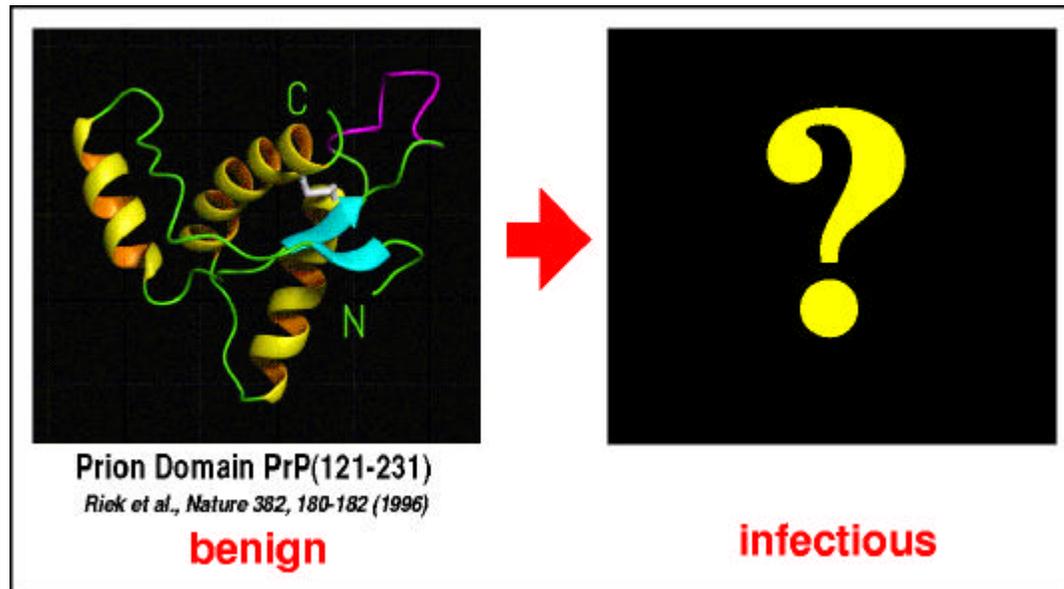


Proteine: Das Faltungsproblem

Wie findet die Faltung statt ?
Wie findet das Protein so schnell
die eine native Raumstruktur ?



Motivation

Krankheitsbekämpfung:
Fehlfaltung (=> Aggregation) führt zu
zahlreichen Krankheiten (z.B. Alzheimer,
Creutzfeld-Jacob (BSE), Huntington)

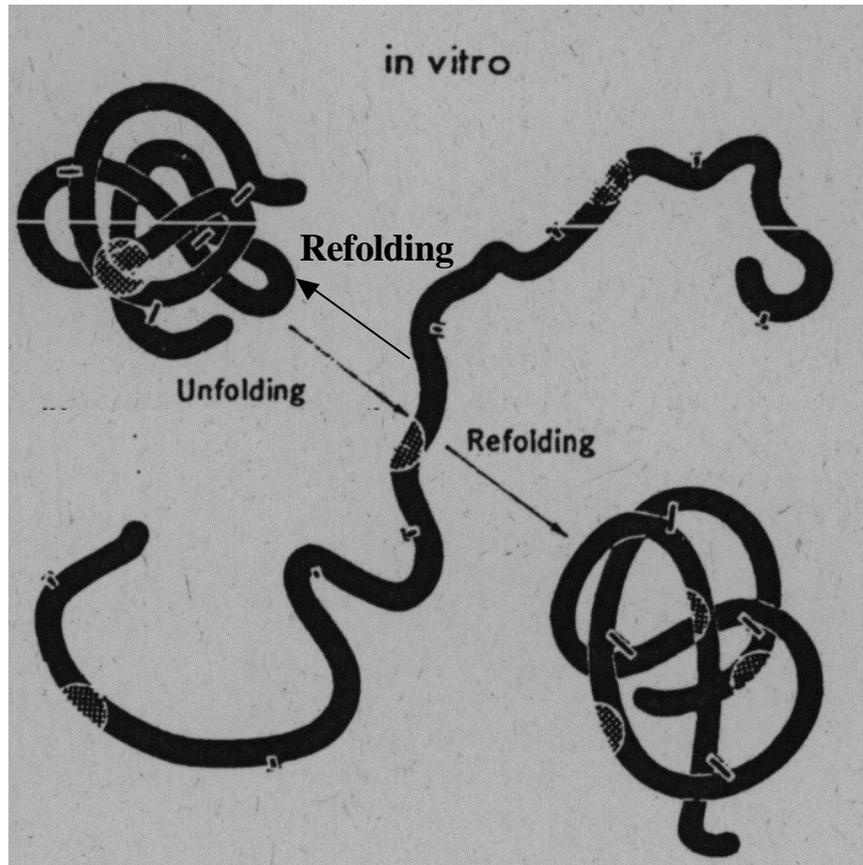
Lösung von Problemen bei Überexpression
rekombinanter Proteine („inclusion bodies“)

Erhöhung der Proteinstabilität
bei „extremen“ Bedingungen:
Biotechnologische Anwendungen
(z.B. Hitzestabilität)

Strukturvorhersagen: Die Faltung ist
das *missing link* im Informationsfluss
von der genetischen Sequenz zur
3D - Struktur und zur Funktion

Anfinsens Experimente

Ribonuclease A



Entfaltung - Rückfaltung
Reversibilität der
Proteinfaltung *in vitro*

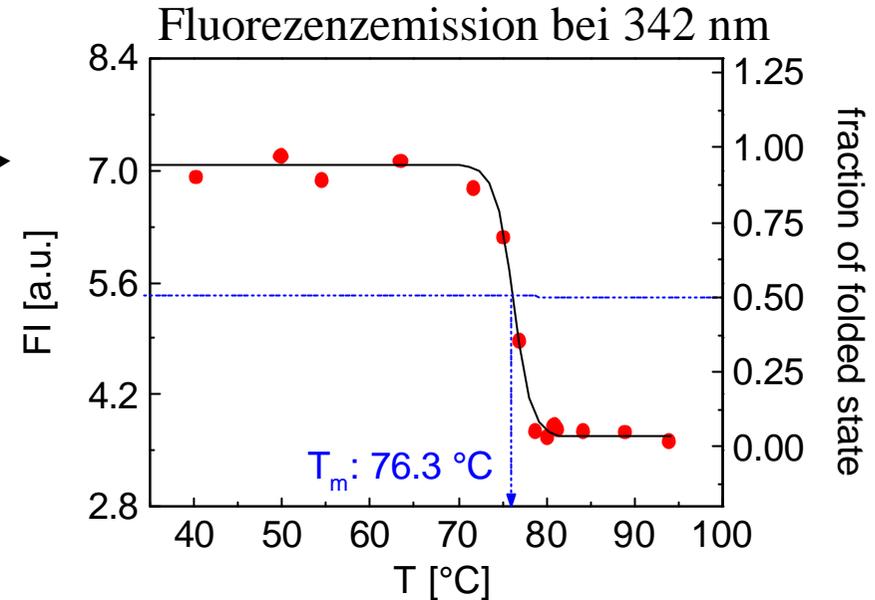
Viele Proteine falten spontan *in vitro*
ohne Hilfe anderer Proteine.

Die native Struktur ist vollständig durch
die Aminosäuresequenz
(+ Solvenseigenschaft) gegeben.

Beobachtung der Faltungsübergänge in Proteinen

Induzierte Entfaltung

- Temperatur
- pH
- Harnstoff, GdmHCl
- mechanische Kraft



Technik	Zeitbereich	Strukturparameter
Fluoreszenzspektroskopie	ns - s	Trp-, Tyr- Umgebung
CD-Spektroskopie	ns - s	sekund. Strukt.
FTIR	ns - s	sekund. Strukt.
Kalorimetrie (DSC)	min - h	globale Struktur
NMR	ms-s, μ s	ortsaufgel. Strukt.
H/D-Austausch	ms - Monate	Seitengr. Zuordnung
Kraftmikroskopie (AFM)	s	globale Struktur (Einzelmol.)

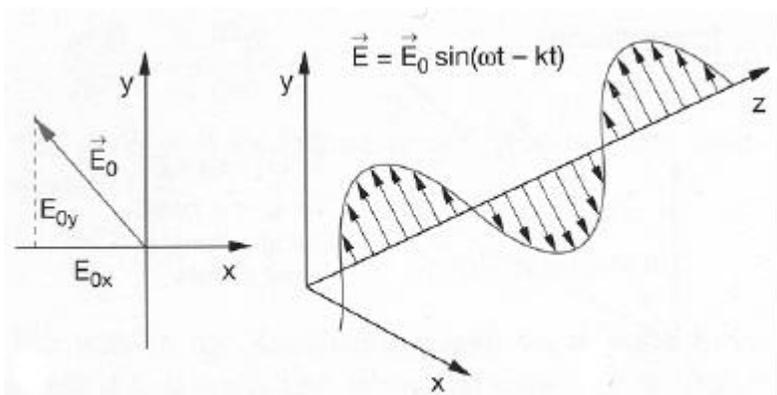
Optische Aktivität

Einige Stoffe haben bei Durchgang von linear polarisiertem Licht die Eigenschaft die Polarisationsrichtung zu ändern (\Rightarrow **optische Aktivität**). Die dabei entstehende Drehung des Lichts um den Winkel α mit

$$\mathbf{a} = \mathbf{a}_s \cdot d$$

hängt vom spezifischen Drehvermögen α_s und der Länge des Lichtweges d ab. Man unterscheidet rechtsdrehende (d; +) oder linksdrehende (l; -) Stoffe. Die Fähigkeit der Stoffe Licht zu drehen hängt mit der Symmetrie der Strukturen (Kristalle oder Moleküle) zusammen (z.B. chirale („händige“) Moleküle: Zucker).

Linear polarisiertes Licht



$$\left. \begin{aligned} E_x &= E_{0x} e^{i(\omega t - kz)} \\ E_y &= E_{0y} e^{i(\omega t - kz)} \end{aligned} \right\} \text{schwingen in Phase}$$

zirkular polarisiertes Licht

$$\begin{aligned} E_x &= E_0 e^{i(\omega t - kz)} \\ E_y &= E_0 e^{i(\omega t - kz + \pi/2)} \end{aligned}$$

elliptisch polarisiertes Licht

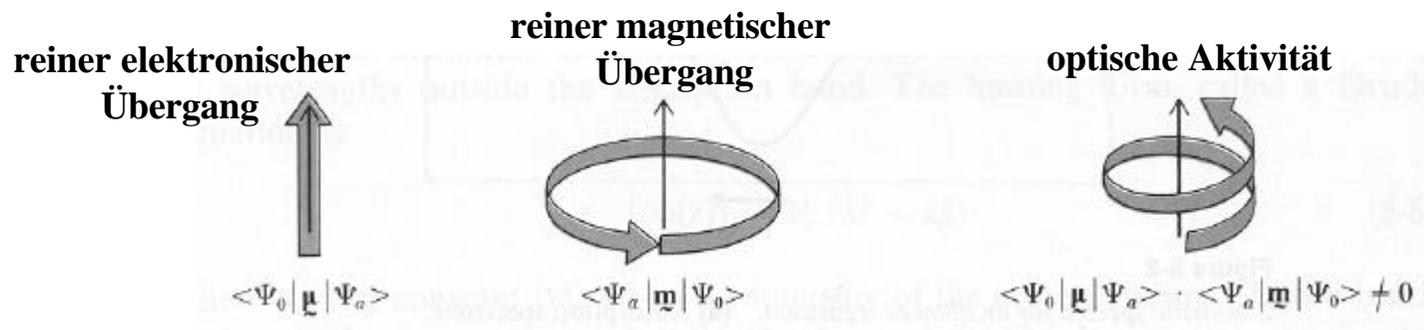
$$\begin{aligned} E_x &= E_{0x} e^{i(\omega t - kz)} \\ E_y &= E_{0y} e^{i(\omega t - kz + \pi/2)} \end{aligned} \quad \text{mit } E_{0x} \neq E_{0y}$$

Optische Aktivität

Verschiedene Strukturbestandteile von Proteinen können auch optisch aktiv sein (z.B. Helices). In der Praxis werden bei Untersuchungen an Proteinen zwei Techniken eingesetzt, die durch Messung der optischen Aktivität (bzw. der Chiralität) Informationen und Struktureigenschaften von Proteinen liefern.

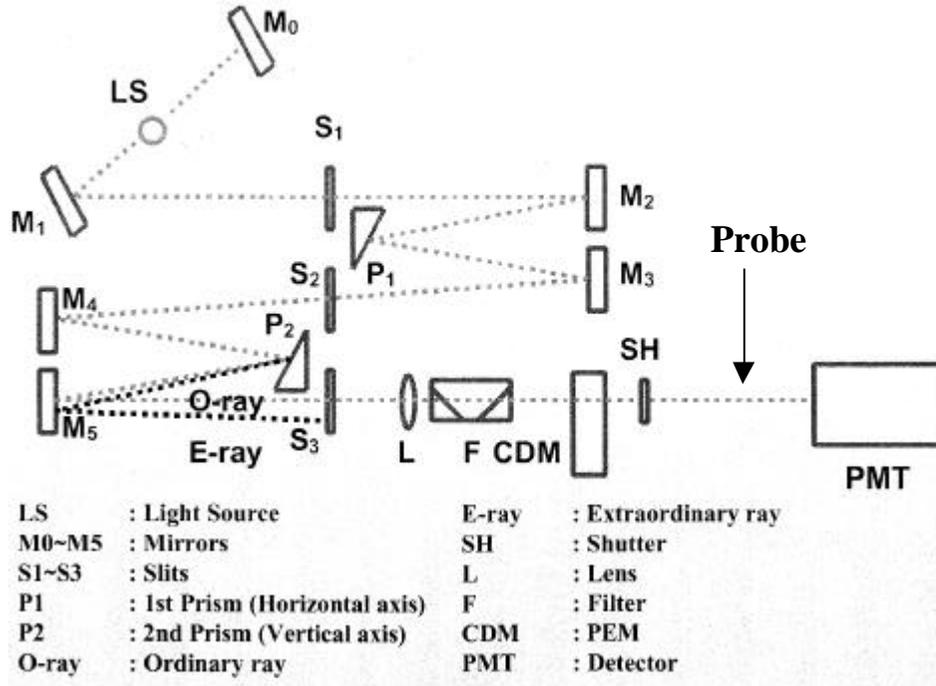
Polarimetrie / ORD (Optical Rotary Dispersion): Die Probe wird mit linear polarisiertem Licht bestrahlt und die Rotation der Polarisierungsebene wird als Funktion der Wellenlänge gemessen (=> wird seltener angewandt).

CD (Circular Dichroism): Die Probe wird mit rechts und links zirkular polarisiertem Licht bestrahlt. Dann wird der Unterschied in der Absorption zwischen beiden Polarisationsrichtungen gemessen. Deshalb muss die Absorption in der Nähe des Chiralitätszentrums relativ groß sein (z.B. π -Elektronen im Proteinrückgrad oder in Chromophoren).



CD-Spektrometrie

Schematischer Aufbau eines CD-Spektrometers (Jasco-810):



Eigenschaften des Spektrometers

- Xenon-Lichtquelle
- M₁-M₂: => linear polarisiertes Licht
- CD-Modulator: Piezoelastischer Modulator (50 kHz) linear => zirkular polarisiertes Licht

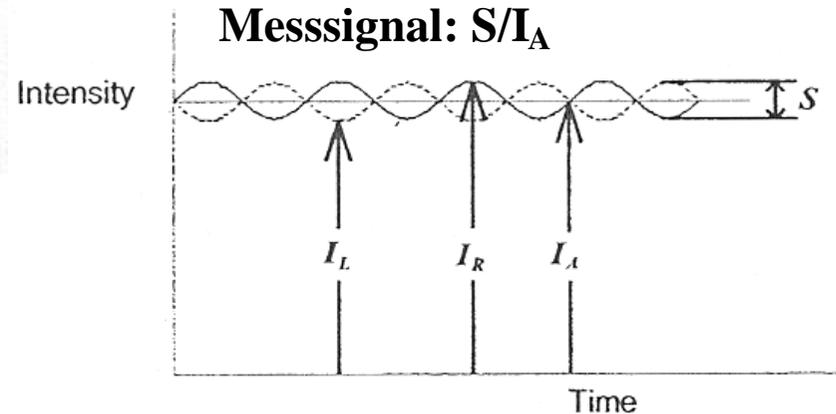
Messgrößen:

$$\Delta A = A_L - A_R$$

$$= \Theta / 32980$$

ΔA : Absorptionsänderung in [OD]

Θ : Elliptizität in [mdeg]

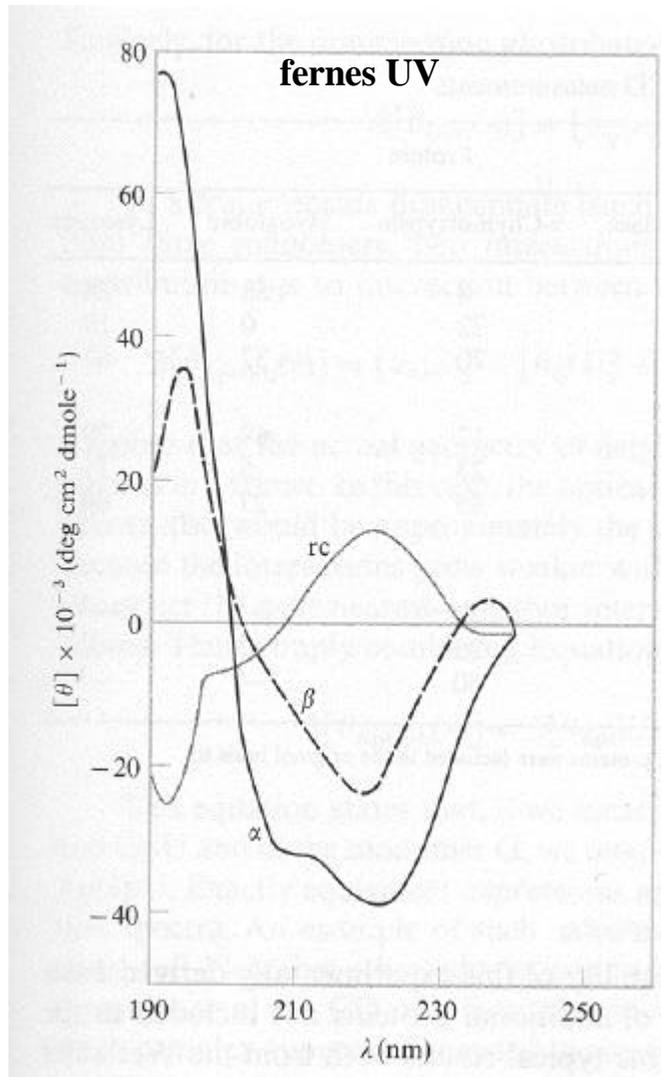


typische Werte (Beispiel):

$$\Theta = 10 \text{ mdeg} \Rightarrow \Delta A = 3.03 \cdot 10^{-4} \text{ OD}$$

CD-Spektrometrie

CD-Spektren von Proteinen



Information über Sekundärstruktur (Proteinrückgrad; Peptidbindung)

Messbereiche **fernes UV (180 –260 nm)**

- Random coil: positive Bande bei 212; negative Bande um 195
- β -Faltblatt: negative Bande bei 218 nm ($\pi \Rightarrow \pi^*$); positive Bande bei 196 nm ($n \Rightarrow \pi^*$)
- α -Helix: negative Bande bei 222 nm ($n \Rightarrow \pi^*$), bei 206 nm ($\pi \Rightarrow \pi^*$) und positiv bei 196 nm ($\pi \Rightarrow \pi^*$)

Information über Tertiärstruktur (AS-Seitengruppen: Tyr, Trp, Phe)

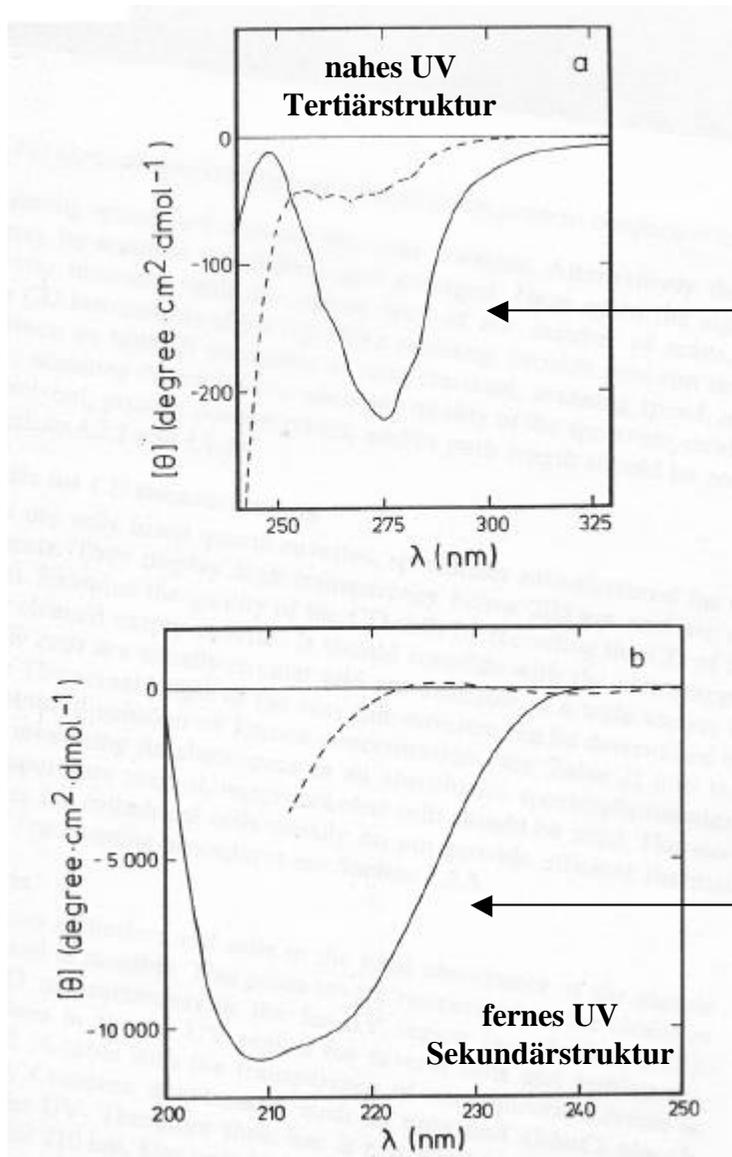
Messbereiche **nahes UV (250 –350 nm)**

Signale im Bereich der starken Absorption der Ringstrukturen (250 –300 nm)

=> siehe auch Fluoreszenzspektroskopie

CD-Spektrometrie

Untersuchung der Proteinfaltung



Beispiel: RNase: 20 °C

- durchgezogene Linie (gefaltet)
- gestrichelte Linie (entfaltet) bei 6 M GdmCl

Bereich der aromatischen Ringe und der Disulfidbrücken:
Quenching Effekte durch Auffaltung der Tertiärstruktur

Charakteristische Signale der Peptidbindung:
15 % α -Helix dominieren das Spektrum für den gefalteten Zustand (222 und 208 nm)

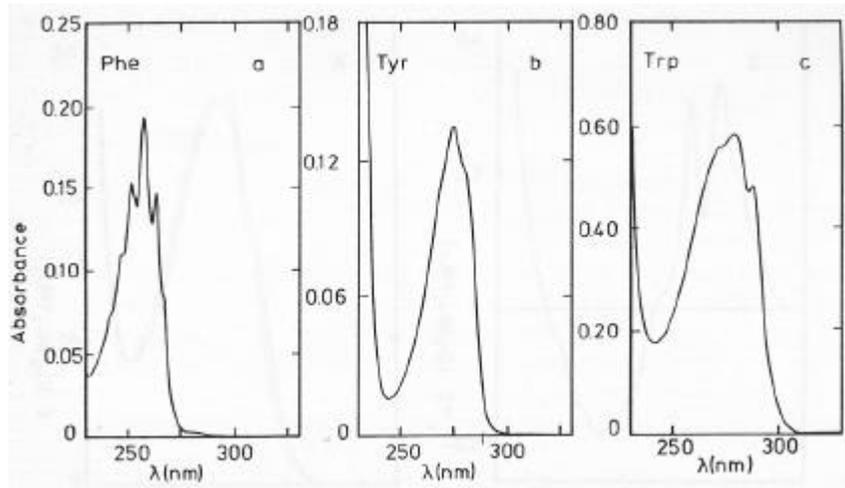
Einflüsse auf CD-Spektren

- viele Puffersubstanzen (z.B. Salze) absorbieren stark im UV-Bereich
- Sauerstoff absorbiert bei ~200 nm
- schwache Temperaturabhängigkeit der Spektren

Fluoreszenzspektroskopie in Proteinen

Fluoreszenz der aromatischen Ringe (Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan)

Absorption



Emission

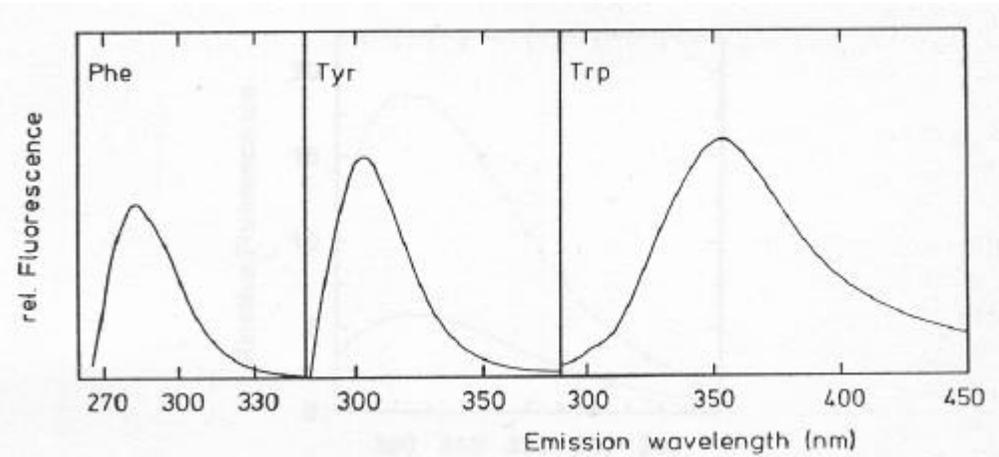


Table 1. Absorbance and fluorescence properties of the aromatic amino acids^a

Amino acid	Absorbance		Fluorescence		Sensitivity
	λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max} ($M^{-1}cm^{-1}$)	λ_{\max} (nm)	φ_F^b	$\epsilon_{\max} \times \varphi_F^b$ ($M^{-1}cm^{-1}$)
Tryptophan	280	5600	355	0.13	730
Tyrosine	275	1400	304	0.14	200
Phenylalanine	258	200	282	0.02	4

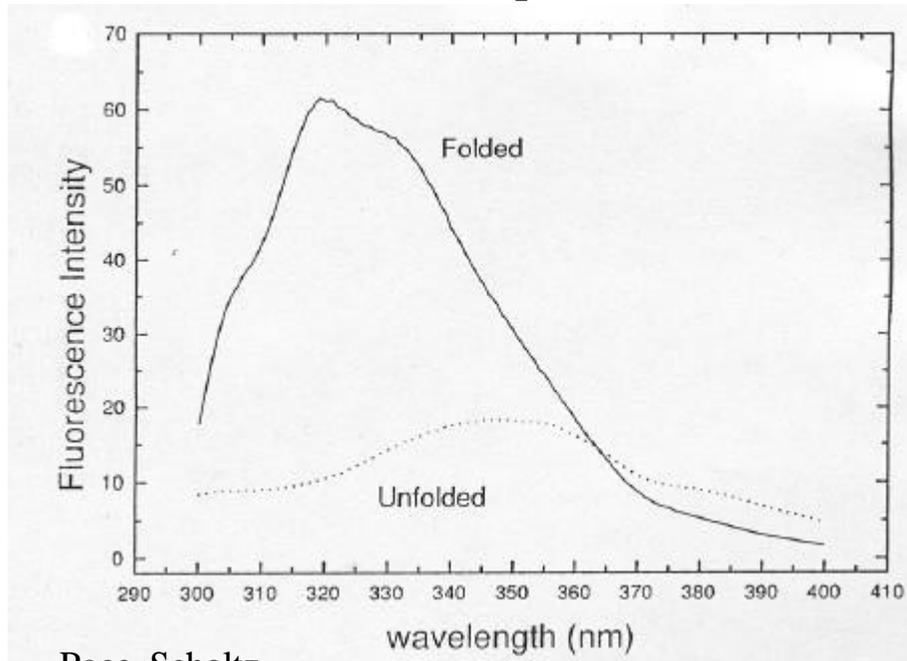
^a In water at neutral pH; data are from ref. 10.

^b φ_F , Fluorescence quantum yield.

Tryptophan dominiert das Fluoreszenzemissionsspektrum bei λ_{abs} : ~295 nm

Fluoreszenzspektroskopie in Proteinen

Fluoreszenzemissionsspektrum von RNase T1



Pace, Scholtz

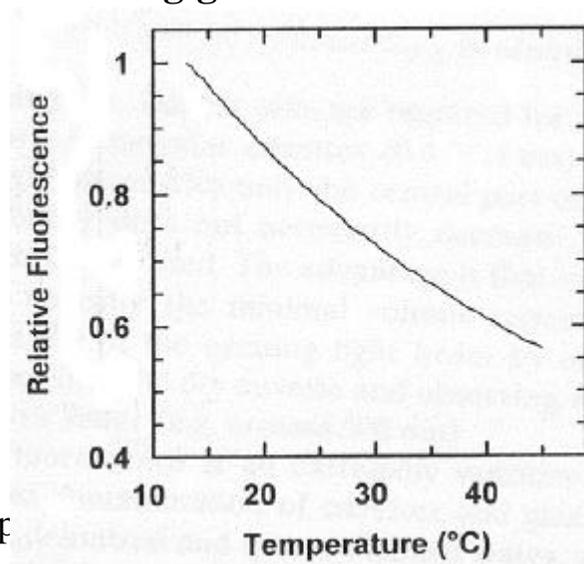
gefaltete => entfaltete Proteinstruktur

Die Fluoreszenzemission **nimmt in ihrer Intensität stark ab** und wird zu **größeren Wellenlängen verschoben**. Dieser Effekt wird durch die veränderte Umgebung der aromatischen Ringe (unpolar => polar) hervorgerufen (bimolekulare Desaktivierung: Löschprozess; Quenching).

Umgebungseinflüsse auf die Fluoreszenz

- starke Abhängigkeit der Emission von der Temperatur
- moderater Einfluss durch hohe Konzentrationen von Harnstoff, GdmCl

T-Abhängigkeit der Fluoreszenzemission

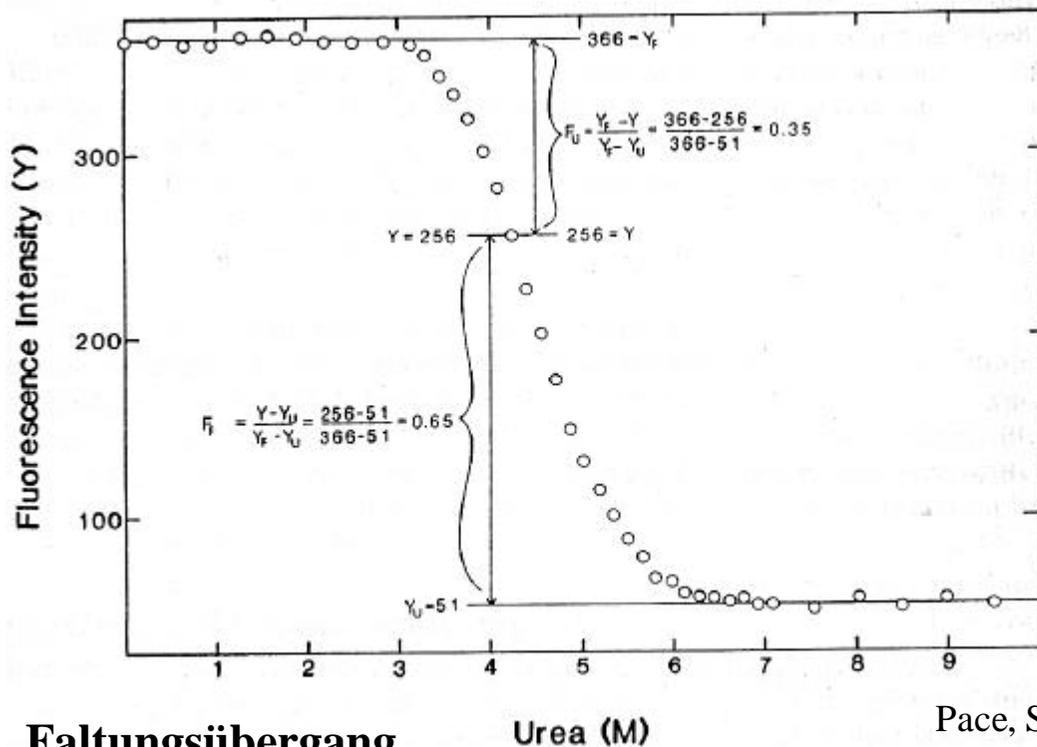


Biospektroskopie

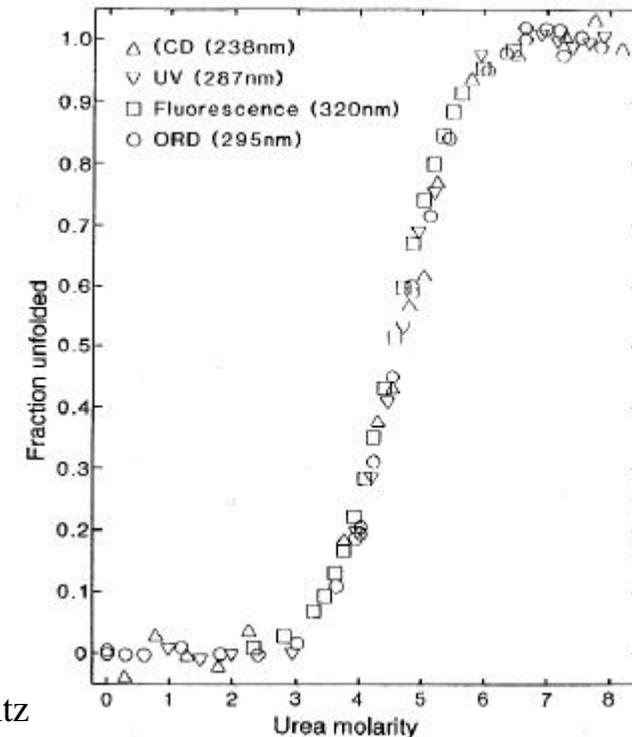
Untersuchung von Faltungsübergängen in Proteinen

Messung der Spektren bei Variation des Parameters der die Entfaltung induziert.

Fluoreszenzemission als Funktion der Harnstoffkonzentration



Faltungsübergang der RNase T1



Faltungsübergang

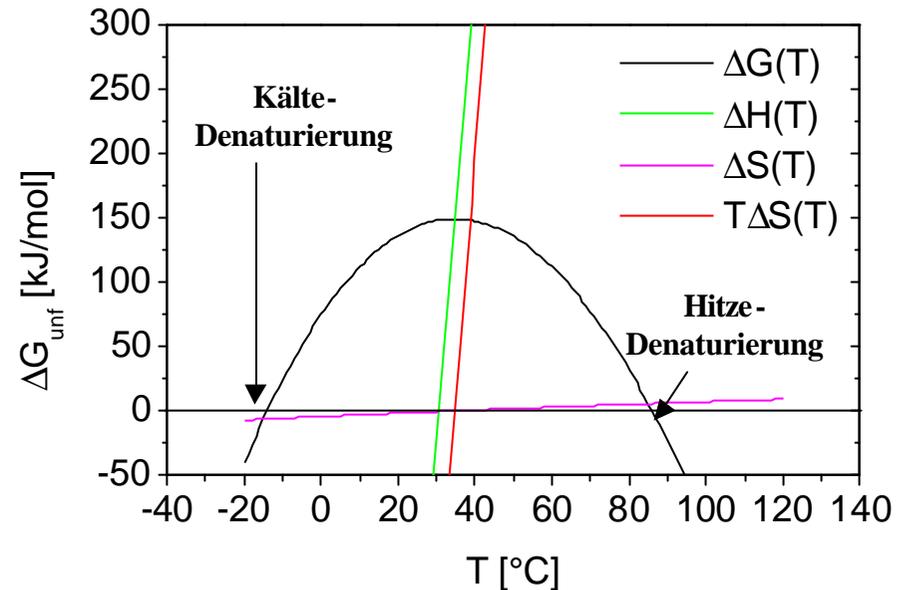
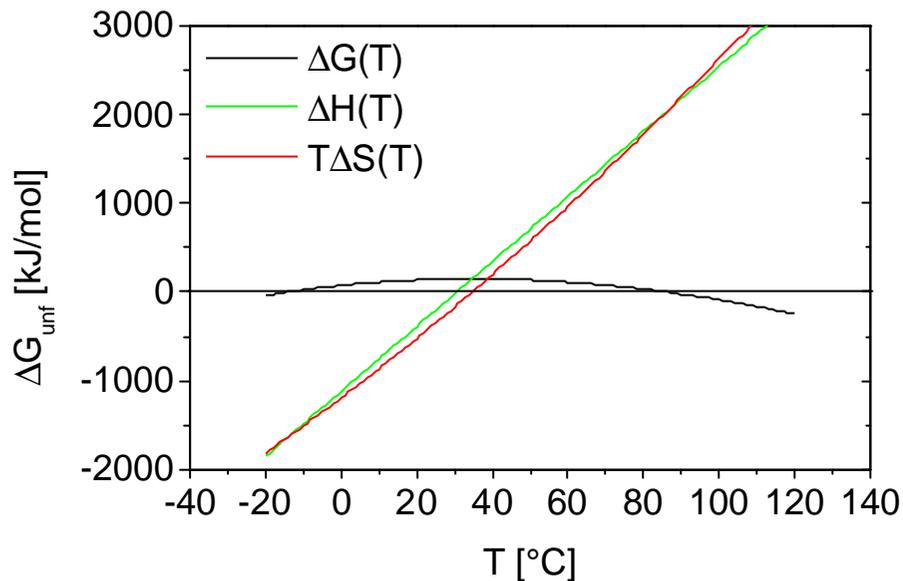
- sigmoider Kurvenverlauf
 - relativ steiler Abfall („Alles oder nichts“-Prozess)
 - Bestimmung der Fraktionen (gefaltet / entfaltet)
- => **Bestimmung thermodynamischer**

Größen !!

→ Übergang sieht für alle Messmethoden sehr ähnlich aus !

Thermostabilität von Proteinen

Sowohl ΔH , als auch ΔS sind im Falle von Proteinen für den Übergang „unfolded \Leftrightarrow folded“ stark Temperaturabhängig.



Gibbs-Helmholz Gleichung

$$\Delta G_{\text{unf}}(T) = G^{\text{U}} - G^{\text{F}} = \Delta H(T) - T \cdot \Delta S(T)$$

$$= -RT \ln K_{\text{eq}}$$

Parabolischer Verlauf von ΔG_{unf} mit der Temperatur im Falle von **2-Zustandsübergang**

- entfaltet \Leftrightarrow gefaltet
- mit $K_{\text{eq}} = [\text{U}]/[\text{N}]$
- keine Intermediate
- Übergang reversibel

Thermostabilität von Proteinen

Bestimmung von ΔH^0 und ΔS^0 aus der Van't Hoff Gleichung
 ($\Delta H^0, \Delta S^0$ Werte bei der Übergangstemperatur T^0)

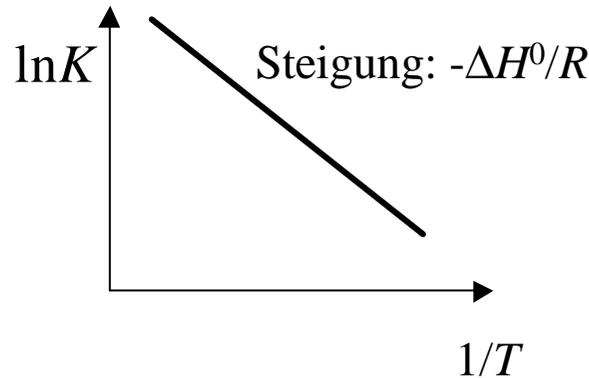
Aus $\Delta G_{unf}(T) = \Delta H(T) - T \cdot \Delta S(T) = -RT \ln K_{eq}$

kann die Van't Hoff Gleichung hergeleitet werden:

Es gilt:

$$d\Delta H(T) = \Delta c_p dT \quad \text{und} \quad d\Delta S(T) = \Delta c_p / T dT$$

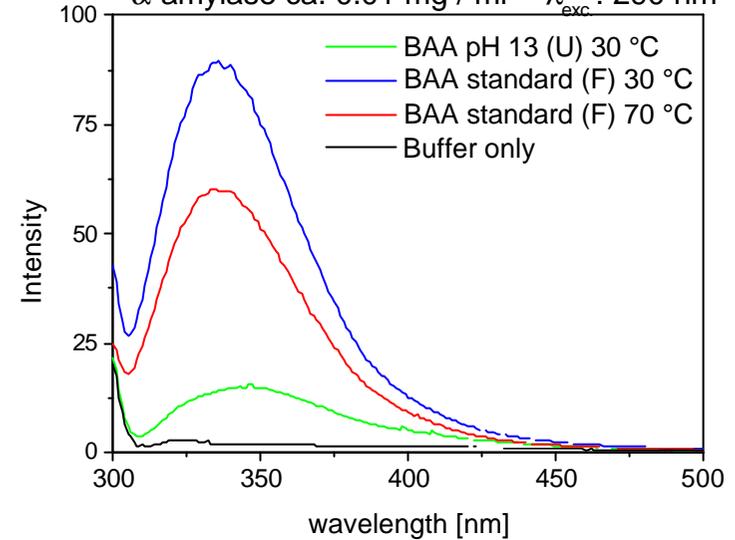
$$\frac{\partial \ln K}{\partial (1/T)} = - \frac{\Delta H^0}{R}$$



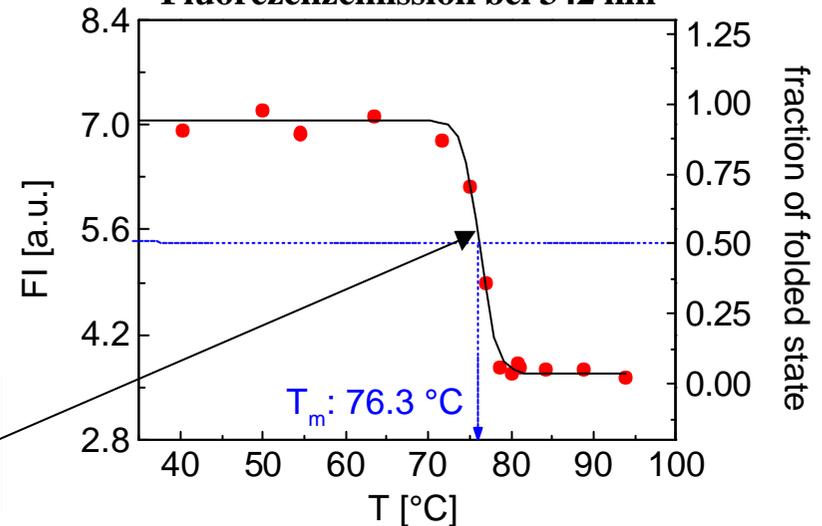
So über die Steigung ermittelte Enthalpien H^0 sind die sogenannten Van't Hoff Entalpien H_{vh}

Floureszenzemission

α -amylase ca. 0.01 mg / ml λ_{exc} : 290 nm



Fluorezenzemission bei 342 nm

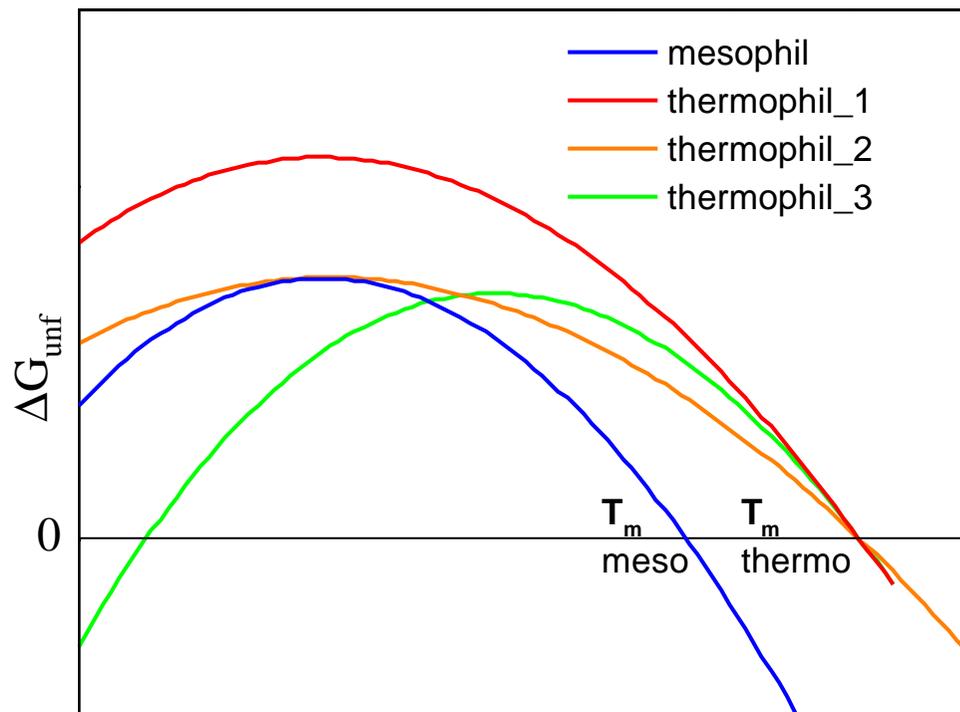


Die thermische und thermodynamische Stabilität von Proteinen

Für die „Schmelztemperatur“ T_m gilt:

$$\Delta G_{\text{unf}}(T_m) = \Delta H_m - T_m \cdot \Delta S_m = 0 \Rightarrow \Delta H_m = T_m \cdot \Delta S_m$$

$$\begin{aligned} \Delta G_{\text{unf}}(T) &= \Delta H(T) - T \cdot \Delta S(T) = \Delta H_m + \Delta c_p (T - T_m) - T \cdot [\Delta H_m / T_m + \Delta c_p \cdot \ln(T / T_m)] \\ &= \Delta H_m \cdot (1 - T / T_m) + \Delta c_p [T - T_m - T \cdot \ln(T / T_m)] \end{aligned}$$



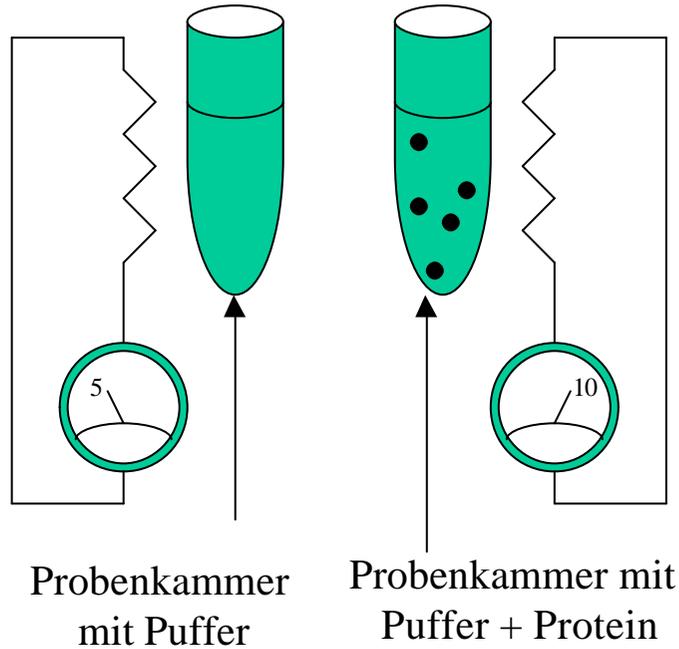
Für alle T bestimmt durch die Messgrößen: $T_m, \Delta H_m, \Delta c_p$
=> **z.B. Kalorimetrie**

Schmelztemperaturen für Proteine

Mesophile (20-50 °C)	Thermophile (60 – 90 °C)
-------------------------	-----------------------------

Proteinstabilität - Kalorimetrie

The Differential Scanning Calorimeter (DSC)

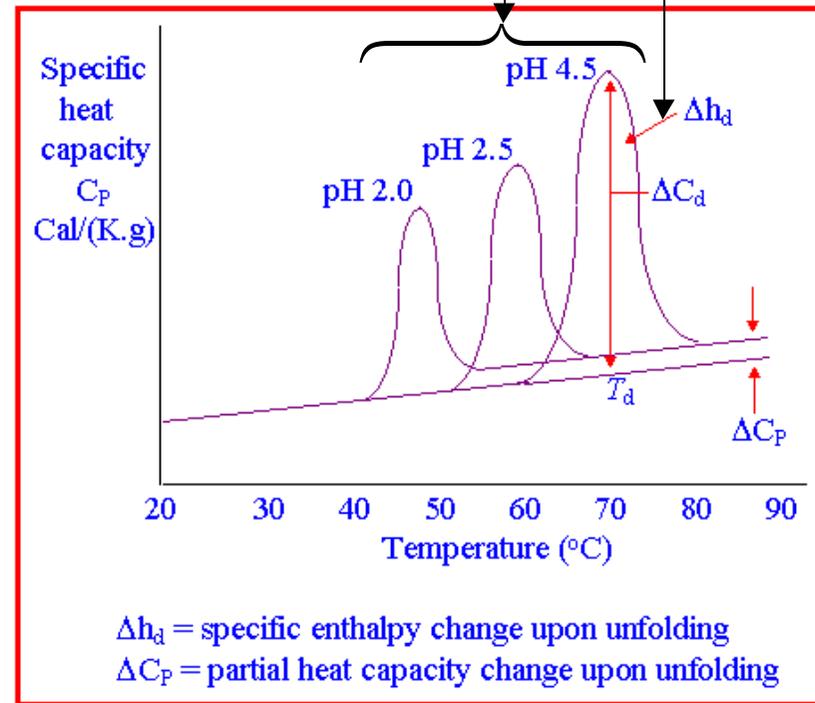


Beim Heizen beider Probenkammern wird ein Unterschied in der Wärmeaufnahme gemessen $\Delta C_p = \Delta Q/\Delta T$

$H_{cal} = H_{vh}$ weist auf 2-Zustandsübergang hin

$$\Delta C_p = d\Delta H/dT$$

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} C_p dT$$



Kalorimetrische Messparameter (ΔH_{cal} , ΔC_p) für einen Übergang (hier Proteinentfaltung bei der Schmelztemperatur $T_d = T_m$)

Proteinstabilität

$$\Delta G_{\text{unf}}(T) = G^{\text{U}} - G^{\text{F}} = \Delta H(T) - T \cdot \Delta S(T)$$

Beispiel Lysozym (T=25°C)

$$-T\Delta S = -184 \text{ kcal/mol}$$

$$\underline{\Delta H = +198 \text{ kcal/mol}}$$

$$\Delta G = +14 \text{ kcal/mol}$$

Beiträge von der **Proteinstruktur** und vom **Solvens (Hydratwasser)**:

Beispiel Entropie

konformelle Entropie der Proteinstruktur

Im entfalteten Zustand hat die Struktur mehr Bewegungsfreiheitsgrade

$$\Rightarrow S_{\text{unf}}^{\text{P}} > S_{\text{fol}}^{\text{P}}$$

$$\Rightarrow \Delta S^{\text{P}} > 0$$

destabilisiert den gefalteten Zustand

Entropischer Beitrag des Hydratwassers

Im entfalteten Zustand sind hydrophobe Residuen polaren Wassermolekülen ausgesetzt, eingeschränkte Beweglichkeit des Wassers

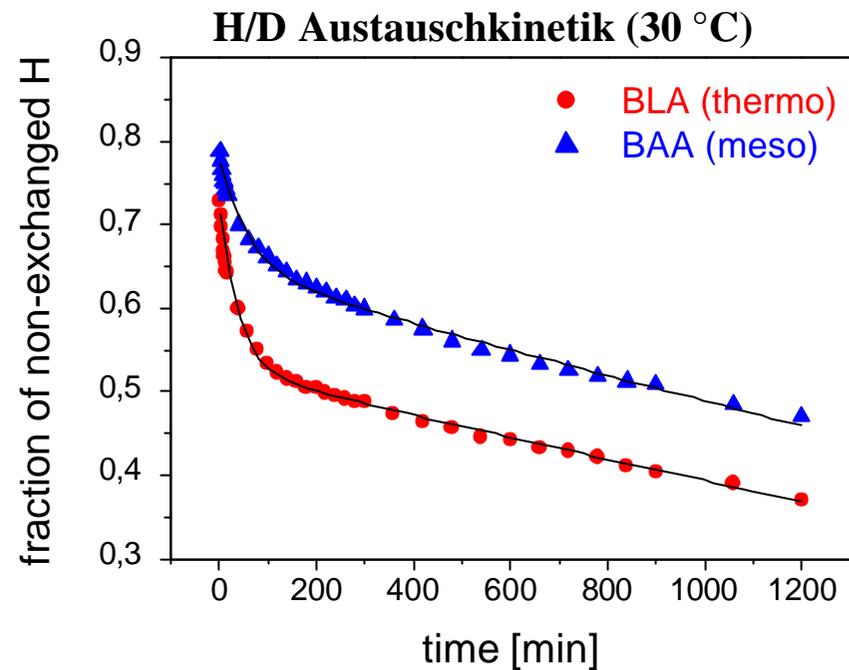
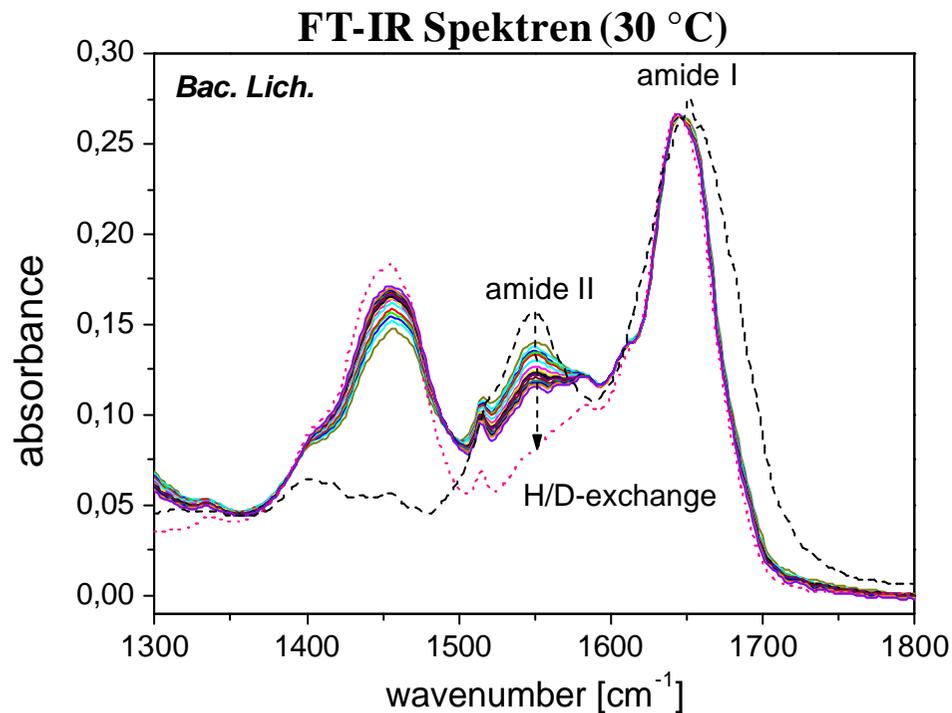
$$\Rightarrow S_{\text{unf}}^{\text{H}} < S_{\text{fol}}^{\text{H}}$$

$$\Rightarrow \Delta S^{\text{H}} < 0$$

stabilisiert den gefalteten Zustand, kompensiert S^{P}

=> Thermodynamische Methoden (z.B. Kalorimetrie) können nicht zwischen den beiden Beiträgen unterscheiden, sie messen die Summe aller Beiträge !

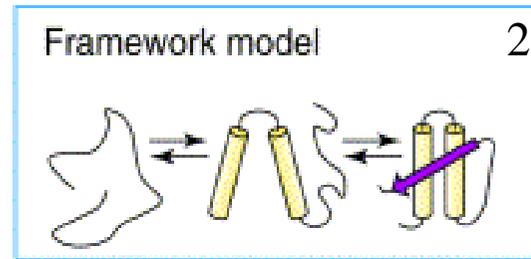
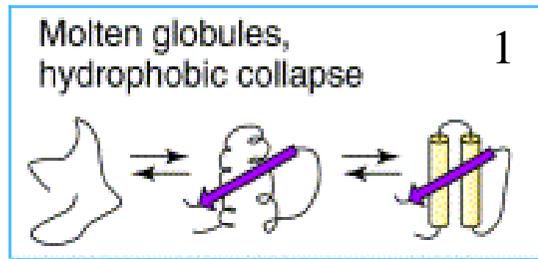
Proteinstabilität: H/D Austausch beobachtet mit FTIR



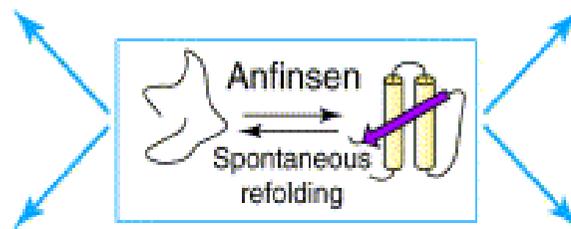
⇒ **Das hitzestabile Enzym ist "flexibler" !!**

	BLA (thermo)		BAA (meso)	
kinetics	fraction of exchanged H	exchange rates [$10^{-2} * \text{min}^{-1}$]	fraction of exchanged H	exchange rates [$10^{-2} * \text{min}^{-1}$]
fast	0.27	-	0.22	-
medium	0.19	2.43	0.13	1.35
slow	0.21	0.011	0.19	0.010
Σ:	0.67		0.54	

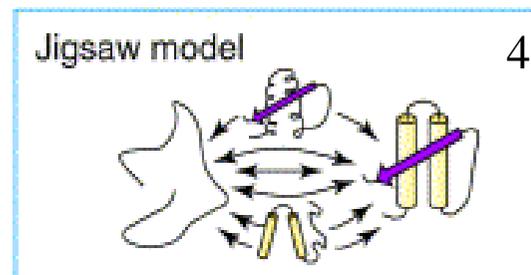
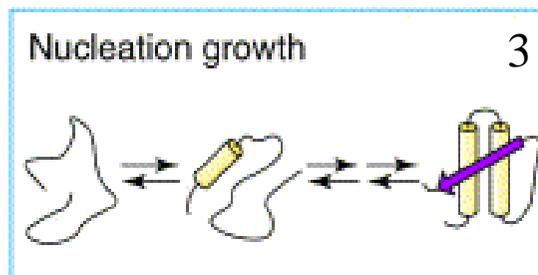
Modelle zur Hierarchie der Faltung



(1) Hydrophober Kollaps:
Seitengruppen orientierter
Ansatz (hydrophob, hydrophil)



(2) Hierarchie: 1. Ausbildung
von Sekundärstrukturelementen
2. dreidimensionale Raumstruktur



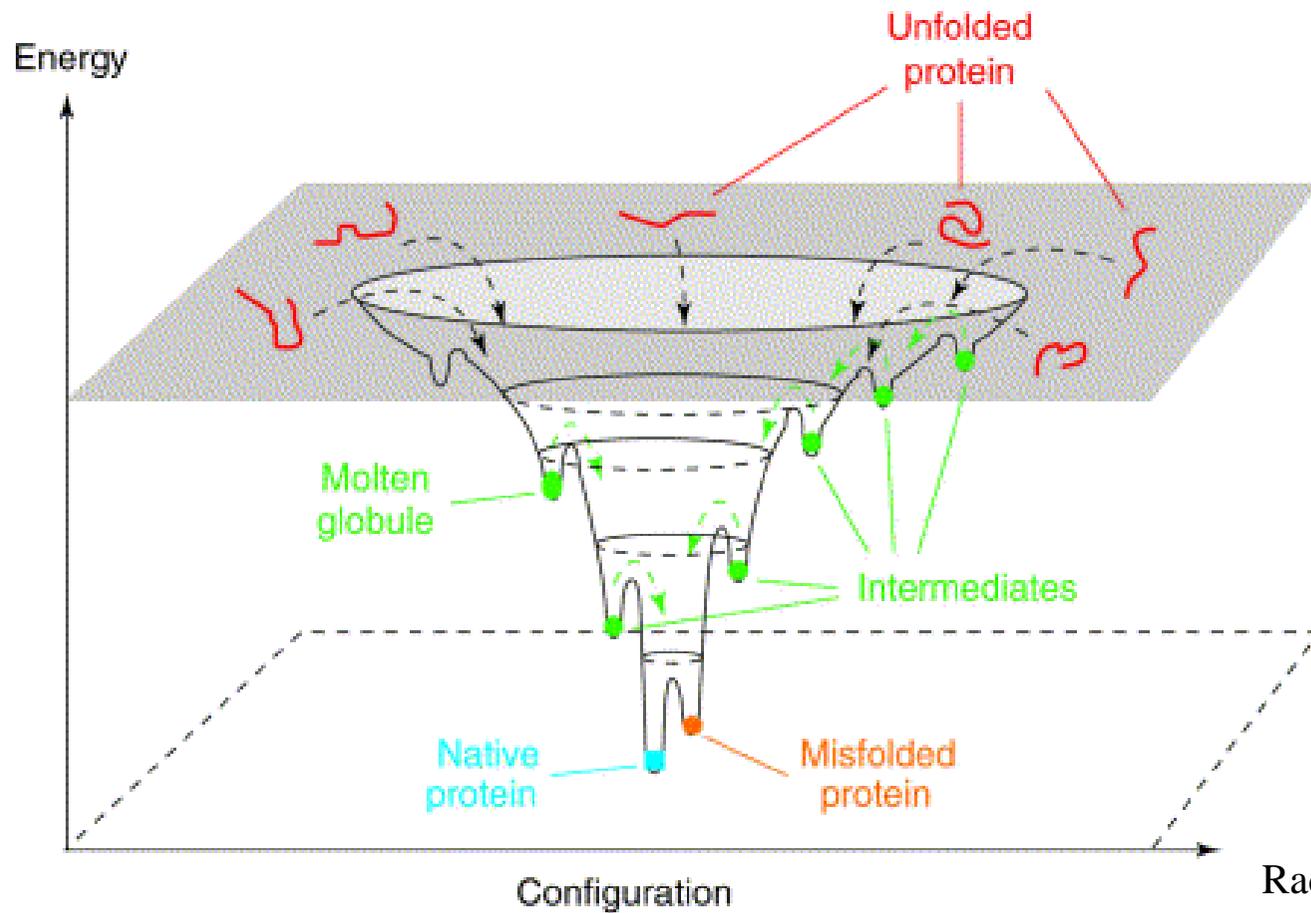
(3) Lokale Ausbildung eines
kleinen Strukturelementes um das
herum die komplette Struktur
aufgebaut wird.

Radford 2000

(4) Parallele Faltungswege;
Kombination verschiedener Modelle

T/BS

Der Faltungstrichter



Radford 2000

TIBS

Heterogenität des entfaltenen Zustandes
=> **parallele Faltungswege !?**



Einzelmolekültechniken !