

6. FALTUNG UND STABILITÄT GLOBULÄRER EINDOMÄNENPROTEINE

6.1. Allgemeine Erkenntnisse

Die Aufklärung des Faltungsweges eines Proteins umfaßt die komplette Beschreibung des Ausgangs- (entfaltet) und Endzustandes (gefaltet) und die während des Prozesses auftretenden Intermediate in struktureller bzw. energetischer Beziehung zueinander (Fersht, 1999; Mayor *et al.*, 2003; Mayor *et al.*, 2000). Als einfache Modellproteine für experimentelle und auch theoretische Studien sind Eindomänenproteine (*small single-chain proteins, one-domain proteins*) und mittels *protein engineering* erzeugte Varianten als Standards etabliert worden (siehe Kapitel 2), woraus ein großer experimenteller Datensatz von Parametern zu deren Stabilität und Faltung resultiert (Pfeil, 1998; Pfeil, 2001). Viele Vorstellungen über Determinanten und Modelle des Faltungsprozesses von Proteinen sind aus diesen Daten abgeleitet worden (siehe Kapitel 3). Es wird für die Suche nach diesen Determinanten generell angestrebt, die Systeme der Untersuchungen so einfach wie möglich zu gestalten, daher Modellproteine zu verwenden, die nach einem ‚idealen‘ Zweizustandsmodell falten. Disulfidbrücken oder Prolylbindungen haben oft die Bildung von Intermediaten zu Folge. Eindomänenproteine falten daher nach einer Zweizustands- (*two-state kinetics*) oder Dreizustands-Kinetik (*three-state kinetics*), wobei in Abhängigkeit der Bedingungen Übergänge möglich sind. Eine Übersicht thermodynamischer und kinetischer Daten zur Faltung etablierter Eindomänenproteine wurde von JACKSON publiziert (Jackson, 1998). Die Heterogenität der experimentellen Daten läßt aber auch hier noch keine Erkenntnis nach einem ‚generellen Trend‘ oder ursächlichen Determinanten zu, ausgenommen die Erkenntnis der hierarchischen Natur des Faltungsprozesses (Jaenicke & Seckler, 1999).

6.2. Barstar

Barstar ist der intrazelluläre Inhibitor der extrazellulären Ribonuklease Barnase aus *Bacillus amyloliquefaciens* (Hartley, 1989). Barstar besteht aus 89 Aminosäuren und ist ein Eindomänenprotein. Er enthält zwei Cysteine (Cys42 und Cys80), die in der aktiven, inhibitorischen Funktion auf Barnase in reduzierter Form vorliegen. Barnase ist rekombinant in *Escherichia coli* als prokaryontischem *host*-Organismus nur durch Coexpression mit Barstar zu produzieren (Hartley, 1988). Die Variante C40A/C82A

von Barstar repräsentiert ein permanent reduziertes und aktives Protein und wurde ursächlich als *pseudo*-Wildtyp* bezeichnet (Schreiber & Fersht, 1993b).

Um Klarheit in der Bezeichnung zu gewährleisten wird die Variante Barstar C40A/C82A (doppelte Mutation) im folgenden Text als *pseudo*-Wildtyp* bezeichnet.

Die Variante Barstar C40A/C82A/P27A (dreifache Mutation) wird im folgenden Text, wie in der Literatur etabliert, als *pseudo*-Wildtyp bezeichnet (Nölting *et al.*, 1995). Auf dessen Grundlage wurden weitere Varianten durch *protein engineering* hergestellt. Untersuchungen zur Faltung dieser Proteine sind Inhalt der in der Habilitationsschrift vorgestellten experimentellen Arbeiten.

Es wurden die Röntgenkristallstruktur dieses Proteins in isolierter Form und im Komplex mit Barnase (Buckle *et al.*, 1994), sowie die Lösungsstruktur durch NMR-Spektroskopie bestimmt (Lubienski *et al.*, 1994). Der PDB-code ist 1BTA. Das Protein enthält zwei Proline, wobei Pro27 in *trans*-Konformation und Pro48 in *cis*-Konformation im nativen Zustand vorliegen. Barstar ist ein α/β -Protein der nachfolgenden Anordnung der Elemente der Sekundärstruktur.

Met0 → β -Faltblatt 1 (Lys1 bis Asn6) → Schleife 1 → α -Helix 1 (Ser14 bis Ala25) → Schleife 2 (enthält Pro27) → α -Helix 2 (Asn33 bis Gly43, enthält Trp38) → Schleife 3 (enthält Trp44, Tyr47 und Pro48) → β -Faltblatt 2 (Leu49 bis Arg54, enthält Trp53) → Schleife 4 → α -Helix 3 (Gln55 bis Thr63) → Schleife 5 → α -Helix 4 (Glu68 bis Gly81) → Schleife 6 → β -Faltblatt 3 (Asp83 bis Ser89)

Der Prozeß der Faltung ist durch Änderungen der intrinsischen Fluoreszenz der Tryptophanreste (blau) detektierbar. Im nativen Zustand liegt Pro27 in *trans*-Konformation, Pro48 in *cis*-Konformation vor. Die Prolinreste und dazugehörige Strukturelemente von Barstar sind rot gekennzeichnet.

Die Wechselwirkung von Pro27 (alicyclischer Ring) mit Trp38 (aromatischer Ring) führt zu einer Aufweitung der C-terminalen Schleife der α -Helix 2 (Lubienski *et al.*, 1994).

Barstar *pseudo*-Wildtyp* kann rekombinant durch heterologe Genexpression in *Escherichia coli* als prokaryontischem *host*-Organismus produziert werden (Hartley, 1988; Schreiber & Fersht, 1993b). Das rekombinant gewonnene und durch Chromatographie gereinigte Protein enthält N-terminal einen Methioninrest (Met0), der durch die Methionyl-aminopeptidase von *Escherichia coli* proteolytisch nicht gespalten wird, da das folgende Lys1 eine basische Aminosäure ist. Das Expressionsprodukt wurde seinerzeit nicht durch N-terminale Sequenzierung und MALDI-MS analysiert, so daß die veröffentlichten Strukturen diesbezüglich inkorrekt sind (Guillet *et al.*, 1993). Die Hemmwirkung des rekombinant hergestellten Proteins

auf Barnase konnte eindeutig gezeigt werden, Met0 erzeugt keine strukturelle Perturbation (Mossakowska *et al.*, 1989).

Die Struktur des *pseudo*-Wildtyps* entspricht im wesentlichen der des reduzierten Wildtyps von Barstar, Unterschiede werden in der Dynamik des Peptidrückgrates für die Variante Barstar C82A aus NMR-Messungen beschrieben (Ratnaparkhi *et al.*, 1998). Die Wechselwirkung von Barstar und Barnase ist vorwiegend elektrostatischer Natur, wobei im äquimolaren Komplex negativ geladene Aminosäurereste von Helix 2 und Schleife 2 von Barstar in der positiv geladenen Bindungstasche von Barnase binden (Buckle *et al.*, 1994). Die individuellen Energiebeiträge der an dieser Wechselwirkung beteiligten Aminosäuren wurden durch thermodynamische (ITC) und kinetische (Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation) Messungen in Kombination mit *protein engineering* ermittelt (Frisch *et al.*, 1997; Schreiber & Fersht, 1993a; Schreiber & Fersht, 1995). Die Wechselwirkung von Barstar und Barnase sind als ein Modellsystem für Proteinwechselwirkungen (*protein-protein interaction*) und Proteinerkennung (*protein recognition*) etabliert (Schreiber & Fersht, 1996).

Die thermodynamischen Stabilitäten des Wildtyps (Agashe & Udgaonkar, 1995) und *pseudo*-Wildtyps* (Martinez *et al.*, 1995) von Barstar wurden durch thermische Denaturierung gemessen. Der von AGASHE *et al.* publizierte thermodynamische Parameter $\Delta C_p = 1460 \pm 70 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ für den Wildtyp ist relativ klein. Die Auswertung der thermodynamischen Parameter auf der Basis einer linearen freien Enthalpiebeziehung (LFE) ergab eine Wechselwirkung des Denaturans mit der Polypeptidkette im entfalteten Zustand, daher ändert sich die Wärmekapazität ΔC_p in Abhängigkeit von der Konzentration des Denaturans. Für GuHCl beträgt dieser Wert $\Delta C_{pi} = 53 \pm 36 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Agashe & Udgaonkar, 1995). Barstar zeigt in Gegenwart von Denaturanzien *cold unfolding* bei Temperaturen $T > 273 \text{ K}$ (Agashe & Udgaonkar, 1995). Verlässlichere Datensätze für Barstar Wildtyp und die Variante C82A wurden von SCHÖPPE *et al.* publiziert (Schöppe *et al.*, 1997), die zudem die globale Anwendung des Zweizustandsmodells validieren. Barstar erfährt durch eine höhere Ionenstärke des Lösungsmittels eine thermodynamische Stabilisierung (Wintrode *et al.*, 1995).

Die Untersuchungen zur Thermodynamik und Kinetik der Faltung und Entfaltung von Barstar (und Varianten) sind sehr umfangreich und ergeben ein relativ

komplexes Bild. Experimentell wurden die Datensätze durch chemische Denaturierung mit Denaturanzien gemessen, wobei für den Wildtyp vorwiegend Guanidiniumchlorid (GuHCl), für den *pseudo*-Wildtyp* Harnstoff zur Anwendung kamen. Durch die oben genannte Stabilisierung des nativen Zustandes durch eine höhere Ionenstärke des Lösungsmittels wird die Verwendung von Harnstoff als Denaturans bevorzugt. Die Transitionen der Gleichgewichtsentfaltung (Fern-UV Circular dichroismus und intrinsische Fluoreszenz) wurden nach einem Zweizustandsmodell ausgewertet und ergaben für beide Proteine moderate thermodynamische Stabilitäten um $4,9 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Tabelle 3).

Die Faltungskinetik von Barstar kann aus Änderungen struktureller Parameter nach Konzentrationsänderungen von Denaturanzien gemessen werden, wobei diese Konzentrations sprünge methodisch in den Transitionsbereich, den *post*- und *prä*-Transitionsbereich erfolgen (Schmid, 1992). Durch die Präsenz von zwei Prolinresten unterschiedlicher Konformation im nativen Zustand ist für Barstar als Eindomänenprotein eine Dreizustands-Kinetik als Minimalmodell zu erwarten. Die mittels *stopped-flow*-Technik gemessenen Progresskurven zeigen im Transitionsbereich der Gleichgewichtsentfaltung einen zweiphasigen Verlauf, wobei sich die zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten um mehr als zwei Größenordnungen unterscheiden (Schreiber & Fersht, 1993b; Shastry *et al.*, 1994). Das Auftreten langsamer Faltungsphasen ist oft durch die Isomerisierung essentieller Prolybindungen bedingt und Ausdruck der Kopplung von Konformationsfaltung und Prolylisomerisierung eines Proteins (siehe Kapitel 4.3). Durch die Methode des Doppelsprungs konnte eine Prolylisomerisierung im entfalteten Zustand (Bildung von U_f und U_s) und in einem nativ-ähnlichen Intermediat I_N nachgewiesen werden (Schreiber & Fersht, 1993b; Shastry *et al.*, 1994). Da in Barstar *pseudo*-Wildtyp* die optischen Eigenschaften des nativen Zustandes und des nativ-ähnlichen Intermediates gleich sind, wurde die Stabilität von I_N aus der Auswertung kinetischer Amplituden bestimmt. Der originäre Ursprung der langsamen Phase der Faltungskinetik von Barstar aus einer Prolylisomerisierung wurde zusätzlich durch deren Beschleunigung durch Cyp18 nachgewiesen (Schreiber & Fersht, 1993b). Die Auswertung der kinetischen Daten führte zu einem ersten Modell (Schema 1) der Faltung von Barstar *pseudo*-Wildtyp*, wobei die Berücksichtigung thermodynamischer Stabilitäten die Population weiterer Intermediate (Schema 3) vermuten ließ (Schreiber & Fersht, 1993b). Eine Zusammenfassung

thermodynamischer und kinetischer Daten zur Faltung von Barstar Wildtyp und Barstar *pseudo*-Wildtyp* enthält Tabelle 3.

Das aus diesen experimentellen Daten in den Schemata 2 und 3 vorgeschlagene Modell ist insofern inkorrekt, als die langsame Phase der Faltung nur der Prolylisomerisierung von Tyr47-(*trans*)Pro48 des nativ-ähnlichen Intermediates in die native *cis*-Konformation zugeschrieben wird (Schreiber & Fersht, 1993b). Auch für die native Peptidbindung von Leu26-(*trans*)Pro27 stellt sich im entfalteten Zustand ein Gleichgewicht der Rotamere ein, so daß vier Spezies zu berücksichtigen sind (U_{27cis}^{48cis} , $U_{27trans}^{48cis}$, $U_{27trans}^{48trans}$, $U_{27cis}^{48trans}$). Ausgehend von im Gleichgewicht entfaltetem Barstar *pseudo*-Wildtyp* ergaben eine Wiederholung der Messungen des Einflusses von Cyp18 auf die langsame Phase der Faltung einen Hinweis auf die Ausbildung eines zweiten nativ-ähnlichen Intermediates. Die Amplitude dieser Phase wird nur zu etwa 60 % durch die enzymatische Aktivität dieser PPlase beschleunigt, 40 % der Amplitude sind unbeeinflusst. Die enzymatisch unbeeinflusste langsame Phase setzt sich daher aus zwei parallel ablaufenden Prozessen mit ähnlicher Geschwindigkeitskonstante zusammen.

Das Modell der Faltung von Barstar *pseudo*-Wildtyp* ist in Schema 1 (Dreizustandsmodell) und in Schema 2 dargestellt (Anhang). Es berücksichtigt die Bildung eines nativ-ähnlichen Intermediates nur für die Bindung Tyr47-Pro48 in *trans*-Konformation.

Der Vergleich der gemessenen und aus thermodynamischen Beziehungen berechneten mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten der Prolylisomerisierung bei der Konversion der entfalteten Spezies ($U_f \rightarrow U_s, U_s \rightarrow U_f$) und der nativen bzw. nativ-ähnlichen Spezies ($I_N \rightarrow N, N \rightarrow I_N$) von Barstar Wildtyp und Barstar *pseudo*-Wildtyp* zeigt fast gleiche Werte (Tabelle 3). Die Geschwindigkeitskonstanten der Konversion von Rotameren der Prolylbindung in einem intermediären Zustand der Faltung eines Proteins können sich durch konformationelle Zwänge schon gefalteter Strukturelemente (*long-range*-, *short-range*- Wechselwirkungen) zum Teil erheblich von denen freier Polypeptidketten unterscheiden (Reimer & Fischer, 2002).

Viele Publikationen der Gruppe um UDGAONKAR haben experimentelle Untersuchungen zu dynamischen Aspekten der Struktur und zum Faltungsweg von Barstar Wildtyp zum Inhalt. Im Rahmen der Habilitationsschrift soll nur auf diejenigen Aspekte dieser Publikationen eingegangen werden, die für die eigene

wissenschaftliche Arbeit wesentlich waren. Der β_T -Wert für die Faltung von Barstar *pseudo*-Wildtyp*, berechnet für die Hauptfaltungsphase aus dem *chevron*-Plot, beträgt 0,87 (Jackson, 1998). Der Übergangszustand der Reaktion ähnelt strukturell dem nativen Zustand. Die Strukturkonsolidierung während der Faltung von Barstar Wildtyp ist kinetisch mit Fern-UV Circular dichroismus (Sekundärstruktur), Nah-UV Circular dichroismus und intrinsischer Fluoreszenz (Tertiärstruktur) und durch die Bindung von ANS (Detektion hydrophober Oberflächen) untersucht worden, wobei mittels *stopped-flow*-Techniken die Detektion früher Intermediate gelang (Shastry & Udgaonkar, 1995). Die Faltung von Barstar Wildtyp beginnt mit einem hydrophoben Kollaps innerhalb der ersten 4 ms nach Initiation der Faltung vor der Bildung von Elementen der Sekundärstruktur (Agashe *et al.*, 1995). Der hydrophobe Kern (*hydrophobic core*) von Barstar Wildtyp wird durch aliphatische (Leu) und aromatische Aminosäuren (aromatischer Cluster Phe56, Phe74, Trp53; Abbildung 4) gebildet (Nölting *et al.*, 1997a; Wong & Daggett, 1998). Der Hauptfaltungsweg des Proteins verläuft neben $U_f \rightarrow I \rightarrow N$ nach der Sequenz $U_s \rightarrow I_{M1} \rightarrow I_{S1} \rightarrow I_N \rightarrow N$ (Shastry & Udgaonkar, 1995). Das Intermediat I_{M1} repräsentiert ein ‚strukturloses‘ kugelartiges Molekül mit unspezifischen hydrophoben Kontakten und keiner optisch aktiven Sekundärstruktur. Die Bindung von ANS ist möglich, aber nicht kooperativ. Das folgende Intermediat I_{S1} ist ein *molten-globule*-ähnliches Intermediat. Es wird durch produktive hydrophobe Kontakte stabilisiert, enthält partielle Elemente der Sekundär- und Tertiärstruktur und bindet ANS. Das nativ-ähnliche Intermediat I_N unterscheidet sich in der generellen Strukturkonsolidierung vom nativen Zustand nur durch die *trans*-Konformation der Prolylbindung Tyr47-Pro48. Während des Faltungsweges auftretende Intermediate haben eine unterschiedliche thermodynamische Stabilität und werden abhängig von der Konzentration des Denaturans in unterschiedlichem Ausmaß (partielle Konzentrationen) populiert. Kinetische Messungen zeigten sowohl einen zweiten, parallel auftretenden Weg der Faltung nach $U_s \rightarrow I_{M2} \rightarrow I_{S2} \rightarrow N$ (Bhuyan & Udgaonkar, 1999; Rami & Udgaonkar, 2001; Shastry & Udgaonkar, 1995), als auch der Entfaltung von Barstar Wildtyp (Agashe *et al.*, 1997; Sridevi & Udgaonkar, 2002). Das Auftreten multipler Intermediate und Übergangszustände bei der Entfaltung des Proteins wurde eindrucksvoll durch Amplitudenauswertungen der bei unterschiedlichen Temperaturen gemessenen Kinetiken und thermodynamischen Stabilitäten des Wildtyps im Vergleich mit einer durch *protein engineering* verfügbaren doppelt

mutierten Variante W38F/W44F gezeigt (Zaidi *et al.*, 1997). Diese Variante hat eine mit dem Wildtyp vergleichbare thermodynamische Stabilität, enthält jedoch nur Trp53 im hydrophoben Kern (nicht austauschbar durch andere kanonische Aminosäuren) als optische Sonde der intrinsischen Fluoreszenz. Der Strukturverlust bei der Entfaltung von Barstar erfolgt in Umkehrung der Faltung stufenweise (*incrementally*) nach dem Prinzip der mikroskopischen Reversibilität. Nach einer kürzlich erschienenen Publikation allerdings ist ein Vergleich der Ergebnisse der Faltungskinetiken der doppelt mutierten Variante mit denen des Wildtyps unsicher (Sridevi *et al.*, 2004).