

Enzymatische Katalyse der Peptidyl-Prolyl-Bindungsrotation: Sind die Bildung des Übergangszustands und die Enzymdynamik direkt gekoppelt?*

Jörg Fanghänel*

Stichwörter:

Cyclophilin · Enzymkatalyse · Moleküldynamik · PPIasen · Proteine

Wie erreichen Enzyme die außerordentliche Erniedrigung der Aktivierungsenergie bei der Umwandlung von Substraten in Produkte? Diese Frage wird schon seit dem Beginn der enzymologischen Forschung intensiv diskutiert. Als besonders bedeutsam kristallisierten sich dabei fünf Katalysemechanismen heraus:^[1]

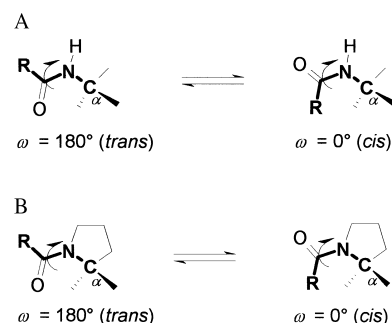
- 1) Katalyse durch Vororientierung und Annäherung der Reaktanten
- 2) kovalente Katalyse
- 3) allgemeine Säure-Base-Katalyse
- 4) Katalyse durch Übergangszustandskomplementarität des aktiven Zentrums
- 5) Katalyse durch konformative Verformung der Reaktanten

Bereits seit 25 Jahren wird vermutet, dass die interne Bewegung des Proteinrückgrats und der Aminosäureseitenketten nicht nur zur Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes, sondern auch zur Substratumwandlung und damit zu allen fünf genannten Katalysemechanismen einen Beitrag leisten könnte.^[2] Ausgehend von Kramers' Theorie wurde die Viskositätsabhängigkeit der Beschleunigung der durch Carboxypepti-

dase A katalysierten Reaktion nachgewiesen, und als Erklärung wurde die gehinderte Flexibilität des Proteins in hoch viskosen Lösungen angeboten.^[2] Die Verwendung der NMR-Spektroskopie (Kernspinrelaxationsraten) zur Beantwortung proteindynamischer Fragestellungen hat unser Bild über die Struktur der Enzyme von dem eines starren Polymers hin zu dem eines dynamischen Makromoleküls gewandelt.^[3,4] Den ersten direkten Nachweis der Beteiligung der Dynamik einzelner Aminosäurereste an der Bildung des enzymgebundenen Übergangszustands haben kürzlich Eisenmesser et al. veröffentlicht. Die Autoren konnten an der durch Cyclophilin 18 (Cyp18) katalysierten Reaktion nachweisen, dass sich die Dynamik eines im aktiven Zentrum des Enzyms gelegenen Aminosäurerests im Takt der Katalyse ändert.^[5] Das untersuchte Protein gehört zu der 1984 erstmals beschriebenen Enzymklasse der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen, EC 5.2.1.8).^[6] Wegen ihres partiellen Doppelbindungscharakters ist die Peptidbindung planar. Bei der Umwandlung zwischen ihren beiden thermodynamisch stabilsten Konformationen (mit Rotationswinkeln ω von 0° (*cis*) bzw. 180° (*trans*), Schema 1 A) muss eine Aktivierungsenergie von 75–100 kJ mol⁻¹ aufgebracht werden. PPIasen können diese Barriere für Peptidyl-Prolyl-Bindungen verringern und so die Umwandlung zwischen den *cis*- und *trans*-Konformeren in Oligopeptiden und Proteinen katalysieren.^[7] Dabei beschleunigen sie neben der Faltung von

denaturierten Proteinen, die eine *cis*-Peptidyl-Prolyl-Bindung in ihrem gefalteten Zustand aufweisen, auch die Isomerisierung dieser Bindung im nativen Zustand der Proteine.^[7–9]

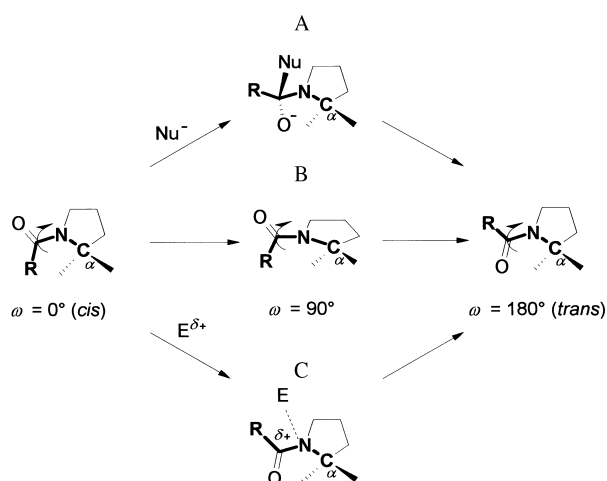
Untersuchungen an Oligo- und Di-peptiden sowie an *N*-Methylacetamid ergaben, dass das *trans*-Konformer einer Peptidbindung vom Typ sekundäres Amid ca. 10–16 kJ mol⁻¹ stabiler ist als das *cis*-Konformer. Für die Peptidyl-Prolyl-Bindung vom Imid-Typ ist die Stabilisierung des *trans*-Konformers mit ca. 2–6 kJ mol⁻¹ wesentlich geringer und führt damit zu einem höheren Gleichgewichtsanteil des *cis*-Konformers von etwa 5–30% (Schema 1 B).^[10,11] Da die *cis/trans*-Isomerisierung eine der einfachsten chemischen Reaktionen ist, eignen sich PPIasen besonders für enzymologische Grundlagenuntersuchungen. In Schema 2 sind die drei wichtigsten in der Literatur diskutierten Katalysemechanismen für PPIasen zusammengefasst.



Schema 1. *cis*- und *trans*-Konformationen einer sekundären Amid-Bindung (A) und einer Peptidyl-Prolyl-Bindung (B).

[*] Dipl.-Biochem. J. Fanghänel
Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung
Weinbergweg 22
06120 Halle an der Saale (Deutschland)
Fax: (+49) 345-551-1972
E-mail: fanghaenel@enzyme-halle.mpg.de

[**] Mein Dank für hilfreiche Diskussionen während der Bearbeitung des Manuskripts gilt Prof. Dr. Gunter Fischer, Halle.



Schema 2. Übersicht über die am intensivsten diskutierten Katalysemodelle zur enzymatischen *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen. A: Nucleophiler Angriff auf das Carbonylkohlenstoffatom; B: Bildung und Stabilisierung eines Übergangszustands, in dem das Carbonylsauerstoffatom orthogonal zur Prolinringebene orientiert ist; C: Destabilisierung des partiellen Doppelbindungscharakters durch die Interaktion des Imidstickstoffatoms mit einem Elektrophil (Schema adaptiert nach G. Fischer^[19]).

Von Fischer et al. wurde aufgrund der Inaktivierung von Cyp18 durch thiolmodifizierende Reagentien geschlossen, dass eine SH-Gruppe als Nucleophil am Carbonylkohlenstoffatom der Peptidyl-Prolyl-Bindung angreift und durch die Bildung eines tetraedrischen Zwischenprodukts deren partiellen Doppelbindungscharakter aufhebt (Schema 2 A).^[6] Enzymkinetische und kristallographische Daten für eine weitere PPIase, Pin1, belegten, dass die Bildung eines solchen Übergangszustands wahrscheinlich ist.^[12]

Dagegen folgten Harrison und Stein aus enzymkinetischen Experimenten zum kinetischen sekundären Isotopeneffekt, dass der Übergangszustand bei der Cyp18-katalysierten Reaktion keine tetraedrische Struktur hat,^[13] und schlugen ein neues Katalysmodell vor: Durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen aktivem Zentrum und Peptidyl-Prolyl-Bindung werden die polaren Resonanzstrukturen der Peptidbindung geringer stabilisiert als im wässrigen Medium und entsprechend der partielle Doppelbindungscharakter der Bindung aufgehoben. Die Peptidyl-Prolyl-Bindung kann deshalb aus ihrer planaren Struktur in einen Übergangszustand ($\omega = 90^\circ$) gedrängt werden, in dem das Carbonylsauerstoffatom senkrecht zur Ringebene des Prolinrests orientiert ist

(Schema 2 B). Untersuchungen mit Inhibitoren, die diesen Übergangszustand nachahmen, sowie NMR-spektroskopische Messungen am enzymgebundenen Oligopeptid konnten diesen Mechanismus jedoch nicht bestätigen.^[14,15]

Y. Zhao und H. Ke stützen durch die Aufklärung der Kristallstruktur eines Cyp18-Substrat-Komplexes einen dritten, zuvor von Kofron et al. vorgeschlagenen Katalysmechanismus. Diese hatten beobachtet, dass die elektrophile Guanidgruppe von Arg 55 in räumlicher Nähe zum Prolin-Peptidstickstoffatom liegt, und gefolgert, dass bei der Bildung des enzymgebundenen Übergangszustands eine Wasserstoffbrückenbindung gebildet werden könnte. Dadurch würde die zur *cis/trans*-Isomerisierung notwendige Aktivierungsenergie verringert (Schema 2 C).^[16,17] In Abbildung 1 ist das aus den Kristallstrukturen abgeleitete aktive Zentrum von Cyp18 dargestellt. In Einklang mit dem von Kofron et al.

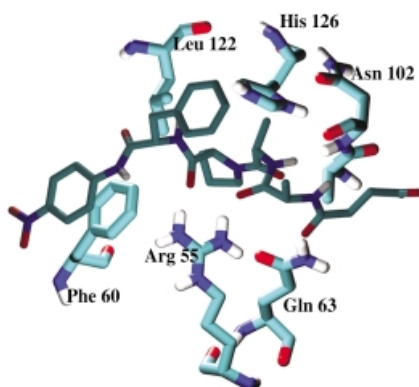


Abbildung 1. Das aktive Zentrum von Cyp18, abgeleitet aus der Kristallstruktur.^[17] Aminosäuren in der Nähe der Peptidyl-Prolyl-Bindung des Substrats sind hervorgehoben. Der C-Terminus des gebundenen Substratpeptids (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-NH-Np) befindet sich links. Folgende Proteinvarianten sind beschrieben: Arg-55-Ala (0.1% Restaktivität), Phen-60-Ala (0.32% Restaktivität) und His-126-Gln (0.5% Restaktivität).

vorgeschlagenen Mechanismus zeigte die Arg-55-Ala-Proteinvariante von Cyp18 nur 0.1% der Aktivität des Wildtypenzym.

Kristallstrukturen spiegeln nur den unter den gewählten Kristallisationsbedingungen thermodynamisch stabilsten Grundzustand eines Enzym-Substrat-Komplexes wider; sie sagen wenig über seinen Übergangszustand während der Katalyse aus. Dieser Grundzustand kann sogar abseits der Reaktionskoordinate liegen und damit einen Sackgasen-Komplex darstellen. Ein weiterer Nachteil kristallographischer Daten ist ihre geringe Aussagekraft hinsichtlich proteindynamischer Prozesse. Mit den Methoden der NMR-Spektroskopie können diese Einschränkungen überwunden werden. Für derartige Untersuchungen eignet sich die durch Cyp18 katalysierte Reaktion aus folgenden Gründen:

- 1) Die Reaktion verläuft vollständig reversibel und ohne Nebenprodukte.
- 2) Im Gleichgewicht sind sowohl Substrat als auch Produkt in ähnlicher Konzentration vorhanden.
- 3) Die Parameter der Katalyse liegen im gleichen Zeitfenster wie die für die Bestimmung der Proteindynamik notwendigen NMR-spektroskopischen Zeitskalen.
- 4) Die Struktur des Enzyms wurde mittels NMR-Spektroskopie ermittelt.
- 5) Das Enzym wurde bereits mit einem breiten Methodenspektrum gut untersucht.

Durch NMR-spektroskopische Analyse der Linienverbreiterung der Oligopeptidsignale während der Katalyse ist bekannt, dass die Affinitäten für die Bindung des *cis*- und des *trans*-Konformers im aktiven Zentrum von Cyp18 ähnlich sind.^[18] Dieselben Untersuchungen lieferten Hinweise darauf, dass während der Katalyse der C-terminal vom Prolinrest gelegene Teil des Substrats rotiert, während der N-Terminus an Cyp18 fixiert bleibt. Anhand der longitudinalen und transversalen Autokorrelationsraten $R1$ bzw. $R2$ wurde von Eisenmesser et al. die Dynamik des Proteinrückgrats in Abhängigkeit von der Substratbindung quantifiziert.^[5] Proteindynamische Prozesse, die entweder mit der Substratbindung oder mit

der Enzymkatalyse korrelieren und sich damit in einem Zeitfenster von Mikros bis Millisekunden bewegen, beeinflussen die Autokorrelationsrate R_2 , während R_1 von strukturellen Fluktuationen im Picosekundenbereich abhängig ist. Für zehn Peptidstickstoffatome von Cyp18 (Arg 55, Thr 68, Gly 72, Lys 82, Leu 98, Ser 99, Ala 101, Asp 102, Ala 103 und Gly 109) wurde nach Substratzugabe eine Änderung von R_2 , jedoch nicht von R_1 beobachtet. Alle identifizierten Peptidstickstoffatome befinden sich in räumlicher Nähe zum Substratmolekül, wenn auch nur einige der zugehörigen Aminosäureseitenketten einen direkten Kontakt zum in der *cis*-Konformation gebundenen Substratmolekül aufweisen (Arg 55, Asp 102, Ala 103).

Sowohl Substratbindungs- als auch Katalyseprozesse können die chemische Umgebung der beobachteten ^{15}NH -H-Bindung im Peptidrückgrat beeinflussen und so zu einer Änderung von R_2 führen. Um beide Effekte zu trennen, wurde R_2 in Abhängigkeit von der eingesetzten Substratkonzentration bestimmt. Peptidstickstoffatome von Aminosäureresten, die nur an der Bindung des Substratpeptids beteiligt sind, sollten dann ihre größte Änderung in R_2 zeigen, wenn in der Lösung gleiche Anteile an freiem und gebundenem Enzym vorliegen. Die Substratabhängigkeit des Parameters R_2 lässt sich bei neun der zehn identifizierten Aminosäuren durch ein Modell beschreiben, das nur die Bindung des Substrats mit Cyp18 berücksichtigt. Dagegen zeigt das Stickstoffatom des Peptidrückgrats von Arg 55 die größte Änderung in R_2 erst bei Substratsättigung. Diese Änderung kann nach der Interpretation der Autoren nicht ausschließlich durch die Substratbindung zustande kommen. Sie folgerten, dass die Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung direkt mit der Dynamik des Proteinrückgrats gekoppelt ist. Ein weiteres Indiz dafür, dass die Dynamik von Arg 55 an der katalysierten Um-

wandlung der *cis*- und *trans*-Konformere direkt beteiligt ist, ergibt sich aus der guten Übereinstimmung der Geschwindigkeit der *cis/trans*-Isomerisierung mit der Bewegung des Arg-55-Peptidrückgratstickstoffatoms. In einer weiteren Arbeit konnten Eisenmesser et al. die Erkenntnisse über die zentrale Bedeutung von Arg 55 bei der Cyp18-katalysierten *cis/trans*-Isomerisierung von prolinhaltigen Oligopeptiden auf ein nativ gefaltetes Proteinsubstrat von Cyclophilin übertragen: Sie wiesen nach, dass die Isomerisierung der Gly-89-Pro-Bindung des nativen HIV-1-Hüllproteins durch katalytische Mengen Cyp18 beschleunigt wird.^[9] Die Arg-55-Ala-Proteinvariante von Cyp18 wies keine PPIase-Aktivität gegenüber diesem Substrat mehr auf.

Mit den beschriebenen Experimenten wurde somit von Eisenmesser et al. erstmals direkt nachgewiesen, dass die Änderung der Dynamik eines Peptidstickstoffatoms unmittelbar mit der Bildung des enzymgebundenen Übergangszustands gekoppelt ist. Außerdem konnte durch die Beteiligung von Arg 55 in Cyp18 an der Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen sowohl in Oligopeptiden als auch in nativ gefalteten Proteinen nachgewiesen werden. Jedoch gewähren diese Messungen keine unmittelbaren Einblicke in die molekularen Details der Beteiligung der Aminosäureseitenketten an der Katalyse. Durch die Einbeziehung aller Seitenkettenatome des aktiven Zentrums in proteindynamische Untersuchungen wird sich das Modell der durch Cyp18 katalysierten Reaktion weiter präzisieren lassen. Trotz der beschriebenen neuen Einblicke in die Proteindynamik von Cyp18 bleibt zu klären, inwiefern die im aktiven Zentrum gelegenen Aminosäurereste und die in den Kristallstrukturen sichtbaren Wassermoleküle an der Bildung des Übergangszustands direkt beteiligt sind. Dabei ist zu beachten, dass die vorhandenen Kristall-

strukturen von Oligopeptid-Cyp18-Komplexen nicht den Übergangszustand widerspiegeln und nur einen Teil des aktiven Zentrums charakterisieren. Die durch Eisenmesser et al. identifizierten zehn Aminosäurereste liefern deshalb erste wichtige Anhaltspunkte für die weiteren Untersuchungen.

-
- [1] R. A. Copeland, *Enzymes*, Wiley-VCH, New York, **2000**.
 - [2] B. Gavish, M. M. Werber, *Biochemistry* **1979**, *18*, 1269.
 - [3] L. E. Kay, *Biochem. Cell Biol.* **1998**, *76*, 145.
 - [4] A. J. Wand, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 926.
 - [5] E. Z. Eisenmesser, D. A. Bosco, M. Akke, D. Kern, *Science* **2002**, *295*, 1520.
 - [6] G. Fischer, H. Bang, C. Mech, *Biomed. Biochim. Acta* **1984**, *43*, 1101.
 - [7] S. F. Gothel, M. A. Marahiel, *Cell. Mol. Life Sci.* **1999**, *55*, 423.
 - [8] K. N. Brazin, R. J. Mallis, D. B. Fulton, A. H. Andreotti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 1899.
 - [9] D. A. Bosco, E. Z. Eisenmesser, S. Pochapsky, W. I. Sundquist, D. Kern, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5247.
 - [10] A. Jabs, M. S. Weiss, R. Hilgenfeld, *J. Mol. Biol.* **1999**, *286*, 291.
 - [11] M. S. Weiss, A. Jabs, R. Hilgenfeld, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 676.
 - [12] R. Ranganathan, K. P. Lu, T. Hunter, J. P. Noel, *Cell* **1997**, *89*, 875.
 - [13] R. K. Harrison, R. L. Stein, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3464.
 - [14] H. C. Wang, K. Kim, R. Bakhtiar, J. P. Germanas, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2593.
 - [15] L. T. Kakalis, I. M. Armitage, *Biochemistry* **1994**, *33*, 1495.
 - [16] J. L. Kofron, P. Kuzmic, V. Kishore, E. Colon-Bonilla, D. H. Rich, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6127.
 - [17] Y. Zhao, H. Ke, *Biochemistry* **1996**, *35*, 7356.
 - [18] D. Kern, G. Kern, G. Scherer, G. Fischer, T. Drakenberg, *Biochemistry* **1995**, *34*, 13594.
 - [19] G. Fischer, *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 119.