

Wassermoleküle in und um Proteine

Martin Billeter, Zürich

Zusammenfassung

Proteine sind an fast allen biologischen Prozessen beteiligt; sie beeinflussen daher zahlreiche Eigenschaften eines jeden Organismus. Die vielfältigen Funktionen von Proteinen werden durch eine noch grössere Vielfalt an dreidimensionalen Strukturen ermöglicht. Die Funktion eines Proteins beruht auf direkten Kontakten zu anderen Molekülen und daher auf seiner Oberflächenstruktur. Die Interaktion von Proteinen mit ihrer Umgebung lässt sich jedoch nicht ohne Berücksichtigung der benachbarten Wassermoleküle beschreiben. Verschiedene experimentelle Methoden (Röntgenkristallographie, NMR) ergeben jeweils verschiedene Teilaspekte von Protein-Wasser-Wechselwirkungen. Zusammen betrachtet entsteht ein Modell, in welchem Wasser nicht nur den Raum zwischen grossen Molekülen auffüllt, sondern darüber hinaus fluktuierende Netzwerke von Wechselwirkungen zwischen Proteinen und anderen Molekülen und die daraus resultierenden entropischen Vorteile ermöglicht. Komplexe von Proteinen mit DNA, in welchen Proteine die genetische Information der DNA «lesen», veranschaulichen dieses Modell.

Water molecules within and around proteins

Proteins participate in almost all biological processes; they thus affect many properties of living organisms. The multitude of protein functions is made possible by an even larger multitude of three-dimensional protein structures. The function of a protein depends on direct contacts to other molecules; therefore protein functions are strongly correlated to protein surface structures. The study of interactions of proteins with their environment requires the consideration of neighbouring water molecules. Different experimental techniques (X-ray crystallography, NMR) show different aspects of protein-water interactions. By combining these results a model emerges, in which water does not simply fill the space between larger molecules but also enables fluctuating interaction networks between proteins and other molecules with the resulting entropic advantages. Complexes of proteins with DNA, where the proteins «read» the genetic information of the DNA, illustrate this model.

1 EINLEITUNG

Biologisches Leben beruht auf der Speicherung, Realisierung und Weitergabe von genetischer Information. Die Erhaltung dieser Information und deren Übertragung an Nachkommen erfolgt in Form sehr langer Polymerketten, den Desoxyribonukleinsäuren (DNA). Proteine, eine andere Klasse von biologischen Makromolekülen, übernehmen die Aufgabe der aktiven Auswertung dieser Information, d.h. das «Lesen» der DNA und den Bau der verschiedenen Zellkomponenten. Damit bestimmen sie den Aufbau des Organismus und dessen Wechselwirkung mit der Umwelt. Sie stellen, abgesehen von Wasser (~70%), mit etwa 15% den grössten Bestandteil der Zellmasse eines Bakteriums dar. In menschlichen Zellen variiert die Verteilung der Molekülarten je nach Zelltyp. Proteine, speziell Hämoglobine, erreichen in

Erythrozyten etwa 90% des Trockengewichts, was ungefähr 10^8 Molekülen pro Zelle entspricht.

Proteine übernehmen verschiedenartigste Funktionen; eine Auswahl ist in Tab. 1 zusammengestellt. Meist bedingen diese Funktionen direkte Kontakte zu anderen Molekülen. Dies erfordert eine Komplementarität der Oberflächen der beteiligten Moleküle. Betrachten wir als Beispiel einen Prozess, der dem «Lesen» genetischer Information vorangeht. Die «Buchstaben» der genetischen Information entsprechen den Bausteinen, aus welcher die DNA-Polymere zusammengesetzt sind; deren Abfolge ergibt «Wörter», die Gene. Die Funktion einiger Proteine ist es, den Startpunkt von Genen zu finden. Dieser entspricht einer bestimmten Folge von DNA-Bausteinen. Das Erkennen dieses Startpunktes löst das hierfür verantwortliche Protein in zwei Schritten. Zunächst

Tab. 1. Beispiele biologischer Funktionen von Proteinen.

Tab. 1. Examples of biological functions of proteins.

Funktion	Beispiel eines Proteins (mit Funktion)
«Lesen» von DNA	Homeodomänen (Erkennen von DNA-Sequenzen)
Zusammensetzung von Molekülen	DNA-Polymerase (Bau von DNA)
Zerschneiden von Molekülen	Trypsin («Verdauen» von Proteinen)
Modifikation von Molekülen	Glutaredoxin (Bildung von Disulfidbrücken)
Transport	Hämoglobin (Sauerstofftransport)
Lagerung	Metallothionein (Bindung von Metallen)
Bewegung	Myosin, Actin (Muskelkomponenten)
Gerüst, Stabilität	Kollagen (Knochen, Knorpel, Sehnen)
Schutz	Kapsidproteine in Viren (Hülle um Virus-DNA)
Immunreaktion	Antikörper (Bindung von Fremdkörpern)
Energieumsetzung	Bacteriorhodopsin (Photoreaktionen)
Hormone	Insulin (Stoffwechselregulierung)
Informationsübertragung	Acetylcholinrezeptor (Nervenimpulse)
Gifte	α-Cobratoxin (Blockierung von Nervenfunktion)

bindet es irgendwo an die DNA; dazu muss seine allgemeine dreidimensionale Struktur derjenigen von DNA angepasst sein. Danach gleitet es der DNA entlang und erkennt dabei die Abfolge der DNA-Bausteine. Dieses Unterscheiden der Bausteine erfordert eine zusätzliche Komplementarität, welche speziell auf einzelne DNA-Bausteine ausgerichtet ist; man spricht in diesem Fall von spezifischer Protein-DNA-Bindung.

2 EIGENSCHAFTEN EINIGER BIOLOGISCH RELEVANTER MOLEKÜLE

2.1 Proteine

Der Aufbau von Proteinen ist eigentlich einfach, erlaubt aber trotzdem zahlreiche Variationen (CREIGHTON, 1993). Proteine formen lineare Ketten, welche aus 20 verschiedenen Bau-

steinen aufgebaut sind: den Aminosäuren. Die Länge dieser Kette liegt im Bereich von etwa 40 bis über 1000 Aminosäuren. Abb. 1 zeigt ein ausgestrecktes Fragment einer Proteinkette bestehend aus vier Aminosäuren. Das Kettenrückgrat verläuft horizontal, kurze Seitenketten und einige weitere Atome stehen davon ab. Die verschiedenen Aminosäuren enthalten einen identischen Rückgratteil bestehend aus einem Stickstoff und zwei Kohlenstoffen (sowie einzeln daran gebundene Atome). Sie unterscheiden sich aber in ihren Seitenketten. Die chemischen Eigenschaften dieser Seitenketten erlauben eine Einteilung der Aminosäuren in hydrophob (wasserabstossend), polar («Wasserstoffbrückenbildend») und elektrisch geladen. Die erste Aminosäure in Abb. 1 ist ein Valin; ihre Seitenkette enthält (abgesehen von Wasserstoffen) ausschliesslich Kohlenstoffe, was ihr eine

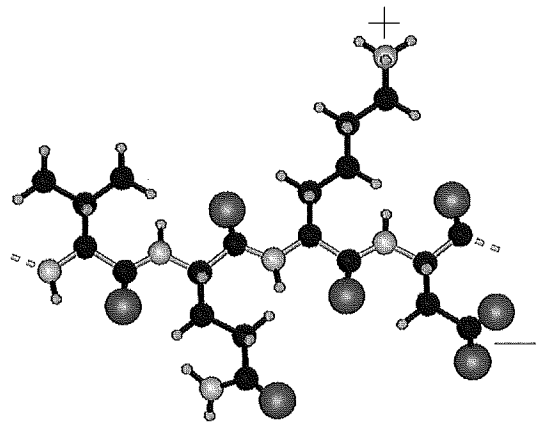


Abb. 1. Fragment einer Proteinkette in ausgestreckter Konformation. Atomkugeln sind kleiner gezeichnet als ihrer Raumbeanspruchung entsprechen würde; damit werden auch die als Balken dargestellten chemischen Bindungen sichtbar. Die grössten Kugeln bezeichnen Sauerstoffe, die kleinsten Kugeln Wasserstoffe. Mittlere Kugeln stehen für Kohlenstoffe (dunkel) und Stickstoffe (hell). Das Rückgrat verläuft horizontal und ist durch hellere Bindungen gekennzeichnet. Die Schnittstellen des Fragmentes sind durch gestrichelte Bindungen markiert. Die Seitenketten der Aminosäuren stehen abwechselnd nach oben und unten vom Rückgrat ab; ihre Reihenfolge ist Valin, Glutamin, Lysin und Asparaginsäure. Geladene Atomgruppen sind mit dem entsprechenden Vorzeichen identifiziert.

Fig. 1. Fragment of a protein chain in extended conformation. Atoms are drawn as spheres that are smaller than would correspond to their space requirements; therefore the chemical bonds, represented as sticks, become visible. The largest spheres indicate oxygens, the smallest hydrogens. Medium size spheres stand for carbons (dark) and nitrogens (bright). The backbone is oriented horizontally and indicated by brighter bonds. The cutting points of the fragment are marked by dashed bonds. The side chains alternate between up and down orientations; their sequence is valine, glutamine, lysine and aspartic acid. Charged atomic groups are identified with a corresponding sign.

stark hydrophobe Eigenart verleiht. Als nächstes folgt ein Beispiel einer polaren Aminosäure, ein Glutamin. Die Fähigkeit, Wasserstoffbrücken zu bilden, erhält sie durch den Stickstoff und den Sauerstoff am Ende der Seitenkette. Die letzten zwei Aminosäuren tragen je eine Ladung am Ende ihrer Seitenketten. Die chemischen Eigenschaften der Aminosäuren bestimmen einerseits die dreidimensionale Faltung des Proteins, andererseits aber auch dessen Funktion. Letztere ist ja, wie schon erwähnt, durch die Komplementarität der Proteinoberfläche mit der Oberfläche anderer Moleküle gegeben. Diese Komplementarität ist nicht nur räumlich zu verstehen, sondern auch chemisch: Hydrophobe Oberflächen neigen zu Kontakt untereinander, ebenso polare. Geladene Gruppen ziehen sich entsprechend dem Coulombgesetz an, falls sie verschiedene Vorzeichen haben; andernfalls stossen sie sich ab. Abb. 2 zeigt die mehrheitlich positiv geladene Oberfläche einer DNA-bindenden Proteindomäne. Da alle DNA-Bausteine in ihrem gemeinsamen Rückgratteil eine negative Ladung tragen, ist durch den einseitigen Ladungsüberschuss der Proteinoberfläche eine allgemeine Affinität dieser Proteindomäne an DNA-Moleküle gegeben.

2.2 Wasser und Wasserstoffbrücken

Wassermoleküle zeigen trotz ihrer geringen Grösse eine grosse Vielseitigkeit (WESTHOF, 1993). Ihre Wechselwirkung

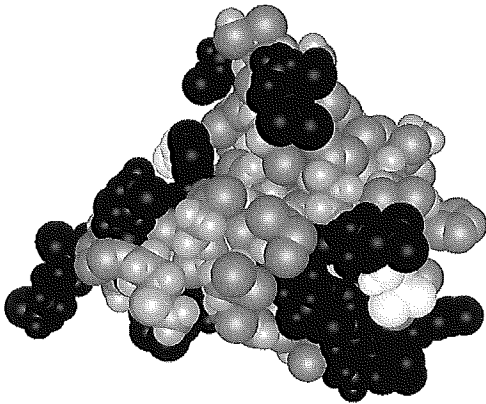


Abb. 2. Darstellung der DNA-bindenden Domäne des *Antp*-Proteins (BILLETER et al., 1993) mittels Kugeln, welche der Raumbeanspruchung der einzelnen Atome entsprechen. Dunkel gezeichnete Atome gehören zu positiv geladenen, helle zu negativ geladenen Aminosäuren. Alle anderen Atome sind grau. Die Ansicht zeigt die DNA-Bindungsstelle von vorne.

Fig. 2. Representation of the DNA-binding domain of the *Antp*-protein (BILLETER et al., 1993) with spheres that correspond to the space requirements of the individual atoms. Atoms drawn in dark and bright belong to positively and negatively charged amino acids, respectively. All other atoms are in grey. The view shows the DNA-binding site from the front.

mit der Nachbarschaft erfolgt wenn immer möglich mittels Wasserstoffbrücken. Wasserstoffbrücken halten zwei Atome eng beieinander, sind aber schwächer als chemische Bindungen. Sie kommen aufgrund der Polarisierbarkeit der beteiligten Atomgruppen zustande. Dabei bindet eine Donorgruppe, d. h. ein Wasserstoff, welcher an einen Sauerstoff oder Stickstoff gebunden ist, an einen Akzeptor, d. h. einen Sauerstoff oder Stickstoff. Das aus nur einem Sauerstoff und zwei Wasserstoffen bestehende Wassermolekül kann als zweifacher Donor und zusätzlich als zweifacher Akzeptor auftreten. In gefrorenem Zustand bildet jedes Wassermolekül alle vier möglichen Wasserstoffbrücken aus; dadurch entsteht das regelmässige Gitter eines Eiskristalls. In flüssigem Wasser liegen zu jedem Zeitpunkt zwei bis drei Wasserstoffbrücken pro Molekül vor. Diese werden in rascher Folge gebrochen und neu gebildet, was den Molekülen hohe Beweglichkeit verleiht. Wasser kann natürlich ebenfalls Wasserstoffbrücken zu anderen Molekülen bilden. Besonders geeignet dafür sind die polaren (oder hydrophilen, d. h. «wasserfreundlichen») Atomgruppen in Proteinen oder in DNA.

3 BESTIMMUNG DREIDIMENSIONALER PROTEINSTRUKTUREN

Bevor wir das Wechselspiel der kleinen Wassermoleküle mit Makromolekülen wie Proteinen oder DNA betrachten, müssen wir noch einige Überlegungen anstellen zu den experimentellen Methoden, welche uns Aufschluss über die räumliche Struktur von Makromolekülen geben. Diese Experimente erlauben auch, Rückschlüsse über die räumliche Nachbarschaft von Wassermolekülen zu den Makromolekülen zu ziehen. Heute existieren zwei Techniken, um Strukturen von Makromolekülen mit atomarer Auflösung zu erhalten.

Röntgenstreuung an Einkristallen

Die ältere der zwei Methoden beruht auf der Streuung von Röntgenstrahlen an Einkristallen, d. h. an regelmässigen Kristallen gebildet aus den untersuchten Makromolekülen und aus Wasser (DRENTH, 1994). Die am Kristall gestreuten Strahlen ergeben auf einem hinter dem Kristall angebrachten Photodetektorsystem ein periodisches Muster. Aus diesem kann, mit einigem Aufwand, die Struktur des Proteins abgeleitet werden. Dabei erhält man räumliche Koordinaten sowohl für die Proteinatome als auch für einzelne Wassermoleküle. Wichtig im folgenden ist: Die so gefundenen Positionen zeigen an, dass sich während der meisten Zeit der Messung ein Atom an diesem Ort befindet. Dabei kann durchaus

der Fall auftreten, dass ein bestimmter Ort zwar häufig besetzt ist, dass sich an diesem Ort aber die Atome sehr rasch abwechseln. Wir werden sehen, dass dies auf Wassermoleküle zutrifft.

In allen Einkristallen von Proteinen befinden sich zahlreiche Wassermoleküle. Viele davon sind zu beweglich, um mittels Röntgenstreuung beobachtet zu werden. Tab. 2 zeigt eine Statistik von 114 Proteineinkristallen, in welchen nebst den Proteinen (mit zusammen 33 140 Aminosäuren) 24 897 Wassermoleküle lokalisiert werden konnten. Pro Protein sind demnach über 200 Wassermoleküle sichtbar. Gut die Hälfte davon sind einem Proteinmolekül direkt benachbart, einige wenige haben sogar direkten Kontakt zu mehreren Proteinmolekülen. Knapp zwei Drittel der Protein-Wasser-Kontakte sind Wasserstoffbrücken. Fast die Hälfte der Wassermoleküle bilden Wasserstoffbrücken zu weiteren beobachtbaren Wassermolekülen. Diese Statistik könnte den Eindruck vermitteln, dass ein beachtlicher Teil der Wassermoleküle feste («eingefrorene») Wechselwirkungen mit den Proteinen oder untereinander bilden; dies hat teilweise zur Beschreibung von Wassermolekülen als integrale Bestandteile der Proteine geführt (BROOKS et al., 1988). Wie wir sehen werden, muss dieses Bild aufgrund von Messungen mittels magnetischer Kernresonanz modifiziert werden.

Magnetische Kernresonanz

Die zweite Methode zur Strukturbestimmung von Makromolekülen ist die magnetische Kernresonanz (englische Abkürzung NMR; WÜTHRICH, 1986). NMR-Experimente werden an konzentrierten wässrigen Lösungen der Makromoleküle

Tab. 2. Wassermoleküle in Einkristallen von Proteinen. Die Statistik beruht auf 114 Proteineinkristallen. Kontakte sind definiert als Distanzen kürzer als 3 Å zwischen einem Proteinatom und einem Wasseratom.

Tab. 2. *Water molecules in single crystals of proteins. The statistics base on 114 single crystals of protein. Contacts are defined as distances shorter than 3 Ångstroms between an atom of the protein and an atom of water.*

Wassermoleküle pro Proteinmolekül	218
Wassermoleküle mit Kontakt zu einem Proteinmolekül	51%
Wassermoleküle mit Kontakt zu mehr als einem Proteinmolekül	3%
Wassermoleküle mit Wasserstoffbrücken zu Wassermolekülen	44%
Proteinkontakte der Wassermoleküle sind Wasserstoffbrücken	61%

durchgeführt, welche in ein starkes Magnetfeld gebracht werden. Durch das Einstrahlen bestimmter Radiofrequenzen können selektiv einzelne Kerne von Wasserstoffatomen angeregt werden. Diese Kerne können ihre Energie durch Abstrahlen derselben Frequenz wieder abgeben. Ein Kern kann aber auch einen benachbarten Kern anregen, welcher darauf seine ihm eigene Frequenz abstrahlt. Das Ausmass der Energieübertragung von einem Kern zum anderen ist von der Distanz der Kerne abhängig, d. h. das Experiment entspricht einer Distanzmessung. Viele dieser Distanzmessungen erlauben die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur des Moleküls.

Wichtig für die Beobachtung von Wassermolekülen ist, dass eine Messung jeweils an zwei ganz bestimmten Wasserstoffkernen erfolgt. Wird einer der Wasserstoffe durch einen dritten ersetzt, etwa durch das Verdrängen eines Wassermoleküls durch ein anderes, so muss die Energieübertragung von neuem beginnen. NMR erlaubt damit eine Charakterisierung der Aufenthaltszeit von Wassermolekülen. Es können verschiedene Austauschbereiche unterschieden werden: Aufenthaltszeiten von Wassermolekülen grösser als Millisekunden geben ein anderes NMR-Spektrum als kürzere Aufenthaltszeiten; ebenfalls unterscheidbar sind sehr kurze Aufenthaltszeiten von weniger als einer Nanosekunde (Milliardstelsekunde) (WÜTHRICH et al., 1992). NMR-Experimente erreichen zwar eine geringere örtliche Auflösung der Wassermoleküle als die Röntgenkristallographie; im Gegensatz zu letzterer Methode wird aber eine sehr gute zeitliche Auflösung erreicht. Bis heute haben sämtliche NMR-Messungen an Wassermolekülen in der Nachbarschaft von Proteinen oder DNA gezeigt, dass deren Aufenthaltsdauer den Millisekundenbereich nicht übersteigt.

4 KOMPLEXE VON PROTEINEN MIT DNA

4.1 Spezifische Erkennung von DNA-Sequenzen

Wie schon erwähnt, ist es die Aufgabe verschiedener Proteine, DNA-Sequenzen zu «lesen», d. h. in einem langen DNA-Molekül die Abfolge bestimmter DNA-Bausteine (Nukleotide) zu erkennen. DNA-Moleküle liegen ebenfalls als lange Ketten gebildet aus einer Auswahl von Bausteinen vor. Ähnlich den Aminosäuren in Proteinen besitzen diese Nukleotide einen gemeinsamen Rückgratteil und unterscheiden sich in ihren Seitenketten. Der DNA stehen nur vier Bausteine (Nukleotide) zur Verfügung. Zwei komplementäre DNA-Ketten umwinden sich zu einer Doppelhelix. Komplementär bedeutet hier, dass je zwei der vier Nukleotidtypen sich mittels

Wasserstoffbrücken paaren können. Dabei kommen die sich paarenden Seitenketten ins Innere der Doppelhelix zu liegen, bleiben aber über zwei Furchen zugänglich. Abb. 3 veranschaulicht die Struktur einer DNA-Doppelhelix. Die zwei Rückgratketten sind schematisch als Bänder mit direkt daran gehefteten Fünfecken dargestellt. Die Seitenketten sind als horizontal orientierte Platten eingezeichnet. Schwarze Plattenpaare entsprechen einer der möglichen Nukleotidpaarungen, weisse der anderen. Ein DNA-lesendes Protein muss nun in eine der Furchen eindringen und dort die DNA-Seitenketten erkennen. Im allgemeinen bilden Proteine Kontakte zu den (schwarzen und weissen) Nukleotidpaaren in der Mitte der Abb. 3 nach vorne gerichteten, grösseren Furche. Im folgenden werden zwei Beispiele von Protein-DNA-Komplexen diskutiert, deren dreidimensionale Struktur in einem Fall mittels Röntgenstreuung an Einkristallen und im anderen Fall anhand von NMR-Experimenten an Lösungen ermittelt wurde.



Abb. 3. Schematisches Modell einer DNA-Doppelhelix. Das Rückgrat der zwei Polymerketten ist als Band mit daran gehefteten Fünfecken dargestellt. Die Seitenketten der DNA sind für das eine mögliche Nukleotidpaar (A-T) als schwarze und für das andere (G-C) als weisse Platten wiedergegeben. Zugang zu diesen Seitenketten ist über zwei Furchen verschiedener Breite möglich.

Fig. 3. Schematic model of a DNA double helix. The backbones of the polymer chains is represented by ribbons with attached pentagons. The DNA side chains are drawn as black plates for one of the two possible nucleotide pairs (A-T), and as white plates for the other (G-C). Access to the side chains is possible through the two grooves of different widths.

4.2 Beispiele von Protein-DNA-Wasser-Wechselwirkungen

Der Komplex des E2-Proteins mit DNA

Schauen wir zunächst die Struktur des Komplexes gebildet aus der DNA-bindenden Domäne des E2-Proteins vom bovinen Papillomavirus-1 und einer Ziel-DNA an (HEGDE et al., 1993). Diese Struktur stellt zurzeit die bestaufgelöste Einkristallstruktur eines Protein-DNA-Komplexes dar. Die Hauptkontaktstelle zwischen den zwei Makromolekülen entsteht durch das Eindringen einer helikalen Teilstruktur des Proteins in die grosse DNA-Furche (Abb. 4). Mehrere der (in Abb. 4 nicht eingezeichneten) Seitenketten dieser Proteinhelix können so direkten Kontakt zu den DNA-Seitenketten erhalten und damit die genetische Information «lesen». Eine Detailansicht dieser Kontaktstelle mit der Wechselwirkung zwischen einer Asparagin-Aminosäure und der DNA ist in Abb. 5 gegeben. Diese polare Aminosäure bildet eine direkte Wasserstoffbrücke zu einem DNA-Nukleotid. Weitere Protein-DNA-Verbindungen mittels Wasserstoffbrücken erfolgen indirekt via die als Kugeln gezeichneten Wassermoleküle. Dieses Netzwerk von Wasserstoffbrücken ist ein essentieller Teil der Wechselwirkungen, welche das spezifische

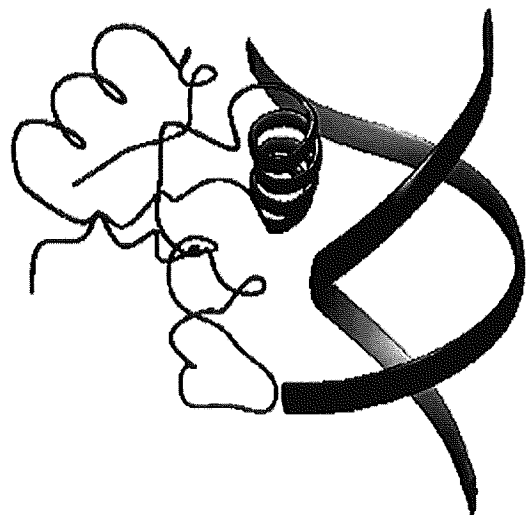


Abb. 4. Schematische Darstellung der DNA-bindenden Domäne des E2-Proteins im Komplex mit einer DNA. Für beide Moleküle ist nur das Rückgrat eingezeichnet. Die helikale Region im Proteinrückgrat, welche in die grosse Furche der DNA eindringt, ist als breites Band, der Rest als Schlauch dargestellt.

Fig. 4. Schematic representation of the DNA-binding domain of the E2-protein in a complex with DNA. For both molecules only the backbone is drawn. The helical region of the protein backbone that penetrates the major groove of the DNA is represented by a ribbon, the rest as a tube.

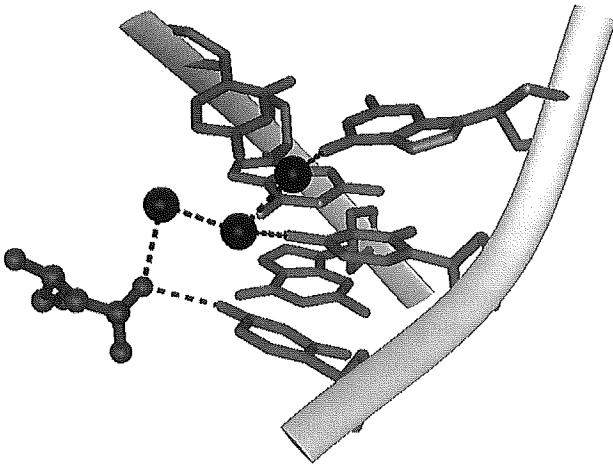


Abb. 5. Detail des Protein-DNA-Komplexes von Abb. 4. Eine Aminosäure des Proteins, ein Asparagin, ist links als «ball and stick»-Modell gezeichnet. Ein DNA-Ausschnitt ist mittels Bändern für das Rückgrat und einzelnen Bindungen für die Seitenketten dargestellt. Drei Wassermoleküle sind durch schwarze Kugeln gekennzeichnet. Sechs Wasserstoffbrücken sind mit gestrichelten Linien markiert.

Fig. 5. Detail of the protein-DNA complex of Fig. 4. One amino acid of the protein, an asparagine, is drawn as a «ball and stick» model. A DNA fragment is represented by ribbons for the backbone and by individual bonds for the side chains. Three water molecules are drawn as black spheres. Six hydrogen bonds are identified as dashed lines.

Erkennen der Nukleotidsequenz der Ziel-DNA erlauben. Die Röntgenstruktur lässt zunächst feste, «eingefrorene» Kontakte zwischen Protein und DNA vermuten, wobei aber Wassermoleküle eine entscheidende Rolle übernehmen. Das folgende Beispiel zeigt, dass diese Rolle über das einfache Vermitteln von Wasserstoffbrücken hinausgeht.

Der Antennapedia-Homeodomänen-DNA-Komplex

Der Komplex zwischen dem DNA-bindenden Teil des *Antennapedia*-Proteins der Fruchtfliege *Drosophila*, der *Antp*-Homeodomäne, und einem kurzen Stück DNA wurde mittels NMR bestimmt (OTTING et al., 1990; BILLETER et al., 1993). Das Rückgrat dieser Homeodomäne faltet zu drei helikalen Abschnitten sowie kurzen Verbindungsstücken. Die dritte Helix liegt ähnlich wie beim E2-Protein in der grossen DNA-Furche (Abb. 6). Aus verschiedenen biochemischen Experimenten sowie aus der dreidimensionalen Struktur lassen sich die Seitenketten von vier Aminosäuren dieser Helix identifizieren, welche für das spezifische Erkennen der DNA verantwortlich sind; sie sind in der Abbildung durch weisse oder schwarze Bindungen dargestellt. Die

Strukturrechnungen ergaben aber mehrere mögliche Konformationen dieser Seitenketten. Dies widerspricht der Existenz eines einzigen Netzwerkes von Protein-DNA-Wechselwirkungen.

Weitere Information aus NMR-Experimenten betrifft Wassermoleküle, welche in Kontakt zum Protein stehen: NMR-Daten belegen, dass sich ähnlich wie im E2-Protein-DNA-Komplex Wassermoleküle in der Kontaktregion zwischen Protein und DNA befinden. Gemessen wurden insbesondere Wasserkontakte von der durch schwarze Bindungen markierten Seitenkette (QIAN et al., 1993). Eine Gesamtansicht des Protein-DNA-Komplexes zeigt, dass diese Seitenkette, ein hydrophobes Isoleucin, völlig durch das Protein und die DNA eingeschlossen ist. Trotzdem geht aus den

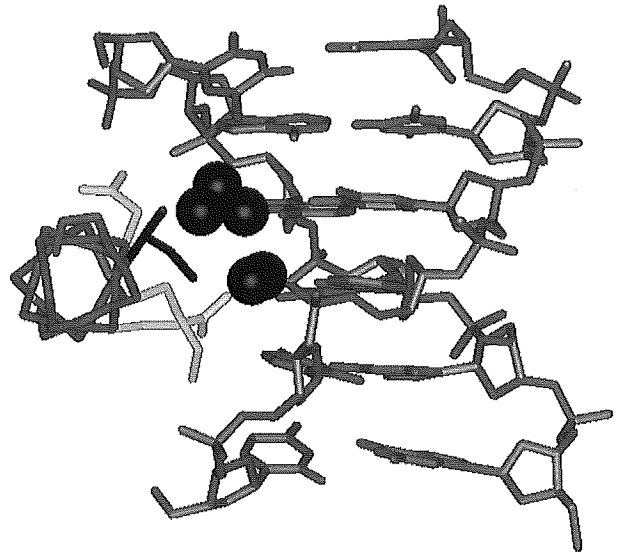


Abb. 6. Schematische Darstellung eines Ausschnittes des *Antp*-Homeodomänen-DNA-Komplexes. Das Rückgrat der Proteinhelix, welche in die grosse Furche der DNA eindringt, ist links sichtbar (die Helixachse steht senkrecht zur Bildebene). Rechts sind die chemischen Bindungen des DNA-Fragmentes gegeben. Die für die DNA-Erkennung verantwortlichen Proteinseitenketten sind mit weissen und schwarzen Bindungen dargestellt, wobei schwarz das im Text erwähnte Isoleucin kennzeichnet. Die dunklen Kugeln zeigen einige der in Strukturrechnungen gefundenen Wasserpositionen.

Fig. 6. Schematic representation of a section of the *Antp* homeodomain-DNA complex. The backbone of a protein helix penetrating the major groove is visible on the left (the axis of the helix runs perpendicular to the figure plane). To the right the chemical bonds of the DNA fragment are shown. The protein side chains that are responsible for the DNA recognition are represented by white and black bonds; black indicates the isoleucine mentioned in the text. The dark spheres identify some of the positions of water molecules found by structure calculations.

NMR-Daten eindeutig hervor, dass die Aufenthaltszeiten dieser Wassermoleküle im Innern des Komplexes im Submillisekundenbereich liegen. Strukturrechnungen ergaben zahlreiche Varianten von Wasserpositionen im Komplex, wovon nur einige in Abb. 6 wiedergegeben sind (BILLETER et al., 1993). Diese Rechnungen legen es nahe, dass die Positionen, welche die Wassermoleküle im Innern des Komplexes einnehmen, mit den Positionen von Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren aus polaren Proteinseitenketten austauschen.

5 EIN MODELL FÜR DNA-ERKENNUNG

Die Struktur des *Antp*-Homeodomänen-DNA-Komplexes führt auf folgendes Modell der spezifischen Erkennung von DNA-Sequenzen durch Proteine. Proteine binden an DNA mittels eines fluktuierenden Netzwerkes von Wechselwirkungen, insbesondere Wasserstoffbrücken. Dieses schliesst das Protein, die DNA sowie Wassermoleküle ein. Zu jedem Zeitpunkt liegen direkte und indirekte, d. h. durch Wassermoleküle vermittelte Kontakte zwischen den Makromolekülen vor; zugleich ändert sich aber das Netzwerk in rascher Folge. Jedes der entstehenden Wechselwirkungsmuster hat eine kurze Lebensdauer. Die Situation ist teilweise vergleichbar mit flüssigem Wasser, wo im Schnitt zahlreiche Wasserstoffbrücken vorliegen, wo aber ebenfalls eine rasche Fluktuation des Wechselwirkungsmusters stattfindet. Ein dynamisches Netz von Wechselwirkungen weist einen Entropievorteil auf. Gleichzeitig erlaubt es die Erklärung von allgemeiner Protein-DNA-Affinität (unspezifische Bindung) und, aufgrund verschiedener Anzahl und Dichte der Netzwerke, von spezifischer Erkennung einer bestimmten DNA-Sequenz.

Die Bedeutung dieses Modells liegt in Forschungsrichtungen wie dem Protein-Engineering. In diesem Gebiet intensiver pharmazeutischer Forschung wird versucht, Protei-

ne so abzuändern, dass sie gewisse klinische Eigenschaften erhalten. Da intermolekulare Wechselwirkungen die Grundlage solcher Eigenschaften bilden, ist es wichtig zu wissen, ob ein Protein wie ein genauer Schlüssel passen soll oder ob der Entropievorteil eines dynamischen Netzes von Wechselwirkungen zu bevorzugen ist.

6 LITERATUR

- BILLETER, M., QIAN, Y.Q., OTTING, G., MÜLLER, M., GEHRING, W.J. & WÜTHRICH, K. 1993. Determination of the nuclear magnetic resonance solution structure of an *Antennapedia* homeodomain-DNA complex. – *J. Mol. Biol.* 234, 1084–1093.
- BROOKS III, C.L., KARPLUS, M. & PETTITT, B.M. 1988. *Proteins*. – Wiley, New York, 259 pp.
- CREIGHTON, T.E. 1993. *Proteins, Structures and Molecular Properties*. – Freeman, New York, 507 pp.
- DRENTH, J. 1994. *Principles of Protein X-ray Crystallography*. – Springer, New York, 303 pp.
- HEGDE, R.S., GROSSMAN, S.R., LAIMINS, L.A. & SIGLER, P.B. 1993. Crystal structure at 1.7 Å of the bovine Papillomavirus-1 E2 DNA-binding domain bound to its DNA target. – *Nature* 359, 505–512.
- OTTING, G., QIAN, Y.Q., BILLETER, M., MÜLLER, M., AFFOLTER, M., GEHRING, W.J. & WÜTHRICH, K. 1990. Protein-DNA contacts in the structure of a homeodomain-DNA complex determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in solution. – *EMBO J.* 9, 3085–3092.
- QIAN, Y.Q., OTTING, G. & WÜTHRICH, K. 1993. NMR detection of hydration water in the intermolecular interface of a protein-DNA complex. – *J. Amer. Chem. Soc.* 115, 1189–1190.
- WESTHOF, E. (ed.) 1993. *Water and Biological Macromolecules*. – Macmillan, London, 461 pp.
- WÜTHRICH, K. 1986. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. – Wiley, New York, 292 pp.
- WÜTHRICH, K., OTTING, G. & LIEPINS, E. 1992. Protein hydration in aqueous solution. – *Faraday Discuss.* 93, 35–45.