

Der thermodynamische Einfluss eingeschlossener Wassermoleküle auf eine Protein-Ligand-Wechselwirkung**

Christian M. Stegmann, Daniel Seeliger, George M. Sheldrick, Bert L. de Groot und Markus C. Wahl*

Ein rationales Design von Protein-bindenden Substanzen setzt detaillierte Kenntnisse der Energetik von Protein-Ligand-Wechselwirkungen voraus, einschließlich der freien Energie (ΔG), der Enthalpie (ΔH), der Entropie (ΔS) und der Änderung der Wärmekapazität bei konstantem Druck (ΔC_p) bei der Bindungsreaktion.^[1] Bisher wurde ΔC_p der Bindungsreaktion häufig mit Änderungen der zugänglichen polaren und unpolaren Kontaktflächen der wechselwirkenden Spezies korreliert,^[2,3] was nahe legte, dass hydrophobe Wechselwirkungen die wichtigste Ursache für Wärmekapazitätseffekte sind (zur Übersicht siehe Lit. [4]). Allerdings verbleiben bei diesem Ansatz wiederholt Diskrepanzen zwischen den gemessenen und berechneten ΔC_p -Werten.^[5] Insbesondere die Einflüsse von Solvens (meist Wasser) und Soluten (z. B. Ionen), die bei der Komplexbildung eingeschlossen werden, sind hier nicht berücksichtigt; jedoch ist bekannt, dass diese Moleküle spezifische nichtkovalente Bindungen zu Protein und Ligand eingehen können und somit die molekularen Erkennungsprozesse beeinflussen können. So können Wassermoleküle an Kontaktflächen die Oberflächen-

form verändern, Wasserstoffbrücken bilden oder aber elektrostatische Kräfte abschirmen.^[6] Zusätzlich wird in eingeschlossenen Solvens- und Solutmolekülen eine Verminderung der weichen Vibrationsmodi induziert, wodurch sich die Wärmekapazität verändert.^[7–9] Derzeit gibt es keine experimentellen Schätzwerte für die Größe dieser Effekte in Protein-Ligand-Wechselwirkungen.

Wir untersuchten die thermodynamischen Auswirkungen eingeschlossener Wassermoleküle im Komplex von humanem Cyclophilin G (CypG; ein Enzym mit Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase (PPIase)-Aktivität) mit dem immunsuppressiven cyclischen Peptid Cyclosporin A (CsA). Anhand von Vergleichen der CsA-Bindung an Wildtyp(wt)-CypG und eine Punktmutante konnten wir den Beitrag von eingeschlossenen Wassermolekülen zur Wärmekapazitätsänderung ermitteln, unabhängig von Beiträgen, die durch Änderungen der zugänglichen Kontaktflächen verursacht werden.

CypG besteht aus einer N-terminalen Cyclophilin-Domäne (CypG_{PPIase}; Aminosäuren 1–177), die CsA bindet, und einer C-terminalen Ser-Arg-Dipeptid-reichen (RS-) Domäne (Aminosäuren 178–754).^[10,11] Wir bestimmten ab initio die Kristallstrukturen von CypG_{PPIase} alleine (Apo) oder im Komplex mit CsA mit einer Auflösung von 0.75 Å. CypG_{PPIase} bindet CsA in ähnlicher Weise wie für Cyclophilin A beschrieben^[12,13] (Abbildung 1a,b) ohne wesentliche Konformationsänderungen zu zeigen (mittlere quadratische Abweichung von 0.20 Å für 174 C α -Atome von Apo- und CsA-gebundenem CypG_{PPIase}). Allerdings ersetzt Arg115 in CypG_{PPIase} einen Alaninrest an der entsprechenden Stelle in CypA (siehe Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Bei der Komplexbildung bildet die Seitenkette von Arg115 eine direkte Wasserstoffbrücke zum Carbonyl-Sauerstoffatom von Abu2 in CsA sowie zu den Carbonyl-Sauerstoffatomen von Arg85 und Gly86 von CypG_{PPIase} (Abbildung 1c). Diese Wechselwirkungen stehen dem äquivalenten Alaninrest in CypA nicht zur Verfügung. Hierdurch verschließt Arg115 die Abu-Tasche,^[12] in der dadurch zwei Wassermoleküle (Positionen 1 und 3) und ein Chloridion (Position 2) eingeschlossen werden.

Die Identität des Chloridions konnte durch Analyse einer anomalen Differenz-Fourier-Karte bestätigt werden (Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen). Die beiden Wassermoleküle sind in ein Wasserstoffbrückennetzwerk integriert und tetraedrisch umgeben: Das Wassermolekül auf Position 1 bindet an die Amidgruppen von Gly121 und Gln123 in der Proteinhauptkette, an die Carbonylgruppe von Ala113 in der Proteinhauptkette und an das Wassermolekül in Position 3. Dieses Wassermolekül bindet außerdem an die Guanidiniumgruppe von Arg115, an die Carbonylgruppe von

[*] C. M. Stegmann, Dr. D. Seeliger, Dr. B. L. de Groot, Prof. Dr. M. C. Wahl
Forschungsgruppe Röntgenkristallographie und
Forschungsgruppe Computergestützte Biomolekulare Dynamik
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie
Am Faßberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)
Fax: (+49) 308-385-3410
E-Mail: mwahl@gwdg.de
Homepage: <http://www.mpibpc.gwdg.de/groups/wahl/>
Prof. Dr. M. C. Wahl
Freie Universität Berlin
Institut für Chemie und Biochemie, AG Strukturbiochemie
Takustraße 6, 14195 Berlin (Deutschland)

Prof. Dr. G. M. Sheldrick
Georg-August-Universität Göttingen, Lehrstuhl für Strukturchemie
Tammannstraße 4, 37077 Göttingen (Deutschland)

[**] Wir danken Gleb P. Bourenkov, Ehmke Pohl und Ina Dix für Hilfe bei Bestrahlungsexperimenten sowie Ulrich Reidt für anfängliche Versuche zur Reinigung und Kristallisation von CypG_{PPIase}, Pawel Burkhardt für Ratschläge zu ITC-Experimenten, Kay Diederichs für die Bereitstellung einer Multiprozessor-Version von SHELXL und Reinhard Lührmann für großzügigen Zugang zu Instrumenten und anhaltendes Interesse. C.M.S. wird durch ein Promotionsstipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes unterstützt. Diese Forschungsarbeit wurde durch die VW-Stiftung (VW I/81 649), die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG-GR 207914) und die Max-Planck-Gesellschaft unterstützt. Die Atomkoordinaten und Strukturfaktoren sind in der RCSB-Proteindatenbank (www.rcsb.org) unter den PDB-Nummern 2wfi und 2wfj hinterlegt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200900481> zu finden.



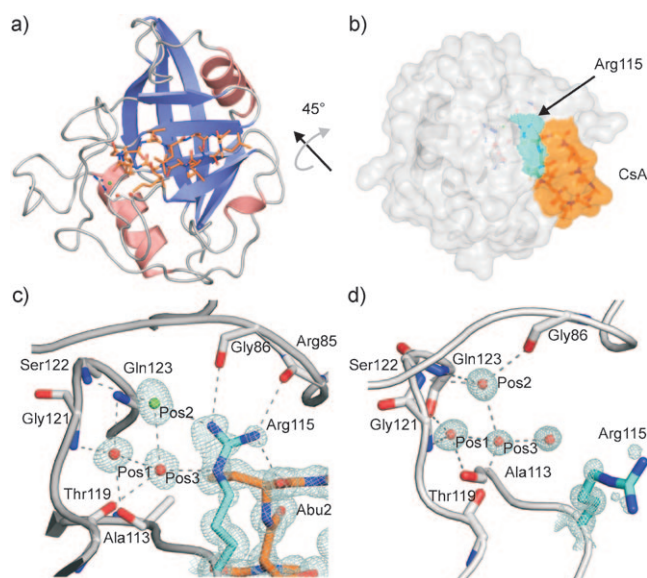


Abbildung 1. a) Kristallstruktur von CypG_{PPIase} (Bänderdarstellung) im Komplex mit CsA (Stabmodell, Kohlenstoffatome: orange). b) Die Arg115-Seitenkette (cyanblau) nimmt im Komplex mit CsA eine geschlossene Konformation ein. c) Im CsA-Komplex ist die Guanidiniumgruppe von Arg115 geordnet und bildet eine Wasserstoffbrücke zu den Carbonyl-Sauerstoffatomen von Arg85 und Gly86 sowie zum Carbonyl-Sauerstoffatom von Abu2, wodurch zwei Wassermoleküle (rote Kugeln, Positionen 1 und 3) und ein Chloridion (grüne Kugel, Position 2) eingeschlossen werden. d) In der Apo-CypG_{PPIase}-Struktur befindet sich Arg115 in einer offenen Konformation (vorherrschende Konformation dargestellt). Gitter: σ_A -gewichtete Elektronendichte auf 1.5 σ -Niveau konturiert.

Thr119 und an das Chloridion in Position 2. Das Chloridion wiederum ist koordiniert durch die Amidfunktion von Ser122 und die Guanidiniumgruppe von Arg115 (Abbildung 1c). In der Apo-Form ist die Arg115-Seitenkette teilweise ungeordnet (Abbildung 1d), wodurch die Abu-Tasche offen bleibt. Hier sind alle drei Positionen durch Wassermoleküle besetzt. Das Wassermolekül in Position 1 bildet Wasserstoffbrücken zur NH-Gruppe von Gly121 in der Hauptkette, zu den Carbonyl-Sauerstoffatomen von Ala113 und Gln123 und zum Wassermolekül in Position 3. Das Wassermolekül in Position 2 bindet an die Amidfunktionen von Ser122 und Gln123, an die Carbonylgruppe von Gly86 und an das Wassermolekül in Position 3 (Abbildung 1d). Arg115 scheint daher wie ein Deckel zu funktionieren, der durch die CsA-Bindung die Tasche verschließt und arretiert bleibt. In CypA hingegen kann der dem Arg115 entsprechende Alaninrest keine derartige Funktion ausüben, sodass die Tasche vermutlich auch nach CsA-Bindung für Solvens und Solute offen ist.

Da die kristallographische Analyse nicht zwischen Besetzung und Aufenthaltszeiten unterscheiden kann, untersuchten wir dies mit Molekulardynamik-Simulationen von Apo-wt-CypG_{PPIase}, wt-CypG_{PPIase} im Komplex mit CsA und einer CypG_{PPIase}(Arg115Ala)-Punktmutante im Komplex mit CsA (zehn unabhängige Simulationen mit einer Dauer von je 10 ns pro System). Die Simulationen zeigten, dass das Chloridion auf Position 2 im CypG_{PPIase}/CsA-Komplex mit einem Wassermolekül austauschbar ist und dass das Chloridion

diese Stelle aufgrund der hohen Chloridkonzentration (400 mM) im Kristallisationsansatz einnimmt. Bei einer Chloridkonzentration von 150 mM, nahe dem physiologischen Wert, wurde das Chloridion auf Position 2 in fünf von zehn Simulationen innerhalb der Simulationsdauer durch ein Wassermolekül ersetzt, wohingegen die Wassermoleküle auf den Positionen 1 und 3 verblieben, wie dies in der Kristallstruktur der Fall ist. Das Wassermolekül auf Position 2 bildet Wasserstoffbrücken zum Wassermolekül in Position 3 und zusätzlich entweder zu Arg115 (Abbildung 2a) oder aber zur Carbonylgruppe von Gly85 (nicht gezeigt). Zusammenfassend kann gesagt werden, das Wasser und Chlorid in Position 2 bei annähernd physiologischen Bedingungen mit ähnlicher Besetzungszahl binden.

Übereinstimmend mit den Kristallstrukturen zeigen die MD-Simulationen eine wesentliche Abnahme der Flexibilität von Arg115 bei CsA-Bindung. Während Arg115 ähnliche Übergangshäufigkeiten des Diederwinkels χ_1 im Fall von Apo-CypG_{PPIase} wie im Komplex CypG_{PPIase}/CsA aufweist, sind die Übergangshäufigkeiten der Winkel χ_2 , χ_3 und χ_4 im Komplex stark reduziert (Abbildung 2b). Sobald Arg115 eine gestreckte Konformation einnimmt und Wasserstoffbrücken zu den Carbonyl-Sauerstoffatomen von Arg85 und Gly86 bildet, entsteht ein Hohlraum, in dem Wassermoleküle eingeschlossen sind (Abbildung 2a und S3 in den Hintergrundinformationen). Aufgrund der reduzierten Flexibilität von Arg115 im CypG_{PPIase}/CsA-Komplex ist die Lebensdauer dieser Konformation verlängert, und infolgedessen sind die Aufenthaltszeiten von zwei der drei Wassermoleküle im Hohlraum drastisch verlängert (Tabelle 1 und Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen).

Tabelle 1: Austausche pro 10 ns auf den drei Positionen in der Abu-Tasche.

Simulation	Pos 1	Pos 2	Pos 3
Wt-CypG _{PPIase} /CsA	0.2	0.5	0.1
Apo-wt-CypG _{PPIase}	0.5	4.1	> 10
CypG _{PPIase} (Arg115Ala)/CsA	0.5	4.3	> 10

Die Austauschgeschwindigkeiten des Wassermoleküls auf Position 1 sind in allen Simulationen für die untersuchten Systeme sehr niedrig (0.2 Austausche pro 10 ns im Wildtyp-Komplex; 0.5 Austausche pro 10 ns im Fall von Apo-wt-CypG_{PPIase} und mutiertem Komplex, Abbildung 2c). Zwar scheinen die Aufenthaltszeiten des Wassermoleküls auf Position 1 in den Simulationen von wt-CypG_{PPIase}/CsA länger als in den anderen Simulationen (Abbildung 2c), doch die absoluten Austauschgeschwindigkeiten sind zu niedrig, um die Differenz präzise zu berechnen. Längere Simulationen der drei Systeme zeigten, dass ein Wassermolekül auf Position 1 bis zu 180 ns verweilen kann.

Im Unterschied hierzu hängt die Austauschgeschwindigkeit auf Position 2 stark davon ab, ob CsA gebunden ist und ob sich auf Position 115 ein Arg- oder Ala-Rest befindet. Während die Austauschgeschwindigkeit auf Position 2 im wt-CypG_{PPIase}/CsA-Komplex ebenfalls sehr niedrig ist (0.5 Austausche pro 10 ns), verachtfacht sie sich in der Apo-Form auf

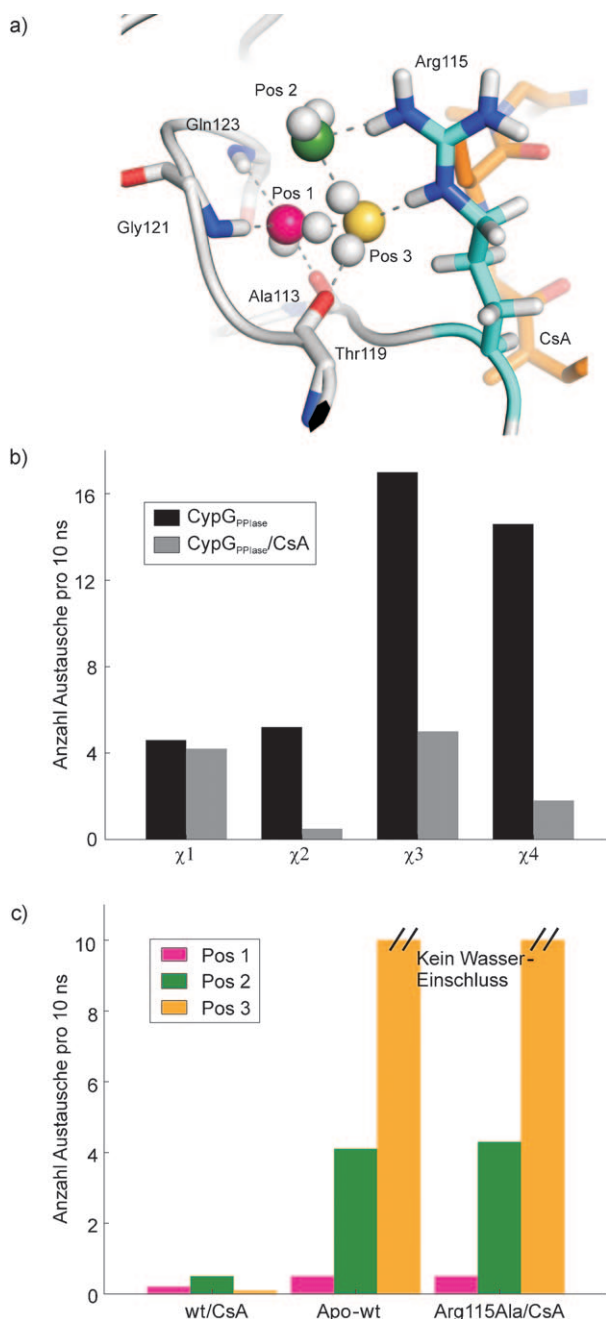


Abbildung 2. a) Repräsentative Stellen und Wasserstoffbrücken der eingeschlossenen Wassermoleküle auf den Positionen 1, 2 und 3 während einer Simulation des CypG_{PPIase}/CsA-Komplexes. Gestrichelte Linien zeigen Wasserstoffbrücken an. b) Histogramm der Diederwinkel-Übergänge von Arg115 in Apo-wt-CypG_{PPIase} (schwarze Balken) und im CypG_{PPIase}/CsA-Komplex (graue Balken). Die Beweglichkeit der Seitenkette ist stark reduziert, sobald CsA bindet. c) Aufenthaltszeiten von Wassermolekülen an den drei Bindungsstellen in der Abu-Tasche. Während das Wassermolekül auf Position 1 (rosa) in keinem der drei Systeme ausgetauscht wird, zeigen die Wassermoleküle auf den Positionen 2 (grün) und 3 (orange) gesteigerte Austauschgeschwindigkeiten bei der Mutation von Arg115 zu Ala (was den „Deckel“ der Abu-Tasche entfernt) und ebenso in Abwesenheit von CsA (wodurch der „Deckel“ beweglich wird).

4.1 Austausche pro 10 ns (Abbildung 2c). Eine vergleichbare Zunahme der Austauschgeschwindigkeit (auf 4.3 Austausche

pro 10 ns) kann auch bei den Simulationen des CypG_{PPIase}-(Arg115Ala)/CsA-Komplexes beobachtet werden (Abbildung 2c).

Ähnlich verhalten sich die Austauschgeschwindigkeiten des Wassermoleküls auf Position 3: Im wt-CypG_{PPIase}/CsA-Komplex liegt eine sehr niedrige Austauschgeschwindigkeit vor (0.1 Austausche pro 10 ns), in den Apo-CypG_{PPIase}-Simulationen hingegen konnten für Wassermoleküle auf Position 3 keine verlängerten Aufenthaltszeiten festgestellt werden (Abbildung 2c). Darüber hinaus wurden auf dieser Position im Fall des CypG_{PPIase}(Arg115Ala)/CsA-Komplexes keine Wassermoleküle eingeschlossen. Somit zeigen unsere Simulationen, dass die reduzierte Flexibilität von Arg115 im wt-CypG_{PPIase}/CsA-Komplex einen starken Effekt auf die Aufenthaltszeiten von zwei der drei eingeschlossenen Wassermoleküle ausübt, wohingegen das Wassermolekül auf Position 1 anscheinend für die Struktur relevant ist und weder durch die CsA-Bindung noch durch die Mutation von Arg115 beeinflusst wird.

Die oben angeführten Untersuchungen legen nahe, dass ein Argininrest auf Position 115 durch die Vermittlung des Einschlusses von Wassermolekülen einen negativen Beitrag zu ΔC_p der Bindungsreaktion mit CsA leistet und dass diese Vermittlung in der Arg115Ala-Mutante gestört ist. Um diese Hypothese zu prüfen, unternahmen wir kalorimetrische Titrationsexperimente mit wt-CypG_{PPIase} und der Punktmutante CypG_{PPIase}(Arg115Ala) über ein Temperaturintervall. Bei 25 °C zeigt die CsA-Bindung an wt- und mutiertem CypG_{PPIase} eine ähnliche freie Energie der Bindung aufgrund von Enthalpie-Entropie-Kompensation (Tabelle 2). Allerdings belegt

Tabelle 2: Thermodynamische Daten, bestimmt durch isotherme Titrationskalorimetrie.

Titrant	CypG _{PPIase}	CypG _{PPIase} (Arg115Ala)
<i>T</i> [°C]	25	25
<i>K</i> _D [nM]	70	64
ΔH_{obs} [cal mol ⁻¹]	-12 790 ± 73	-13 360 ± 81
ΔS [cal mol ⁻¹ K ⁻¹]	-10.2	-11.9
$-T\Delta S$ [cal mol ⁻¹]	3039	3546
ΔG [cal mol ⁻¹]	-9750	-9813
ΔC_p [cal mol ⁻¹ K ⁻¹]	-580 ± 31	-466 ± 11

eine Auftragung der Wechselwirkungsenthalpien gegen die Temperatur, dass die ΔC_p der Bindung von CsA an CypG_{PPIase} im Vergleich zur ΔC_p der Bindung von CsA an die Mutante um 114 cal mol⁻¹ K⁻¹ reduziert ist (Abbildung 3).

Der Anteil der Proteinkontaktfläche, die bei der Bindung von CsA unzugänglich wird, beträgt 426 Å² für wt-CypG_{PPIase} und 444 Å² für CypG_{PPIase}(Arg115Ala) (basierend auf der wt-Kristallstruktur). Auf der Grundlage der Änderung der polaren und unpolaren Kontaktfläche^[3] würde diese Zunahme an unzugänglicher Kontaktfläche zu einer Zunahme von ΔC_p der Bindungsreaktion führen. Stattdessen beobachteten wir eine Abnahme von ΔC_p der Bindungsreaktion, die wir dem differenziellen Einschluss von Wassermolekülen im wt-Komplex zuschreiben. Obgleich beim Entfernen der Seitenkette von Arg115 die Austauschgeschwindigkeiten der Wassermoleküle auf den Positionen 2 und 3 verschieden stark

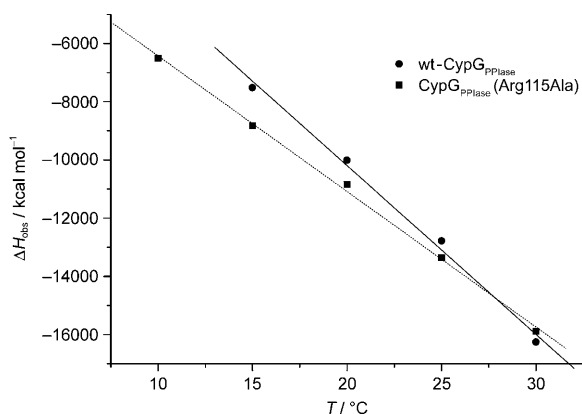


Abbildung 3. Auftragung der integrierten Enthalpien aus kalorimetrischen Titrationsexperimenten (ΔH_{obs}) gegen die Temperatur (T) für die wt-CypG_{PPlase}/CsA- und die CypG_{PPlase}(Arg115Ala)/CsA-Wechselwirkung. Die unterschiedliche Änderung der Wärmekapazität (ΔC_p) bei CsA-Bindung ergibt sich aus den Steigungen der Geraden.

zunehmen (Abbildung 2c), ist anhand der Statistiken keine quantitative Abschätzung der individuellen Beiträge zu ΔC_p der Bindungsreaktion möglich. Unsere Ergebnisse liefern einen experimentellen Wert von $-(57 \pm 21) \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ für die durchschnittliche Wärmekapazitätsänderung aufgrund des Einschusses von einem Wassermolekül in einem Protein-Ligand-Komplex. Dieser Wert stimmt sehr gut mit berechneten Werten und mit Studien an Modellverbindungen überein. Holdgate und Mitarbeiter^[14] schlugen einen Wert von $-(48 \pm 31) \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ vor. Cooper^[5] errechnete eine Änderung von ΔC_p von mindestens $-18 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ pro eingeschlossenem Wassermolekül auf der Grundlage einfacher Gittermodelle. Habermann und Murphy^[15] bestimmten einen Wert von $-(60 \pm 8) \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ pro eingeschlossenem Wassermolekül ausgehend von der Solubilisierung von c(AS)-Diketopiperazin-Kristallen, einer Dipeptid-Modellverbindung, die in kristalliner Form ein Wassermolekül enthält.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass der Austausch einer Aminosäure im aktiven Zentrum eines konservierten Enzyms den Einschluss von Wassermolekülen verursachen kann und dadurch Änderungen in der Thermodynamik der Wechselwirkung mit Liganden hervorrufen kann.

Eingegangen am 25. Januar 2009,
veränderte Fassung am 18. März 2009
Online veröffentlicht am 4. Juni 2009

Stichwörter: Biophysik · Isomerasen · Moleküldynamik · Strukturbiochemie · Wirkstoffdesign

- [1] R. Perozzo, G. Folkers, L. Scapozza, *J. Recept. Signal Transduction Res.* **2004**, 24, 1.
- [2] K. P. Murphy, D. Xie, K. C. Garcia, L. M. Amzel, E. Freire, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1993**, 15, 113.
- [3] R. S. Spolar, J. R. Livingstone, M. T. Record, Jr., *Biochemistry* **1992**, 31, 3947.
- [4] N. V. Prabhu, K. A. Sharp, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2005**, 56, 521.
- [5] A. Cooper, *Biophys. Chem.* **2005**, 115, 89.
- [6] C. S. Poornima, P. M. Dean, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1995**, 9, 500.
- [7] J. M. Sturtevant, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, 74, 2236.
- [8] J. E. Ladbury, J. G. Wright, J. M. Sturtevant, P. B. Sigler, *J. Mol. Biol.* **1994**, 238, 669.
- [9] S. Bergqvist, M. A. Williams, R. O'Brien, J. E. Ladbury, *J. Mol. Biol.* **2004**, 336, 829.
- [10] L. Cavarec, T. Kamphausen, B. Dubourg, I. Callebaut, F. Le-meunier, D. Metivier, J. Feunteun, G. Fischer, N. Modjtahedi, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 41171.
- [11] F. P. Nestel, K. Colwill, S. Harper, T. Pawson, S. K. Anderson, *Gene* **1996**, 180, 151.
- [12] V. Mikol, J. Kallen, G. Pflugl, M. D. Walkinshaw, *J. Mol. Biol.* **1993**, 234, 1119.
- [13] G. Pflugl, J. Kallen, T. Schirmer, J. N. Jansonius, M. G. Zurini, M. D. Walkinshaw, *Nature* **1993**, 361, 91.
- [14] G. A. Holdgate, A. Tunnicliffe, W. H. Ward, S. A. Weston, G. Rosenbrock, P. T. Barth, I. W. Taylor, R. A. Pauptit, D. Timms, *Biochemistry* **1997**, 36, 9663.
- [15] S. M. Habermann, K. P. Murphy, *Protein Sci.* **1996**, 5, 1229.