

Fluorproline als Werkzeuge für gezieltes Proteindesign**

Christian Renner, Stefan Alefelder, Jae H. Bae,
Nediljko Budisa, Robert Huber und Luis Moroder*

Das natürlich vorkommende Fluorisotop ^{19}F ist bestens für die Kernspinresonanzspektroskopie geeignet.^[1] Es ist der zweitempfindlichste Kern nach Wasserstoff und sogar empfindlicher bezüglich Änderungen der chemischen Umgebung. Trotz kleiner Unterschiede im van-der-Waals-Radius und besonders in der Länge und im Dipolmoment der C-F-Bindung wird Fluor generell als isosterisch zu Wasserstoff angesehen, den es ersetzt. Da Fluor in biologischen Molekülen extrem selten vorkommt,^[2] gibt es keine natürlichen Hintergrundsignale, und so ist die ^{19}F -NMR-Spektroskopie ein nützliches Werkzeug zur Untersuchung von Proteinstruktur und -dynamik sowie von Wechselwirkungen zwischen fluorierten Liganden und Rezeptoren geworden. Der In-vivo-Einbau von (4S)-4-Fluorprolin ((4S)-FPro) in Kollagen und in die Vorstufen Proto- und Prokollagen wurde an Zellkulturen beobachtet; er führte zu einer Verringerung der Stabilität und/oder der Faltungsgeschwindigkeit der Kollagentriplehelix.^[3] Dagegen ist die Triplehelix synthetischer Kollagen-Modellpeptide, die statt Hydroxyprolin (4R)-4-Fluorprolin enthielten, wesentlich stabiler.^[4] Dies wurde aufgrund kinetischer und thermodynamischer Untersuchungen an (4R)-FPro in Dioxan mit dem induktiven Effekt des Fluors erklärt.^[5]

Um die Thermodynamik der *cis/trans*-Isomerisierung der Fluorproline besser mit der Stabilität der entsprechenden Proteinmutanten korrelieren zu können, haben wir in einer vergleichenden Studie die Kinetik und Thermodynamik der Isomerisierung von Ac-L-Pro-OMe **1**, Ac-(4R)-L-FPro-OMe **2**, Ac-(4S)-L-FPro-OMe **3** und Ac-L-4,4-F₂Pro-OMe **4** in wässriger Lösung FT-IR- und $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -NMR-spektroskopisch charakterisiert. Die deutliche Präferenz von **3** für die *cis*-Konformation im Vergleich zur Situation bei **1** und besonders bei **2** wurde durch die unterschiedlichen thermischen Stabilitäten der entsprechenden Barstarmutanten bestätigt.

Tabelle 1. Aktivierungsenthalpien (ΔH^\ddagger) und -entropien (ΔS^\ddagger) aus Eyring-Auftragungen. Die Fehlgrenzen wurden aus Kleinst-Fehlerquadrate-Anpassungen zu 1–2 % für **1**, **3** und **4** sowie 2–3 % für **2** abgeschätzt. Weiterhin sind die Freien Aktivierungsgenerien bei 300 K ($\Delta G_{300\text{K}}^\ddagger$) aufgeführt.

Prolinderivat	<i>trans → cis</i>			<i>cis → trans</i>		
	ΔH^\ddagger [kJ mol ⁻¹]	ΔS^\ddagger [J mol ⁻¹ K ⁻¹]	$\Delta G_{300\text{K}}^\ddagger$ [kJ mol ⁻¹]	ΔH^\ddagger [kJ mol ⁻¹]	ΔS^\ddagger [J mol ⁻¹ K ⁻¹]	$\Delta G_{300\text{K}}^\ddagger$ [kJ mol ⁻¹]
Ac-Pro-OMe 1	92.3	12.8	88.4	87.2	9.00	84.5
Ac-(4R)-FPro-OMe 2	91.8	14.8	87.4	84.2	5.37	82.6
Ac-(4S)-FPro-OMe 3	87.5	4.17	86.3	84.7	2.42	84.0
Ac-4,4-F ₂ Pro-OMe 4	103.7	66.38	83.8	98.5	59.11	80.8

[*] Prof. L. Moroder, Dr. C. Renner, Dr. S. Alefelder, J. H. Bae,
Dr. N. Budisa, Prof. R. Huber
Max-Planck-Institut für Biochemie
Am Klopferspitz 18 A, 82152 Martinsried (Deutschland)
Fax: (+49) 89-8578-2847
E-mail: moroder@biochem.mpg.de

[**] Wir danken Fr. E. Weyher für ihre wertvolle technische Hilfe bei der Spektroskopie, Fr. W. Wenger für ihre exzellente Arbeit bei der Proteinherstellung sowie Dr. R. Golbik für die Bereitstellung des Barstarplasmids und der Aufreinigungsvorschriften.

In den Modellverbindungen wurde der bekannte pH-Effekt auf die Isomerisierung von Xaa-Pro-Bindungen^[6] durch N- und C-Derivatisierung unterbunden. Der induktive Effekt des F-Substituenten wurde bereits für Ac-(4R)-L-FPro-OMe **2** in Dioxan beschrieben,^[5] er tritt bei beiden monofluorierten Prolinderivaten in wässriger Lösung auf und ist, wie erwartet, beim Difluorderivat **4** noch stärker, wie anhand der Blauverschiebung der Amid-I-Bande (C=O-Streckschwingung) im FT-IR-Spektrum gegenüber der von **1** nachgewiesen wurde (**2**: +8.5 cm⁻¹, **3**: +12.5 cm⁻¹, **4**: +18 cm⁻¹). Diese Verstärkung der C=O-Bindung geht mit einer Schwächung des Doppelbindungscharakters der Ac-Pro-Amidbindung einher. Der induktive Effekt äußert sich auch deutlich im pK_a -Wert der Immoniumgruppe der ungeschützten Aminosäure L-4,4-F₂Pro (7.15 ± 0.1) im Vergleich zu den bekannten pK_a -Werten von 9.2 für (4R)-L-FPro und 10.8 für L-Pro.^[5] Die resultierende Pyramidisierung des N-Atoms der Ac-Pro-Bindung führt zu einer Beschleunigung der *trans/cis*-Isomerisierung in der Reihenfolge **1** < **2** < **3** < **4** (Abbildung 1). Aus Eyring-Auftragungen der Isomerisierungsgeschwindigkeiten k_{tc} zwischen 4 und 60 °C wurden die Aktivierungsenthalpien ΔH^\ddagger und -entropien ΔS^\ddagger ermittelt (Tabelle 1). Die Gleichgewichtskonstanten K_{ZE} (*trans/cis*-Verhältnis) zeigen ein völlig anderes Verhalten: Sie nehmen in der Reihe **3** < **4** < **1** < **2** zu

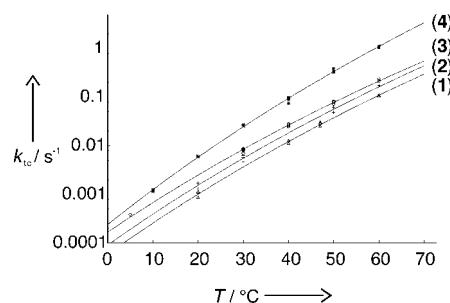


Abbildung 1. Logarithmische Auftragung der *trans → cis*-Isomerisierungsgeschwindigkeiten k_{tc} von **1**–**4** gegen die Temperatur. Diese Art der Darstellung ähnelt, ist aber nicht gleich einer Eyring-Auftragung; sie wurde gewählt, um die Geschwindigkeiten k_{tc} direkt ablesen zu können. Mehrere Symbole bei einer Temperatur resultieren aus Messungen mit verschiedenen NOESY-Mischzeiten τ_m .

(Abbildung 2). Der Unterschied der Freien Energie zwischen *cis*- und *trans*-Isomer ist beim (4S)-L-FPro-Derivat **3** am kleinsten (Tabelle 2), während der K_{ZE} -Wert des Difluorderivats **4** etwas kleiner ist als der der Prolinverbindung **1**. Durch van't Hoff-Auftragungen wurden der enthalpische und der entropische Beitrag zum Unterschied in der Freien Energie zwischen *cis*- und *trans*-Isomer bestimmt; diese Beiträge stimmen gut mit den Differenzen der Werte für ΔH^\ddagger und

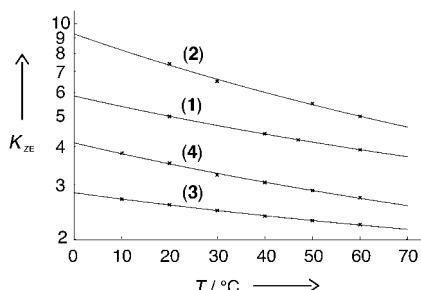


Abbildung 2. Logarithmische Auftragung der Gleichgewichtskonstanten K_{ZE} (*trans/cis*) für die Amidbindung von **1–4** gegen die Temperatur. Diese Art der Darstellung ähnelt, ist aber nicht gleich einer van't-Hoff-Auftragung; sie wurde gewählt, um K_{ZE} direkt ablesen zu können.

Tabelle 2. Enthalpie- (ΔH^0) und Entropiebeiträge (ΔS^0) zum Unterschied der Freien Energien von *trans*- und *cis*-Isomeren aus van't-Hoff-Auftragungen. Die Fehlergrenzen wurden aus Kleinste-Fehlerquadrate-Anpassungen abgeschätzt. Weiterhin ist der Unterschied der Freien Energien ΔG^0 bei 300 K aufgeführt.

Prolinderivat	ΔH^0 [kJ mol ⁻¹]	ΔS^0 [J mol ⁻¹ K ⁻¹]	$\Delta G^0_{300\text{K}}$ [kJ mol ⁻¹]
Ac-Pro-OMe 1	-5.04 ($\pm 1.0\%$)	-3.82 ($\pm 4.3\%$)	-3.90
Ac-(4R)-FPro-OMe 2	-7.73 ($\pm 3.3\%$)	-9.81 ($\pm 8.3\%$)	-4.78
Ac-(4S)-FPro-OMe 3	-3.04 ($\pm 1.1\%$)	-2.47 ($\pm 4.3\%$)	-2.30
Ac-4,4-F ₂ Pro-OMe 4	-5.21 ($\pm 2.3\%$)	-7.32 ($\pm 5.3\%$)	-3.01

ΔS^\ddagger für die *cis* → *trans*- und die *trans* → *cis*-Isomerisierung überein.

Der große Unterschied der K_{ZE} -Werte von **2** und **3** beruht auf der unterschiedlichen Faltung (Pucker) des Prolinrings. Für 4-Fluor-L-prolin wurde der Einfluss der Substitutionsposition (*S* oder *R*) auf den Ringpucker bereits 1973 NMR-spektroskopisch bestimmt.^[7] Aus den ¹H-¹H- und ¹H-¹⁹F-NMR-Kopplungskonstanten ergab sich ein γ -Exopucker für die ungeschützte Aminosäure (4*R*)-L-FPro und ein γ -Endopucker für (4*S*)-L-FPro. Bei der Analyse der hier untersuchten Modellverbindungen **1–4** deuten die ¹H-¹H- und ¹H-¹⁹F-Kopplungsmuster unabhängig von der *cis/trans*-Konformation auf einen γ -Endopucker für alle Verbindungen außer für **2**, das als γ -Exopucker vorliegt. Die Kristallstrukturen der ungeschützten Aminosäuren (4*R*)-L-FPro und L-FPro bestätigen die Ergebnisse der NMR-Analyse: den γ -Exopucker für (4*R*)-L-FPro und den γ -Endopucker für L-FPro.^[8] Der γ -Exopucker des Prolinrings in (4*R*)-L-FPro und der γ -Endopucker in (4*S*)-L-FPro werden mit dem *gauche*-Effekt erklärt.^[4] Beim Difluorderivat wirken die *gauche*-Effekte der beiden Fluoratome entgegengesetzt, sodass ein prolinähnliches Verhalten resultiert, d.h. eine Präferenz für den Endopucker. Molecular-Modeling-Betrachtungen zufolge ist aufgrund sterischer Hinderung die Energiedifferenz zwischen dem *trans*- und dem *cis*-Isomer beim Exopucker deutlich größer als beim Endopucker. Dies deutet darauf hin, dass eine Bevorzugung des Endopuckers zu einer kleineren Energiedifferenz zwischen *cis*- und *trans*-Konformer und somit im Gleichgewicht zu einem größeren Anteil an *cis*-Isomer führt, wie tatsächlich im Experiment für (4*S*)-L-FPro im Vergleich zu (4*R*)-L-FPro festgestellt wurde. Diese Befunde sind in völliger Übereinstimmung mit dem Ergebnis einer statistischen Analyse der Brookhaven-Datenbank für

Proteinstrukturen,^[9] nach dem *cis*-Xaa-Pro-Peptidbindungen mit einem Endopucker des Prolinrestes einhergehen, während bei *trans*-Xaa-Pro-Bindungen keine Präferenz festzustellen war.

Um die thermodynamischen Daten der Modellverbindungen mit den thermischen Stabilitäten von 4-FPro-Proteinmutanten zu vergleichen, haben wir Barstar als Modellprotein gewählt. Barstar ist ein extrazellulärer RNase-Inhibitor und besteht aus nur einer Domäne, die zwei Prolinreste enthält: Pro27 in *trans*- und Pro48 in *cis*-Konformation. Für die Substitutionsexperimente wurde die Barstarmutante b*C40A/C82A/P27A verwendet, da hier Komplikationen durch Oxidation der Cysteinreste oder durch Isomerisierung der Peptidyl-Pro27-Bindung nicht auftreten können. Die Tripelmutante enthält nur einen Prolinrest (Pro48), der im nativen Zustand in *cis*-Konformation vorliegt und durch seine Position in einer Schleife an der Proteinoberfläche fast völlig dem Lösungsmittel zugänglich ist.^[10] Die Fluorproline (4*R*)-L-FPro und (4*S*)-L-FPro wurden in Barstar an der Sequenzposition Pro48 unter Benutzung eines ein CCG-Codon enthaltenden Plasmids durch Fermentation mit dem prolinauxotrophen *E. coli*-Stamm DSM 1562 unter starkem Selektionsdruck eingebaut.^[11, 12] Unseres Wissens ist dies der erste Einbau eines fluorierten Prolinrestes in ein Protein eines bakteriellen Expressionssystems. Die Ausbeuten an fluorierten Proteinmutanten ähneln der Ausbeute an nichtfluorierter Barstarmutante (Abbildung 3). Wie erwartet wies die

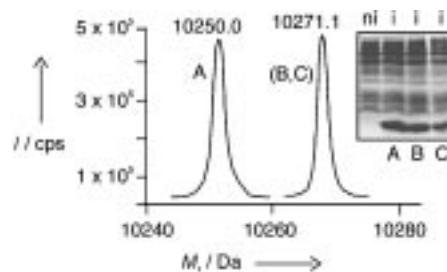


Abbildung 3. Links: ESI-MS-Spektren von zwei separaten Messungen an Barstar b*C40A/C82A/P27A (A; $M_r = 10250$ Da) und den P48(4*R*)-L-FPro- und P48(4*S*)-L-FPro-Mutanten (B bzw. C; $M_r = 10271$ Da). Rechts: Expressionsprofile von Barstar b*C40A/C82A/P27A und den FPro-Mutanten: ni = nichtinduzierte Zellen (Kontrolle); i = induzierte Zellen.

(4*S*)-L-FPro-Mutante eine höhere (Schmelzpunkt $T_m = 69.4^\circ\text{C}$) und die (4*R*)-L-FPro-Mutante eine niedrigere thermische Stabilität ($T_m = 61.5^\circ\text{C}$) verglichen mit Barstar b*C40A/C82A/P27A ($T_m = 64.3^\circ\text{C}$) auf. In ersten Experimenten konnte auch Difluorprolin in Barstar eingebaut werden, allerdings ohne nennenswerte Änderung der thermischen Stabilität ($T_m = 64.2^\circ\text{C}$); über die detaillierte biophysikalische Charakterisierung aller Barstarmutanten werden wir an anderer Stelle berichten.

Die erfolgreiche Expression der Barstarmutanten bestätigt somit, dass fluorierte Proline von den Aminoacyl-tRNA-Synthasen erkannt werden und in Proteine ähnlich effizient wie fluoriertes Tyrosin,^[13] Tryptophan^[14] und Phenylalanin^[15] eingebaut werden. Außerdem kann, je nachdem, ob (4*S*)- oder (4*R*)-L-FPro verwendet wird, sogar in Proteinen die *cis*- oder *trans*-Konformation von Peptidyl-Pro-Bindungen be-

günstigt oder benachteiligt werden (im Vergleich zu nicht-fluoriertem Prolin). Demgegenüber kann man beim Einbau von Difluorprolin in Proteine erwarten, dass Mutanten mit unveränderter thermischer Stabilität, aber mit der wertvollen Fluormarkierung für NMR-Strukturuntersuchungen zugänglich werden. Die Veränderung von Proteineigenschaften durch synthetische Aminosäuren mit definierten Eigenschaften, wie hier vorgeführt, eröffnet einen neuen Weg zum gezielten Design und Verändern von Proteinen.

Experimentelles

Ac-(4R)-L-FPro-OMe **2**, Ac-(4S)-L-FPro-OMe **3** und Ac-(4)-L-F₂Pro-OMe **4** wurden nach der Vorschift von Demange et al.^[16] hergestellt, Ac-Pro-OMe nach Standardverfahren. Die FT-IR-Spektren wurden bei 25 °C auf einem Perkin-Elmer-1760X-FT-IR-Spektrometer mit einer ATR-Zelle (ATR = attenuated total reflection) aufgenommen. Für die thermischen Entfaltungsexperimente wurde ein JASCO-J-715-Spektralpolarimeter, ausgerüstet mit einem FDCD-Peltierelement, Modell PFD-350S/350L, verwendet. Die Proben wurden in rechteckigen 110-QS-Hellma-Quarzzellen mit einer optischen Weglänge von 0.1 cm gemessen. Die Schmelzkurven der Barstarmutanten wurde zwischen 25 und 95 °C in 50 mM Natriumphosphat und 20 mM Tris/HCl-Puffer (Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan) bei pH 8.0 aufgenommen. Das Entfaltungsprofil wurde bei 222 nm und einem Temperaturgradienten von 50 °C/h⁻¹ mit einer Protein-Konzentration von 0.2 mg mL⁻¹ gemessen. Die Proben für die NMR-Messungen wurden durch Auflösen der Verbindung (3 mg) in 0.5 mL D₂O hergestellt. Alle NMR-Experimente wurden auf einem Bruker-DRX500-Spektrometer durchgeführt, entweder mit einem inversen Tripelresonanz-(¹⁵N/¹³C/¹H) oder Dual-Probenkopf (¹⁹F/¹H). Die ¹H-, ¹³C- und ¹⁹F-NMR-Signale wurden mittels homonuklearer 2D-¹H-¹H-NOESY- und TOCSY-Experimente und heteronuklearer 2D-¹⁹F-¹H und ¹³C-¹H-COSY-Experimente zugeordnet.^[17]

Thermodynamik und Kinetik der Isomerisierung der Amidbindung: Die Gleichgewichtskonstanten K_{ZE} für die *trans/cis*-Isomerisierung bei verschiedenen Temperaturen wurden durch Integration von Signalen in den 1D-¹H- und 1D-¹³C-NMR-Spektren für **1–3** und im 1D-¹⁹F-Spektrum für **4** ermittelt. Bei den 4-FPro-Derivaten waren die ¹⁹F-NMR-Signale der *trans*- und *cis*-Isomere so stark überlagert, dass weder Gleichgewichtskonstanten noch Isomerisierungsgeschwindigkeiten ¹⁹F-NMR-spektroskopisch gemessen werden konnten. Ein Vergleich der aus den 1D-¹H- und den 1D-¹³C-Spektren erhaltenen Werte für K_{ZE} ergab, dass die Signale von γ - und δ -Protonen am Besten für die Integration geeignet sind. Die enthalpischen und entropischen Beiträge zu den Unterschieden der Freien Energien der *trans*- und *cis*-Isomere wurde aus van-’t-Hoff-Auftragungen gemäß $\ln(K_{ZE}) = (-\Delta H^0/R)(1/T) + \Delta S^0/R$ berechnet. Die Geschwindigkeitskonstanten k_{EZ} für die *cis* → *trans*- und k_{ZE} für die *trans* → *cis*-Isomerisierung der Ac-Pro-Amidbindung wurden aus 2D-NOESY-Spektren ermittelt. Für **4** wurden die Kreuzsignale zwischen ¹⁹F_γ^{trans} und ¹⁹F_γ^{cis} im ¹⁹F-¹⁹F-NOESY-Spektrum integriert und mit den Integralen der entsprechenden Diagonalsignalen verglichen. Um den Einfluss unterschiedlicher T_1 -Zeiten zu vermeiden, wurden nur Kreuz- und Diagonalsignale derselben F₁-Frequenz

(indirekte Dimension) verglichen. Für **1–3** wurden die Kreuzsignale zwischen ¹H_a^{trans} und ¹H_a^{cis} im ¹H-¹H-NOESY-Spektrum verwendet, da nur diese in den Spektren hinreichend getrennt sind. Die so erhaltenen Verhältnisse von Kreuz- zu Diagonalsignalintensität wurden wie folgt skaliert, um das differentielle Relaxationsverhalten der Signale zu berücksichtigen:^[18] $k_{EZ} = (I_{ct}/I_{cc} + (I_{tc}/I_{tt})K_{ZE})/(2\tau_m)$, $k_{ZE} = ((I_{ct}/I_{cc})/K_{ZE} + I_{tc}/I_{tt})/(2\tau_m)$. I_{α} bezeichnet dabei die Integrale der Signale aus den 2D-NOESY-Spektren, wobei der erste tiefgestellte Buchstabe die F₁-Frequenz bezeichnet (*cis* oder *trans*) und der zweite die F₂-Frequenz. Bei jeder Temperatur wurden die NOESY-Mischzeiten τ_m so gewählt, dass $I_{ct} \ll I_{cc}$ und $I_{tc} \ll I_{tt}$ ist. Aktivierungsenthalpien und -entropien für die *cis* → *trans*- und die *trans* → *cis*-Isomerisierungen wurden aus Eyring-Auftragungen erhalten ($\ln(k/T) = (-\Delta H^\ddagger/R)(1/T) + \Delta S^\ddagger/R + \ln(k_B/h)$).

Konformationsanalyse: Der Ringpucker der Prolinreste wurde analog zur Arbeit von Gerig und McLeod^[7] durch die charakteristischen ¹H-¹H- und ¹H-¹⁹F-Kopplungsmuster in den 1D-¹H- und 1D-¹⁹F-Spektren bestimmt. Ein γ -Exopucker geht einher mit ähnlichen großen Kopplungen $J(H_a-H_{\beta 1})$ und $J(H_a-H_{\beta 2})$, während beim Endopucker eine der beiden Kopplungskonstanten groß und die andere klein ist. In ähnlicher Weise zeigen auch die anderen Kopplungen typische Muster für Exo- bzw. Endopucker.

Eingegangen am 5. September 2000 [Z15760]

- [1] J. T. Gerig, *Prog. NMR Spectrosc.* **1994**, *26*, 293–370.
- [2] D. B. Harper, D. O'Hagen, *Nat. Prod. Rep.* **1994**, *11*, 123–133.
- [3] J. Uitto, D. J. Prockop, *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *336*, 234–251.
- [4] S. K. Holmgren, L. E. Bretscher, K. M. Taylor, R. T. Raines, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 63–79.
- [5] E. S. Eberhardt, N. Panasik, Jr., R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12261–12266.
- [6] C. Grathwohl, K. Wüthrich, *Biopolymers* **1976**, *15*, 2025–2041.
- [7] J. T. Gerig, R. S. McLeod, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 5725–5729.
- [8] N. Panasik, Jr., E. S. Eberhardt, A. S. Edison, D. R. Powell, R. T. Raines, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *44*, 262–269.
- [9] D. Pal, P. Chakrabarti, *J. Mol. Biol.* **1999**, *294*, 271–288.
- [10] R. Golbik, G. Fisher, A. R. Fersht, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 1505–1514.
- [11] N. Budisa, C. Minks, F. J. Medrano, J. Lutz, R. Huber, L. Moroder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 455–459.
- [12] N. Budisa, C. Minks, S. Alefelder, W. Wenger, F. Dong, L. Moroder, R. Huber, *FASEB J.* **1999**, *13*, 41–51.
- [13] M. Ring, I. M. Armitage, R. E. Huber, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1985**, *131*, 675–680.
- [14] C. Minks, R. Huber, L. Moroder, N. Budisa, *Biochemistry* **1999**, *38*, 10649–10659.
- [15] C. Minks, R. Huber, L. Moroder, N. Budisa, *Anal. Biochem.* **2000**, *284*, 29–34.
- [16] L. Demange, A. Ménez, C. Dugave, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *39*, 1169–1172.
- [17] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York, **1986**.
- [18] S. Macura, B. T. Farmer II, L. R. Brown, *J. Magn. Reson.* **1986**, *70*, 493–499.