Funktion der für den Biochemiker inter-

essantesten Parameter: Temperatur, pH-Wert, Salzkonzentration, Anteil an Disulfidbrücken und Aminosäuresequenz. So gewinnen wir tieferen Einblick in die Strukturcharakteristika und Kräfte, die dieses kleine globuläre Protein stabilisieren.

3.1. Messung der Konformationsstabilität

Beim Entfalten eines Proteins wird die definierte dreidimensionale Struktur, wie sie z.B. in Abbildung 2 gezeigt ist, zerstört, und das Protein nimmt eine Zufallskonformation („random coil“) an (siehe Abschnitt 3.6)^[41–45]. Diese Änderung der Konformation ist so dramatisch, daß sie mit beinahe jeder physikalischen Meßmethode beobachtet werden kann. Als Beispiel werden in Abbildung 7 oben die Absorptionsspektren im nahen UV von gefalteter und entfalteter RNase T1 gezeigt. RNase T1 enthält einen Tryptophanrest, der sich vollständig, und neun Tyrosinreste, die sich im Durchschnitt zu 82% im Inneren des gefalteten Proteins befinden. Der Kontakt dieser Aminosäuren mit dem Lösungsmittel beim entfalteten Protein bedingt hauptsächlich die

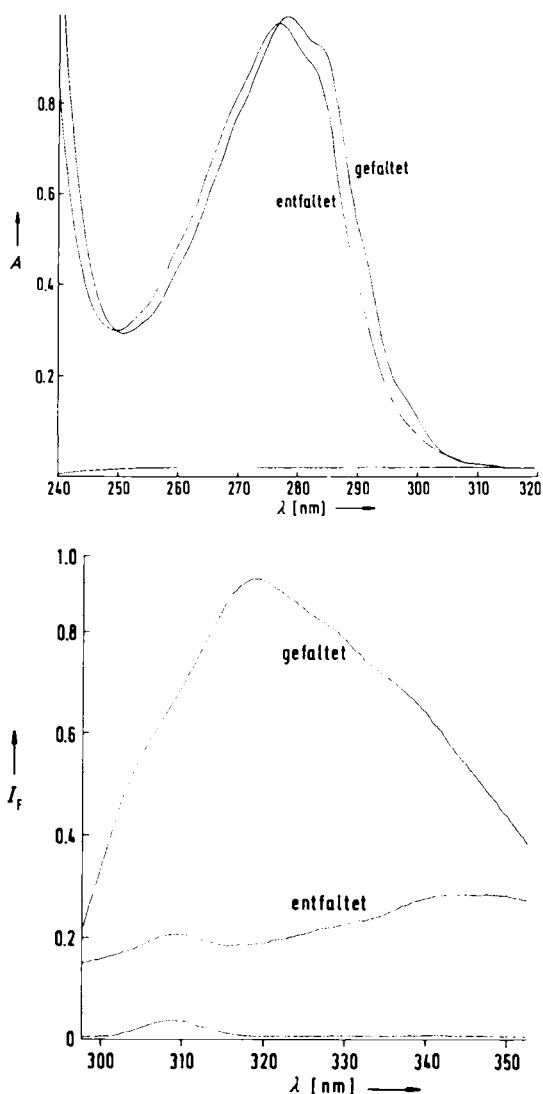


Abb. 7. Oben: Absorptionsspektrum gefalteter und entfalteter (8 M Harnstoff) RNase T1 ($0,52 \text{ mg mL}^{-1}$) [41]. Unten: Fluoreszenzemissionsspektrum (I_F = Fluoreszenzintensität) gefalteter und entfalteter (8 M Harnstoff) RNase T1 (Anregungs-Wellenlänge 278 nm, $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ RNase T1) [40].

Blauverschiebung im Absorptionsspektrum^[46]. In Abbildung 7 unten sind Fluoreszenzspektren von gefalteter und entfalteter RNase T1 wiedergegeben. Die Fluoreszenzintensität nimmt ab, weil einerseits der Tryptophanrest von einer apolaren in eine polare Umgebung gebracht wird, andererseits weil die Energieübertragung von den neun Tyrosinresten zum Tryptophanrest nach der Entfaltung weniger effizient ist^[47].

In Abbildung 8 oben sind zwei typische, durch Fluoreszenzmessungen erhaltene Entfaltungskurven dargestellt, die die Entfaltung von RNase T1 durch Harnstoff wiedergeben, und in Abbildung 8 unten sind zwei UV-spektroskopisch

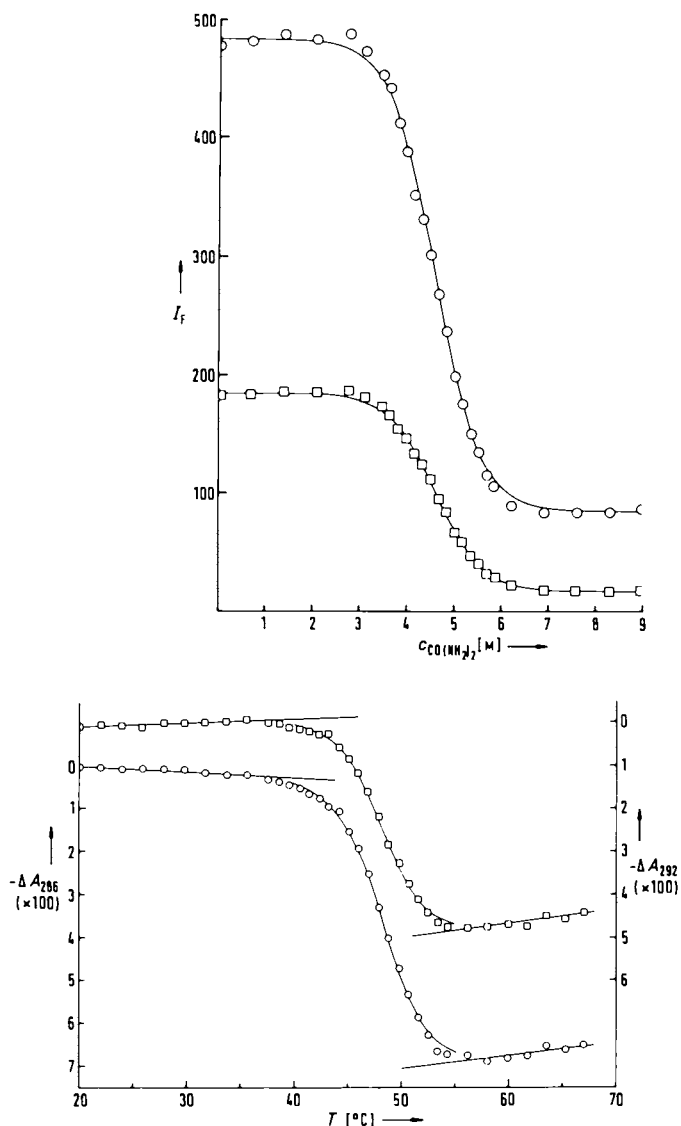
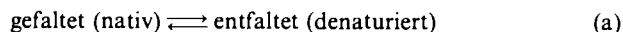


Abb. 8. Oben: Entfaltung von RNase T1 in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration $c_{\text{CO}(\text{NH}_2)_2}$ bei 25 °C und pH 7 in 30 mM MOPS-Puffer (MOPS = Na-Salz der 3-(*N*-Morpholino)propan-sulfonsäure) durch Messung der Fluoreszenzintensität I_F bei 320 nm nach Anregung bei 278 nm (○) und 295 nm (□) aufgenommen. Unten: Entfaltung der RNase T1 in Abhängigkeit von der Temperatur bei pH 7 in 30 mM MOPS-Puffer. Gemessen wurde die Absorptionsdifferenz bei 286 nm (○) und 292 nm (□) [41].

bestimmte Entfaltungskurven gezeigt, die die Entfaltung beim Erwärmen demonstrieren. Die Entfaltung wird als eine einzige steile Stufe in den Kurven beobachtet, was die Kooperativität dieses Prozesses widerspiegelt. Zur Analyse die-

ser Kurven nehmen wir einen Faltungsmechanismus an, der von nur zwei Proteinzuständen ausgeht [Gl.(a)].



Dabei kommen nur die gefaltete und die entfaltete Konformation in signifikanten Konzentrationen im Gleichgewicht vor. Dann kann der Anteil an entfalteten Molekülen (F_u) im Übergangsbereich aus Gleichung (b) berechnet werden

$$F_u = (y_f - y)/(y_f - y_u) \quad (\text{b})$$

den (Die Indices f und u für gefaltet bzw. entfaltet sind aus den englischen Begriffen folded bzw. unfolded abgeleitet.) Dabei ist y der im Entfaltungsexperiment beobachtete Parameter, y_f und y_u sind die Werte dieses Parameters für reine gefaltete bzw. entfaltete Konformation. Sie werden durch Extrapolation der Kurven vor bzw. nach vollständiger Entfaltung im Übergangsbereich bestimmt. In Abbildung 9 ist F_u in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration aufgetragen. Die Übereinstimmung der mit vier Meßmethoden

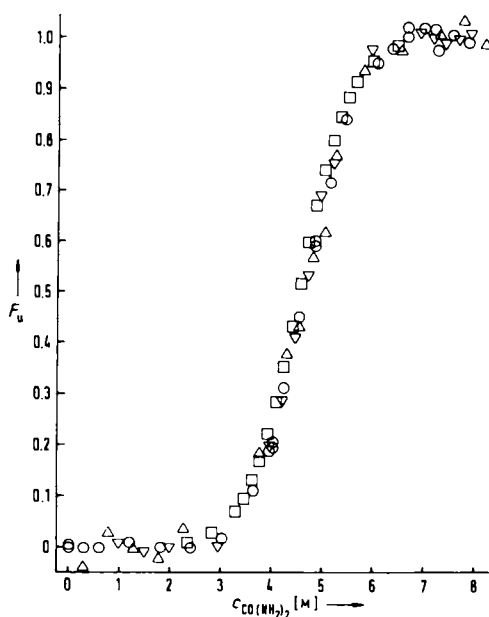


Abb. 9. Anteil an entfalteter RNase T1 (F_u) als Funktion der Harnstoffkonzentration, mit Gleichung (b) berechnet. Folgende Meßmethoden wurden zur Beobachtung der Entfaltung verwendet: Δ Circular dichroismus (CD) bei 238 nm, ∇ UV-Absorption bei 287 nm, \blacksquare Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 320 nm, \circ optische Rotationsdispersion (ORD) bei 295 nm.

bestimmten Werte zeigt, daß die Konzentration von teilweise gefalteten Zwischenstufen im Gleichgewicht gering ist. Diese und andere Ergebnisse rechtfertigen die Analyse von Gleichgewichtsexperimenten mit einem Zwei-Zustände-Modell des Faltungsmechanismus^[41, 48]. Schmid et al. haben allerdings gezeigt, daß teilweise gefaltete Zwischenstufen mit kinetischen Methoden während der Rückfaltung nachgewiesen werden können^[48]. (Die Entfaltung von RNase T1 durch Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid ist vollständig reversibel.) Zwischenstufen, die sehr früh während der Faltung gebildet werden, zeigen eine ausgeprägte Sekundärstruktur. Die Charakterisierung dieser Spezies ist von großem Interesse und würde uns noch weitere Einblicke in den Mechanis-

mus der Proteinfaltung geben^[49]. RNase T1 faltet sich demnach in drei Hauptschritten zurück: Der erste schnelle Schritt dauert weniger als eine Sekunde, während die folgenden zwei Schritte Minuten bis Stunden brauchen^[48]. Wie bei vielen anderen Proteinen kann man die langsamen Schritte durch das „Prolinmodell“ erklären^[50]. In nativer RNase T1 sind Tyr38 und Pro39 sowie Ser54 und Pro55 *cis*-, im entfalteten Zustand dagegen hauptsächlich *trans*-verknüpft: Die *trans/cis*-Isomerisierung dieser Einheiten verursacht die langsamen Faltungsphasen, wie durch Mutation von Ser54-Pro55 nach Gly54-Asn55 gezeigt werden konnte^[51]. Die Konformationsstabilität dieser Mutante ist nur $0.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ geringer als die der Wildtyp-RNase T1, bei der Rückfaltung fehlt aber einer der langsamen Schritte. Der Faltungsprozeß ist also durch den Wegfall einer der beiden langsamen Schritte einfacher geworden^[51].

Die freie Enthalpie der Entfaltung ΔG kann als Funktion der Harnstoffkonzentration oder der Temperatur aus Ergebnissen, wie sie beispielsweise in Abbildung 8 gezeigt sind, nach Gleichung (c) berechnet werden.

$$\Delta G = -RT \ln[F_u/(1 - F_u)] = -RT \ln[(y_f - y)/(y - y_u)] \quad (\text{c})$$

R ist die allgemeine Gaskonstante und T die absolute Temperatur. ΔG ist der Harnstoffkonzentration direkt proportional (Abb. 10), und $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ kann durch Extrapolation zur Harnstoffkonzentration = Null erhalten werden^[40]. Die

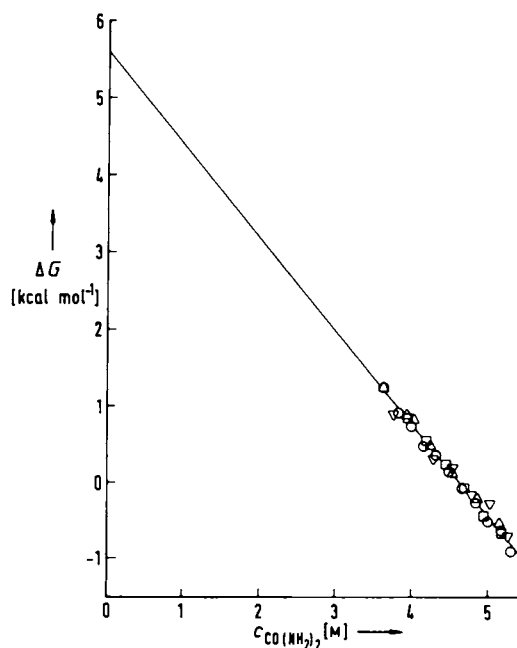


Abb. 10. ΔG der RNase-T1-Entfaltung als Funktion der Harnstoffkonzentration. Die ΔG -Werte wurden nach Gleichung (c) berechnet, und zwar mit Daten, die sich mit den in der Legende von Abbildung 9 genannten Methoden ergaben. Die durchgezogene Linie wurde nach folgender Gleichung berechnet [41]: $\Delta G = \Delta G(\text{H}_2\text{O}) - m(\text{CO}(\text{NH}_2)_2)$; $m = 1.21 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$, $\Delta G(\text{H}_2\text{O}) = 5.6 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Anwendung der linearen Extrapolation wurde in letzter Zeit durch theoretische^[52] und experimentelle Arbeiten^[53, 54] gerechtfertigt, es wurden aber auch andere Methoden angewendet^[40, 44, 55]. Abschätzungen von ΔG bei 25°C können auch aus Kurven, die die Entfaltung in Abhängigkeit von der

Temperatur zeigen (Abschnitt 3.3), oder durch kalorimetrische Messungen gewonnen werden^[45].

3.2. Die Konformationsstabilität von globulären Proteinen ist erstaunlich niedrig

„Für globuläre Proteine ist charakteristisch, daß sie in einem „physiologischen“ Medium eine bestimmte stabile Konformation annehmen... dies ist aber wahrscheinlich keine allgemeine Eigenschaft von Polypeptidketten. Die natürlichen Proteine, so groß ihre Zahl auch sein mag, sind nur ein winziger Teil der riesigen Zahl möglicher Kombination von Aminosäuren. Die Mehrzahl hiervon würde wahrscheinlich in keinem Lösungsmittel eine definierte Konformation annehmen.“

J. T. Edsall^[56]

„Die Stabilität eines Proteins muß groß genug sein, damit es seine native Konformation findet und beibehält, aber nicht so groß, daß Konformationsänderungen, die für viele Funktionen der Proteine wesentlich sind, unmöglich werden.“

W. J. Becktel, J. A. Schellman^[57]

In Tabelle 2 sind Schätzwerte für die Konformationsstabilität $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ und einige weitere Strukturdaten der RNase T1 und etlicher anderer Proteine zusammengefaßt. Die

Tabelle 2. Strukturinformationen und gemessene Konformationsstabilitäten von neun globulären Proteinen.

Protein [a]	R [b]	-SS- [c]	R-Typ [%] [d]	np(bur) [%] [e]	H-Brücken [f]	$\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ [kcal mol ⁻¹] [g]		
			c	p	np			
PPT	36	0	22	36	42	62	21	1.4
BPTI	58	3	24	21	55	65	32	14.3
RNase T1	104	2	14	43	43	79	96	8.9
RNase A	124	4	19	42	39	79	116	9.0
Lysozym	129	4	21	29	50	85	111	8.8
Nuclease	149	0	32	26	43	80	104	6.1
DHFR	159	0	25	21	54	79	123	5.9
T4 Lyso	164	0	27	25	48	83	109	7.6
α -CT	241	5	13	32	55	86	156	14.0

[a] PPT = Pankreas-Polypeptid (1PPT) [58]; BPTI = Rinderpankreas-Trypsin-Inhibitor (4PTI) [59]; RNase T1 = Ribonuclease T1 (1RNT) [60]; RNase A = Ribonuclease A (1RN3) [60]; Lysozym (5LYZ) [61]; Nuclease = Staphylokokken Nuclease (2SNS) [62]; DHFR = Dihydrofolat-Reduktase (4DFR) [63]; T4 Lyso = Bakteriophagen-T4-Lysozym (1LZM) [64]; α -CT = α -Chymotrypsin (4CHA) [65]. Für jedes Protein ist der Identifizierungscode für die Atomkoordinaten in der Brookhaven Data Bank (Brookhaven National Laboratories) in Klammern angegeben, gefolgt von der Literaturstelle, welcher der Wert für $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ entnommen wurde. [b] Zahl der Aminosäurereste. [c] Zahl der Disulfidbrücken. [d] Prozentualer Anteil der verschiedenen Typen von Aminosäureseitenketten: c = geladene (charged) Seitenketten (Asp, Glu, Lys, Arg); p = polare Seitenketten (Tyr, Ser, Thr, Asn, Gln, His); np = unpolare Seitenketten (Gly, Ala, Pro, Val, Ile, Leu, Cys, Met, Phe, Trp). [e] Prozentualer Anteil der im Protein eingeschlossenen (buried) unpolaren Seitenketten. Für jede Seitenkette wurde die Zugänglichkeit nach einem Programm von Lee und Richards [66] bestimmt. [f] Zahl der intramolekularen Wasserstoffbrücken in jedem Protein, nach Presta und Rose [67].

Konformationsstabilität der meisten natürlich vorkommenden Proteine liegt zwischen 5 und 15 kcal mol⁻¹. Für lebende Organismen ist es anscheinend günstig, wenn die gefaltete, biologisch aktive Konformation ihrer Proteine nur geringfügig stabiler ist als die inaktive, entfaltete Konformation. Die Gründe dafür sind ungeklärt. Dieses Phänomen könnte, wie von Becktel und Schellman vorgeschlagen^[57], für die Funktion eines Proteins wichtig sein, oder es könnte eine Rolle bei

der Metabolitregulation spielen, indem es die Konzentrationen von Schlüsselenzymen durch „protein turnover“ beeinflusst^[68]. Wenn man Edsalls Gedankengänge^[56] weiterführt, könnte man zu der Ansicht gelangen, daß es nicht möglich ist, durch Änderungen der Aminosäuresequenz eine wesentlich stabilere globuläre Konformation eines Proteins zu erhalten. Es konnte jedoch ein Protein aus vier Helices mit einer Konformationsstabilität von 22.5 kcal mol⁻¹ synthetisiert werden^[69]; außerdem wurde die Konformationsstabilität globulärer Proteine durch Austausch einer einzigen Aminosäure um 4.2,^[70] 4.8^[71] und 9.7 kcal mol⁻¹^[72] erhöht (siehe Abschnitt 3.7). Dies läßt vermuten, daß die Evolution stabilere Proteine hätte produzieren können, wären sie gebraucht worden.

3.3. RNase T1 kann durch Erwärmen oder Abkühlen entfaltet werden

Die Stabilitätskurve in Abbildung 11 zeigt, daß RNase T1 bei -5 °C und pH 7 am stabilsten ist (≈ 8 kcal mol⁻¹). Mit

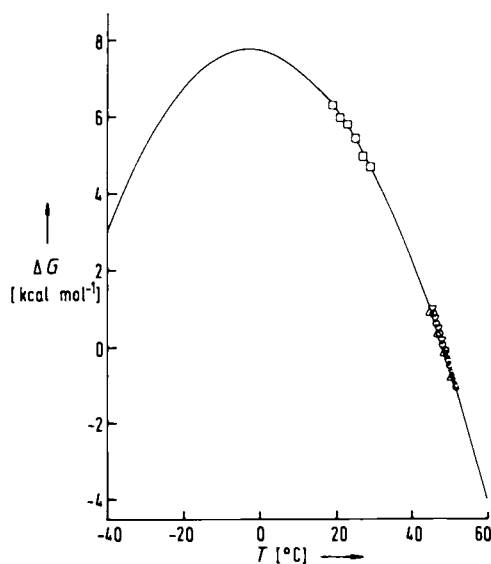


Abb. 11. ΔG der Entfaltung von RNase T1 als Funktion der Temperatur bei pH 7. Die Daten unter 30 °C wurden aus „Harnstoff-Entfaltungskurven“, die über 40 °C aus Kurven der thermischen Entfaltung ermittelt. Die durchgezogene Linie wurde mit Gleichung (d) aus den folgenden thermodynamischen Parametern berechnet: $T_m = 48.1$ °C, $\Delta H_m = 97.1$ kcal mol⁻¹, $\Delta C_p = 1.65$ kcal mol⁻¹ K⁻¹, $\Delta G(25$ °C) = 5.6 kcal mol⁻¹.

zunehmender oder abnehmender Temperatur sinkt die Stabilität. Diese Temperaturabhängigkeit wird durch eine Form der Gibbs-Helmholtz-Gleichung [Gl.(d)] beschrieben.

$$\Delta G(T) = \Delta H_m(1 - T/T_m) - \Delta C_p[(T_m - T) + T \ln(T/T_m)] \quad (d)$$

$\Delta G(T)$ ist hier ΔG bei der Temperatur T , T_m ist der Wendepunkt der Kurve der thermischen Entfaltung, ΔH_m ist die Enthalpieänderung bei der Entfaltung bei der Temperatur T_m und ΔC_p ist der Unterschied der Wärmekapazität zwischen gefalteter und entfalteter Konformation^[57]. Alle diese Parameter können entweder aus Kurven der thermischen Entfaltung^[40] oder durch Differential-Scanning-Calorimetry (DSC)^[73] bestimmt werden. Die ΔG -Werte unter 40 °C in Abbildung 11 sind aus „Harnstoff-Entfaltungskurven“ be-

stimmte $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ -Werte und dienen zur Abschätzung von ΔC_p [53]. Die ΔG -Werte über 40 °C dagegen wurden aus Kurven der thermischen Entfaltung erhalten. RNase T1 ist bei der Temperatur T_s am stabilsten, bei der gilt: $\Delta S = 0$. Sie ist durch Gleichung (e) bestimmt. Für RNase T1 liegt T_s bei

$$T_s = T_m \exp[-\Delta H_m/(T_m \Delta C_p)] \quad (\text{e})$$

– 5 °C, bei anderen bisher untersuchten Proteinen liegt T_s zwischen – 10 °C und 35 °C. Die Bedeutung von ΔC_p in der Thermodynamik der Proteinfaltung wurde zuerst von Brandts et al. erkannt [74]. Denaturierung durch Abkühlung wurde erstmals direkt an β -Lactoglobulin beobachtet [75]. Kürzlich wurde festgestellt, daß für T4-Lysozym [64], Myoglobin [76] und Staphylokokken-Nuclease [77] T_s über 0 °C liegt, so daß bei diesen Proteinen die Entfaltung sowohl durch Temperaturniedrigung als auch -erhöhung direkt beobachtet werden kann.

Der hohe positive ΔC_p -Wert für die Proteinfaltung bewirkt starke Temperaturabhängigkeiten von ΔH und ΔS . Nach der Kirchhoff-Gleichung gilt:

$$\Delta C_p = C_p(u) - C_p(f) = d(\Delta H)/dT \quad (\text{f})$$

Dabei ist $C_p(u)$ und $C_p(f)$ die Wärmekapazität für die entfaltete bzw. gefaltete Konformation. Beim Entfalten von RNase T1 bei pH 7 erhöht sich demnach ΔH von $\approx 18 \text{ kcal mol}^{-1}$ bei 0 °C auf 97 kcal mol^{-1} bei T_m (48.1 °C). Ein solches thermodynamisches Verhalten wird bei jeder Reaktion beobachtet, bei der hydrophobe Wechselwirkungen eine wichtige Rolle spielen. Bei der Entfaltung eines Proteins kommen die im Innern eingeschlossenen unpolaren Seitengruppen mit Wasser in Berührung. 80–85% der unpolaren Seitengruppen befinden sich bei allen globulären Proteinen, mit Ausnahme der kleinsten, im Innern des Moleküls (Tabelle 2). Die Seitengruppen werden im entfalteten Zustand von Wassermolekülen Clathrat-ähnlich umschlossen. Die Wärmekapazität eines entfalteten Proteins ist größer als die eines gefalteten Proteins, da diese Clathrate bei Temperaturerhöhung aufbrechen. Der gleiche Effekt, der hydrophobe Wechselwirkungen verursacht, bedingt also auch den hohen Wert von ΔC_p , der die Thermodynamik der Proteinfaltung bestimmt [73, 78–80].

3.4. Die Stabilität der RNase T1 ist am isoelektrischen Punkt am höchsten

RNase T1 ist bei 25 °C und pH 4.5 mit einer freien Enthalpie $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ von $\approx 8.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ am stabilsten, die Nettoladung ist dort nahe Null (Abb. 12). Die pH-Abhängigkeit der Konformationsstabilität eines globulären Proteins hängt in erster Linie von zwei miteinander verwandten Faktoren ab: 1. den elektrostatischen Wechselwirkungen geladener Gruppen und 2. den Unterschieden in den pK -Werten der ionisierbaren Gruppen der gefalteten und entfalteten Konformation [43, 81–84]. Die Verteilung der geladenen Gruppen auf der Oberfläche von RNase T1 bei pH 7 ist in Abbildung 13 dargestellt. Bei der Nettoladung Null trägt RNase T1 sieben positive Ladungen (3 His, 2 Lys, 1 Arg und 1 α -Amino) und sieben negative Ladungen von 13 Carboxylatgruppen (6 Asp, 6 Glu und 1 α -Carboxyl).

Im allgemeinen sind Ladungen auf der Oberfläche eines globulären Proteins so verteilt, daß mehr günstige als ungünstige elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den geladenen Gruppen stattfinden und so zur allgemeinen Konformationsstabilität beitragen [85]. Bei der Entfaltung eines Proteins werden die Ladungen voneinander entfernt und die effektive Dielektrizitätskonstante steigt. Folglich nehmen die elektrostatischen Wechselwirkungen besonders bei geringeren Salzkonzentrationen ab. In letzter Zeit wurden elektrostatische Effekte in Proteinen mehrfach berechnet [86]; die Berechnungen sind jedoch problematisch, da es zum Beispiel schwierig ist, eine effektive Dielektrizitätskonstante anzugeben [87, 88] und die Solvation zu berücksichtigen [89]. Außerdem gibt es nur wenig verlässliche experimentelle Daten von Proteinen, mit denen Modelle getestet werden können. Berechnungen von Wodak et al. [88] über die elektrostatischen Wechselwirkungen in RNase T1 werden im Abschnitt 4.4 diskutiert.

Aus den in Abbildung 12 gezeigten Ergebnissen läßt sich eine Schlußfolgerung ziehen, die auch für RNase A gilt [60].

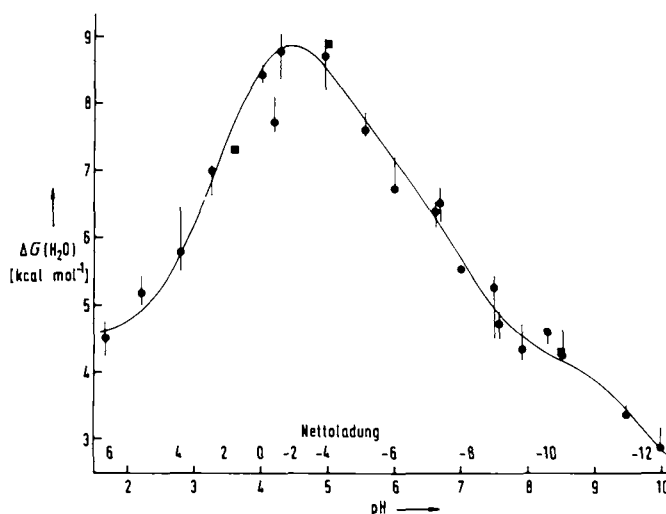


Abb. 12. $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ für die Entfaltung von RNase T1 als Funktion des pH-Werts bei 25 °C. Die angegebene ungefähre Nettoladung wurde aus der Titrationskurve für RNase T1 bestimmt [84]. Die durchgezogene Kurve wurde aus folgenden pK -Werten der gefalteten (pK_f) und entfalteten Konformation (pK_u) berechnet [60]: 3 Asp: $pK_f = 2.7$, $pK_u = 4.1$; 2 Glu: $pK_f = 5.5$ und 5.7 , $pK_u = 4.5$; 2 His: $pK_f = 7.2$ und 7.8 , $pK_u = 6.4$; 5 Tyr: $pK_f = 9.9$, $pK_u = 9.6$.

Die Konformationsstabilität von RNase T1 ist bei pH 10 um ca. 6 kcal mol^{-1} vermindert. Das Molekül trägt dann bereits eine Nettoladung von – 12, und abstoßende elektrostatische Wechselwirkungen sollten vorherrschen. Daraus kann man schließen, daß die elektrostatischen Wechselwirkungen von Ladungen auf der Oberfläche eines globulären Proteins einen relativ geringen Beitrag zur Konformationsstabilität leisten, der wahrscheinlich sogar geringer wiegt als Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen (siehe Abschnitte 4.2 und 4.3).

Ein weiterer wichtiger Beitrag zur pH-Abhängigkeit von $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ resultiert aus den Unterschieden zwischen den pK -Werten der einzelnen Seitengruppen in den gefalteten und entfalteten Konformationen [43, 90]. Bei RNase T1 steigt $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ um 6 kcal mol^{-1} , wenn man den pH von 10 auf 5 erniedrigt. Das liegt hauptsächlich daran, daß es Seitengruppen gibt, die Protonen in gefalteter Konformation stärker



Abb. 13. Stereobild der RNase T1. Basische Seitenketten sind blau und saure Seitenketten rot gezeichnet.

binden (höhere pK -Werte) als in entfalteter. Auf diese Weise verschieben sie das Gleichgewicht in Richtung gefalteter Konformation und erhöhen so deren Stabilität. Durch NMR-Titrations wurde gezeigt, daß in nativer RNase T1 die pK -Werte der Histidinreste 7.9 (His92), 7.8 (His40) und 7.3 (His27) betragen^[91]. Für die entfaltete Konformation erwartet man dagegen einen pK -Wert von 6.6 für die Histidinreste. Dies allein entspricht einer Änderung von $\Delta G(H_2O)$ um 4 kcal mol^{-1} ^[66]. Bei negativer Nettoladung der Moleküloberfläche sind höhere pK -Werte zu erwarten und bei positiver Nettoladung kleinere. Das Sinken von $\Delta G(H_2O)$ bei Erniedrigung des pH-Werts kann mit drei Asp-Gruppen erklärt werden, die in der gefalteten Konformation einen mittleren pK -Wert von 2.7 aufweisen, der beim Entfalten auf 4.1 steigt. In der Legende zu Abbildung 12 sind pK -Werte angegeben, aus denen die mit der durchgezogenen Kurve gezeichnete pH-Abhängigkeit berechnet wurde. Diese pK -Werte wurden für die Beschreibung der Daten willkürlich gewählt, um eine möglichst gute Anpassung zu erreichen. Sie sind selbstverständlich nicht die einzig mögliche Kombination von pK -Differenzen, die die beobachtete pH-Abhängigkeit von $\Delta G(H_2O)$ erklären kann.

Sowohl die pK -Unterschiede als auch die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen geladenen Gruppen begünstigen also die maximale Konformationsstabilität von RNase T1 in der Nähe des isoelektrischen Punkts, wie auch allgemein bei globulären Proteinen beobachtet wird.

3.5. Spezifische Bindung an die gefaltete Konformation stabilisiert RNase T1

Die Konformationsstabilität der RNase T1 wird durch Salz erhöht und kann durch Zugabe von $0.2 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$ beinahe verdoppelt werden (Abb. 14). Dieser bemerkenswerter Anstieg der Konformationsstabilität wird hauptsächlich durch die Bindung eines zweiwertigen Kations oder zweier einwertiger Kationen an eine Kationenbindungsstelle der nativen RNase T1 verursacht, an der Asp15 beteiligt ist. Ein weiterer Grund ist die Bindung eines $[\text{HPO}_4]^{2-}$ -Ions an die Anionenbindungsstelle, die zugleich das aktive Zentrum

ist^[92] (siehe auch Abb. 4 Mitte und 6). Der Zusammenhang zwischen dem Zuwachs der Konformationsstabilität $\Delta(\Delta G)$ der „freien Konzentration“ der gebundenen Spezies L und der Bindungskonstante K wird durch Gleichung (g) beschrieben^[43, 93, 94].

$$\Delta(\Delta G) = \Delta G(L) - \Delta G(L = 0) = RT \ln(1 + K[L]) \quad (g)$$

Schon geringe Bindungskonstanten wie z.B. $6.2 (\text{Na}^+)$, $155 (\text{Mg}^{2+})$ und 282 M^{-1} ($[\text{HPO}_4]^{2-}$) sind ausreichend, um die Erhöhung der Stabilität zu erklären^[92]. Ein wichtiges Ziel der Veränderung von Proteinen mit gentechnologischen Methoden ist die Erhöhung der Stabilität. Unsere Untersuchungen zeigen, daß es für die Erhöhung der Stabilität von Proteinen günstig sein kann, an ihrer Oberfläche durch geeigneten Austausch von Aminosäuren spezifische Bindungsstellen für Kationen und Anionen zu schaffen. Die genauen Kenntnisse der Struktur von Kationen- und Anionenbindungsstellen in Proteinen wird beim „Entwurf“ neuer Bindungsstellen sehr hilfreich sein^[20, 21, 95].

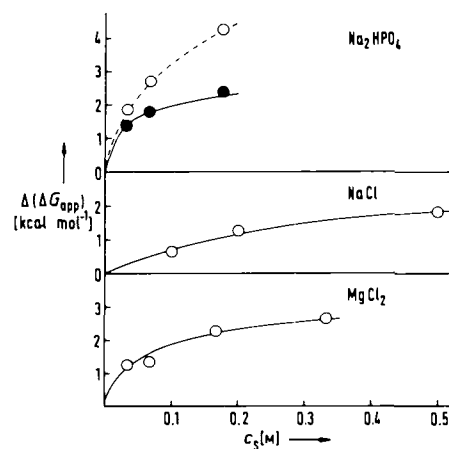


Abb. 14. Änderung der freien Enthalpie $\Delta(\Delta G)$ bei der Entfaltung von RNase T1 als Funktion der Salzkonzentration c_s . Für Na_2HPO_4 wurde der Beitrag der Na^+ -Ionen von den $\Delta(\Delta G)$ -Werten für Na_2HPO_4 abgezogen, um den Beitrag von $\Delta(\Delta G)$ für $[\text{HPO}_4]^{2-}$ zu bestimmen (●). Die durchgezogenen Kurven wurden mit Gleichung (g) und den folgenden Bindungskonstanten berechnet: 155 M^{-1} für MgCl_2 , 6.2 M^{-1} für NaCl und 282 M^{-1} für Na_2HPO_4 [92].

Die Stabilisierung eines Proteins durch spezifische Bindung eines Liganden kennt man schon lange. Im Jahre 1890 berichteten O'Sullivan und Thomson^[96]: „... wir haben gezeigt, daß Invertase durch Zugabe von Rohrzucker ohne Schaden um 25 °C höhere Temperaturen ertragen kann als ohne Zucker. Diese bemerkenswerte Tatsache können wir nur dadurch erklären, daß Invertase mit Zucker einen Komplex eingeht.“ In den folgenden Jahren wurden viele Aspekte der Stabilisierung von Enzymen durch Substrate und Inhibitoren untersucht^[97]. Wir haben beispielsweise die Stabilisierung von Lysozym durch Tri-*N*-Acetylglucosamin^[94] und die Stabilisierung von RNase T1 durch den Inhibitor 2'-GMP gemessen. In einer Konzentration von nur 80 µM erhöht 2'-GMP die Konformationsstabilität von RNase T1 um über 0.5 kcal mol⁻¹. Die Stabilisierung durch eine (unspezifische) Ionenbindung hat im Gegensatz zur Bindung eines Inhibitors den großen Vorteil, daß dabei nicht unbedingt in die Funktionsweise des aktiven Zentrums eingegriffen wird.

3.6. Disulfidbrücken stabilisieren RNase T1 durch Erhöhung der freien Enthalpie entfalteter Konformationen

Die 2-10-Disulfidbrücke in RNase T1 ist dem Lösungsmittel zu etwa 90 % zugänglich, die 6-103-Disulfidbrücke ist dagegen vollständig im Innern verborgen (Abb. 2). Es ist also verständlich, daß die 2-10-Disulfidbrücke leichter reduziert wird als die 6-103-Disulfidbrücke. Man kann deshalb ein Derivat der RNase T1 gewinnen, in dem nur die 2-10-Disulfidbrücke gespalten ist^[98]. Derivate mit einer oder zwei gespaltenen Disulfidbrücken wurden hergestellt, um den Einfluß dieser Disulfidbrücken auf die Konformationsstabilität der RNase T1 zu untersuchen^[99]. Aktivität, Schmelzpunkt und Konformationsstabilität dieser Derivate sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Durch das Spalten der

Tabelle 3. Aktivität, Schmelzpunkte und Konformationsstabilität von RNase T1 und Derivaten mit einer oder zwei gespaltenen Disulfidbrücken [a] [99].

Protein	Aktivität [b] [%]	<i>T_m</i> [c] [°C]	Δ <i>G</i> (H ₂ O) [d] [kcal mol ⁻¹]	Δ(Δ <i>G</i>) [kcal mol ⁻¹]
RNase T1	100	59.3	10.2	
(2-10)-RCM-T1	86	53.5	6.8	3.4
R-T1	53	27.2	3.0	7.2
RCAM-T1	43	21.2	1.5	8.7
RCM-T1	35	16.6	0.9	9.3

[a] (2-10)-RCM-T1 = RNase T1 mit reduzierter 2-10-Disulfidbrücke und carboxymethylierter Cysteingruppe; R-T1 = reduzierte RNase T1; RCAM-T1 = reduzierte, carboxamidomethylierte RNase T1; RCM-T1 = reduzierte, carboxymethylierte RNase T1. Alle Experimente wurden in 0,1 M Na-Formiat-Puffer bei pH 5,0 und 0,25 M NaCl durchgeführt. [b] RNA-Hydrolyse bei 5 °C. [c] Scheitelpunkt der Kurve der thermischen Entfaltung. [d] Konformationsstabilität bei 12,5 °C.

2-10-Disulfidbrücke wird die Konformationsstabilität um über 3 kcal mol⁻¹ erniedrigt, durch das Spalten beider Disulfidbrücken um 7 bis 9 kcal mol⁻¹, je nach blockierender Gruppe. Die Disulfidbrücken liefern also einen signifikanten Beitrag zur Stabilität der RNase T1. Das ist besonders bemerkenswert, da das homologe und ähnlich wie RNase T1 gefaltete Enzym Barnase^[100, 101] stabiler ist als RNase T1, obwohl es keine Disulfidbrücken enthält^[71, 102].

Die fünf Proteine in Tabelle 2, die durch Disulfidbrücken stabilisiert sind, entfalten sich alle, wenn die Disulfidbrücken gespalten werden. Nur RNase T1 faltet sich zurück und behält seine Funktion, wenn beide Disulfidbrücken gespalten und die Cysteinreste carboxymethyliert worden sind. Diese Eigenschaften der RNase T1 sind aber keine Ausnahme, da sich sowohl RNase A^[103] als auch Lysozym^[104] ähnlich verhalten. Für beide wurden enzymatisch aktive Derivate hergestellt, in denen zwei der vier Disulfidbrücken gespalten und die Cysteinreste blockiert wurden. Diese Untersuchungen weisen darauf hin, daß die gefaltete Konformation der Proteine zu einem gewissen Grade flexibel ist^[105], worauf auch H/D-Austauschexperimente im kristallinen Zustand hinweisen^[106].

Die Annahme, daß Proteine mit gespaltenen Disulfidbrücken in 6 M Guanidinhydrochlorid (Gdn · HCl) oder 8 M Harnstoff^[42] in eine Zufalls-Konformation („random coil“-Konformation) übergehen, ist wahrscheinlich falsch. Untersuchungen an Wildtyp- und Mutanten-Staphylokokken-Nuclease^[107] und an anderen Proteinen ohne Disulfidbrücken, die im entfalteten Zustand sehr verschieden mit dem Denaturierungsmittel wechselwirken^[66], lassen vermuten, daß die Konformationen von entfaltenen Proteinen nicht „zufällig“ sind, sondern auch von der Aminosäuresequenz der Polypeptidkette abhängen. Der entfaltete Zustand eines Proteins hat also möglicherweise einen viel größeren Einfluß auf die Konformationsstabilität als bisher angenommen wurde^[107]. Die Schmelzpunkte von RCM- und RCAM-RNase T1 (Tabelle 3) liegen unter 25 °C. Somit liegt unter physiologischen Bedingungen ein entfalteter Zustand vor, der nun mit den entfaltenen Konformationen, die bei höheren Temperaturen oder in Gegenwart von Gdn · HCl oder Harnstoff existieren, verglichen werden kann. RNase T1 ist damit ein gutes Modellsystem, um den entfaltenen Zustand von Proteinen besser verstehen zu lernen.

Disulfidbrücken erhöhen die Konformationsstabilität hauptsächlich dadurch, daß sie die Beweglichkeit der entfaltenen Konformation einschränken und dabei die Konformationsentropie erniedrigen. Auf der Grundlage unserer und anderer Experimente haben wir Gleichung (h) zur Abschätzung des Einflusses der Quervernetzung auf die Konformationsentropie eines Proteins vorgeschlagen.

$$\Delta S_{\text{konf}} = -2.1 - (3/2)R \ln n \quad (\text{h})$$

Dabei ist *n* die Anzahl der Aminosäurereste, die die Schleife zwischen der Quervernetzung bilden^[99]. Nach dieser Gleichung wird die Konformationsstabilität durch Schleifen von 15, 45 oder 135 Aminosäuren um 3, 4 bzw. 5 kcal mol⁻¹ erhöht. In globulären Proteinen sind 49 % der Disulfidbrücken durch weniger als 24 Aminosäuren getrennt; die durchschnittliche Schleifengröße beträgt 15 Aminosäuren^[108].

Aus diesen Resultaten sollte man schließen, daß zusätzliche Disulfidbrücken die dreidimensionale Faltung der Proteine stabilisieren würden. Die ersten Experimente in dieser Richtung waren aber enttäuschend. In das Enzym Subtilisin wurden sieben verschiedene zusätzliche Disulfidbrücken eingebaut, und keines der erhaltenen Proteine war stabiler als das Wildtyp-Enzym^[109]. Dies zeigt auch, daß es schwierig ist, in ein Protein Disulfidbrücken einzubauen, die keine zusätzlichen Spannungen auf die gefaltete Konformation ausüben und sie dadurch destabilisieren. Vor kurzem wurden

mit T4-Lysozym ermutigende Ergebnisse erhalten^[110]. Drei verschiedene Disulfidbrücken wurden eingefügt, wobei sich die T_m -Werte jeweils um 5, 6 bzw. 11 K erhöhten. Wurden alle drei Disulfidbrücken zugleich eingebaut, erhöhte sich die Schmelztemperatur des Proteins um 23 K.

3.7. RNase T1 kann durch Aminosäureaustausch stabilisiert oder destabilisiert werden

Mit Mutanten, die wir durch ortsgerichtete Mutagenese hergestellt haben, können wir mehr über die Kräfte lernen, die zur Konformationsstabilität der RNase T1 beitragen^[5, 111]. Tabelle 4 zeigt einige unserer ersten Ergebnisse mit einer Mutante, deren Konformationsstabilität um $0.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ erhöht ist, während eine andere eine um $0.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ erniedrigte Stabilität zeigt. In der Doppelmutante heben sich diese beiden Beiträge gegenseitig auf, ihre Konformation ist also beinahe genauso stabil wie die der Wildtyp-RNase-T1.

Tabelle 4. Parameter der durch Harnstoff oder Erwärmung induzierten Entfaltung von RNase T1 und dreier Mutanten bei pH 7.0 in 30 mM MOPS-Puffer [111].

Protein	„Harnstoff-Entfaltung“			
	$\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ [a] [kcal mol ⁻¹]	m [a] [cal mol ⁻¹ M ⁻¹]	$[\text{Harnstoff}]_{1/2}$ [a] [M]	$\Delta(\Delta G)$ [b] [kcal mol ⁻¹]
Wildtyp (<i>A. oryzae</i>)	5.62	1240	4.53	
Wildtyp (Klon)	5.61	1235	4.54	
Gln25 → Lys [f]	6.39	1210	5.30	0.94
Glu58 → Ala	4.72	1200	3.92	-0.77
Doppelmutante	6.29	1360	4.58	0.05

Protein	thermische Entfaltung				
	ΔS_m [c] [cal mol ⁻¹ K ⁻¹]	ΔH_m [c] [kcal mol ⁻¹]	T_m [c] [°C]	$\Delta G(25)$ [d] [kcal mol ⁻¹]	$\Delta(\Delta G)$ [e] [kcal mol ⁻¹]
Wildtyp (<i>A. oryzae</i>)	298	96	48.3	5.5	
Wildtyp (Klon)	288	93	49.3	5.5	
Gln25 → Lys	330	107	51.7	6.9	0.93
Glu58 → Ala	270	86	46.0	4.5	-0.78
Doppelmutante	299	93	48.8	5.4	0.06

[a] Die Auftragung von ΔG als Funktion der Harnstoffkonzentration wurde durch Kleinst-Quadrat-Anpassungen der Meßwerte an die Gleichung: $\Delta G = \Delta G(\text{H}_2\text{O}) - m$ (Harnstoff) gewonnen. $[\text{Harnstoff}]_{1/2}$ = Wendepunkt der „Harnstoff-Entfaltungskurve“. [b] $\Delta(\Delta G) = \Delta([\text{Harnstoff}]_{1/2}) \times m$ (Wildtyp). Daraus erhält man $\Delta(\Delta G)$ bei einer Harnstoffkonzentration zwischen den entsprechenden Werten von $[\text{Harnstoff}]_{1/2}$. [c] T_m = Wendepunkt der Kurve der thermischen Entfaltung; ΔS_m und ΔH_m = Änderung von Entropie und Enthalpie bei T_m . [d] ΔG bei 25 °C. $\Delta G(25)$, wurde nach Gleichung (d) mit $\Delta C_p = 1650 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ berechnet [53]. [e] $\Delta(\Delta G) = \Delta(T_m) \times \Delta S_m$ (Wildtyp) ergibt $\Delta(\Delta G)$ bei einer Temperatur zwischen den entsprechenden Werten von T_m . [f] Die gentechnisch hergestellte Mutante Gln25 → Lys entspricht dem auch natürlich vorkommenden Isoenzym Lys25-RNase-T1.

Die Mutation Gln25Lys ändert die α -Helix der RNase T1 an einer Stelle, die dem Lösungsmittel ausgesetzt ist (Abb. 2). Es ist ermutigend, daß diese Substitution die Konformationsstabilität um fast 1 kcal mol^{-1} erhöht, ohne die Aktivität zu ändern. Die Mutante Glu58Ala ist wichtig, weil Glu58 zum aktiven Zentrum der RNase T1 gehört (Abb. 4 Mitte) und eine besondere chemische Reaktivität aufweist^[4]. Kürzlich wurde eine interessante pH-Abhängigkeit dieser Mutante gefunden: Wildtyp-RNase-T1 ist bei pH-Werten unter 7.5 stabiler als die Mutante, bei pH-Werten über 7.5 dagegen weniger stabil^[60b]. Dies liegt daran, daß der durchschnittliche pK-Wert der Histidinreste in der Mutante von 7.6 (Wildtyp) auf 7.1 gesenkt wurde (siehe auch Ab-

schnitt 3.4). Der größte Effekt zeigt sich bei His40, dessen pK-Wert von 7.6 (Wildtyp) auf 7.1 verringert ist. Das unterstützt eine Hypothese von Rüterjans und Pongs^[38d], die lange vor der Strukturaufklärung aufgestellt wurde: Danach beruht der hohe pK-Wert darauf, daß His40 mit einem Carboxylat-Ion einer sauren Aminosäure wechselwirkt. Beide angesprochenen Mutationen sind komplex, und Änderungen von Konformationsentropie, Wasserstoffbrücken sowie elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen tragen wahrscheinlich alle zu den beobachteten Unterschieden in der Konformationsstabilität bei.

Im allgemeinen verringern gentechnologisch erzeugte oder natürliche Mutationen die Stabilität eines Proteins, aber in einigen Fällen führt der Austausch einer bestimmten Aminosäure zu einer starken Erhöhung der Konformationsstabilität. Das ist für biotechnologische Anwendungen von großem Interesse, die oft zum Ziel haben, ein Protein so stabil wie möglich zu machen^[112–115]. In der Barnase-Mutante Ala14Leu sind T_m um 12 K und $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ um $4.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ erhöht^[71], und in Cytochrom c steigt T_m bei der Asn57Ile-Mutante um 17 K und $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ ebenfalls um $4.8 \text{ kcal mol}^{-1}$, bezogen auf das Wildtyp-Protein^[70]. In Tryptophan-Synthase wurde Glu an Position 49 durch jede mögliche Aminosäure außer Arg ersetzt und die Konformationsstabilität gemessen^[72]. Die Glu49Ile-Mutante hat einen um $9.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ erhöhten Wert von $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$. Das ist der größte positive Effekt, der bisher durch den Austausch einer einzigen Aminosäure beobachtet wurde. Die Effekte des Austauschs mehrerer Aminosäuren sind oft so lokalisiert, daß sie sich additiv auf die Stabilität auswirken. In Subtilisin wurden beispielsweise sechs Aminosäuren ausgewechselt, wobei jeder einzelne Austausch die Stabilität um 0.3 bis $1.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ erhöhte. Als alle sechs Reste zugleich ausgetauscht wurden, erhöhte sich die Stabilität um $3.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ ^[115]. Auf der Suche nach stabileren Proteinen durch Aminosäureaustausch sind aber die Natur und zufällige Mutagenese noch immer erfolgreicher als Biochemiker, die gezielt von der dreidimensionalen Struktur gefalteter Proteine ausgehen.

4. Theoretische Studien zur Konformationsstabilität

In diesem Abschnitt werden wir Informationen über Konformationsentropie, hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken und andere elektrostatische Wechselwirkungen benutzen, um die wichtigsten Beiträge zur Konformationsstabilität der RNase T1 zu ermitteln. Obwohl dies nur eine grobe Abschätzung von Größenordnungen sein kann, wird sich zeigen, daß die geringe Konformationsstabilität der RNase T1 als Balance aus viel stärkeren entgegengesetzten Kräften resultiert.

4.1. Konformationsentropie

Die Konformation der Hauptkette eines Proteins kann durch Angabe der Torsionswinkel jeder N-C α -Bindung (Φ) und jeder C α -C-Bindung (Ψ) beschrieben werden^[116]. Da die Konformation der Hauptkette und der meisten Seitengruppen durch Röntgenkristallographie bestimmt werden kann,

muß die Rotation um diese Bindungen im gefalteten Protein eingeschränkt sein. Im entfalteten Zustand sind diese Rotationen weniger behindert, und die Polypeptidkette kann wesentlich mehr Konformationen annehmen. Der entfaltete Zustand hat damit eine viel höhere Konformationsentropie als der gefaltete. Dies ist der stärkste Beitrag, der die Entfaltung begünstigt.

Kauzmann hat 1954 vorgeschlagen, daß eine zufällig gewundene Polypeptidkette z^x -Konformationen annehmen kann^[117]. Dabei ist x die Anzahl der Bindungen, um die Rotation möglich ist, und z die Anzahl der Rotationszustände gleicher Energie pro Bindung. Für eine erste Abschätzung verwendete er Werte von $x = 3.33$ und $z = 2$ für jede Aminosäure. Wenn für das gefaltete Protein nur eine einzige Konformation möglich wäre, führte dies zu einer Konformationsentropie ΔS_{konf} [Gl. (i)], die die ungefaltete Konforma-

tion begünstigte. Dies ergibt $4.1 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ und $1.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ für jede Aminosäure bei 25°C . Ein ähnlicher Ansatz wurde auch von Dill unter einem anderen Gesichtspunkt gemacht^[118].

$$\Delta S_{\text{konf}} = R \ln z^x \quad (\text{i})$$

Privalov^[45] zeigte, daß für mehrere kleine globuläre Proteine die spezifische Entfaltungsenthalpie zu einem Wert von 13 cal g^{-1} bei 110°C konvergiert. Er schloß daraus, daß „... der Beitrag des Wassers zur Entfaltungsentropie bei 110°C klein ist, und die beobachteten Effekte daher der wachsenden Konformationsfreiheit der Polypeptide bei der Entfaltung zugeschrieben werden können“. Als durchschnittlicher Beitrag wurden $4.2 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ pro Aminosäure beobachtet, ein Wert der dem von Kauzmann gefundenen erstaunlich nahekommt.

Da die gefalteten Konformationen der globulären Proteine keine starren Strukturen sind^[105], können sie sicher nicht durch eine einzige Konformation dargestellt werden. Karplus et al.^[119] haben auf der Grundlage von Berechnungen vorgeschlagen, daß die Konformationsentropie eines gefalteten Proteins groß ist, und zwar ca. $35 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ pro Aminosäure; die Entropie jedes beliebigen Konformers des ungefalteten Proteins sollte etwa denselben Betrag haben. Man könnte also annehmen, daß das Abzählen der entfalteten Konformationen, wie es Kauzmann in seinem einfachen Ansatz vor 30 Jahren vorgeschlagen hat, wenigstens eine grobe Abschätzung von ΔS_{konf} ergibt. Wir haben diese Methode benützt, um den Beitrag der Konformationsentropie zur Stabilität der RNase T1 abzuschätzen (siehe Tabelle 5).

Disulfidbrücken beschränken die Zahl der möglichen Konformationen einer zufällig gewundenen Polypeptidkette und erniedrigen damit die Konformationsentropie. Zur Abschätzung dieses Beitrags in Proteinen leiteten Schellmann^[120] und Flory^[121] und später auch Chan und Dill^[122] aus der Polymertheorie^[123] entsprechende Gleichungen ab. Mit Hilfe von Gleichung (h) (Abschnitt 3.6) haben wir ΔS_{konf} für die Einschränkungen der freien, ungefalteten Konformation von RNase T1 durch die beiden Disulfidbrücken korrigiert. Das scheint sinnvoll, da die empirische Gleichung (h) ja auch auf experimentellen Daten für RNase T1 basiert^[99].

Tabelle 5. Abschätzung der Beiträge von Konformationsentropie, hydrophoben Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken zur Konformationsstabilität der RNase T1.

A) Konformationsentropie

Rotation um die Winkel Φ , Ψ und χ : 104 Aminosäuren $\times -1.2 \text{ kcal pro Aminosäure [a]}$.

Beiträge der Disulfidbrücken:

$T\Delta S(\text{SS-}) = T(2.1 - (3/2)R \ln n)$, wobei n die Zahl der Aminosäurereste ist, die durch die Disulfidbrücke eine Schleife bilden [b].

RNase-T1-Disulfidbrücken: 2 nach 10 ($n = 9$) und 6 nach 103 ($n = 98$).

$T\Delta S(\text{SS-}) = 2.6 + 4.7 = 7.3 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Netto: $T\Delta S_{\text{konf}} = -124 + 7 = -117 \text{ kcal mol}^{-1}$

B) Hydrophobe Wechselwirkungen

Seitenkette	Häufigkeit	wasserunzugänglich [c]	ΔG_{tr} [d]	wasserunzugänglich [c] $\times \Delta G_{\text{tr}}$
Trp	1	1.0	3.1	3.1
Phe	4	3.7	2.4	8.9
Ile + Leu	5	4.4	2.4	10.6
Val	8	6.7	1.7	11.4
Tyr	9	8.9	1.3	11.6
Cys	4	3.3	1.3	4.3
Pro	4	3.4	1.0	3.4
Thr	6	3.3	0.4	1.3
Ala	7	4.7	0.4	1.9
His	3	2.3	0.2	0.5
Ser	15	3.5	0.0	0.0
Gln	3	2.4	-0.3	-0.7
Asn	9	5.0	-0.8	-4.1
-CH ₂ - [e]	23	16.6	0.7	11.6

Netto: Hydrophobe Wechselwirkungen = 64 kcal mol^{-1}

C) Wasserstoffbrücken

Gefaltete RNase T1 enthält 96 schwache bis starke Wasserstoffbrücken [f].

96 Wasserstoffbrücken $\times 0.76 \text{ kcal pro Wasserstoffbrücke [g]} = 73 \text{ kcal mol}^{-1}$.

In gefalteter RNase T1 bilden vier Peptid-NH- und zwei Peptid-C=O-Gruppen keine Wasserstoffbrücken und sind vollständig wasserunzugänglich. Alle Seitenketten-Sauerstoffatome bilden Wasserstoffbrücken [h].

$4 \times 1.4 \text{ kcal pro NH-Wasserstoffbrücke [h]} + 2 \times 2.8 \text{ kcal pro C=O-Wasserstoffbrücke [h]} = -11 \text{ kcal mol}^{-1}$

Netto: Wasserstoffbrücken = $73 - 11 = 62 \text{ kcal mol}^{-1}$

D) Summe

$\Delta G(\text{H}_2\text{O}) = T\Delta S_{\text{konf}} + \text{hydrophobe Wechselwirkungen} + \text{Wasserstoffbrückenbindungen}$

$\Delta G(\text{H}_2\text{O}) = -117 + 64 + 62 = 9 \text{ kcal mol}^{-1}$

[a] Basierend auf einem theoretischen Wert von $4.1 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ pro Aminosäure von Kauzmann [117], und einem experimentellen Wert von $4.2 \text{ cal}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ pro Aminosäure von Privalov [45]. [b] Siehe [99]. [c] Siehe [66b]. [d] ΔG_{tr} gibt die Änderung der freien Enthalpie für den Transfer von Aminosäureseitenketten aus unpolare Umgebung (*n*-Octanol) in Wasser an; siehe [126]. [e] Die CH₂-Gruppen der Seitenketten Asp, Glu, Arg und Lys. [f] Siehe [16]. [g] Fersht [125] schlägt 0.5 bis $1.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ vor. $0.76 \text{ kcal mol}^{-1}$ wurden gewählt, damit $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ (experimentell) = $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ (theoretisch). [h] N. Pace, R. Erickson, unveröffentlichte Beobachtung.

4.2. Hydrophobe Wechselwirkungen

Zur Abschätzung des Beitrages der hydrophoben Wechselwirkungen zur Stabilität globulärer Proteine werden zwei wichtige Informationen benötigt. Zum einen muß man wissen, welche unpolare Gruppen bei der Proteinfaltung den Kontakt zum Wasser verlieren, zum anderen muß für jede unpolare Gruppe die Änderung der freien Enthalpie beim Übergang vom Wasser ins Innere eines globulären Proteins (ΔG_{tr}) bekannt sein.

Kürzlich wurde die Zugänglichkeit von Wasser zu den einzelnen Aminosäuren für 37 monomere globuläre Proteine, deren Kristallstruktur bei hoher Auflösung bekannt ist, untersucht^[124]. Die Aminosäureseitenketten können nach ihren Eigenschaften in geladene, polare und unpolare Seitenketten eingeteilt werden (Tabelle 2). Der für das Lösungsmittel zugängliche Teil eines gewöhnlichen globulären Proteins besteht nach dieser Klassifizierung zu etwa gleichen

Teilen aus diesen drei Typen von Aminosäuren. Das Innere des Proteins enthält dagegen hauptsächlich unpolare und sehr wenige geladene Seitengruppen. Es ist zu beachten, daß für die Proteine in Tabelle 2 der Anteil an unpolaren Gruppen zwischen 42 und 55% liegt. Wie zu erwarten, steigt der Anteil der eingeschlossenen unpolaren Gruppen mit wachsender Größe des Proteins und erreicht für α -Chymotrypsin 86%.

Bei gefalteter RNase T1 sind 70% der Peptidgruppen und 79% der unpolaren Seitengruppen für Wasser unzugänglich. In Abbildung 15 wird gezeigt, welche Peptidgruppen und unpolare Seitengruppen in gefalteter RNase T1 zu mindestens 50% verborgen sind. In Tabelle 5 wird die Zugänglichkeit für jeden Typ polarer und unpolarer Seitengruppen angegeben. Für unsere Berechnungen nehmen wir an, daß jede dieser verborgenen Seitengruppen bei der Entfaltung für Wasser vollständig zugänglich wird. Dies ist zwar wahrscheinlich nicht der Fall (siehe Abschnitt 3.6), aber da wir über die Benetzung völlig entfalteter Proteine noch zu wenig wissen, haben wir keine andere Wahl. Das bedeutet, daß unsere Abschätzungen für den Beitrag hydrophober Wechselwirkungen zur Stabilität der RNase T1 als obere Grenze anzusehen sind.

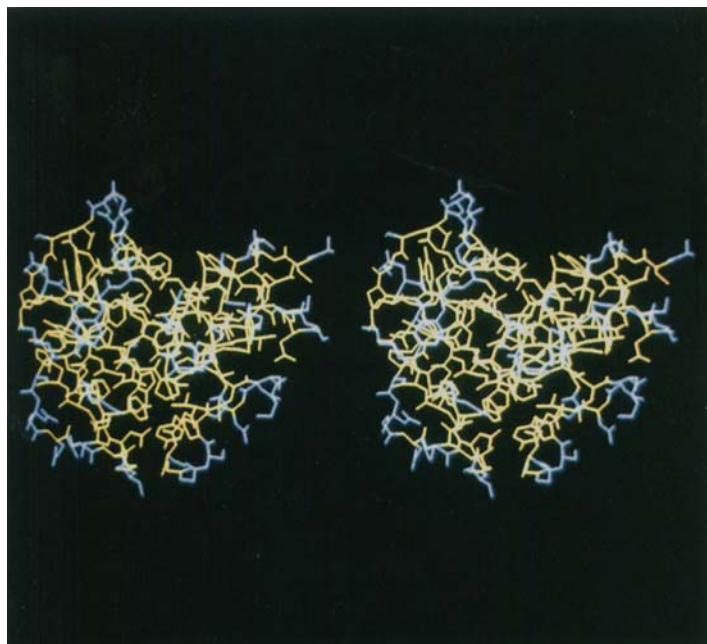


Abb. 15. Lösungsmittelzugänglichkeit der RNase-T1-Seitenketten. Dieses Stereobild zeigt alle dem Lösungsmittel Wasser zu über 50% zugänglichen Peptidgruppen und Seitenketten in hellblau, die weniger und nicht zugänglichen in gelb.

Die Änderung der freien Enthalpie für den Transfer von Aminosäureseitenketten aus unpolare Umgebung, wie *n*-Octanol, Hexan und *N*-Methylacetamid in Wasser (ΔG_{tr}) wurde seit 1962 in einer Serie experimenteller Arbeiten bestimmt^[126–132]. Ein einzelnes Lösungsmittel kann das heterogene Innere eines globulären Proteins nicht simulieren, aber *n*-Octanol ist wahrscheinlich ein besseres Modell als völlig unpolare Lösungsmittel wie Cyclohexan. Deshalb haben wir die ΔG_{tr} -Werte für *n*-Octanol benutzt, um die Beiträge der hydrophoben Wechselwirkungen zur Stabilität der RNase T1 abzuschätzen (Tabelle 5).

Tabelle 6. Beiträge von Wasserstoffbrücken und hydrophoben Wechselwirkungen zur Konformationsstabilität.

Wechselwirkung	ΔG [kcal mol ⁻¹]
Hydrophobe Wechselwirkungen	
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{O} \quad \text{H}_2\text{O} \quad \text{H}_2\text{O} \\ \quad \quad \\ -\text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	1.7 [a]
Wasserstoffbrücken	
$\begin{array}{c} >\text{C}=\text{O} \cdots \text{H}-\text{N}< \\ >\text{C}=\text{O} \\ \text{H}-\text{N}< \end{array}$	0.5–1.8 [b]
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{C}- \\ \\ \text{O} \end{array}$	–5.8 [c]
$\text{H}-\text{O}-$	–3.3 [c]

[a] Siehe [126]. ΔG_{tr} (*n*-Octanol \rightarrow Wasser) Werte für die anderen Seitenketten sind in Tabelle 5 angegeben. [b] Siehe [125]. [c] N. Pace, unveröffentlichte Ergebnisse. Der ΔG -Wert der -OH-Gruppe von Tyr beträgt 2.2 kcal mol⁻¹.

Der Beitrag der hydrophoben Wechselwirkungen einer Valin-Seitenkette zur Konformationsstabilität eines Proteins ist in Tabelle 6 angegeben. Die Stabilität der gefalteten Konformation erhöht sich um 1.7 kcal mol⁻¹ für jede Valin-Seitenkette, die durch die Faltung eingeschlossen wird. Nach diesem Ansatz wurden in Tabelle 5 die Beiträge aller polaren und unpolaren Seitenketten sowie der CH₂-Gruppen der geladenen Seitenketten zur Konformationsstabilität von RNase T1 abgeschätzt. Demnach wird durch hydrophobe Wechselwirkungen anscheinend mehr als die Hälfte der freien Enthalpie zurückgewonnen, die durch den Beitrag der Konformationsentropie verloren wurde. Dieser Ansatz hat einige Nachteile, die bereits diskutiert wurden^[71, 133–135]. Eine ähnliche Studie unter Verwendung von Daten anderer Modellschubstanzen wurde kürzlich vorgestellt^[80].

4.3. Wasserstoffbrücken

In einem entfalteten Protein werden im allgemeinen alle Gruppen, die sich an Wasserstoffbrücken beteiligen können, diese mit Wassermolekülen ausbilden. In einem gefalteten Protein dagegen sind die Hälfte der Gruppen durch intramolekulare Wasserstoffbrücken abgesättigt^[136, 137], die meisten der anderen sind weiterhin an Wasserstoffbrücken mit Wasser beteiligt, und nur wenige oder gar keine der Wasserstoffbrücken-Donoren oder -Acceptoren bleiben frei^[28, 136–138]. Die Gruppen, die in beiden Zuständen Wasserstoffbrücken mit Wasser bilden, werden keinen wesentlichen Beitrag zur Konformationsstabilität leisten. Von den Gruppen aber, die intramolekulare oder gar keine Wasserstoffbrücken bilden, müssen wir die Energien der Wasserstoffbrücken kennen so-

wie die Anzahl der Gruppen in den entsprechenden Kategorien.

Fersht hat auf experimenteller Basis vorgeschlagen^[125], daß intramolekulare Wasserstoffbrücken zwischen ungeladenen Gruppen gegenüber Wasserstoffbrücken mit Wasser um 0.5 bis 1.8 kcal mol⁻¹ günstiger sind. In einem gefalteten Protein gibt es wegen der Unterschiede in Geometrie und Umgebung sicherlich eine gewisse Spannweite von Beiträgen individueller Wasserstoffbrücken. Es ist beruhigend, daß *Turner et al.*^[139] experimentell für den Netto-Energiegewinn pro Wasserstoffbrücke in der DNA-Doppelhelix ganz ähnliche Werte (0.5–2.0 kcal mol⁻¹) fanden.

Die Gruppen, die bei der Faltung der Polypeptidkette keine Wasserstoffbrücken bilden, begünstigen den entfalteten Zustand, da sie dort Wasserstoffbrücken mit Wassermolekülen eingehen können. In Tabelle 6 sind Schätzwerte von ΔG für diesen Prozeß angegeben. Es ist zu beachten, daß der Stabilitätsgewinn durch Bildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen den Gruppen einer Peptidbindung (0.5–1.8 kcal mol⁻¹) deutlich geringer ist als der Verlust an Stabilität (–4.2 kcal mol⁻¹), wenn die gleiche Gruppe bei der Proteinfaltung keine Wasserstoffbrücke bilden kann. Das ist sicher der Grund dafür, daß es in globulären Proteinen so viele intramolekulare Wasserstoffbrücken und einen so hohen Anteil an Sekundärstrukturelementen, wie α -Helices und β -Faltblättern gibt, in denen die Peptid-N–H- und -C=O-Gruppen vollkommen durch Bildung von Wasserstoffbrücken abgesättigt sind.

RNase T1 enthält 293 Stickstoff- und Sauerstoffatome, die Wasserstoffbrücken-Donoren oder -Acceptoren sein können; davon befinden sich 205 in der Hauptkette und 88 in Seitenketten. Nach theoretischen Überlegungen von *Baker und Hubbard*^[128] können diese Atome insgesamt 503 Wasserstoffbrücken bilden, und zwar 312 von Hauptketten- und 191 von Seitenkettenatomen^[140]. Auf der Grundlage geometrischer Kriterien, die von den genannten Autoren aufgestellt wurden, finden wir in der RNase T1 96 schwache bis starke Wasserstoffbrücken mit einem durchschnittlichen N...O-Abstand von 2.98 Å^[16]. 51 dieser Wasserstoffbrücken werden zwischen Peptidgruppen der Hauptkette gebildet, von denen die meisten zu den Sekundärstrukturelementen der RNase T1 gehören, wie in Abbildung 3 gezeigt ist.

In einer Auswahl von zehn gut verfeinerten Proteinstrukturen ist der Prozentsatz der Gruppen, die keine Wasserstoffbrücken bilden, bei Peptidgruppen 11.2% für C=O und 12.4% für N–H; bei ungeladenen, polaren Seitengruppen 22% für Tyr, 18% für Ser, 16% für Thr, 17% für Gln und 17% für Asn; bei geladenen Seitengruppen 3% für Asp, 5% für Glu, 2% für His, 11% für Arg und 24% für Lys (der Wert für Lys ist so hoch, da diese Seitengruppe beweglicher als die anderen und deshalb die Partner in Wasserstoffbrücken schwieriger zuzuordnen oder zu lokalisieren sind)^[128]. Diese Prozentangaben sind als obere Grenze für den Anteil an Gruppen anzusehen, die nicht an Wasserstoffbrücken beteiligt sind. Schwächer gebundene Wassermoleküle können oft nicht in der Elektronendichtekarte festgestellt werden, so daß bestimmt einige dieser Gruppen wenigstens teilweise zusätzlich Wasserstoffbrücken zu Wassermolekülen bilden.

Bei RNase T1 haben wir die Gruppen gezählt, die keine Wasserstoffbrücken bilden und vollkommen im Innern des gefalteten Proteins verborgen sind. Es gibt keine solchen Seitenketten, wohl aber vier N–H-Gruppen und zwei C=O-

Gruppen von Peptidbindungen. Wir haben diese Gruppen in Tabelle 5 aufgenommen, um den ungünstigen Beitrag ungesättigter Donoren und Acceptoren zur Konformationsstabilität zu berechnen.

Um den Beitrag der Wasserstoffbrücken zur Konformationsstabilität der RNase T1 in Tabelle 5 abzuschätzen, müssen wir einen Durchschnittswert für den Beitrag jeder einzelnen intramolekularen Wasserstoffbrücke wählen. Wir benutzen 0.76 kcal mol⁻¹, aus dem einfachen Grund, daß dieser Wert zur Übereinstimmung zwischen dem experimentell bestimmten Wert von $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ und der Abschätzung aus der Analyse in Tabelle 5 führt. Dieser Wert liegt auch im Rahmen der von *Fersht*^[125] vorgeschlagenen 0.5 bis 1.8 kcal mol⁻¹. Nach Tabelle 5 liegt demnach der Nettobeitrag der Wasserstoffbrücken an $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ für RNase T1 in der gleichen Größenordnung wie der Beitrag der hydrophoben Wechselwirkungen.

4.4. Elektrostatische Wechselwirkungen

„Die allgemeine elektrostatische Wechselwirkung zwischen geladenen Gruppen auf der Oberfläche dieser Proteine scheint für die Stabilität der gefalteten Konformation energetisch nicht wichtig zu sein. Alle elf Aminogruppen von Ribonuclease A, 18 der 19 von Cytochrom c und bis zu zehn von β -Lactoglobulin wurden ohne signifikante Änderungen der Netto-Stabilität durch saure Aminosäuren ersetzt.“

Hollecker und Creighton^[141]

Die in Abschnitt 3.4 beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß elektrostatische Wechselwirkungen zwischen geladenen Gruppen weniger als 6 kcal mol⁻¹ zur Konformationsstabilität von RNase T1 beitragen und folglich kein wesentlicher Faktor sind. Es ist weitaus schwieriger, den Beitrag von permanenten und induzierten Dipolen zur Konformationsstabilität experimentell zu bestimmen. Rechnungen von *Wodak et al.*^[188] weisen darauf hin, daß elektrostatische Wechselwirkungen sowohl der geladenen Gruppen als auch aller permanenten Dipole die gefaltete Konformation von RNase T1 destabilisieren. Dies könnte aber durch die günstigen Beiträge durch Wechselwirkungen induzierter Dipole mehr als ausgewogen werden, so daß der Gesamtbeitrag der elektrostatischen Wechselwirkung zur Konformationsstabilität vorteilhaft ist. Das Modell von *Wodak et al.* versucht, die dielektrischen Effekte des Proteins selbst zu berücksichtigen, die Effekte des umgebenden Solvens dagegen wurden noch nicht eingeschlossen.

Der Ansatz zur Abschätzung des Beitrages von Wasserstoffbrücken, den wir im vorigen Abschnitt erläutert haben, berücksichtigt einige, aber gewiß nicht alle elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen permanenten Dipolen. Desgleichen berücksichtigt der Ansatz zur Abschätzung des Beitrags der hydrophoben Wechselwirkungen einige, aber bestimmt nicht alle Beiträge induzierter Dipole (van-der-Waals-Kräfte) zur Konformationsstabilität. Experimentelle Ergebnisse von Proteinen, in denen die elektrostatischen Wechselwirkungen durch Punktmutation lokal geändert wurden, werden eine Verbesserung der theoretischen Modelle ermöglichen, so daß wir Beiträge von elektrostatischen Wechselwirkungen zur Stabilität globulärer Proteine besser verstehen werden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

RNase T1 ist sicherlich eines der geeignetsten Proteine für Untersuchungen der Zusammenhänge zwischen der Struktur eines Proteins und seinen chemischen, physikalischen und funktionellen Eigenschaften. Wir haben in diesem Beitrag zusammengefaßt, was bis jetzt über die Struktur von RNase T1 aus Röntgenstrukturanalysen bei hoher Auflösung bekannt ist. Außerdem haben wir Ergebnisse einer Reihe von experimentellen Untersuchungen zur Konformationsstabilität der RNase T1 vorgestellt. Im letzten Abschnitt haben wir anhand von Strukturinformationen und Daten von Modellsubstanzen die Beiträge von Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophoben Wechselwirkungen und Konformationsentropie zur Konformationsstabilität der RNase T1 abgeschätzt. Ferner haben wir die ersten Ergebnisse von ortsgerichteter Mutagenese von RNase T1 vorgestellt, die zeigen, wie stark diese Technik unser Verständnis über Proteine und ihre Funktionen verbessern kann. In einigen neueren Übersichtsartikeln wurden ähnliche Ergebnisse von Untersuchungen anderer Proteine zusammengefaßt^[142].

Durch Kombination von Strukturuntersuchungen und biophysikalischen Studien sollte sich für RNase T1 und ausgewählte Mutanten in kristallinem Zustand und in Lösung auch Einblick in die Struktur und Funktion von Proteinen im allgemeinen gewinnen lassen. Eine sehr hochaufgelöste Strukturanalyse bei 1.5 Å von Wildtyp-RNase-T1 ohne Inhibitor ist gegenwärtig in Arbeit und wird bisher fehlende Details über die Orientierung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen liefern. Zusammen mit kinetischen Untersuchungen von Mutanten werden die Strukturdaten dazu beitragen, den immer noch kontrovers diskutierten Mechanismus der durch RNase T1 katalysierten RNA-Hydrolyse aufzuklären. Ähnliche Studien an verwandten mikrobiellen Ribonucleasen sind in Arbeit^[143]. Weitere theoretische Studien über Struktur, Stabilität, Dynamik und Substratbindung der RNase T1 sollten so angelegt werden, daß ihre direkte experimentelle Überprüfung möglich ist. In dieser Hinsicht ist es sehr ermutigend, daß kürzlich spektroskopische Methoden entwickelt wurden, mit denen die Proteindynamik auf einer Zeitskala untersucht werden kann, die Moleküldynamik-Simulationen zugänglich ist^[144].

Möglicherweise können, wie kürzlich bei der verwandten bakteriellen Ribonuclease Barnase^[145], Zwischenstufen des Faltungsvorganges gefunden werden. Schließlich bleibt zu hoffen, daß auch die Biologie der mikrobiellen Ribonucleasen weiter untersucht wird, um die offenen Fragen über ihre Rolle im Nucleinsäure-Metabolismus und den Grund ihrer Basenspezifität zu beantworten.

Die in diesem Aufsatz beschriebenen eigenen Arbeiten wurden durch die National Institutes of Health (NIH), die Robert-A.-Welch-Stiftung, die Texas Agricultural Experiment Station und die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert.

Eingegangen am 6. April,
veränderte Fassung am 3. September 1990 [A 809]
Übersetzt von Frau Gertraud Koellner, Berlin

- [1] a) P. Blackburn, S. Moore, *Enzymes*, 3rd. Ed. 15 (1982) 317; b) L. X.-Q. Chen, J. W. Longworth, G. R. Fleming, *Biophys. J.* 51 (1987) 865.
[2] a) A. Wlodawer in F. A. Jurnak, A. McPherson (Hrsg.): *Biological Macromolecules & Assemblies*, Vol. 2, Nucleic Acids and Interactive Proteins,

- Wiley, New York 1985, S. 393; b) A. Wlodawer, L. A. Svensson, L. Sjölin, G. L. Gilliland, *Biochemistry* 27 (1988) 2705.
[3] F. Egami, T. Oshima, T. Uchida, *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* 32 (1980) 250.
[4] K. Takahashi, S. Moore, *Enzymes* 3rd. Ed. 15 (1982) 435.
[5] U. Heinemann, U. Hahn in W. Saenger, U. Heinemann (Hrsg.): *Protein-Nucleic Acid Interaction*, MacMillan, London 1989, S. 111.
[6] H. Donis-Keller, A. M. Maxam, W. Gilbert, *Nucleic Acids Res.* 4 (1977) 25.
[7] A. Simonsits, G. G. Brownlee, R. S. Brown, J. R. Rubin, H. Guille, *Nature* 269 (1977) 833.
[8] M. Silberklang, A. M. Gillum, U. L. RajBhandary, *Methods Enzymol.* 59 (1979) 58.
[9] a) K. Takahashi, *J. Biochem.* 70 (1971) 617; b) *ibid.* 98 (1985) 815.
[10] M. Ikehara, E. Ohtsuka, T. Tokunaga, S. Nishikawa, S. Uesugi, T. Tanaka, Y. Aoyama, S. Kikyodani, K. Fujimoto, K. Yanase, K. Fuchimura, H. Morioka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 4695.
[11] R. Quaas, Y. McKeown, P. Stanssens, R. Frank, H. Blöcker, U. Hahn, *Eur. J. Biochem.* 173 (1988) 617.
[12] R. Quaas, H.-P. Grunert, M. Kimura, U. Hahn, *Nucleosides Nucleotides* 7 (1988) 619.
[13] J. Steyaert, C. Thoen, P. Stanssens in A. Pavlovsky, K. Polyakov (Hrsg.): *Structure and Chemistry of Ribonucleases*, Akademie der Wissenschaften der UdSSR, Moskau 1989, S. 216.
[14] U. Heinemann, W. Saenger, *Nature* 299 (1982) 27.
[15] R. Arni, U. Heinemann, M. Maslowska, R. Tokunaga, W. Saenger, *Acta Crystallogr. Sect. B* 43 (1987) 548.
[16] R. Arni, U. Heinemann, R. Tokunaga, W. Saenger, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 15358.
[17] S. Sugio, T. Amisaki, H. Ohishi, K.-I. Tomita, U. Heinemann, W. Saenger, *FEBS Lett.* 181 (1985) 129.
[18] S. Sugio, T. Amisaki, H. Ohishi, K.-I. Tomita, *J. Biochem.* 103 (1988) 354.
[19] S. Sugio, K.-I. Oka, H. Ohishi, K.-I. Tomita, W. Saenger, *FEBS Lett.* 183 (1985) 115.
[20] J. Koepke, M. Maslowska, U. Heinemann, W. Saenger, *J. Mol. Biol.* 206 (1989) 475.
[21] D. Kostrewa, H.-W. Choe, U. Heinemann, W. Saenger, *Biochemistry* 28 (1989) 7592.
[22] a) A. Lenz, F. Cordes, U. Heinemann, W. Saenger, *J. Biol. Chem.*, im Druck; b) A. Lenz, U. Heinemann, W. Saenger, *Acta Crystallogr. Sect. B*, im Druck.
[23] G. Koellner, H.-W. Choe, U. Heinemann, U. Hahn, H.-P. Grunert, W. Saenger, unveröffentlicht.
[24] P. Verhelst, J. Zegers, U. Heinemann, W. Saenger, L. Wyns, unveröffentlicht.
[25] P. M. D. Fitzgerald, *J. Appl. Crystallogr.* 21 (1988) 273.
[26] a) W. A. Hendrickson, J. H. Konner in R. Diamond, S. Ramaseshan, K. Venkatesan (Hrsg.): *Computing in Crystallography*, Indische Akademie der Wissenschaften, Bangalore 1981, Kapitel 13.01; b) W. A. Hendrickson, *Methods Enzymol.* 115 (1985) 252; c) B. C. Finzel, *J. Appl. Crystallogr.* 20 (1987) 58; d) S. Sheriff, *ibid.* 20 (1987) 55.
[27] a) T. A. Jones, *J. Appl. Crystallogr.* 11 (1987) 268; b) *Methods Enzymol.* 115 (1985) 157.
[28] E. N. Baker, R. E. Hubbard, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 44 (1984) 97.
[29] S. Hirono, P. M. Kollman, *J. Mol. Biol.* 212 (1990) 197.
[30] S. Nishikawa, T. Kimura, H. Morioka, S. Uesugi, T. Hakoshima, K.-I. Tomita, E. Ohtsuka, M. Ikehara, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150 (1988) 68.
[31] U. Heinemann, W. Saenger, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1 (1983) 523.
[32] K. Takahashi, *J. Biochem.* 67 (1970) 833.
[33] F. Eckstein, H. H. Schulz, H. Rüterjans, W. Haar, W. Maurer, *Biochemistry* 11 (1972) 3507.
[34] a) M. Ikehara, E. Ohtsuka, T. Tokunaga, S. Nishikawa, S. Uesugi, T. Tanaka, Y. Aoyama, S. Kikyodani, K. Fujimoto, K. Yanase, K. Fuchimura, H. Kim, Y. Ueda, T. Kimura, H. Morioka in K. S. Brzuzik, W. J. Stec (Hrsg.): *Biophosphates and Their Analogues – Synthesis, Structure, Metabolism and Activity*, Elsevier, Amsterdam 1987, S. 335; b) S. Nishikawa, H. Morioka, H. J. Kim, K. Fuchimura, T. Tanaka, S. Uesugi, T. Hakoshima, K.-I. Tomita, E. Ohtsuka, M. Ikehara, *Biochemistry* 26 (1987) 8620.
[35] H.-P. Grunert, A. Zouni, M. Beineke, R. Quaas, Y. Georgalis, W. Saenger, U. Hahn, *Eur. J. Biochem.*, im Druck.
[36] a) P. Verhelst, U. Heinemann, W. Saenger, P. Stanssens, J. Steyaert, L. Wyns in A. Pavlovsky, K. Polyakov (Hrsg.): *Structure and Chemistry of Ribonucleases*, Akademie der Wissenschaften der UdSSR, Moskau 1989, S. 202; b) J. Steyaert, K. Hallenga, L. Wyns, P. Stanssens *Biochemistry* 29 (1990) 9064.
[37] a) A. D. MacKerell, Jr., R. Rigler, L. Nilsson, U. Heinemann, W. Saenger, *Eur. Biophys. J.* 16 (1988) 287; b) A. D. MacKerell, Jr., L. Nilsson, R. Rigler, W. Saenger, *Biochemistry* 27 (1988) 4547; c) A. D. MacKerell, Jr., L. Nilsson, R. Rigler, U. Heinemann, W. Saenger, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 6 (1989) 20.
[38] a) H. Rüterjans, E. Hoffmann, J. Schmidt, J. Simon in J. Zelinka, J. Balan (Hrsg.): *Metabolism and Enzymology of Nucleic Acids Including Gene Manipulations*, Vol. 6, Slovakische Akademie der Wissenschaften, Bratis-

- lava 1987, S. 81; b) E. Hoffmann, H. Rüterjans, *Eur. J. Biochem.* 177 (1988) 539; c) E. Hoffmann, J. Schmidt, J. Simon, H. Rüterjans, *Nucleosides Nucleotides* 7 (1988) 757; d) H. Rüterjans, O. Pongs, *Eur. J. Biochem.* 18 (1971) 313.
- [39] R. Malin, P. Zielenkiewicz, W. Saenger, *J. Biol. Chem.*, im Druck.
- [40] a) C. N. Pace, *Methods Enzymol.* 131 (1986) 266; b) C. N. Pace, B. A. Shirley, J. A. Thomson in T. E. Creighton (Hrsg.): *Protein Structure: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford 1988, S. 311.
- [41] J. A. Thomson, B. A. Shirley, G. R. Grimsley, C. N. Pace, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 5315.
- [42] C. Tanford, *Adv. Protein Chem.* 23 (1968) 121.
- [43] C. Tanford, *Adv. Protein Chem.* 24 (1970) 1.
- [44] C. N. Pace, *Crit. Rev. Biochem.* 3 (1975) 1.
- [45] P. Privalov, *Adv. Protein Chem.* 33 (1979) 167.
- [46] J. W. Donovan in S. J. Leach (Hrsg.): *Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry*, Vol. 5, Academic Press, Orlando, FL, USA 1969, S. 101.
- [47] J. W. Longworth, *Photochem. Photobiol.* 8 (1968) 589.
- [48] T. Kiefhaber, R. Quaas, U. Hahn, F. X. Schmid, *Biochemistry* 29 (1990) 3053, 3061.
- [49] a) P. S. Kim, R. L. Baldwin, *Annu. Rev. Biochem.* 59 (1990) 631; b) R. L. Baldwin, *Trends Biochem. Sci.* 14 (1989) 276; c) K. Kuwajima, *Proteins: Struct. Funct. Gen.* 6 (1989) 87; d) R. Jaenicke, *Angew. Chem.* 9b (1984) 385; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 395.
- [50] J. F. Brandts, H. R. Halvorson, M. Brennan, *Biochemistry* 14 (1975) 4953.
- [51] T. Kiefhaber, H.-P. Grunert, U. Hahn, F. X. Schmid, *Biochemistry* 29 (1990) 6475.
- [52] a) J. A. Schellman, *Biopolymers* 17 (1978) 1305; b) *ibid.* 26 (1987) 549; c) K. A. Dill, *Biochemistry* 24 (1985) 1501.
- [53] C. N. Pace, D. V. Laurents, *Biochemistry* 28 (1989) 2520.
- [54] M. M. Santoro, D. W. Bolen, *Biochemistry* 27 (1988) 8063.
- [55] a) K. A. Aune, C. Tanford, *Biochemistry* 8 (1969) 4568; b) C. N. Pace, K. E. Vanderburg, *ibid.* 18 (1979) 288.
- [56] J. T. Edsall in A. Rich, N. Davidson (Hrsg.): *Structural Chemistry and Molecular Biology*, Freeman, San Francisco 1968, S. 88.
- [57] W. J. Becktel, J. A. Schellman, *Biopolymers* 26 (1987) 1859.
- [58] I. Kanazawa, H. Hamaguchi, *J. Biochem.* 100 (1986) 207.
- [59] H. Schwarz, H.-J. Hinz, A. Mehlich, H. Tschesche, H. R. Wenzel, *Biochemistry* 26 (1987) 3544.
- [60] a) C. N. Pace, D. V. Laurents, J. A. Thomson, *Biochemistry* 29 (1990) 2565; b) M. McNutt, L. S. Mullins, F. M. Rauschel, C. N. Pace, *ibid.* 29 (1990) 7572.
- [61] F. Ahmad, C. C. Bigelow, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 12935.
- [62] D. Shortle, A. K. Meeker, *Proteins: Struct. Funct. Gen.* 1 (1986) 81.
- [63] E. P. Garvey, C. R. Matthews, *Biochemistry* 28 (1989) 2083.
- [64] B. Chen, J. A. Schellman, *Biochemistry* 28 (1989) 685.
- [65] R. Lumrey, R. Biltonen in S. N. Timasheff, G. D. Fasman (Hrsg.): *Structure and Stability of Biological Macromolecules*, Marcel Dekker, New York 1969, S. 65.
- [66] a) F. M. Richards, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 6 (1977) 151; b) B. Lee, F. M. Richards, *J. Mol. Biol.* 55 (1971) 379.
- [67] L. G. Presta, G. D. Rose, *Science* 240 (1988) 1632.
- [68] a) R. A. Bradshaw, *Trends Biochem. Sci.* 14 (1989) 276; b) S. M. Arfin, R. A. Bradshaw, *Biochemistry* 27 (1988) 7979; c) A. L. Goldberg, A. C. St. John, *Annu. Rev. Biochem.* 45 (1976) 747; d) C. N. Pace, A. J. Barrett, *Biochem. J.* 219 (1984) 411; e) C. N. Pace, L. M. Fisher, J. F. Cupo, *Acta Biol. Med. Ger.* 40 (1981) 385; f) E. R. Stadtman, *Biochemistry* 29 (1990) 6323.
- [69] a) S. P. Ho, W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 6751; b) L. Regan, W. F. DeGrado, *Science* 241 (1988) 976.
- [70] G. Das, D. R. Hickey, G. McLendon, F. Sherman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 496.
- [71] J. T. Kellis, K. Nyberg, A. R. Fersht, *Biochemistry* 28 (1989) 4914.
- [72] K. Yutani, K. Ogasahara, T. Tsujita, Y. Sugino, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 4441.
- [73] a) P. L. Privalov, S. J. Gill, *Adv. Protein Chem.* 39 (1988) 191; b) J. M. Sturtevant, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 38 (1987) 463.
- [74] a) J. F. Brandts, L. Hunt, *J. Am. Chem. Soc.* 89 (1967) 4826; b) J. F. Brandts, *ibid.* 86 (1964) 4291, 4302.
- [75] C. N. Pace, C. Tanford, *Biochemistry* 7 (1968) 198.
- [76] P. L. Privalov, Y. V. Griko, S. Y. Venyaminov, V. P. Kutyschenko, *J. Mol. Biol.* 190 (1986) 487.
- [77] Y. V. Griko, P. L. Privalov, J. M. Sturtevant, S. Y. Venyaminov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 343.
- [78] B. Lee, *Biopolymers* 24 (1985) 813.
- [79] R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 8096.
- [80] R. S. Spolar, J.-H. Ha, M. T. Record, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 8382.
- [81] C. Tanford: *Physical Chemistry of Macromolecules*, Wiley, New York 1961.
- [82] T. Imoto, *Biophys. J.* 44 (1983) 293.
- [83] R. L. Baldwin, D. Eisenberg in D. L. Oxender, C. F. Fox (Hrsg.): *Protein Engineering*, Alan R. Liss, New York 1987, S. 127.
- [84] S. Iida, T. Ooi, *Biochemistry* 8 (1969) 3897.
- [85] a) A. Wada, H. Nakamura, *Nature* 293 (1981) 757; b) D. J. Barlow, J. M. Thornton, *Biopolymers* 25 (1986) 1717.
- [86] a) S. C. Harvey, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 5 (1989) 78; b) M. K. Gilson, B. H. Honig, *ibid.* 3 (1988) 32; c) M. Delepiere, C. M. Dobson, M. Karplus, F. M. Poulsen, D. J. States, R. E. Wedin, *J. Mol. Biol.* 197 (1987) 111; d) M. J. E. Sternberg, F. R. F. Hayes, A. J. Russell, P. G. Thomas, A. J. Fersht, *Nature* 330 (1987) 86; e) A. Warshel, *ibid.* 330 (1987) 15.
- [87] A. R. Fersht, M. J. E. Sternberg, *Protein Eng.* 2 (1989) 527.
- [88] D. Van Belle, I. Couplet, M. Prevost, S. J. Wodak, *J. Mol. Biol.* 198 (1987) 721.
- [89] M. K. Gilson, B. Honig, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 4 (1988) 7.
- [90] a) J. J. Hermans, H. A. Scheraga, *J. Am. Chem. Soc.* 83 (1961) 3283; b) K. A. Aune, C. Tanford, *Biochemistry* 8 (1969) 4582.
- [91] F. Inagaki, Y. Kawano, I. Shimada, K. Takahashi, T. Miyazawa, *J. Biochem.* 89 (1981) 1185.
- [92] C. N. Pace, G. R. Grimsley, *Biochemistry* 27 (1988) 3242.
- [93] J. A. Schellman, *Biopolymers* 14 (1975) 999.
- [94] C. N. Pace, T. McGrath, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 3862.
- [95] a) M. Fujinaga, T. J. Delbare, G. D. Brayer, M. N. G. James, *J. Mol. Biol.* 183 (1985) 479; b) O. Herzberg, N. M. G. James, *Biochemistry* 24 (1985) 5298; c) J. W. Pflugrath, F. A. Quiocho, *Nature* 314 (1985) 257; d) D. I. Stuart, K. R. Acharya, N. P. C. Walker, S. G. Smith, M. Lewis, D. C. Phillips, *ibid.* 324 (1986) 84; e) N. K. Vyas, M. N. Vyas, F. A. Quiocho, *ibid.* 327 (1987) 635.
- [96] C. O'Sullivan, F. W. Thomson, *J. Chem. Soc.* 57 (1890) 834.
- [97] a) N. Citri, *Adv. Enzymol.* 37 (1973) 397; b) S. Grisolia, *Physiol. Rev.* 44 (1964) 657.
- [98] C. N. Pace, T. E. Creighton, *J. Mol. Biol.* 188 (1986) 477.
- [99] C. N. Pace, G. R. Grimsley, J. A. Thomson, B. J. Barnett, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 11820.
- [100] C. Hill, G. Dodson, U. Heinemann, W. Saenger, Y. Mitsui, K. Nakamura, S. Borisov, G. Tischenko, K. Polyakov, S. Pavlovsky, *Trends Biochem. Sci.* 8 (1983) 364.
- [101] R. W. Hartley, *Trends Biochem. Sci.* 14 (1989) 450.
- [102] R. W. Hartley, *Biochemistry* 8 (1969) 2929.
- [103] H. Neumann, I. Z. Steinberg, J. R. Brown, R. F. Goldberger, M. Sela, *Eur. J. Biochem.* 3 (1967) 171.
- [104] A. S. Acharya, H. Taniuchi, *Int. J. Pept. Protein Res.* 15 (1980) 503.
- [105] a) F. R. N. Gurd, T. M. Rothberg, *Adv. Protein Chem.* 33 (1981) 1; b) G. Wagner, K. Wüthrich, *Naturwissenschaften* 70 (1983) 105.
- [106] A. A. Kossiakoff, *Nature* 296 (1982) 713.
- [107] D. Shortle, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 5315.
- [108] J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.* 151 (1981) 261.
- [109] C. Mitchinson, J. A. Wells, *Biochemistry* 28 (1989) 4897.
- [110] a) M. Matsumura, G. Signor, B. W. Matthews, *Nature* 342 (1989) 291; b) M. Matsumura, W. J. Becktel, M. Levitt, B. W. Matthews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 6562.
- [111] B. A. Shirley, P. Stanssens, J. Steyaert, C. N. Pace, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 11621.
- [112] M. Mutter, S. Vuilleumier, *Angew. Chem.* 101 (1989) 551; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28 (1989) 535.
- [113] W. F. DeGrado, *Adv. Protein Chem.* 39 (1988) 51.
- [114] J. S. Richardson, D. C. Richardson, *Trends Biochem. Sci.* 14 (1989) 304.
- [115] M. W. Pantoliano, M. Whitlow, J. F. Wood, S. W. Dodd, K. D. Hardman, M. L. Rollence, P. N. Bryan, *Biochemistry* 28 (1989) 7205.
- [116] G. E. Schulz, R. H. Schirmer: *Principles of Protein Structure*, Springer, New York 1979.
- [117] W. Kauzmann in W. D. McElroy, B. Glass (Hrsg.): *The Mechanism of Enzyme Action*, Johns Hopkins Press, Baltimore 1954.
- [118] K. A. Dill, *Biochemistry* 24 (1985) 1501.
- [119] M. Karplus, T. Ichiiye, B. M. Pettitt, *Biophys. J.* 52 (1987) 1083.
- [120] J. A. Schellman, *C.R. Trav. Lab. Carlsberg Ser. Chim.* 29 (1955) 230.
- [121] P. J. Flory, *J. Am. Chem. Soc.* 78 (1956) 5222.
- [122] H. S. Chan, K. A. Dill, *J. Chem. Phys.* 90 (1989) 492.
- [123] H. Jacobson, W. H. Stockmayer, *J. Chem. Phys.* 18 (1950) 1600.
- [124] S. Miller, J. Janin, A. M. Lesk, C. Chothia, *J. Mol. Biol.* 196 (1987) 641.
- [125] A. R. Fersht, *Trends Biochem. Sci.* 12 (1987) 301.
- [126] J.-L. Fauchere, V. Pliska, *Eur. J. Med. Chem. - Chim. Ther.* 18 (1983) 369.
- [127] Y. Nozaki, C. Tanford, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 2211.
- [128] D. J. Abraham, A. J. Leo, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 2 (1987) 130.
- [129] J. H. Fendler, F. Nome, J. Nagyvary, *J. Mol. Evol.* 6 (1975) 215.
- [130] S. Damodaran, K. B. Song, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 7220.
- [131] E. J. Cohn, J. T. Edsall: *Proteins, Amino Acids and Peptides*, Hafner Publishing, New York 1965, S. 212.
- [132] A. Radzicka, R. Wolfenden, *Biochemistry* 27 (1988) 1664.
- [133] J. Bello, *Int. J. Pept. Protein Res.* 12 (1978) 38.
- [134] J. Bello, *J. Theor. Biol.* 67 (1977) 335.
- [135] T. E. Creighton, *J. Phys. Chem.* 89 (1985) 2452.
- [136] C. Chothia, *Nature* 245 (1975) 304.
- [137] J. L. Finney, B. J. Gellatly, I. C. Golton, J. Goodfellow, *Biophys. J.* 10 (1980) 17.
- [138] J. J. Birktoft, D. M. Blow, *J. Mol. Biol.* 68 (1972) 187.
- [139] a) D. H. Turner, N. Sugimoto, R. Kierzek, S. D. Dreiker, *J. Am. Chem.*

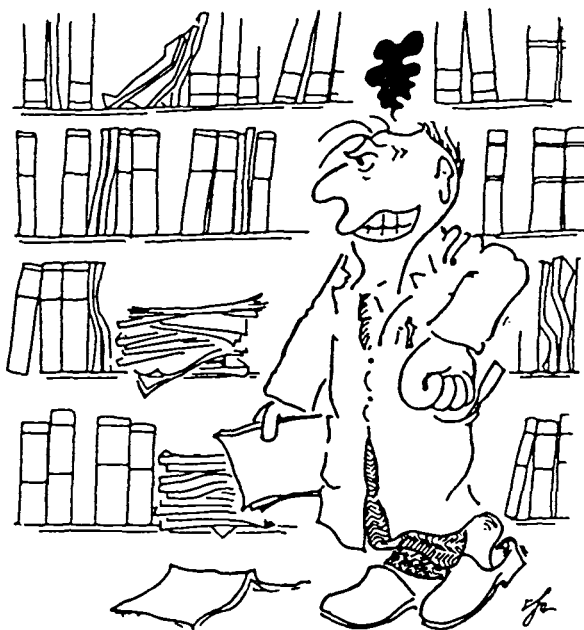
Soc. 109 (1987) 3783; b) S. M. Freier, N. Sugimoto, A. Sinclair, D. Alkema, T. Neilson, R. Kierzek, M. H. Caruthers, D. H. Turner, *Biochemistry* 25 (1986) 3214.

- [140] Die 103 Peptidgruppen von RNase T1 können je an drei Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sein, wobei die Carbonyl-Sauerstoffatome als zweifacher Acceptor und die N-H-Gruppen als einfacher Donor auftreten können. Ausgenommen sind die vier X-Pro-Peptidbindungen, denen die N-H-Gruppen fehlen, womit jeweils eine Wasserstoffbrückenbindung verlorengeht. Addiert man zu den hieraus resultierenden 305 möglichen Wasserstoffbrückenbindungen noch drei von der terminalen Aminogruppe und vier von der endständigen Carboxygruppe, ergeben sich 312 mögliche Wasserstoffbrückenbindungen zum Kettenrückgrat. Seitenketten-Wasserstoffbrückenbindungen stammen von den folgenden Resten in RNase T1: 15 Ser (3), 6 Thr (3), 6 Glu (4), 6 Asp (4), 2 Gln (4), 9 Asn (4), 2 Lys (3), 1 Arg (5), 3 His (2), 9 Tyr (2) und 1 Trp (1); die

Anzahl der möglichen Wasserstoffbrückenbindungen sind für die Seitenketten jeweils in Klammern angegeben.

- [141] M. Hollecker, T. E. Creighton, *Biochim. Biophys. Acta* 701 (1982) 395.
 [142] a) B. W. Matthews, *Biochemistry* 26 (1987) 6885; b) D. P. Goldenberg, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 17 (1988) 481; c) T. Alber, *Annu. Rev. Biochem.* 58 (1989) 765.
 [143] a) D. E. Mossakowska, K. Nyberg, A. R. Fersht, *Biochemistry* 28 (1989) 3843; b) J. Sevcik, R. G. Sanishvili, A. G. Pavlovsky, K. M. Polyakov, *Trends Biochem. Sci.* 15 (1990) 158.
 [144] a) A. D. MacKerell, Jr., R. Rigler, L. Nilsson, U. Hahn, W. Saenger, *Biophys. Chem.* 27 (1987) 4547; b) P. H. Axelsen, F. G. Prendergast, *Biophys. J.* 56 (1989) 43.
 [145] a) A. Matouschek, J. T. Kellis, Jr., L. Serrano, M. Bycroft, A. R. Fersht, *Nature* 346 (1990) 440; b) M. Bycroft, A. Matouschek, J. T. Kellis, Jr., L. Serrano, A. R. Fersht, *ibid.* 346 (1990) 488.

WUT ZUR LÜ KE



**Hat schon wieder ein anderer die Angewandte?
 Statt vor Wut zu kochen: Lückenlos auf dem
 neuesten Stand mit einem persönlichen
 Abonnement!**

Anruf oder Fax genügt



Tel. (06201) 602216, Fax (06201) 602328
 Postfach 101161, D-6940 Weinheim