

## **Determinanten der Proteinstabilität am Beispiel von Barstar**

Prof. Dr. Renate Ulbrich-Hofmann, Dipl.-Biochem. Hagen Hofmann

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie und Biotechnologie,  
06099 Halle

### **Abstract**

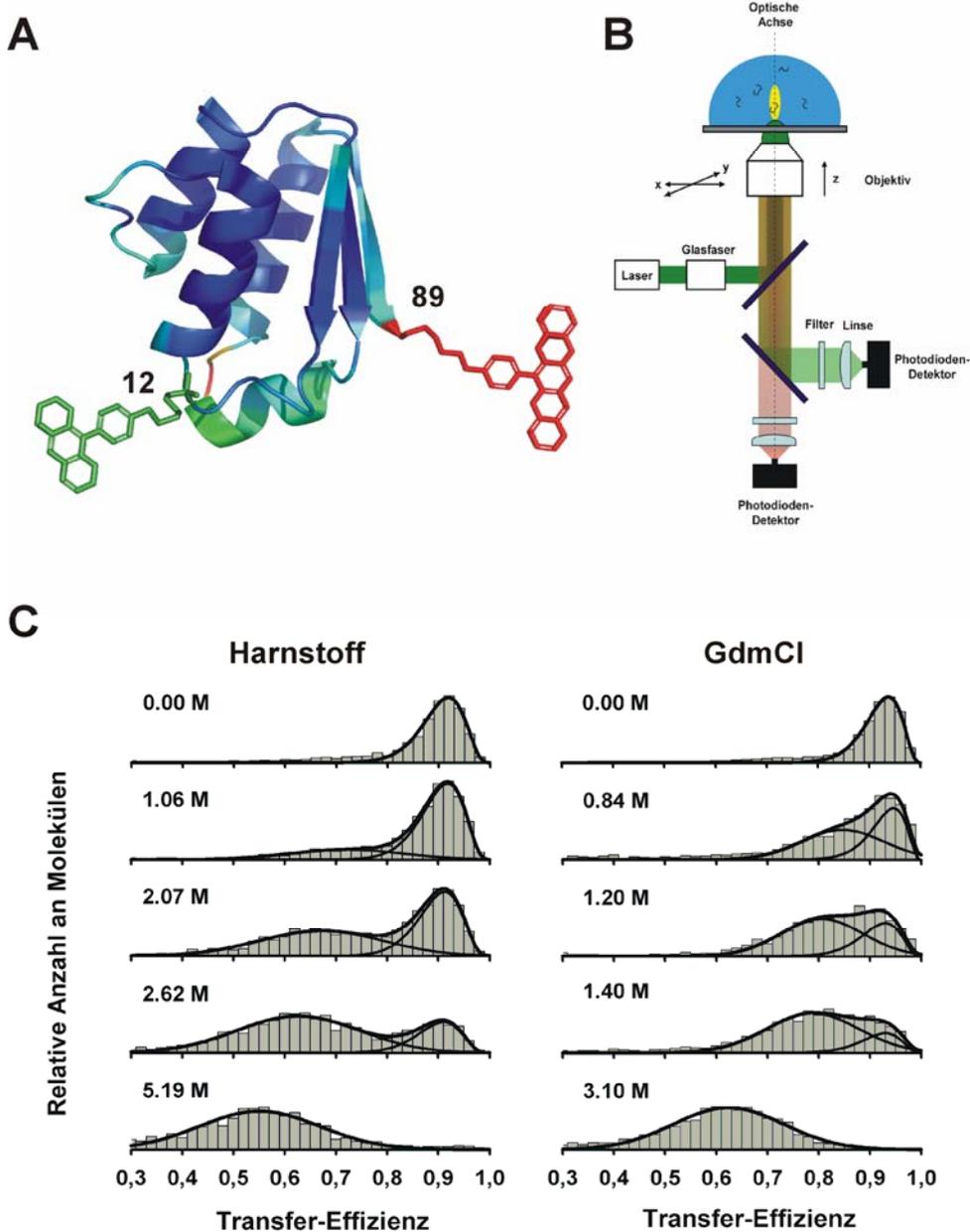
Für die Entwicklung von Methoden zur Stabilisierung von Proteinen ist das genaue Verständnis ihrer Faltungs- bzw. Entfaltungsvorgänge erforderlich. In der vorliegenden Arbeit gelang es für das Modellprotein Barstar mittels Einzelmolekülspektroskopie, gekoppelt mit Fluoreszenzenergietransfer, sowie mittels NMR-Spektroskopie, gekoppelt mit Amidprotonen-Austauschreaktionen, initiale Ereignisse der Faltung bzw. Entfaltung des Proteins zu charakterisieren.

## **Einleitung**

Die biologische Aktivität von Proteinen - wie beispielsweise die katalytische Aktivität von Enzymen – ist an ihre hochgeordnete Raumstruktur gebunden. Diese spezifische Konformation, die jedoch nicht starr ist, sondern für ihre Funktion auch eine bestimmte Flexibilität benötigt, ist im Allgemeinen nur unter Bedingungen stabil, die der natürlichen Umgebung des Proteins entsprechen. In früheren Arbeiten konnten wir zeigen, dass die verschiedenen Regionen der Raumstruktur des Proteins (wie z.B. Loopregionen) unterschiedliche Bedeutung für den Faltungs- bzw. Entfaltungsprozess eines Proteins und damit für seine Stabilität besitzen [1-6]. Während in diesen Studien gezielte chemische und gentechnische Modifizierungen der Proteinstruktur mit der Methode der limitierten Proteolyse [7] sowie konventionellen spektroskopischen Techniken [8, 9] gekoppelt wurden, orientierten die Arbeiten des vorliegenden Vorhabens auf neue Erkenntnisse zur Proteinstabilität, die mittels Einzelmolekülspektroskopie sowie mittels neuer NMR-Techniken zugänglich sind. Mit Einzelmolekülspektroskopie sollte es gelingen, Faltungszustände eines einzelnen Moleküls unter verschiedenen denaturierenden Bedingungen zu charakterisieren und miteinander zu vergleichen, während NMR-Messungen zur Verfolgung von Amidprotonen-Austausch-Reaktionen die Analyse von Entfaltungsreaktionen auf atomarer Ebene erlauben. Als Modellsystem für diese Untersuchungen wurde eine bereits gut charakterisierte und in der Literatur als Pseudowildtyp (pWT) bekannte Variante des Barstar (10,2 kDa), dem Inhibitor der Ribonuclease aus *B. amyloliquefaciens* [10], verwendet.

## **Charakterisierung der Proteinfaltung mittels Einzelmolekülspektroskopie**

Zur Charakterisierung der Faltung von Barstar unter verschiedenen denaturierenden Bedingungen auf Einzelmolekülebene wurden in die Variante pWT zwei Cysteinreste (S12C/S89C) eingeführt. Mit den Farbstoffen Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 594 erfolgte eine spezifische Fluoreszenzmarkierung an den Aminosäurepositionen 12 und 89 (Abb. 1 A), die aufgrund des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) Abstandsbestimmungen auf molekularer Ebene ermöglicht. Die FRET-gekoppelten

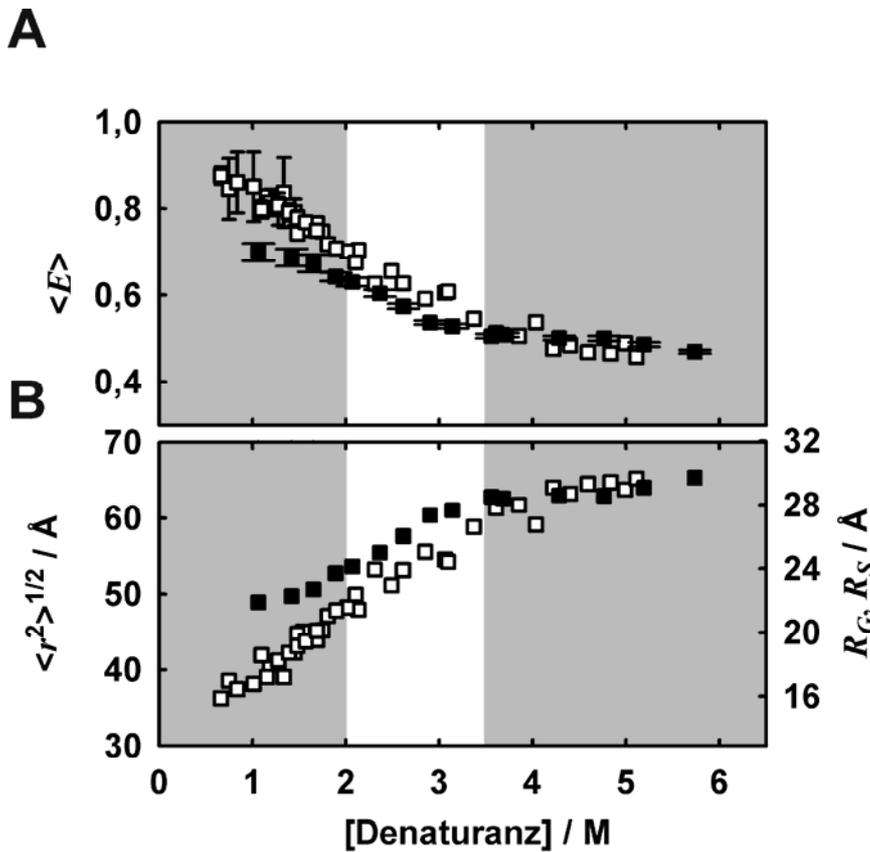
**Abbildung 1**

- (A) Raumstruktur von Barstar (pdb-Datei 1bta) mit schematisch eingezeichneten Farbstoffmolekülen.
- (B) Darstellung des in dieser Arbeit verwendeten Konfokal-Mikroskops zur Detektion von FRET im Einzelmolekülmaßstab
- (C) FRET-Histogramme bei verschiedenen Harnstoff- und GdmCl-Konzentrationen. in 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 8, 25°C.

Einzelmolekülmessungen an einem Konfokal-Mikroskop (Abb. 1B) (ausgeführt in Kooperation mit Prof. Dr. Ch. Hübner im Institut für Physik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) erlaubten eine Separation von nativen Molekülen (hohe

Transfer-Effizienz) und entfalteten Molekülen (niedrige Transfer-Effizienz) der markierten Variante (pWT<sub>SS</sub><sup>DA</sup>) bei verschiedenen Konzentrationen an Denaturanzien wie Harnstoff und Guanidiniumchlorid (GdmCl) (Abb. 1C). Auf diese Weise gelang es, entfaltete Proteinmoleküle unter nativ-ähnlichen Bedingungen zu charakterisieren. Wie Abb. 2A zeigt, steigt die Transfer-Effizienz ( $\langle E \rangle$ ) in den entfalteten Barstar-Molekülen mit sinkenden Konzentrationen an Harnstoff und GdmCl. Entsprechend sinkt der daraus berechnete Gyrationradius von entfaltetem pWT<sub>SS</sub><sup>DA</sup> (Abb. 2B). Der Verlauf dieser Abnahme ist jedoch in den beiden Denaturanzien Harnstoff und GdmCl verschieden. Während bei hohen Denaturanzkonzentrationen identische Gyrationradien von 28 Å erreicht werden, divergieren die Gyrationradien mit sinkenden Harnstoff- und GdmCl-Konzentrationen (Abb. 2B). Die Diskrepanz zwischen den Gyrationradien bei geringen Denaturanzkonzentrationen, die bei Extrapolation zu unterschiedlichen Werten in Abwesenheit von Denaturanz führt, wurde darauf zurückgeführt, dass GdmCl, im Gegensatz zu Harnstoff, ein Salz ist. Während GdmCl bevorzugt Wasserstoffbrücken zu negativ geladenen Aminosäuren ausbildet und zudem als Salz die intrinsischen Ladungen der Polypeptidkette abschirmen sollte (Barstar besitzt eine Nettoladung von -8 unter den gegebenen Bedingungen), ist Harnstoff zwar ein polares, insgesamt jedoch neutrales Denaturanz, das elektrostatische Interaktionen nicht beeinflusst [11]. Folglich ist anzunehmen, dass die elektrostatischen Abstoßungen innerhalb der Polypeptidkette bei geringen Harnstoffkonzentrationen eine weitere Abnahme des Gyrationradius verhindern. Im Gegensatz dazu kommen diese abstoßenden Kräfte in GdmCl nicht zum Tragen. Der Gyrationradius des entfalteten Proteins ist deshalb geringer. Zusätzliche Experimente konnten diese These bestätigen. Es konnte gezeigt werden, dass sich die elektrostatischen Abstoßungen bei geringen Harnstoffkonzentrationen durch Zusatz von KCl unterdrücken lassen, was sich in der Abnahme des Gyrationradius mit steigender KCl-Konzentration niederschlägt. Eine Berechnung der elektrostatischen Energie innerhalb der entfalteten Polypeptidkette, basierend auf einem einfachen Modell des entfalteten Zustandes [12], ermöglichte eine Abschätzung der Coulomb-Energie unter nativen Bedingungen. Bei 0 M Denaturanz und einer Ionenstärke von 0,11 M sollten im entfalteten Zustand von pWT<sub>SS</sub><sup>DA</sup> Coulomb-Kräfte vom 1,4 fachen der Raumtemperaturenergie (3,5 kJ mol<sup>-1</sup>) vorliegen. Die berechneten Coulomb-Energien und ihre Änderung als Funktion der Denaturanzkonzentration legen nahe, dass die zur

Bestimmung der Stabilität eines Proteins häufig genutzte lineare Extrapolationsmethode nur in gewissen Grenzen Gültigkeit besitzt. Eine nichtlineare Abhängigkeit der freien Reaktionsenthalpie der Entfaltung von der GdmCl-Konzentration konnte auch experimentell nachgewiesen werden.

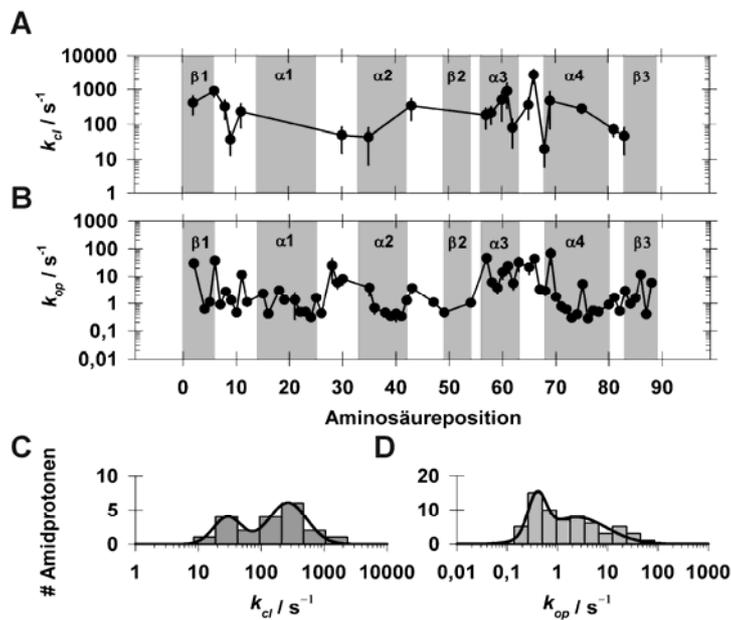


**Abbildung 2**

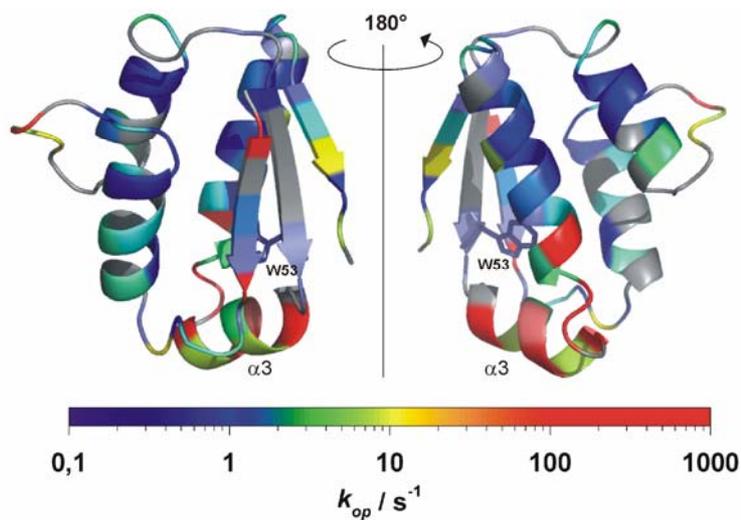
- (A) Effekt der Denaturanzkonzentration auf die korrigierte mittlere Transfer-Effizienz ( $\langle E \rangle$ )  
 (B) Effekt der Denaturanzkonzentration auf die Dimensionen der Polypeptidkette ( $\langle r^2 \rangle^{1/2}$ : Quadratwurzel des mittleren Abstands der Farbstoffmoleküle;  $R_G$ : Gyrationradius;  $R_S$ : Stokes-Radius)  
 Weiße Symbole: GdmCl; schwarze Symbole: Harnstoff.

### Charakterisierung der Proteinentfaltung mittels NMR-Messungen des Amidprotonen-Austauschs

Kinetische Experimente mittels *stopped-flow*-Fluoreszenzspektroskopie zeigten, dass die Entfaltung von Barstar-pWT über ein partiell entfaltetes Intermediat verläuft. Mittels

**Abbildung 3**

- (A) Geschwindigkeitskonstanten der Schließreaktion ( $k_{cl}$ ) für 20 Amidprotonen von Barstar-pWT  
 (B) Geschwindigkeitskonstanten der Öffnungsreaktion ( $k_{op}$ ) für 64 Amidprotonen von Barstar-pWT  
 (C) Häufigkeitsverteilung von  $k_{cl}$   
 (D) Häufigkeitsverteilung von  $k_{op}$

**Abbildung 4**

Struktur von Barstar-WT (1bta). Die Aminosäurereste sind entsprechend der  $k_{op}$ -Werte eingefärbt. Der Tryptophanrest 53 im hydrophoben Kern und die Helix 3 ( $\alpha_3$ ) sind markiert.

einer NMR-Methode zur Verfolgung schneller Amidprotonen-Austauschreaktionen (ausgeführt in Kooperation mit Prof. Dr. J. Balbach im Institut für Physik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) konnten die Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltungsreaktion (Öffnungsreaktion) für 72 % und der Rückfaltungsreaktion (Schließreaktion) für 22 % der insgesamt 90 Amidprotonen bestimmt werden (Abb. 3A und B). Sie variieren jeweils im Bereich von zwei Größenordnungen. Die Häufigkeitsverteilungen für die Werte der Geschwindigkeitskonstanten sowohl der Öffnungsreaktion als auch der Schließreaktion sind bimodal (Abb. 3 C und D) und implizieren die Existenz mindestens eines Entfaltungsintermediates. Die Zuordnung der einzelnen Konstanten zu den Aminosäureresten zeigt eine Häufung der schnellen Austauschreaktionen für die Aminosäurereste in Helix 3 des Proteins (Abb. 4). Aus der Übereinstimmung der Größenordnungen der mittels Amidprotonen-Austausch bestimmten Geschwindigkeitskonstanten der Öffnungs- und Schließreaktion mit den mittels *stopped-flow*-Fluoreszenz gefundenen Geschwindigkeitskonstanten der Faltung und Entfaltung des Proteins wurde geschlussfolgert, dass Helix 3 in dem mit *stopped-flow*-Fluoreszenzspektroskopie identifizierten Intermediat entfaltet vorliegt, während der Rest des Proteins nativ-ähnlich bleibt. Aus den Daten ließ sich abschätzen, dass dieses Intermediat unter nativen Bedingungen um  $8 \text{ kJ mol}^{-1}$  gegenüber dem nativen Zustand destabilisiert ist.

### **Schlussfolgerungen**

Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren, wie es mit modernen biophysikalischen Methoden gelingt, den Prozess der Proteinfaltung bzw. -entfaltung stärker als bisher bis in den atomaren Bereich hinein zu verfolgen, um daraus spezifische Strategien zur Proteinstabilisierung abzuleiten. Aus den hier gewonnenen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Energielandschaft der Proteinfaltung zu einem Großteil von der Elektrostatik der Polypeptidkette bestimmt wird. Im Hinblick auf die Entwicklung von Methoden zur Stabilisierung von Proteinen folgt daraus eine Alternative zu bisherigen Stabilisierungsstrategien, die auf der Erhöhung elektrostatischer Abstoßungen im entfalteten Zustand, z.B. durch gezielte Einführung geladener Aminosäuren, beruht.

Die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen mittels NMR-gekoppelten Amidprotonen-Austausch weisen nach, dass diese Methode gut geeignet ist, initiale Entfaltungsereignisse im Proteinmolekül zu lokalisieren. Damit ist eine weitere Basis für gezielte chemische oder gentechnische Modifizierungen zur Proteinstabilisierung gegeben.

### Literatur

- [1] Ulbrich-Hofmann, R., Arnold, U. and Mansfeld, J. (1999) The concept of the unfolding region for approaching the mechanisms of enzyme stabilization. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 7, 125-131.
- [2] Arnold, U. and Ulbrich-Hofmann, R. (1997) Kinetic and thermodynamic thermal stabilities of ribonuclease A and ribonuclease B. *Biochemistry* 36, 2166-2172.
- [3] Arnold, U., Schierhorn, A. and Ulbrich-Hofmann, R. (1999) Modification of the unfolding region in bovine pancreatic ribonuclease and its influence on the thermal stability and proteolytic fragmentation. *Eur. J. Biochem.* 259, 470-475 (1999).
- [4] Arnold, U., Hinderaker, M. P., Köditz, J., Golbik, R., Ulbrich-Hofmann, R. and Raines, R. T. (2003) Protein Prothesis: A Nonnatural residue accelerates folding and increases stability. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 7500-7501
- [5] Mansfeld, J., Vriend, G., Dijkstra, B. W., Veltman, O. R., van den Burg, B., Venema, G., Ulbrich-Hofmann, R. and Eijsink, V. G. H. (1997) Extreme stabilization of a thermolysin-like protease by an engineered disulfide bond. *J. Biol. Chem.* 272, 11152-11156.
- [6] Mansfeld, J., Vriend, G., Van den Burg, B., Eijsink, V. G. H. and Ulbrich-Hofmann, R. (1999) Probing the unfolding region in a thermolysin-like protease by site-specific immobilization. *Biochemistry* 38, 8240-8245.
- [7] Arnold, U., Köditz, J., Markert, Y., and Ulbrich-Hofmann, R. (2005) Local fluctuations vs. global unfolding of proteins investigated by limited proteolysis. *Biocatal. Biotransf.* 23, 159-167.
- [8] Dürrschmidt, P., Mansfeld, J., and Ulbrich-Hofmann, R. (2005) An engineered disulfide bridge mimics the effect of calcium to protect neutral protease against local unfolding. *FEBS J.* 272, 1523-1534.
- [9] Arnold, U., Schulenburg, C., Schmidt, D., and Ulbrich-Hofmann, R. (2006) Contribution of the structural peculiarities of Onconase to its high stability and folding kinetics. *Biochemistry* 45, 3580-3587
- [10] Golbik, R., Fischer, G. and Fersht, A. R. (1999) Folding of barstar C40A/C82A/P27A and catalysis of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerisation by human cytosolic cyclophilin (Cyp18). *Protein Sci.* 8, 1505-1514.

- [11] O'Brien, E.P., Dima, R.I., Brooks, B. and Thirumalai, D. (2007) Interactions between hydrophobic and ionic solutes in aqueous guanidinium chloride and urea solutions: lessons for protein denaturation mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 7346-7353.
- [12] Zhou, H.X. (2002) A Gaussian-chain model for treating residual charge-charge interactions in the unfolded state of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 3569-3574.