

PUNKTMUTATIONEN UND PROTEINSTABILITÄT

Michael Renner, Peter Weber und Hans-Jürgen Hinz

INSTITUT FÜR BIOPHYSIK UND PHYSIKALISCHE BIOCHEMIE,
REGENSBURG, UNIVERSITÄTSSTRAßE 31 D-8400 REGENSBURG

Proteins are characterized by a marginal stability of their secondary and tertiary structure that renders them susceptible to stability perturbations by single amino acid exchanges. One of the most powerful techniques to determine the typical thermodynamic stability parameters is high sensitivity scanning microcalorimetry. The present paper describes some basic methodological aspects of the technique. Main attention is, however, focussed on the determination and magnitude of covalent and noncovalent contributions to overall protein stability. Two well defined proteins, bovine pancreatic trypsin inhibitor /BPTI/ and /ROP/ have served to exemplify the general rationale of the approach.

Die spontane Bildung geordneter Strukturen bei Proteinen in wäßriger Lösung und bei Zimmertemperatur ist die Grundvoraussetzung für die Funktion biologischer Systeme. Aber unabhängig von der Komplexität der Kinetik des Strukturbildungsmechanismus oder anders ausgedrückt, von der Überwindung der verschiedenen Aktivierungsbarrieren, hängt das Resultat der richtigen Faltung zu einem funktionsfähigen Makromolekül davon ab, daß die algebraische Summe aller energetischen Wechselwirkungen und entropischen Beiträge zur freien Enthalpie einen negativen Wert liefert. Da, wie wir sehen werden, der Energieunterschied zwischen dem nativen und denaturierten Zustand sehr klein ist, können kleine Änderungen der Wechselwirkungen oder der Entropie einen drastischen Einfluß auf die Stabilität und Funktion von Proteinen ausüben.

Die heutigen Techniken der Molekularbiologie oder der chemischen Modifikation von Proteinen bieten eine große Anzahl von Möglichkeiten, die inter- und intramolekularen Wechselwirkungen zu verändern. Gezielter Aminosäureaustausch oder spezifische chemische Modifikation können dazu benutzt werden, die Größe und Natur der Wechselwirkungen aufzuklären und quantitative Parameter abzuleiten, die möglicherweise die bisherigen Algorithmen zur Strukturvorhersage verbessern und damit eine Basis für ein rationales "Protein Design" schaffen.

Theoretische Überlegungen auf der Grundlage der Heisenberg'schen Unschärferelation zeigen, daß die makroskopischen Energieparameter für die Beschreibung der molekularen Phänomene bei Proteinen und ihrer Umgebung herangezogen werden können, wenn die Betrachtungen sich auf thermische Prozesse, die langsamer als 10^{-13} s sind, und auf Dimensionen, die größer als 1 Å sind, beschränken [1].

Der einzige Parameter, der die Stabilität von Biopolymeren in wäßriger Lösung eindeutig beschreibt, ist die freie Enthalpie der Stabilisierung. Diese thermodynamische Zustandsfunktion läßt sich am einfachsten und genauesten durch direkte mikrokalorimetrische Messungen bestimmen, wie die Formelzusammenstellung in **Tabelle (1)** zeigt.

Alle benötigten Werte erhält man aus der mikrokalorimetrisch meßbaren, sogenannten Umwandlungskurve des Proteins, die schematisch im **Abb. (1)** für ein einfaches globuläres Protein gezeigt wird.

Im allgemeinen erhält man für wäßrige Proteinlösungen bei niedrigen Temperaturen ein lineares Ansteigen der Wärmekapazität. Bei höheren Temperaturen durchläuft die c_p vs. T Kurve ein Maximum innerhalb eines relativ kleinen Temperaturintervalls, um dann auf einem um c_p höheren Niveau wieder linear zu verlaufen.

Die Fläche ist der Energie proportional, die für die Zerstörung der strukturstabilisierenden Wechselwirkungen notwendig ist. T_m ist die soge-

Tabelle 1: a) Thermodynamische Funktionen zur Charakterisierung von Proteinlösungen

$$\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T \cdot \Delta S^{\circ}$$

$$\Delta G^{\circ} = -R \cdot T \cdot \ln K_{e q}$$

$$d \ln K_{e q} / dT = \Delta H^{\circ} / RT^2$$

$$\Delta C_p = R (\partial / \partial T) \cdot [-\partial \ln K_{e q} / \partial (1/T)]$$

$$\Delta C_p = C_{p, f} - C_{p, b} = d\Delta H^{\circ} / dT$$

$$\Delta S^{\circ} = (\Delta H^{\circ} - \Delta G^{\circ}) / T$$

$$S^{\circ}(T) = \int_0^{T_1} C_p^{\circ} dT/T + \frac{\Delta H(T_1)}{T_1} + \int_{T_1}^{T_2} C_p^{\circ} dT/T + \frac{\Delta H(T_2)}{T_2} + \dots$$

$$\Delta G_d = \Delta H_d (1 - T/T_m) + \Delta C_p \cdot T \cdot \ln(T_m/T) - \Delta C_p (T_m - T)$$

b) Kalorimetrische Meßgrößen

$$dH/dt = m_p \cdot C_{p, p}(T) \cdot r$$

$$C_{p, p}(T) = C_{p, s} \cdot \frac{V_p(T)}{V_s(T)} - \frac{\Delta(T)}{m_p}$$

$$dH/dt \text{ [J/s]} = \text{Leistung}$$

$$m_p \text{ [g]} = \text{Masse des Proteins in der Reaktionzelle}$$

$$C_{p, p} \text{ [J/(g.Grad)]} = \text{partielle spezifische Wärmekapazität des Proteins}$$

$$C_{p, s} \text{ [J/(g.Grad)]} = \text{partielle spezifische Wärmekapazität des Puffers}$$

$$V_p, V_s \text{ [cm}^3/\text{g]} = \text{partielle spezifische Volumina von Protein und Puffer}$$

$$\Delta(T) \text{ [J/Grad]} = \text{Signaldifferenz zwischen Proben- und Referenzkurve}$$

$$r \text{ [grad/s]} = \text{Heizrate}$$

nannte Umwandlungstemperatur, die sich auf 50% Auffaltung des Proteins, also die halbe Fläche des Umwandlungspeaks, bezieht.

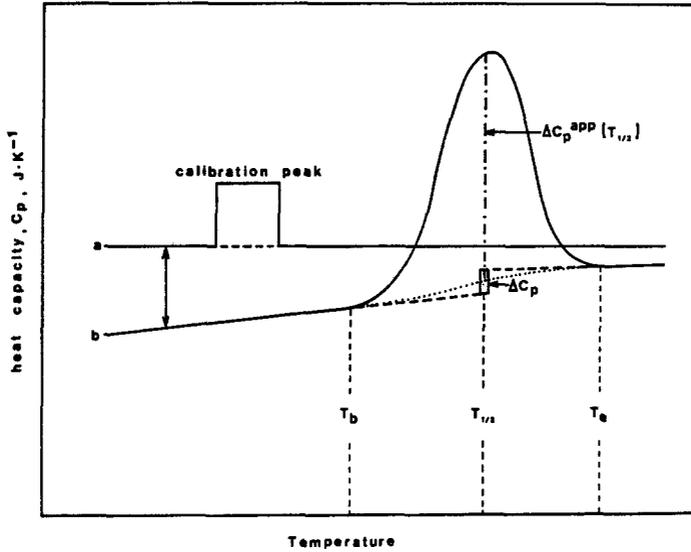


Abbildung (1): Schematische Umwandlungskurve für die Auffaltung eines Proteins [2]

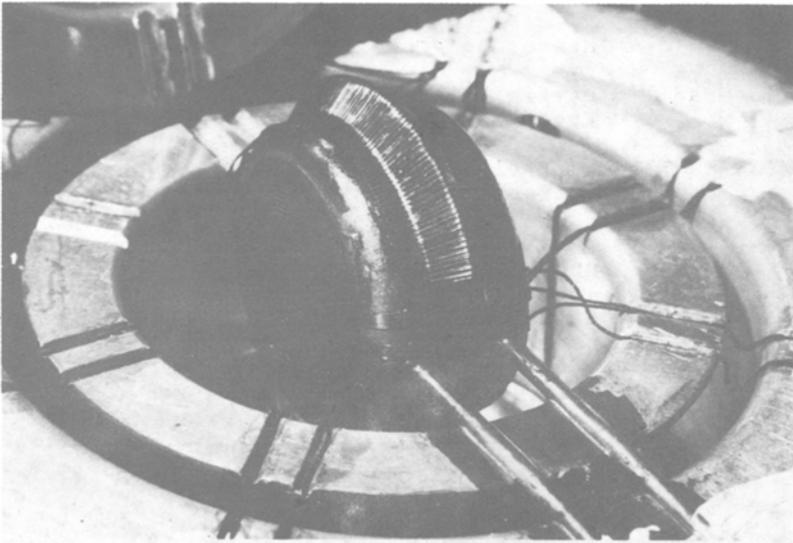


Abbildung (2): Meßzellen des adiabatischen Mikrokolorimeters DASM 1

Wie kann man eine solche Messung der Wärmekapazität als Funktion der Temperatur realisieren?

In der nächsten Abbildung **Abb. (2)** ist der Aufbau eines für Messungen an biologischen Makromolekülen optimierten adiabatischen Wärmekapazitätsmikrokalorimeters dargestellt. Genaue Wärmekapazitätsmessungen haben immer zum wichtigen Repertoire physikalischer Meßtechniken gehört, aber diese Messungen wurden für biologische Makromoleküle erst nach der Konstruktion von für hochverdünnte Lösungen einsetzbaren Mikrokalorimetern möglich.

Das Mikrokalorimeter **DASM 1** besteht aus zwei physikalisch identischen Meßzellen von 1 ml Volumen, die als Meß- und Referenzzelle dienen. Sie sind vom Wärmeaustausch mit der Umgebung durch zwei adiabatische Schirme abgesichert. Die Messung der Exzeßenergie erfolgt nach dem Kompensationsprinzip. Meß- und Referenzzelle werden mit demselben Strom aufgeheizt und zeigen dieselben Aufheizgeschwindigkeiten, solange in der Meßzelle das Protein sich nicht verändert. Wird aber bei einer bestimmten Temperatur in der Meßzelle eine energieabsorbierende Strukturumwandlung induziert, so wird in der Meßzelle ein Teil der Heizenergie nicht mehr zur Temperaturerhöhung sondern für diese Reaktion verbraucht. Dadurch erhöht sich die Temperatur der Meßzelle langsamer als die der Referenzzelle, und es entsteht eine Temperaturdifferenz zwischen den Zellen. Dieses Signal wird dazu benutzt, um mit einem elektronischen Regelsystem zusätzliche Heizenergie in die Meßzelle einzuführen, um die Temperaturdifferenz auf "Null" zu bringen.

Mit dem Mikrokalorimeter können Wärmemengen in der Größenordnung 1/100 000 cal gemessen werden. Das Gerät ist an einen Computer angeschlossen, sodaß Berechnungen der Energiewerte und Kurvenanalysen schnell ausgeführt werden können.

Verlassen wir jetzt die technischen Aspekte und wenden uns den Problemen zu, die für die **Korrelation von strukturellen und energetischen Parametern** gelöst werden müssen.

In **Tabelle (2)** sind die wichtigsten Faktoren zusammengestellt, die die Stabilität eines Proteins beeinflussen können. Die quantitative Kenntnis ihrer Beiträge zur Gesamtstabilität ist notwendig, um ein besseres Verständnis der physikalischen Grundlagen der Proteinstabilität zu gewinnen.

Tabelle (2): Zusammenstellung der wichtigsten für die Stabilität von Proteinen verantwortlichen Faktoren

- 1.) DISULFIDBRÜCKEN
 - 2.) LADUNGEN
 - 3.) HYDROPHOBIZITÄT
 - 4.) HYDRATATION
 - 5.) PROLINKONFIGURATION
 - 6.) LIGANDEN
 - 7.) STABILISIERENDE UND DENATURIERENDE AGENTIEN (GLYCERIN, ZUCKER, HARNSTOFF, GUANIDIN HCL)
 - 8.) DIPOLMOMENTE
-

Um zum heutigen Zeitpunkt eine Chance für die Beantwortung dieser Fragen zu haben, sollten die Proteine, die man zur Untersuchung auswählt, bestimmte Kriterien erfüllen. Sie sollten möglichst vollständig biochemisch und physikalisch-chemisch charakterisiert sein, wozu wesentlich eine genaue Kenntnis der Tertiär- und Quartärstruktur und der potentiellen Wechselwirkungen gehört. Weiter sollten die Proteine mit den zur Verfügung stehenden theoretischen Methoden wie z.B. "Molecular Dynamics Rechnungen", erfaßbar sein.

Geeignete Modellproteine nach diesen Kriterien sind der Trypsin Inhibitor "BPTI" und das sogenannte "ROP" Protein. Einige wichtige Charakteristika sind in **Abb. (3)** zusammengefaßt.

BPTI

58 AMINOSÄUREN, M=6500
 GLOBULÄR, KOMPAKT; MONOMER,
 3-S-S-BRÜCKEN

ROP

63 AMINOSÄUREN, M=7148
 ≈100% α-HELICAL; MONOMER BESTEHT
 AUS 2 α-HELICES; IN LÖSUNG DIMER

TERTIÄRSTRUKTUR

RÖNTGEN- UND NEUTRONENMESSUNGEN, RÖNTGENMESSUNGEN 1.7 Å AUFLÖSUNG
 1.0-1.5 Å AUFLÖSUNG

MOLECULAR DYNAMICS RECHNUNGEN

NMR-DATEN BEKANNT

CHEMISCHE MODIFIKATIONEN MÖGLICH FÜLLE VON MUTANTEN VORHANDEN

GEN KÜRZLICH KLONIERT

FUNKTION

PROTEASEINHIBITOR MIT HOHER
 AFFINITÄT

REGULATION VON PLASMID KOPIENZAHL

Abbildung (3): Charakteristische Parameter von BPTI und ROP

Bleiben wir zunächst bei BPTI. In Abb. (4) ist die Primärstruktur dargestellt.

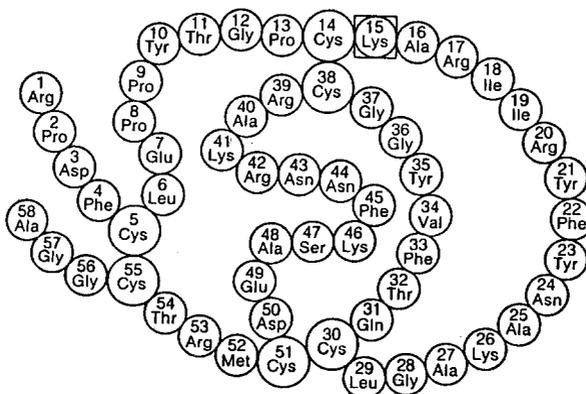


Abbildung (4): Primärstruktur von BPTI

Das nächste Bild **Abb. (5)** zeigt die dreidimensionale Struktur von BPTI.

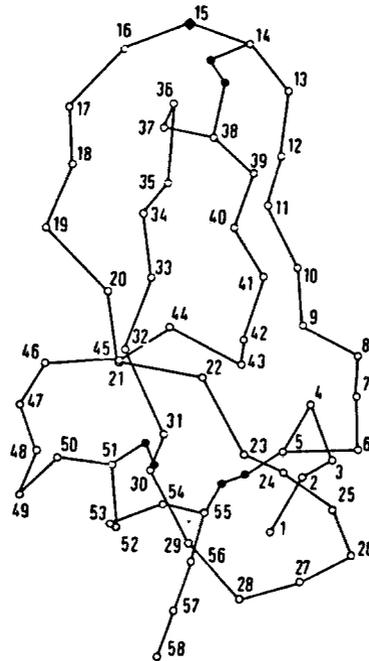


Abbildung (5): Tertiärstruktur von BPTI

Diese Tertiärstruktur ist so stabil, daß man BPTI bei $\text{pH} = 1$ bis 100°C aufheizen muß, um die Struktur zu zerstören. Die Auffaltung ist reversibel; wenn man die Temperatur erniedrigt, bildet sich die native Struktur zurück.

Typische Meßkurven für die Wärmekapazität als Funktion der Temperatur von BPTI-Lösungen sind in **Abb. (6)** wiedergegeben.

Integriert man die Kurven und trägt die Enthalpiewerte als Funktion der Umwandlungstemperatur T_m auf, so erhält man ein für Proteindenaturierung ungewöhnliches Bild, das in **Abb. (7)** dargestellt ist.

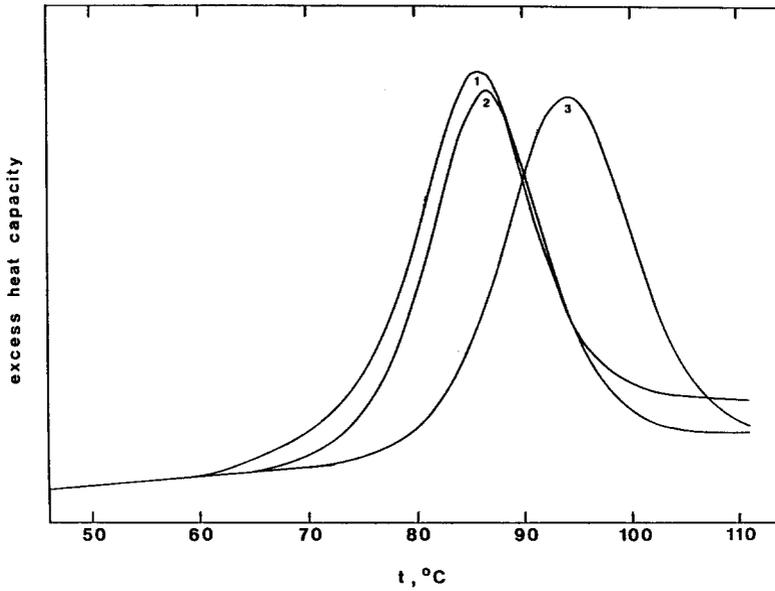


Abbildung (6): Temperaturabhängigkeit der Wärmekapazität von BPTI-Lösungen [3]

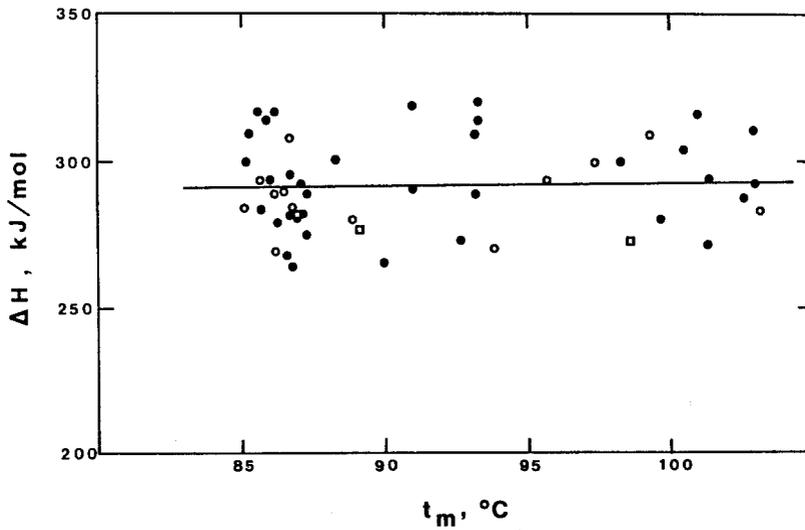


Abbildung (7): Temperaturabhängigkeit der Auffaltungsenthalpie von nativem BPTI [3]

Es ergibt sich nämlich eine praktisch temperaturunabhängige Auffaltungsenthalpie von ca. 290 kJ/Mol.

Wer noch nichts mit Proteinen zu tun hatte, wird zu Recht fragen: Was ist daran so ungewöhnlich? Das ist die Normalsituation bei Reaktionen zwischen kleinen Molekülen, wo gewöhnlich die Wärmekapazitäten von Anfangs- und Endprodukten sehr ähnlich sind. Nach dem Kirchhoff'schen Satz $d\Delta H/dT = \Delta c_p$ ist die Reaktionsenthalpie dann notwendigerweise temperaturunabhängig.

Dieses Ergebnis einer temperaturunabhängigen Auffaltungsenthalpie ist deshalb so bemerkenswert, weil Proteine Makromoleküle sind und im allgemeinen eine starke Abhängigkeit der Stabilisierungsenthalpie von der Temperatur zeigen. Einige charakteristische Werte sind in **Tabelle (3)** zusammengestellt.

Für Lysozym, ein kleines globuläres Protein mit einem Molekulargewicht von 14600, wurde eine Temperaturabhängigkeit der Stabilisierungsenthalpie von -6.7 kJ/(Mol·Grad) bestimmt, d.h. mit jedem Grad, um das sich die Umwandlungstemperatur erhöht, wird die Stabilisierungsenthalpie um 6.7 kJ/Mol stärker exotherm.

Dieser Wert ist repräsentativ für eine ganze Klasse von globulären Proteinen, die verschwindend kleine Wärmekapazitätsänderung bei der Auffaltung von BPTI ist dagegen untypisch.

Nun ist natürlich nicht die Enthalpie ΔH das Kriterium für die Stabilität eines Makromoleküls in Lösung sondern die freie Enthalpie ΔG .

Berechnet man ΔG mit den aus den Wärmekapazitätsmessungen gewonnenen Daten, so ergibt sich für BPTI bei $\text{pH} = 3$ ein $\Delta G = -51$ kJ/Mol. Vergleicht man diesen Wert mit der Energie, die für die Spaltung eines Mols H_2 Moleküle in Atome notwendig ist, 436 kJ/Mol, so hat man einen klaren Hinweis für die **Labilität von Proteinen**.

Tabelle (3): Wärmekapazitätsänderungen bei Auffaltungsreaktionen globulärer Proteine [4]

Protein	Δc_p kJ/Mol·K	pH
L-Arabinose-binding protein (E.coli)	13.2	7.4
Chymotrypsinogen	14.0	4.0
Lysozym	6.7	4.0
Ovalbumin	11.3	7.0
Papain	13.7	3.8
Parvalbumin (ohne Ca^{2+})	4.6	7.0
Pesinogen	25.5	6.0
Ribonuclease	8.7	7.0
BPTI	0.1	

Diese Tatsache wird noch deutlicher, wenn man die freien Enthalpien für verschiedene Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten vergleicht Tabelle (4). Eine andere Überlegung beleuchtet die charakteristische Stabilitätssituation des marginalen Gleichgewichtes bei Proteinen. Nehmen wir das Beispiel von Chymotrypsin mit einem ΔG -Wert von 50 kJ/25000 g. Pro Aminosäure ergibt das einen Wert von $50000/243 = 205$ J/AA, d.h. dieser Wert liegt unter der thermischen Energie RT. Proteine können also nur Tertiärstrukturen ausbilden, weil die Reaktion hochkooperativ verläuft.

Tabelle (4): Freie Stabilisierungsenthalpien globulärer Proteine [4]

Protein	ΔG_{st} <i>kJ/Mol</i>	T	pH
α -Chymotrypsin	49.6	25	4.0
Cytochrom b ₅	21.0	25	7.4
Lysozym	60.7	25	7.0
Metmyoglobin	50.2	25	10.0
Tryptophan Synthase (α -Untereinheit)	49.0	25	7.8
BPTI	51.7	25	3.0

Was sind nun die molekularen physikalischen Gründe für die relativ zu anderen Proteinen hohe Stabilisierungsenthalpie von BPTI. Untersucht man die stabilisierenden Wechselwirkungen z. B. wie es in der Röntgenstrukturanalyse üblich ist durch Abzählen der H⁺-Brücken und hydrophoben Kontakte, so stellt man fest, daß BPTI sogar unterdurchschnittlich wenige H⁺-Brücken pro g aufweist und auch nur eine normale oder sogar niedrige Anzahl von hydrophoben Kontakten besetzt. Da beide Zahlen im allgemeinen als ein Maß für die Thermostabilität angesehen werden, wäre auf Grund dieser, wie man betonen muß, rein strukturellen Kriterien nur eine niedrige Stabilität zu erwarten.

Genau das Gegenteil ist der Fall. Welche Wechselwirkungen bewirken also die hohe relative Stabilität von BPTI? In diesem Zusammenhang müssen wir uns daran erinnern, daß das kleine Protein durch 3 Disulfidbrücken hoch vernetzt ist, wie in Abb. (5) zu sehen ist.

Wie können diese Vernetzungen zur Stabilität beitragen? Prinzipiell gibt es offenbar 2 Möglichkeiten:

- 1.) Der hohe Vernetzungsgrad kann die Kontakte zwischen den Aminosäuren verbessern, so daß höhere Wechselwirkungsenergien (Dispersionskräfte proportional r^{-6}) auftreten.
- 2.) Der Vernetzungsgrad kann die Konfigurationsentropie des aufgefalteten Zustandes so erniedrigen, daß der Entropiegewinn bei der Auffaltung kleiner ist als bei nicht vernetzten Proteinen. Beide Effekte führen zu höherer Stabilität.

Betrachten wir zunächst die Verringerung des Konfigurationsentropiegewinnes bei der Auffaltung. Für eine ganze Serie von Proteinen ist die spezifische Entropieänderung ca. $0.149 \text{ J}/(\text{g}\cdot\text{K})$ [5]. Aus unseren Messungen ergibt sich für BPTI $\Delta S = 0.123 \text{ J}/(\text{g}\cdot\text{K})$, also ein um $0.026 \text{ J}/(\text{g}\cdot\text{K})$ kleinerer Wert. Dieser Wert stimmt ausgezeichnet mit Berechnungen von Poland und Scheraga [6] über den Konfigurationsentropieverlust vernetzter Ringe überein. Pro Aminosäurerest liefern die Berechnungen einen Entropieverlust von $-2.7 \text{ J}/(\text{Aminosäure}\cdot\text{K})$, während unsere Messung $-2.9 \text{ J}/(\text{Aminosäure}\cdot\text{K})$ ergibt.

Der 2. mögliche Faktor für die hohe spezifische Stabilität von BPTI ist die Verbesserung der Wechselwirkungsenergien durch Verringerung der Abstände im Gefolge der Vernetzung. Wenn dieser Effekt wirklich auftritt, sollte er sich experimentell nachprüfen lassen, nämlich z. B. durch Öffnen einer Disulfidbrücke oder durch Spaltung einer anderen kovalenten Bindung unter Beibehaltung der 3 Disulfidbrücken. Entsprechende Untersuchungen sind mit in den Positionen 14,38 carboxamidiertem oder carboxymethyliertem BPTI durchgeführt worden. Abb. (8) zeigt ein Energiediagramm dieser modifizierten Proteine.

Man erkennt eindeutig eine starke Reduktion sowohl der freien Enthalpie- wie auch der Enthalpiewerte. Damit ist ganz eindeutig die landläufige These widerlegt, daß Vernetzungen sich nur auf die Entropie auswirken.

BPTI – Analoge

THERMODYNAMISCHE PARAMETER 25 Grad

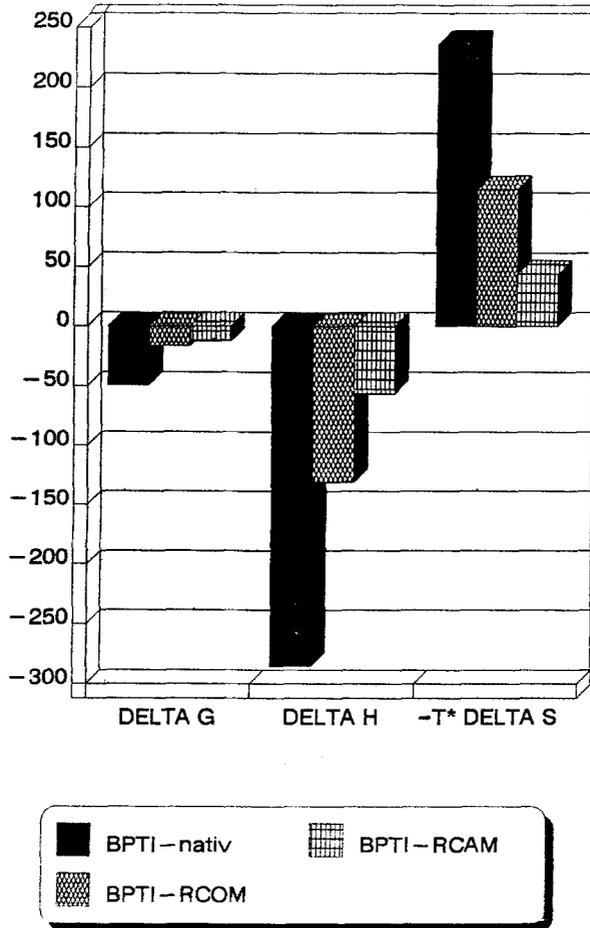


Abbildung (8): Thermodynamische Parameter von nativem und modifiziertem BPTI

Einen quantitativ fast identischen Effekt erzielt man, wenn man die kovalente Bindung zwischen C 15 und C 16 spaltet, ohne die Disulfidbrücken zu verändern.

Bis jetzt haben wir nur von einer Erniedrigung der Stabilisierungsenergie durch Veränderung des Vernetzungsgrades gesprochen. Gibt es auch Möglichkeiten zu einer Stabilisierung ohne den Vernetzungsgrad zu ändern?

Ein Ansatzpunkt könnte aus folgendem experimentellen Befund resultieren. Man hat aus vergleichenden Untersuchungen thermophiler und mesophiler LDH herausgefunden, daß das thermophile Enzym relativ zum mesophilen Enzym eine größere Anzahl von Argininen besitzt [7]. Wenn diese Tatsache wirklich ein Grund für die höhere Thermostabilität ist, dann müßte BPTI bei Umwandlung der Lysine in Homoarginine stabiler werden.

Die ersten Untersuchungen zeigen jedoch, daß dieser für LDH richtige Befund nicht verallgemeinert werden kann.

Zusammenfassend kann man aus diesen Untersuchungen an BPTI ableiten, daß Vernetzungen in zweierlei Art stabilisierend wirken können. 1.) Sie können die Wechselwirkungen verbessern und 2.) sie verringern den Konfigurationsentropiegewinn bei der Auffaltung. Als 3. Ergebnis kann man sagen, daß Einführung von Guanidinstrukturen an der Oberfläche eines Proteins nicht notwendigerweise zu einer Erhöhung von ΔH führt.

Die bisherigen Untersuchungen zum Einfluß von Aminosäuremodifikation auf die Stabilität von Proteinen stützten sich auf ein chemisch modifiziertes Protein. Diese Art der Sequenzveränderung ist normalerweise auf wenige, außergewöhnlich stabile Proteine beschränkt. Ein weit größeres Spektrum von Aminosäureveränderungen läßt sich mit den modernen Methoden des "genetic engineering" erzielen. Diesen Weg haben wir in Zusammenarbeit mit Dr. Cesareni (Universität Rom) beim sogenannten "ROP" Protein gewählt. Ein Ausschnitt aus den vielfältigen Möglichkeiten der Aminosäureaustausche ist in **Abb. (9)** angedeutet.

ROP besteht aus 2 α -Helices, die durch eine Brücke von 5 Aminosäuren (Asp30-Glu34) verbunden sind. In Lösung liegt ROP als dimeres Molekül vor,

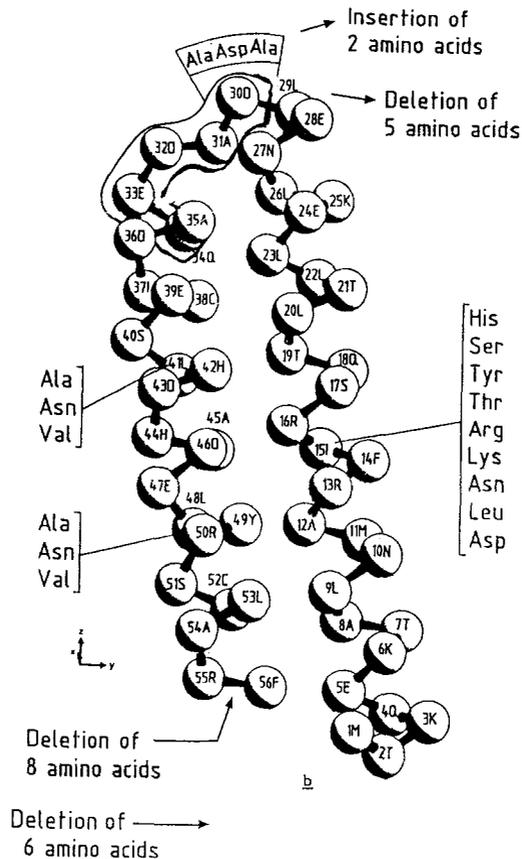


Abbildung (9): Primärstruktur von ROP Protein und Mutanten [8]

wie in Abb. (10) wiedergegeben ist. ROP ist also ein Prototyp eines durch intermolekulare, nicht kovalente Wechselwirkungen stabilisierten Proteins.

Es ist offensichtlich, daß mit Hilfe der Mutanten dieses Proteins eine große Anzahl definierter Fragen nach dem Einfluß spezifischer Aminosäuren auf Struktur und Stabilität von Proteinen beantwortet werden können.

Die Struktur von ROP ist bis zu einer Auflösung von 1.7 Å bekannt [9]. Bei dieser Auflösung sind auch die fest gebundenen H₂O Moleküle identifizierbar. Damit besteht die Hoffnung, daß im Rahmen zukünftiger Untersuchungen eine Korrelation von Energieparametern zu röntgenographisch erfaßbaren Strukturänderungen möglich ist.

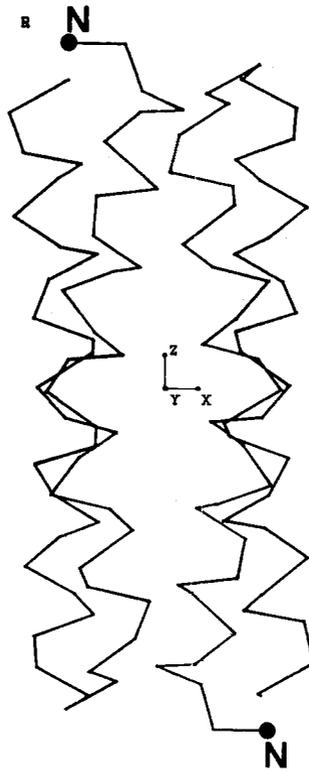


Abbildung (10): Struktur des ROP Dimeren

Wir wollen in diesem Zusammenhang nur zwei Ergebnisse andeuten, die hinsichtlich der Topologie der Proteinfaltung von erheblicher Bedeutung sind. Es ist bis jetzt keineswegs geklärt, welchen Beitrag zur Stabilität die oft scheinbar strukturlosen Aminosäurebereiche zwischen z.B. helikalen Sekundärstrukturbereichen in einem Protein leisten. Zur Klärung dieser Frage haben wir zwei ROP Mutanten untersucht, die sich von nativem Protein folgendermaßen unterscheiden: Bei der Mutante RM6 sind die 5 Aminosäuren, die die beiden α -Helices verbinden, nicht mehr vorhanden; in der anderen Mutante sind 2 zusätzliche Aminosäuren eingeführt.

Die beiden vorläufigen Ergebnisse sind folgende: Fehlen die 5 verbindenden Aminosäuren, so reduziert sich die Auffaltungsenthalpie von 612 kJ/Mol auf 424 kJ/Mol. Eine Verlängerung der 5 Aminosäuren im Verbindungsstück auf 7 Aminosäuren durch Einführung von 2 Ala erhöht die Auffaltungstemperatur nicht, reduziert aber die Stabilisierungsenthalpie um ca. 50 kJ/Mol. Außerdem lassen sich starke Veränderungen in den zirkulardichroitischen Spektren nachweisen, die auf eine Strukturänderung in den helikalen Bereichen der mutierten Proteine hindeuten oder eine Modifikation der Wechselwirkungen des in Lösung vorhandenen Dimeren reflektieren.

Mit diesen wenigen Beispielen für unsere ersten Versuche, eine Korrelation zwischen Stabilitätsparametern und strukturellen Änderungen bei Proteinen, die in definierter Weise durch genetische oder chemische Modifikation verändert wurden, herzustellen möchte ich diese Übersicht schließen. Offensichtlich müssen noch eine Vielzahl an thermodynamischen, spektroskopischen und kinetischen Messungen ausgeführt werden, um eine quantitative, prognostisch im Rahmen von "protein design" verwendbare Basis für eine Energie-Struktur-Funktionskorrelation zu schaffen.

REFERENZEN

- 1 Cooper, A. (1984) *Progr. Biophys. Molec. Biol.* **44**, 181-214.
- 2 Hinz, H.-J. (1988) *Modern Methods in Protein Chemistry* **3**, 245-273.
- 3 Moses, E. and Hinz, H.-J. (1983) *J. Mol. Biol.* **170**, 765-776.
- 4 Pfeil, W. (1986) in "Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology (Hinz, H.-J., ed.) pp.349-376.
- 5 Privalov, P.L. (1979) *Advanc. Protein Chem.* **33**, 167-241.
- 6 Poland, D.C. and Scheraga, H.A. (1965) *Biopolymers* **3**, 379-399.
- 7 Zuber, H. (1981) in "Trends in the Biology of Fermentations for Fuels and Chemicals" (Hollaender, A. et al., eds.) Plenum Publishing Corporation, New York, N.Y.

- 8 Cesarini, G. and Bauer, D.W. (1985) Trends Biochem. Sci. 10, 303-306.
- 9 Banner, D.W., Kokkinidis, M. and Tsernoglou, D. (1987) J. Mol. Biol. 196, 657-675.

Zusammenfassung - Eine charakteristische Eigenschaft von Proteinen ist die marginale Stabilität der Sekundär- und Tertiärstrukturen. Deshalb ist es möglich, durch Austausch einzelner Aminosäuren messbare Stabilitätsänderungen hervorzurufen. Eine der besten Methoden zur Bestimmung der thermodynamischen Stabilitätsparameter ist die Wärmekapazitätsmikrokalorimetrie. Im vorliegenden Artikel werden die methodischen Grundlagen dieses Messverfahrens kurz beschrieben. Das Hauptgewicht liegt jedoch auf der Bestimmung der Beiträge der kovalenten und nicht-kovalenten Wechselwirkungen zur Gesamtstabilität von Proteinen. Am Beispiel von zwei biochemisch und biophysikalisch gut charakterisierten Proteinen, dem pankreatischen Trypsin Inhibitor /BPTI/ und /ROP/, werden die Grundideen der Separation der energetischen Einzelbeiträge diskutiert.

Резюме - Протеины характеризуются незначительной устойчивостью вторичной и третичной структуры, что делает их чувствительными к возмущениям, вызванным обменом только одной аминокислоты. Одним из самых лучших методов определения типичных параметров их термодинамической устойчивости является высокочувствительная сканирующая микрокалориметрия. В статье описываются некоторые основные методологические аспекты этого метода. Однако, главное внимание уделено количественному определению ковалентных и нековалентных вкладов в общую стабильность протеинов. Общее логическое обоснование этого метода показано на примере двух хорошо изученных протеинов: ингибитор трипсина BPTI и ROP.