

3. MODELLE DER PROTEINFALTUNG UND DETERMINANTEN

Der vorliegende experimentelle Datensatz stützt die Vorstellung einer hierarchischen Natur der Faltung von Proteinen, auf der generell auch die bisher vorgeschlagenen Modelle aufbauen (Tabelle 1). Viele Erkenntnisse konnten aus Untersuchungen der Stabilität und Faltung kleiner Proteine (RNase A, RNase T₁, Nuklease aus *Staphylococcus aureus*, Chymotrypsininhibitor 2 aus Gerste, Barnase und Barstar aus *Bacillus amyloliquefaciens*, Apomyoglobin, SH3-Domänen, Cytochrom c, Tendmistat, p53, Csp B) als vergleichsweise einfache Modelle gewonnen werden. Für Proteine, die nach einem Zweizustandsmodell falten (*two-state folder*), fand man eine Korrelation zwischen der Kontaktordnung (*contact order*), ein Maß des durchschnittlichen Abstandes kontaktierender Reste in der Sequenz nativer Proteine, und den gemessenen Geschwindigkeiten der Faltung (Myers & Oas, 2002; Plaxco *et al.*, 1998). Die Stärke dieser Korrelation zeigt, daß die Topologie des Proteins eine wichtige Determinante ist. Helikale Sekundärstrukturen bilden mehr lokale Kontakte als β -Faltblätter, daher tendieren helikale Proteine zu höheren Geschwindigkeiten der Faltung. Circulare Permutationen eines Proteins, die in eine ähnliche dreidimensionale Struktur, jedoch mit veränderter Topologie aufweisen, zeigen in diesem Zusammenhang, daß die Kontaktordnung nicht allein die Geschwindigkeit der Faltung bestimmt, sondern auch Kontakte der Aminosäurereste über längere Distanzen (Myers & Oas, 2002). Die Primärstruktur (Sequenz) eines Proteins ist die wesentliche Determinante seiner Faltung (Anfinsen, 1973). Nicht-native Strukturelemente können transient während der Faltung von Proteinen auftreten (Radford *et al.*, 1992). Die artifizielle Einführung solcher Elemente in natürliche Sequenzen vermindert erwartungsgemäß die thermodynamische Stabilität dieser Konstrukte, hat aber nur einen geringen Effekt auf die Geschwindigkeit der Faltung bzw. auf den Übergangszustand.

Die Rolle von Intermediaten als Determinanten wird in der Literatur zum Teil kontrovers diskutiert. Auch wenn sich Proteine bei Messungen der thermodynamischen Stabilität und der Kinetik nach einem Zweizustandsmodell verhalten, kann die Existenz von Intermediaten nicht ausgeschlossen werden, da alle Konformationen nach einer Boltzmann-Verteilung in geringen Konzentrationen populiert sein können. Die Beobachtbarkeit (bzw. strukturelle Charakterisierung mittels *pulse-labeling*) von Intermediaten hängt von deren freier Enthalpie relativ zu den Grundzuständen des Proteins ab. Zudem zeigt die experimentelle

Charakterisierung dieser nach einem Zweizustandsmodell faltenden Proteine, daß der Zustand des *molten globule* nicht für alle Proteine von Bedeutung ist. Die Energiebeträge für die Faltung eines Proteins können durch Perturbationen geändert werden. Durch destabilisierende Mutationen konnten für Ubiquitin, dessen Wildtyp nach einem Dreizustandsmodell faltet, Varianten erzeugt werden, die nach einem Zweizustandsmodell falten. Nach Stabilisierung dieser Varianten mit Natriumsulfat (Hofmeister-Effekt) ist das Intermediat wieder detektierbar (Dreizustandsmodell) (Khorasanizadeh *et al.*, 1996). Nach FERSHT ist der Faltungsweg eines Proteins dann hinreichend vollständig verstanden, wenn alle auftretenden Intermediate und Übergangszustände in ihrer energetischen Beziehung zueinander charakterisiert werden können (Fersht, 1999). Erweiternd dazu wird von MYERS & OAS vorgeschlagen, daß auch bei kleinen Proteinen, die nach einem Zweizustandsmodell falten, das Ensemble der wenig populierten Zustände aus strukturellen bzw. energetischen Neigungen (*bias*) des entfalteten Zustandes vorbestimmt ist (Myers & Oas, 2002). Damit ist auch der entfaltete Zustand als Ausgangspunkt der Faltung eine Determinante. Residuelle Mikrostrukturen, die während des Entfaltungsprozesses persistent bleiben, wurden erstmals von NERI als hydrophobe Cluster des 434 Repressors im chemisch entfalteten Zustand mittels NMR detektiert (Neri *et al.*, 1992). Das Auftreten lokaler Reststrukturen im entfalteten Zustand wurde für FkBP (Logan *et al.*, 1994), Dihydrofolatreductase (Garvey *et al.*, 1989) und Nuklease aus *Staphylococcus aureus* (Shortle & Meeker, 1989) gezeigt. Experimentelle Untersuchungen mittels NMR an Peptiden (Case *et al.*, 1994; Kemmink & Creighton, 1995; Nardi *et al.*, 1997; Yao *et al.*, 1994a; Yao *et al.*, 1994b) und Proteinfragmenten zeigen die Bildung von Wendebögen (*turns*) oder fluktuierenden Helices, die mit Zufallsknäueln (*random coil conformation*) in einem schnellen Gleichgewicht stehen können (Zeitbasis 10 ns bis 100 ns). Es kann davon ausgegangen werden, daß diese Strukturneigung von Polypeptidketten im entfalteten Zustand eine wesentliche Determinante bei der Ausbildung lokaler Kontakte im Faltungsprozeß von Proteinen ist und daher das von LEVINTHAL aufgestellte Paradoxon als solches nicht existiert (Levinthal, 1968). Eine „lokale Neigung“ kann die Konkurrenz zwischen multiplen kinetischen Wegen, wie zum Beispiel produktive Faltung und Aggregation, modulieren (Myers & Oas, 2002).

Verschiedene Modellvorstellungen über die Faltung von Proteinen sind auf der Grundlage experimenteller Daten und theoretischer Ansätze entwickelt worden. Man

faßt unter dem ‚*old view*‘ die klassischen Modelle zur Faltung von Proteinen, unter dem ‚*new view*‘ Modelle der Beschreibung des Prozesses mittels Energietrajektorien (Faltungstrichter, *foldng funnel*) zusammen. Bezüglich der Struktur des Übergangszustandes wird auch zwischen homogenen und heterogenen Mechanismen unterschieden. Elementar beschreiben erstere einen einzelnen Übergangszustand mit sehr eingeschränkter konformationeller Heterogenität, zweitere einen Übergangszustand als eine Ansammlung von divergierenden Zuständen (Myers & Oas, 2002). In Tabelle 1 sind die wesentlichen Modellvorstellungen zusammengefaßt.

Nukleationen stellen die initialen Faltungsschritte der Polypeptidkette dar, die auch als hydrophober Kollaps (*hydrophobic collapse*) bezeichnet werden. Die meisten Modelle gehen von einer Vielzahl nicht-nativer Konformationen der Polypeptidkette aus, deren Verteilung im Verlaufe des Faltungsprozesses abnimmt (Entropieabnahme), während die Verteilung nativähnlicher Konformationen in der Zeiteinheit zunimmt.