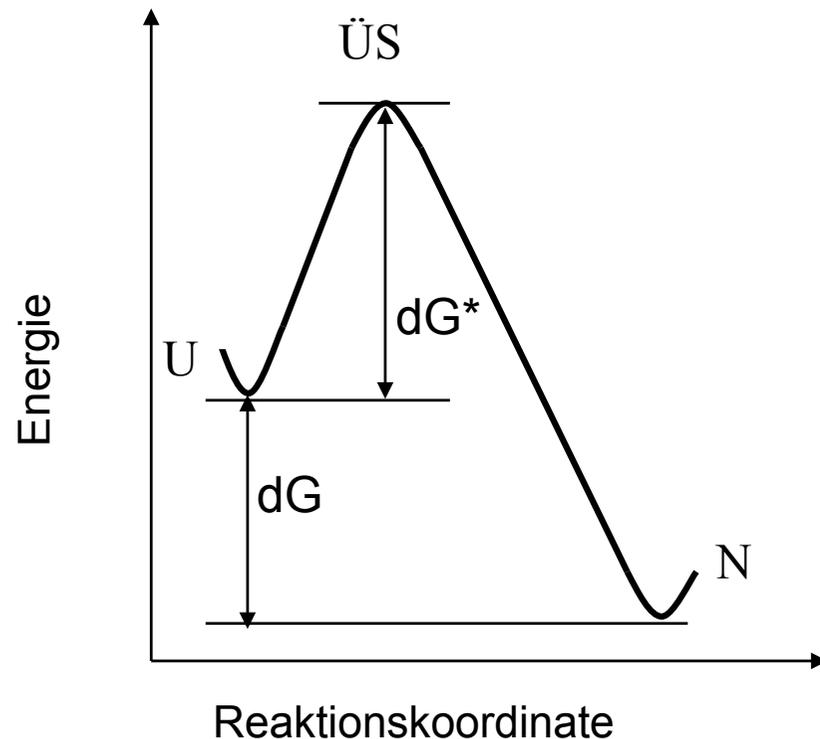


# Falschfaltung von Proteinen

- Aggregation
- domain swapping
- amyloidogene Strukturen

# Was determiniert die Faltung von Proteinen ?

Einfachstes System: **Zwei-Zustandsmodell**  $N \longleftrightarrow U$

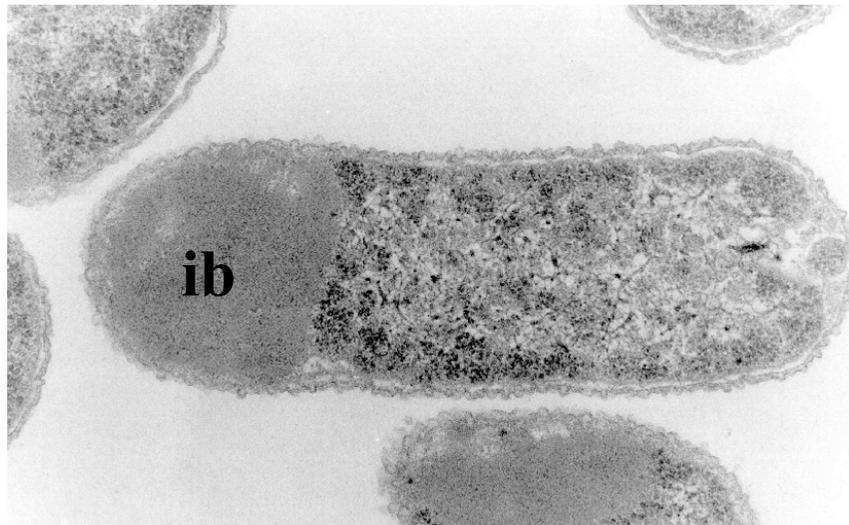


Molekulare Wechselwirkungen:

- H-Brücken
- Ionische Wechselwirkungen
- van der Waals Ww.
- hydrophober Effekt

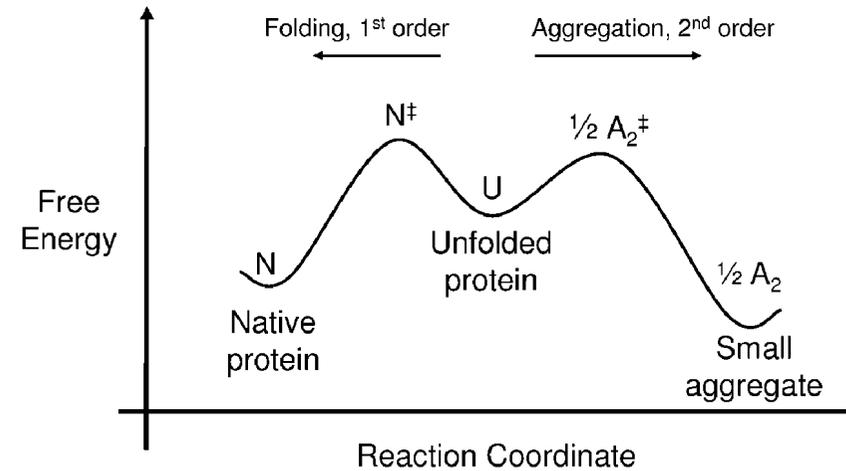
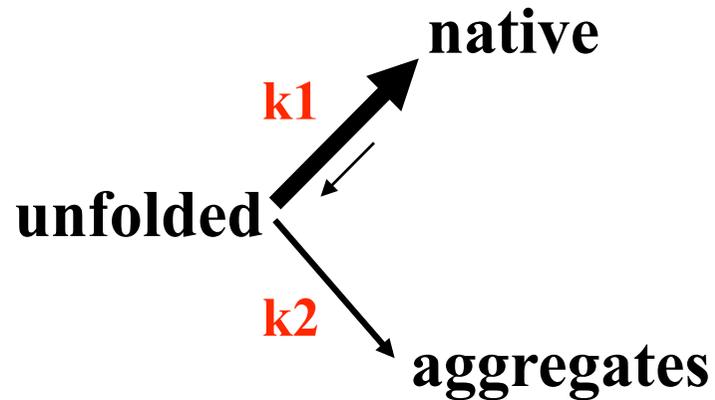
# Aggregation von Proteinen

**Überexpression rekombinanter  
Proteine in *E. coli* führt häufig zur  
Bildung von inclusion bodies (ib's)**

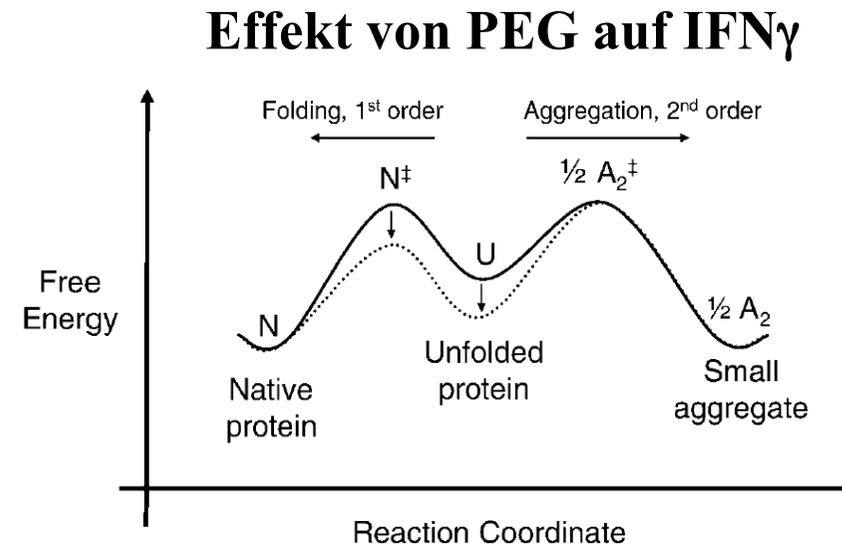
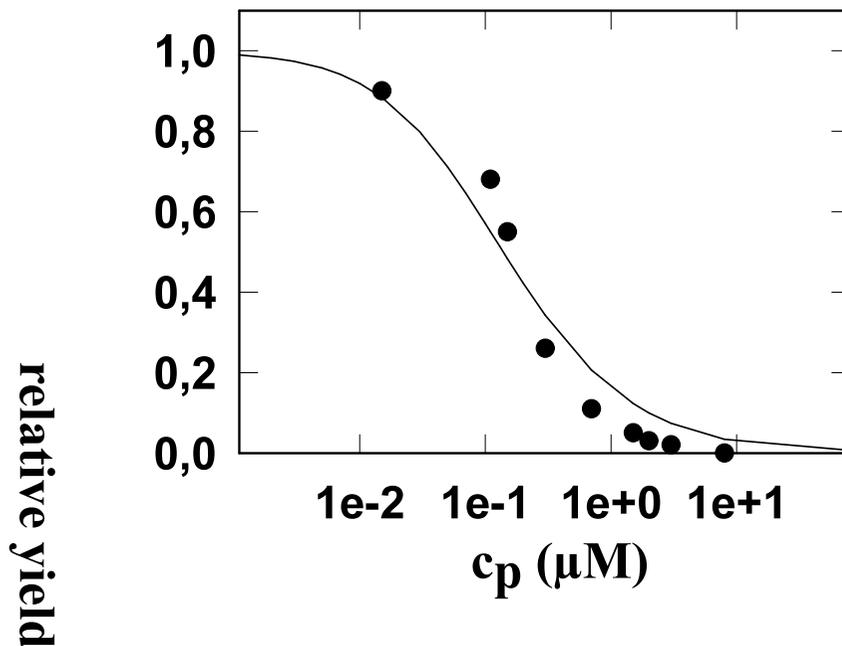


Elektronenmikroskopisches Bild einer  
Antikörper-produzierenden *E. coli* Zelle

# Kinetische Konkurrenz zwischen Faltung und Aggregation

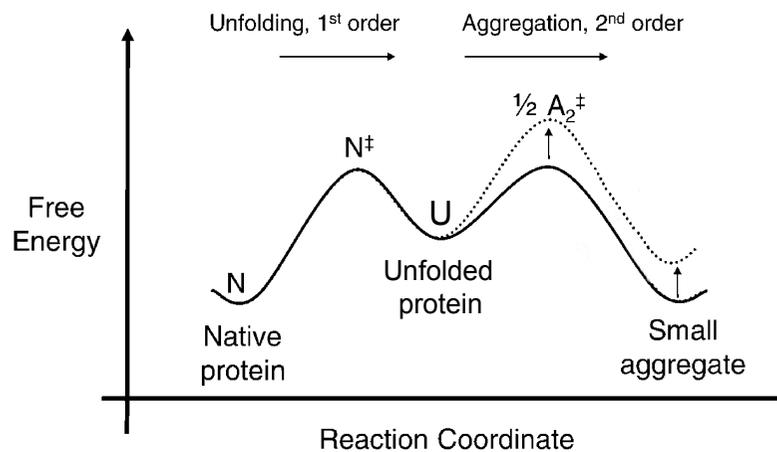


$$\text{Yield} = \frac{k_1}{k_2 \times [U]} \times \ln(1 + k_2 \times [U])$$

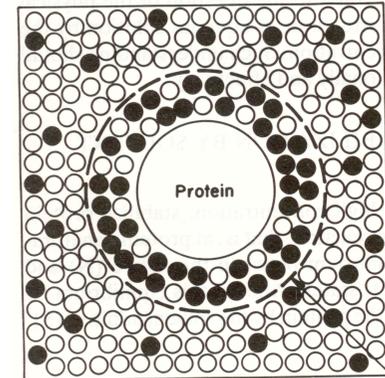


# Kinetische Konkurrenz zwischen Faltung und Aggregation

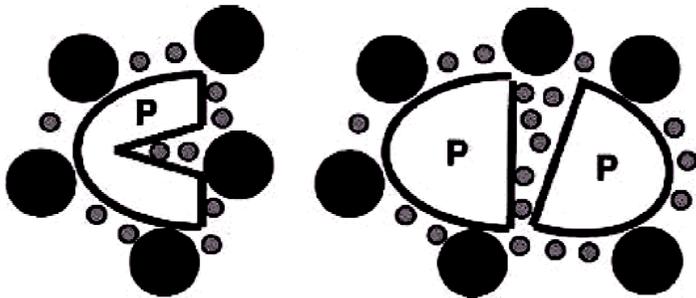
## Effekt von Arginin auf Proteinassoziation / aggregation



preferential binding  
↓  
verhindert Aggregation  
aber  
destabilisiert Struktur

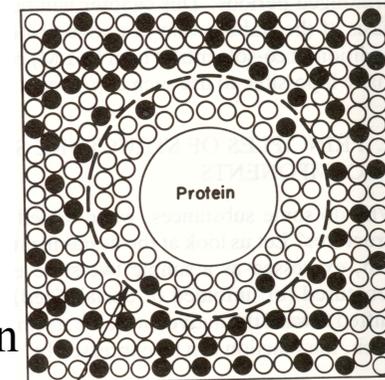


„gap effect“ verlangsamt Aggregationskinetik

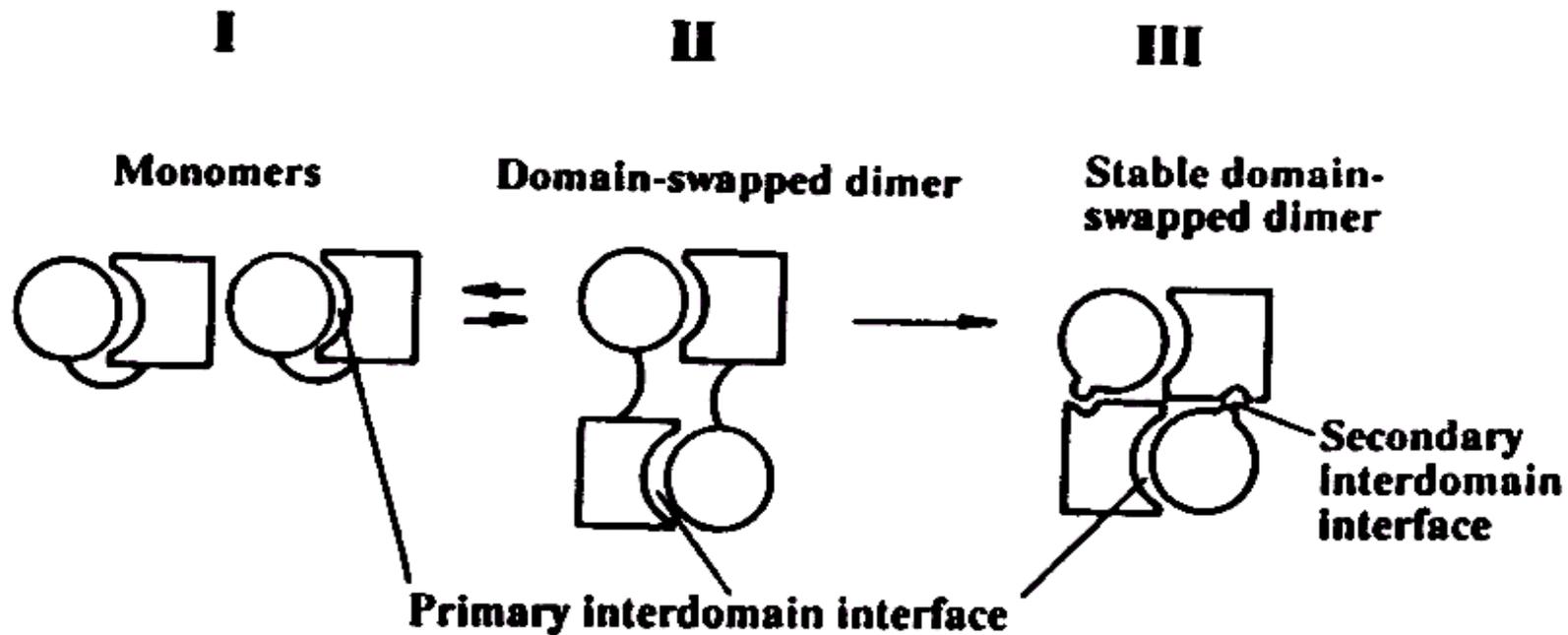


○ water      ● arginine

preferential hydration  
↓  
stabilisiert Struktur  
aber  
induziert oft Aggregation  
während Renaturierung



# Domain swapping



- Domain swapping  $\longrightarrow$  Evolution von Monomeren zu Dimeren
- Produkt von domain swapping  $\longrightarrow$  Dimere,  
aber auch größere Assoziante  $\longrightarrow$  Viruskapsids
- $\longrightarrow$  Aggregation

# Domain swapping

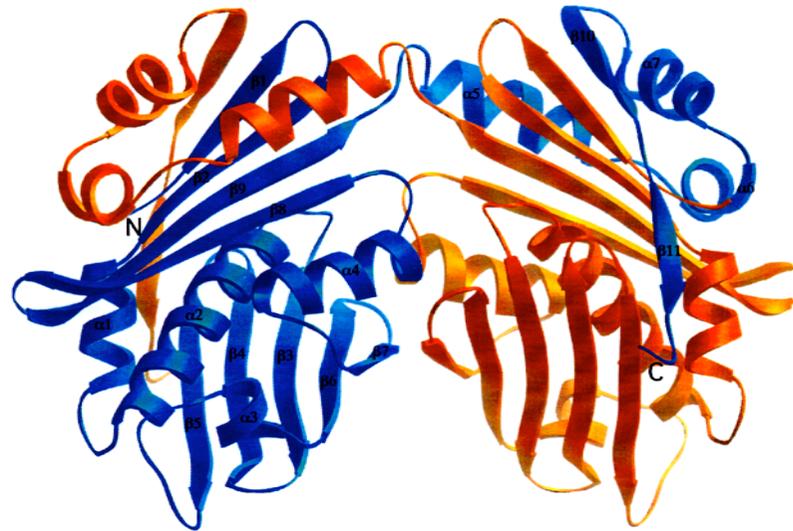
## Austausch

von Domänen



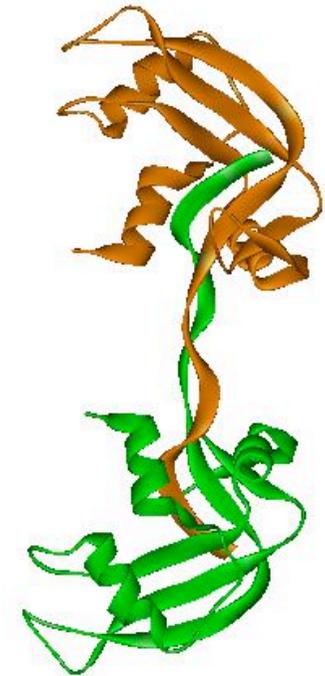
Crystallins

Supersekundärstrukturen



Hsp 33

einzelnen Sekundärstrukturelementen

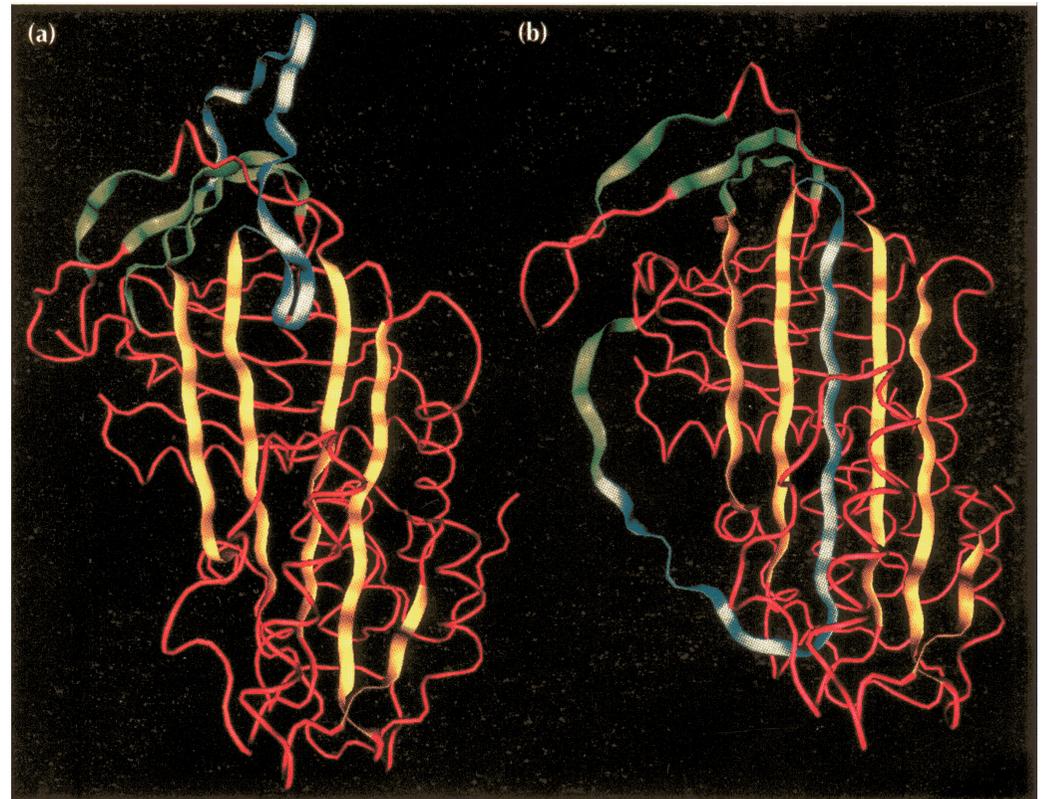


RNase A

# Domain swapping als Mechanismus der Aggregation

## Beispiel: Antithrombin

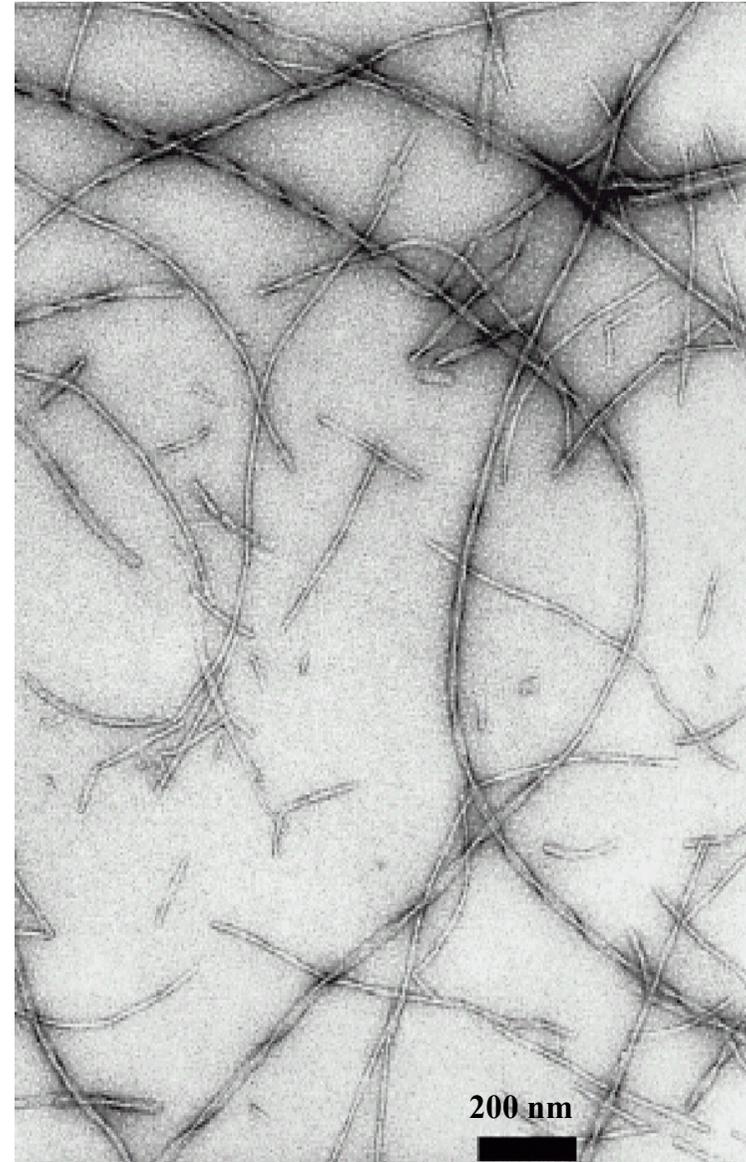
- gehört zur Klasse der Serpine (Serinproteaseinhibitor)
- ca. 400 AS
- single use-Molekül
- 3 Arten von Konformationen:
  - ungespalten
  - aktiviert (Übergangszustand, gebunden an Protease)
  - gespalten oder latent (inaktiv)



bei Antithrombin kann der 5.  $\beta$ -Strang von anderem Molekül kommen  
=> Polymerisation

# Amyloidogene Strukturen - Fibrillenbildung

- Struktur der Fibrillen
- Mechanismus der Fibrillenbildung
- Inhibition der Fibrillenbildung  
→ Therapie



# Fibrillenbildung

- Trinukleotidexpansionen -> Polyaminosäuresequenzen
  - Poly-Gln: Huntingtin (N-terminal bis zu 200 Gln)  
Ure2p (N-terminale Domäne > 45 % Gln/Asn)
  - Poly-Ala: PABPN1 (10-17 Ala N-terminal)  
Hox13
- inhärente Eigenschaft der Proteinsequenz
  - Wildtypprotein häufig unter sauren Bedingungen
  - Mutanten unter physiologischen Bedingungen

# Amyloidogene Strukturen

## - Assoziierte Krankheiten -

<b>Disease</b>	<b>Protein</b>
Morbus Alzheimer	APP/Alzheimer- $\beta$ -Peptid (1-40, 1-42, 1-43); Tau-Protein
Transmissible Spongiforme Enzephalopathie (CJD, Kuru, BSE, Scrapie) - TSE	Prion-Protein
Chorea Huntington	Huntingtin
Morbus Parkinson	$\alpha$ -Synuclein

# Amyloidogene Strukturen

## - Assoziierte Krankheiten -

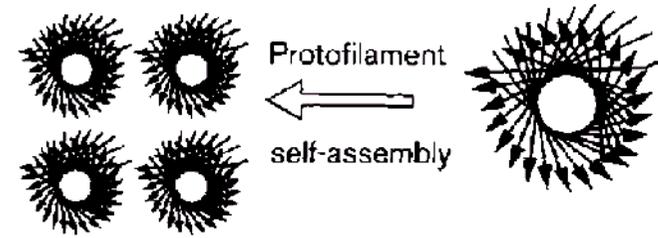
<b>Disease</b>	<b>Protein</b>
Injektionslokalisierte Amyloidose	Insulin
$\beta$ -2-Mikroglobulin-Amyloidose	$\beta$ -2-Mikroglobulin
Vererbte Cerebrale Amyloide Angiopathie	Cystatin C
Primäre Asystemische Amyloidose	Immunglobulin
Finnische Vererbte Systemische Amyloidose	Gelsolin
Atriale Amyloidose	Atrial Natriuretic Factor
Familiäre Amyloide Polyneuropathie	Transthyretin
Medullaria-Carcinom der Schilddrüse	Calcitonin
Vererbte Nichtneuropathische Amyloidose	Lysozym
<i>Diabetes mellitus</i> Typ II	Islet-Amyloid-Polypeptid
Reaktive Asystemische Amyloidose	Lipoproteine
Cleidocraniale Dysplasie	Transkriptionsfaktor CBFA1
Vererbte Renale Amyloidose	Fibrinogen
Okularpharyngeale Muskeldystrophie	Poly(A)-Bindungsprotein II

# Fibrillierung von Transthyretin

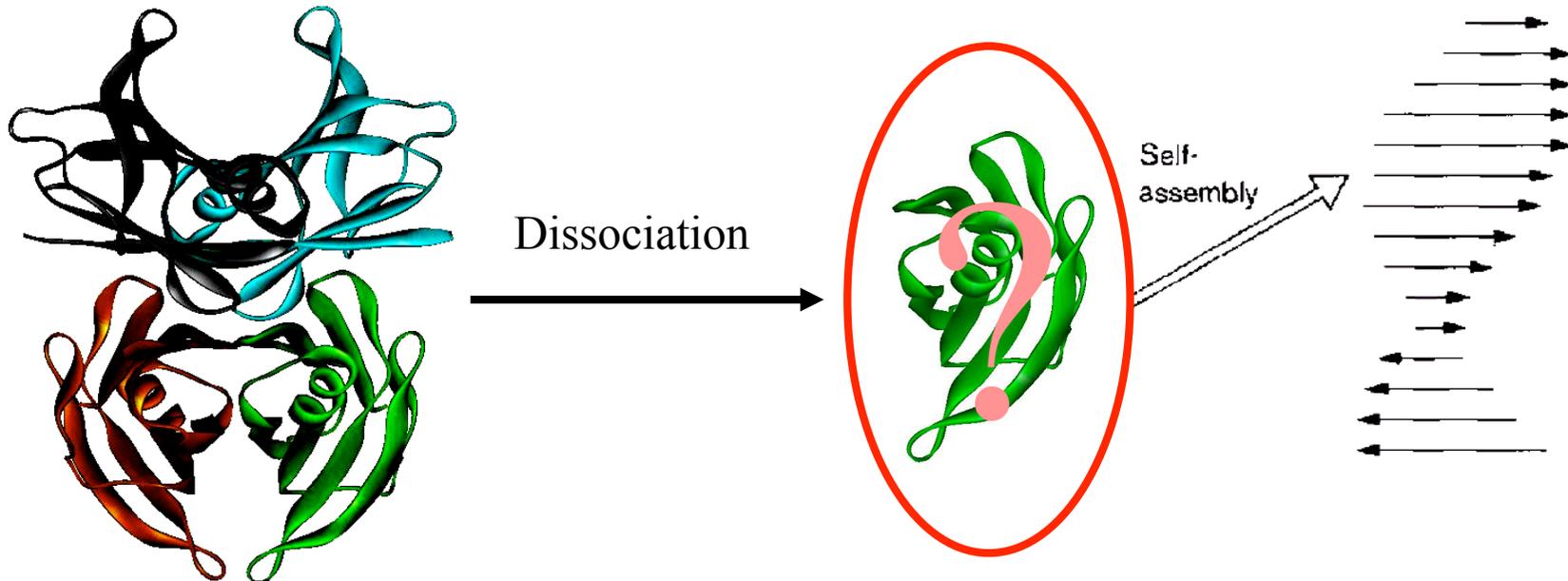
Homotetramer

transportiert Thyroxin

Fibrillierung - pH < 4.5 (wt)  
- pH 7 (Mutanten)



Stabilisierung des Tetramers  
verhindert Fibrillierung



# Fibrillierungs-kompetenter Zustand von Transthyretin

H/D exchange experiment:

completely deuterated protein



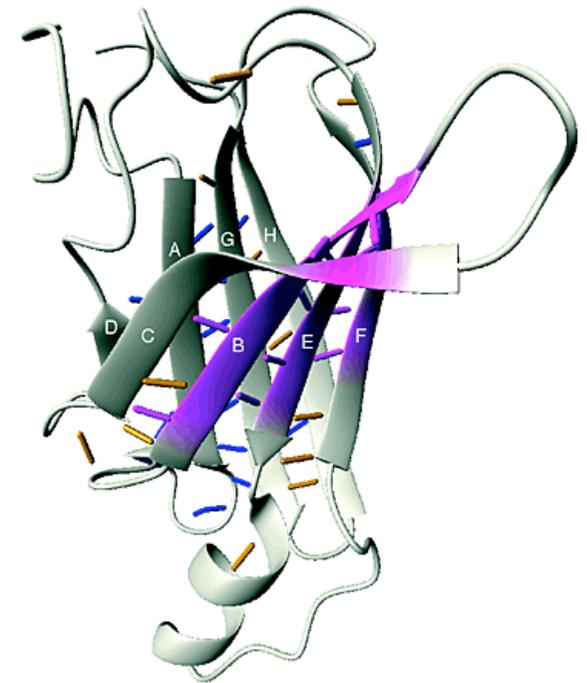
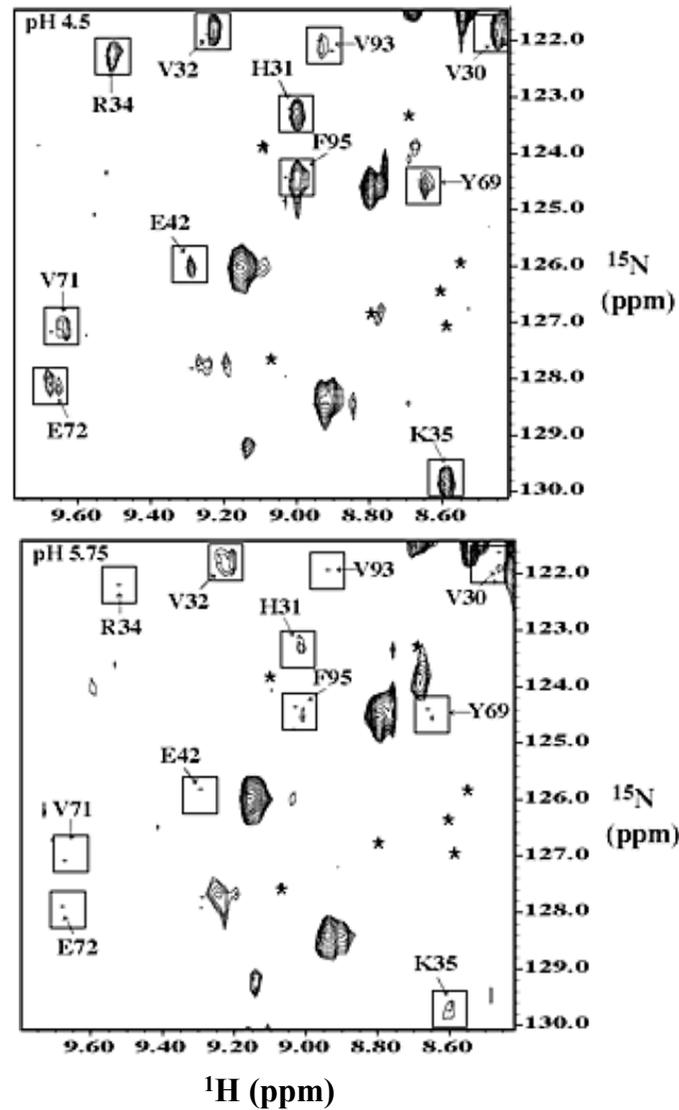
dilution into buffer at 8  $\mu\text{g/ml}$   
pH either pH 4.5 or pH 5.8



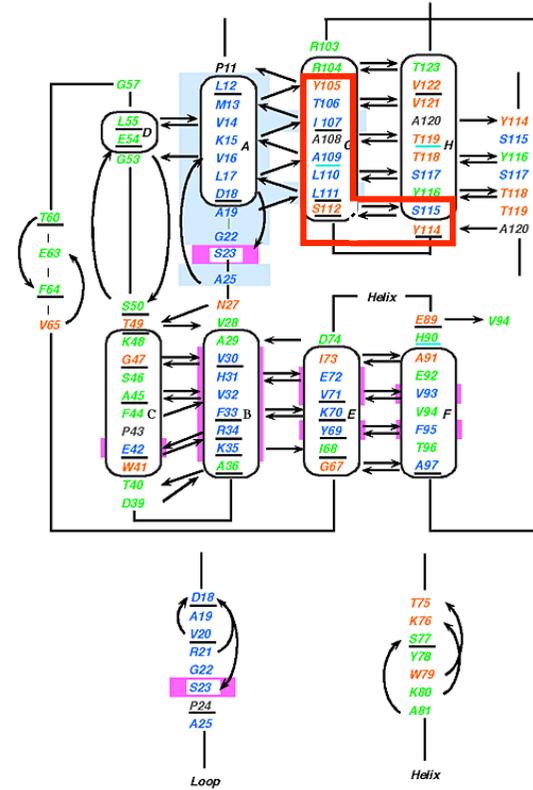
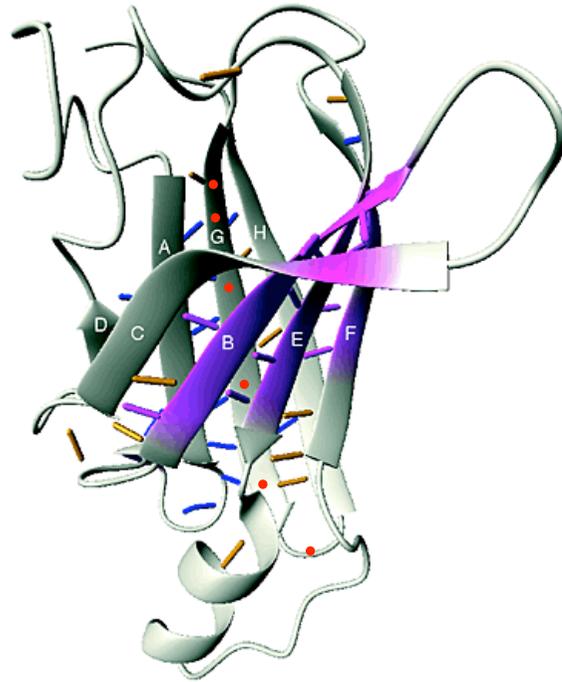
shift to native conditions,  
concentrating to 10  $\text{mg/ml}$



2D NMR

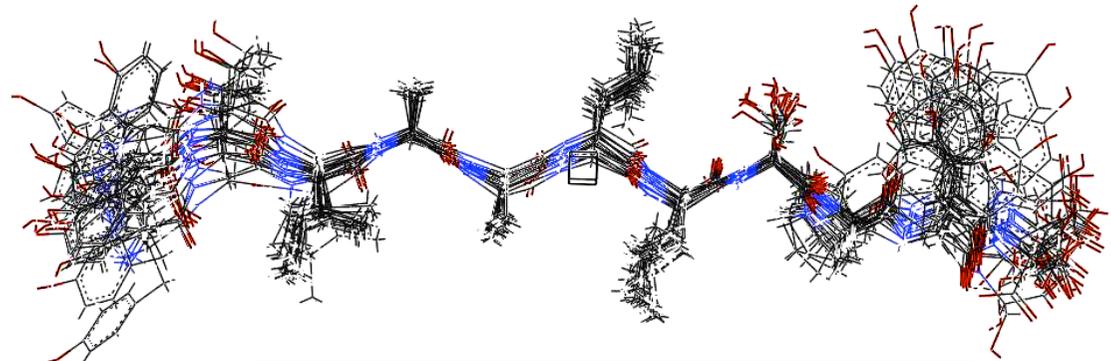


# Struktur eines Transthyretinpeptides in Fibrillen



Solid state NMR (magic angle)  
von einem Transthyretinpeptid  
in Fibrillen

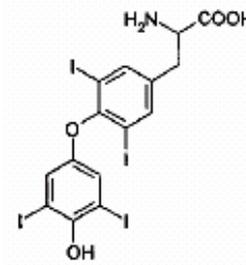
→ gestreckte Konformation  
( $\beta$ -sheet)



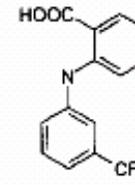
Peptid 105-115 von Transthyretin

# Inhibition der Fibrillierung von Transthyretin

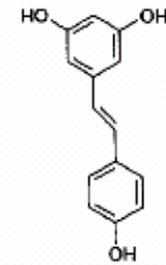
Stabilisierung des tetrameren  
Zustandes durch Liganden



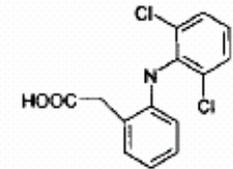
Thyroxine (T4)



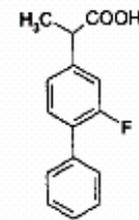
1. Flufenamic acid



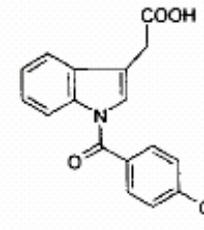
2. Resveratrol



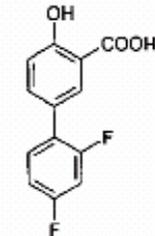
3. Diclofenamic acid



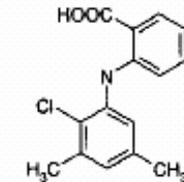
4. Flurbiprofen



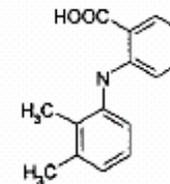
5. Indomethacin



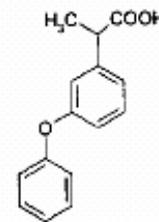
6. Diflunisal



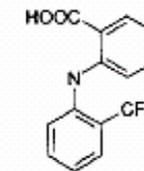
7. Meclofenamic acid



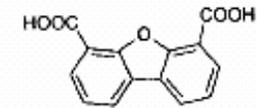
8. Mefenamic acid



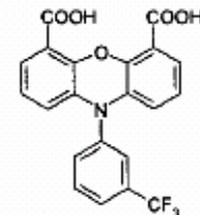
9. Fenoprofen



10. o-FLU



11. DDBF



12. PHENOX

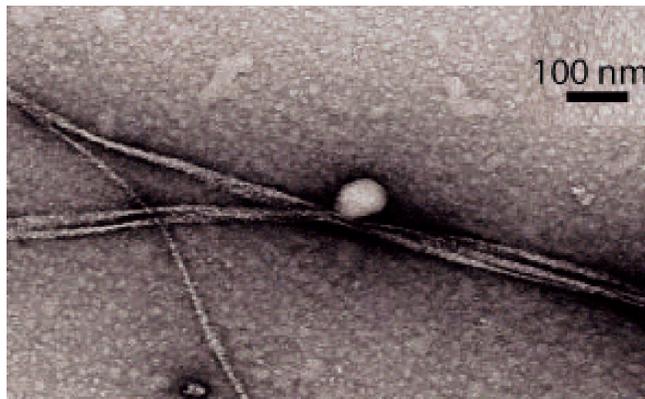
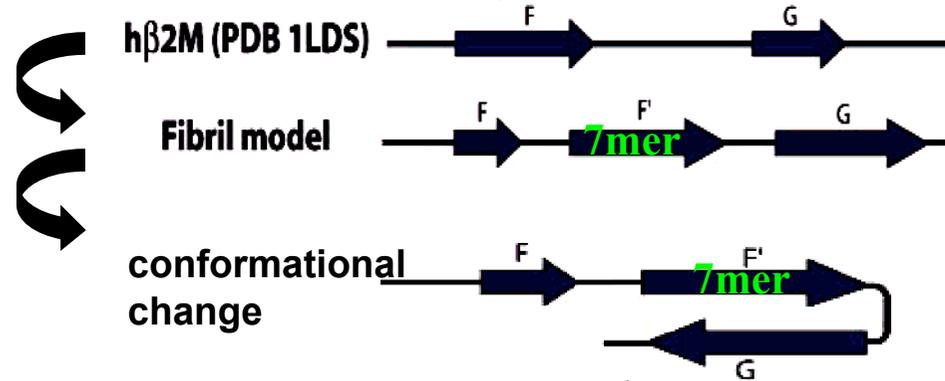
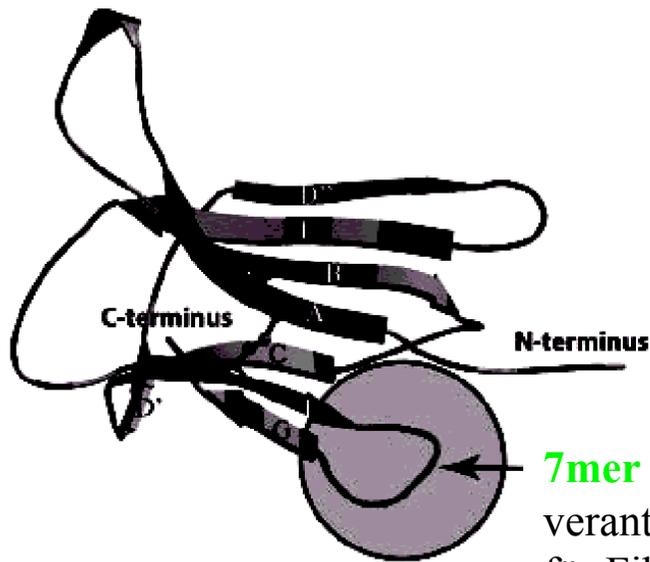
# Inhibition der Fibrillierung von Transthyretin

## Stabilisierung des tetrameren Zustandes durch Liganden

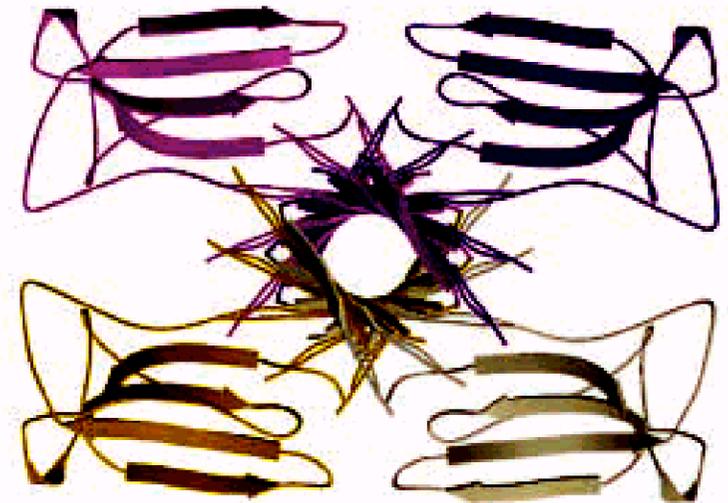
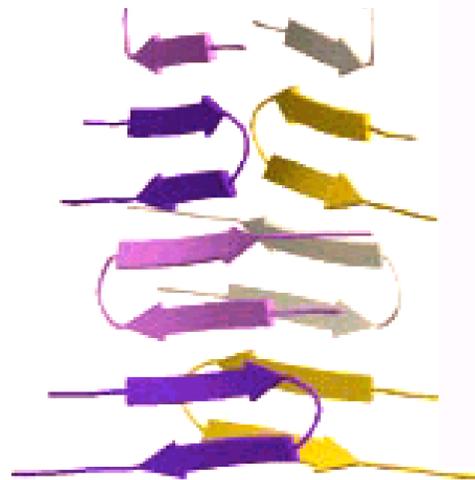
Table 1 TTR amyloid fibril inhibition<sup>1</sup>

Inhibitor	Fibril formation <sup>2</sup> (%) at 7.2 $\mu$ M	Fibril formation <sup>2</sup> (%) at 3.6 $\mu$ M	Fibril formation <sup>2</sup> (%) at 1.8 $\mu$ M
Flufenamic acid (1)	2	30	65
Resveratrol (2)	6	34	66
Diclofenac (3)	17	37	66
Flurbiprofen (4)	29	56	77
Indomethacin (5)	48	70	86
Diflunisal (6)	2	17	56
Meclofenamic acid (7)	3	31	63
Mefenamic acid (8)	7	38	67
Fenoprofen (9)	8	26	50
oFLU (10)	9	36	66
DDBF (11)	20	54	81
PHENOX (12)	3	27	67

# Amyloid **Modell** von $\beta$ 2-Mikroglobulin ( $\beta$ 2M)

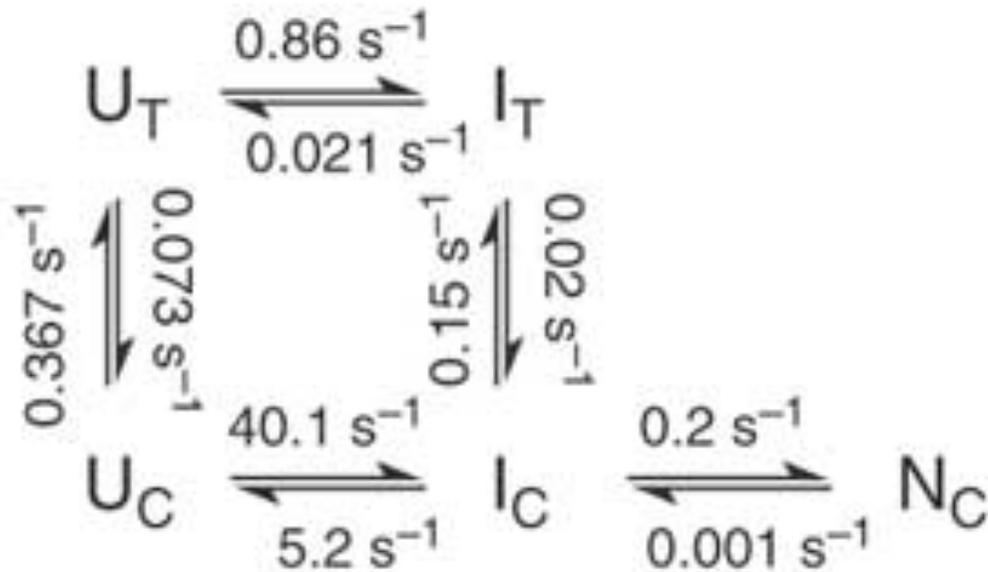


**Fibrillierung**

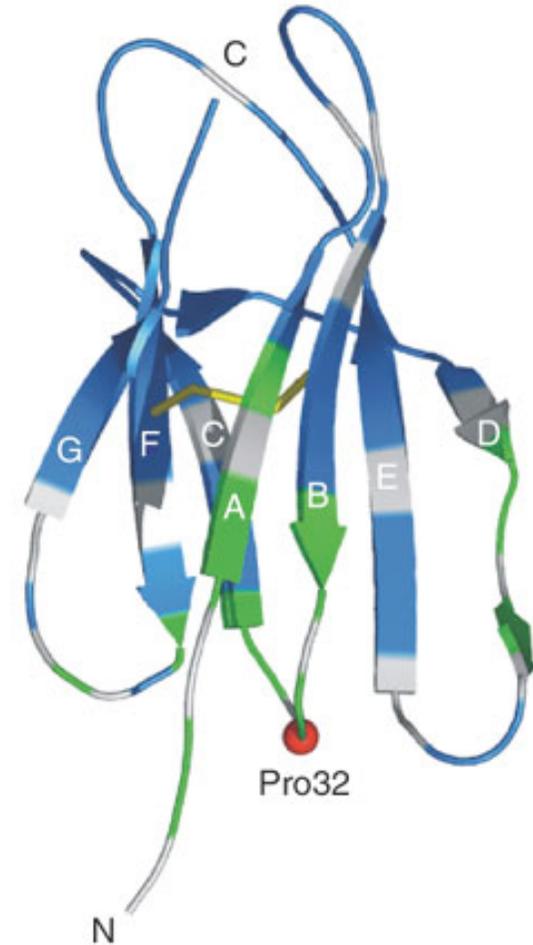


Modell einer vollständigen Fibrille  
(top view)

# Beziehung von Faltung und Fibrillierung von $\beta$ 2M



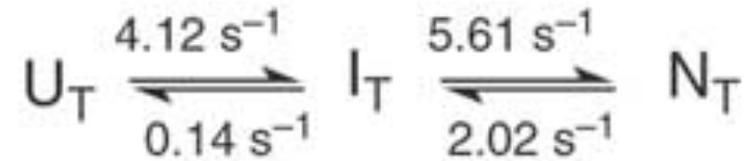
$U_T$  denaturiert (unfolded) mit Pro32 in trans  
 $U_C$  denaturiert mit Pro32 in cis (native Konformation)  
 $I_T$  und  $I_C$  Faltungsintermediate  
 $N_C$  natives Protein mit Pro32 in cis



$I_T$  unter Nativbedingungen zu 3.7 % populiert;  
möglicher Ausgangspunkt für Fibrillierung

# Änderung des Faltungsweges von $\beta$ 2M

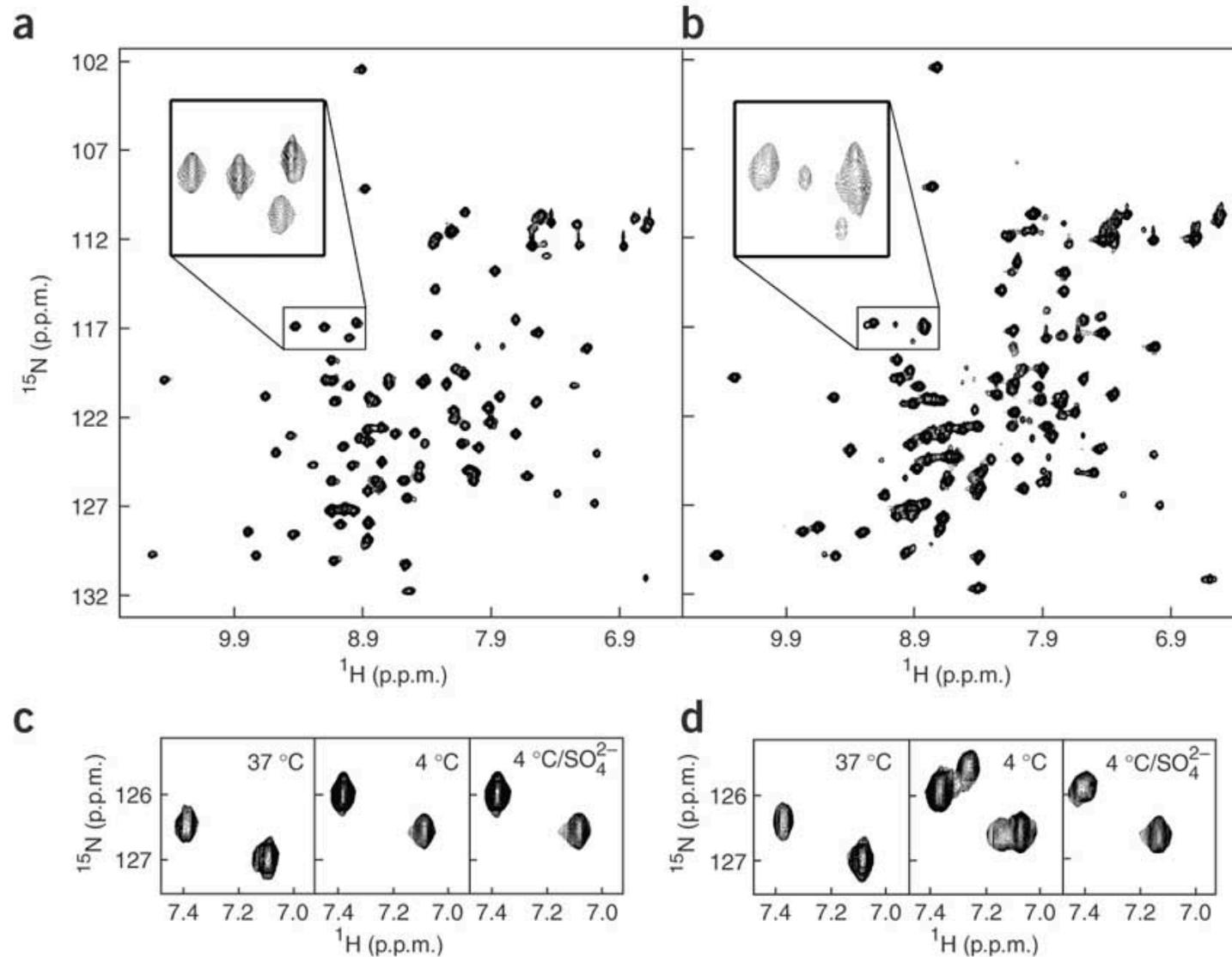
## - Austausch von Pro32 gegen Gly -



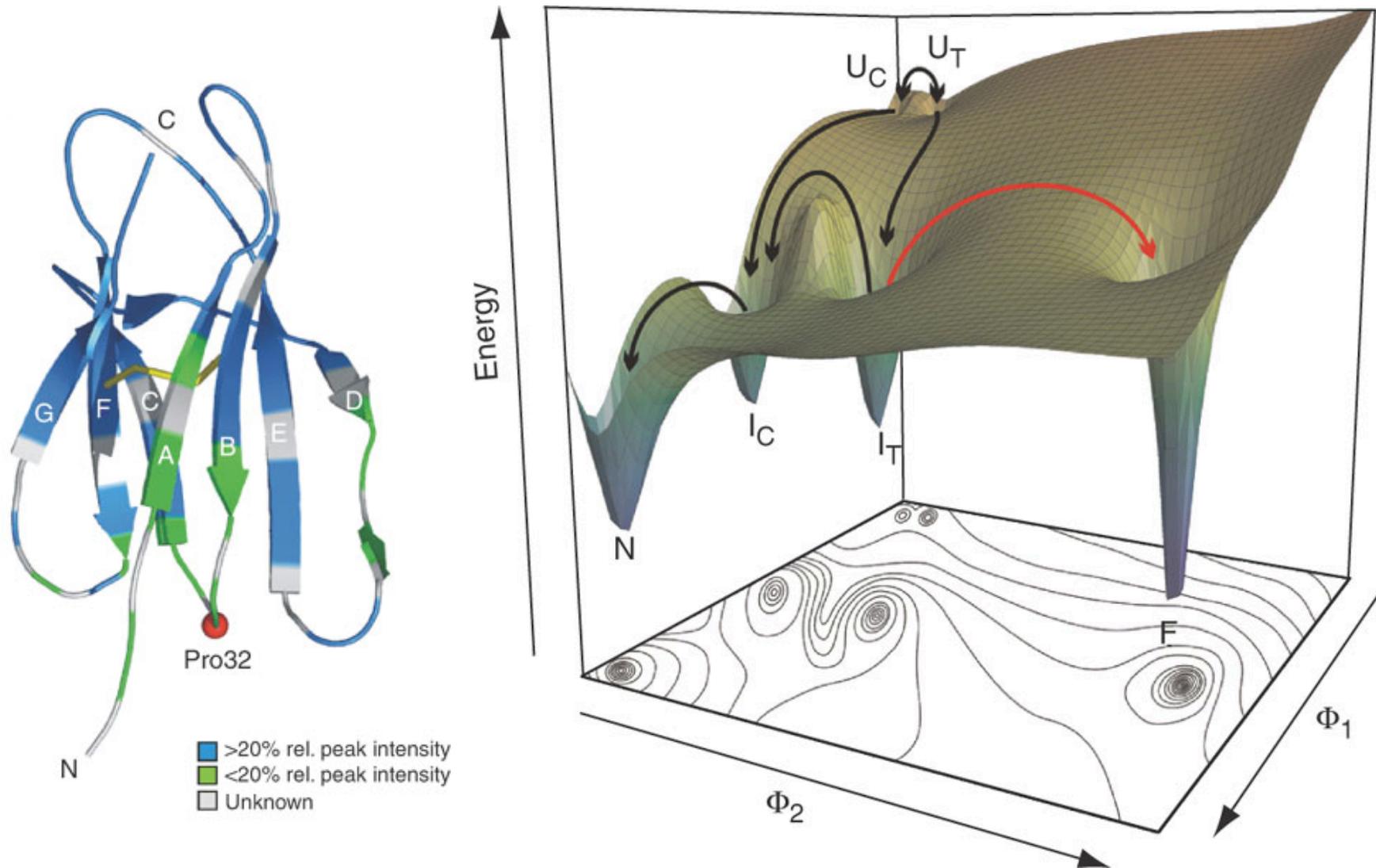
- Peptidbindung von Glycin liegt nur in trans vor  
=> Vereinfachung des Faltungsweges
- Intermediat ist zu ca. 30 % populiert
- Mutante zeigt verstärkte Fibrillierung

# Strukturelle Analyse des Faltungsintermediates $I_T$

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -NMR-measurements at 37°C, pH 7



# Strukturelle Analyse des Faltungsintermediates $I_T$



# Take Home Message

## Nebenreaktionen zur Faltung (off pathway reactions)

- basieren auf der gleichen Art von Wechselwirkung wie die Faltung (hydrophober Effekt dominiert)
- Irreversibilität der Nebenreaktionen meist durch Aggregation (oder andere Art der Assoziation)
- Grundlage für Aggregation/Assoziation sind strukturierte Bereiche von Proteinen
- Wechselwirkungen in Aggregaten/Assoziaten können (müssen aber nicht) nativ-ähnlich sein
- Erfolg der Faltung abhängig vom Verhältnis der Aktivierungsenergien für on- und off-pathway Reaktionen (kinetic competition) (Aggregation/Assoziation Reaktion höherer Ordnung -> bevorzugt bei hohen Proteinkonzentrationen)