

Aus dem Institut für Biochemie/Biotechnologie,  
Fachbereich Biochemie, Abteilung Enzymologie

## **Beiträge zur Stabilität, Faltung und strukturellen Integrität von Proteinen**

**H a b i l i t a t i o n s s c h r i f t**  
Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium habitatus (Dr. rer. nat. habil.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Dr. rer. nat. Ralph Golbik  
geboren am 20.11.1959 in Schlema (Sachsen)

Gutachter:

- |                              |                   |
|------------------------------|-------------------|
| 1. Prof. Dr. Jochen Balbach  | Halle/Saale       |
| 2. Prof. Dr. Gerhard Hübner  | Halle/Saale       |
| 3. Prof. Dr. Rainer Jaenicke | Schwalbach/Taunus |
- Halle/Saale, den 29.07.2005

**urn:nbn:de:gbv:3-000008890**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008890>]

## INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Abkürzungsverzeichnis	4
2. Einleitung	6
3. Modelle der Proteinfaltung und Determinanten	24
4. <i>Cis / trans</i> –Isomerisierung von Peptidyl-prolyl-Bindungen als langsame Konformationsänderungen und deren Katalyse durch Peptidyl-prolyl- <i>cis / trans</i> –Isomerasen	27
4.1. Eigenschaften von Peptidyl-prolyl-Bindungen (Prolylbindungen)	27
4.2. Effekte von Substituenten am Pyrrolidinring von Prolinresten auf das Gleichgewicht und die Konversion von Rotameren	32
4.3. Isomerisierung von Prolylbindungen als langsame Faltungsreaktionen von Proteinen	37
4.4. Katalyse der Isomerisierung von Prolylbindungen durch Peptidyl-prolyl- <i>cis / trans</i> -Isomerasen (PPlasen)	41
5. Molekulare Chaperone (GroEL)	45
6. Faltung und Stabilität globulärer Eindomänenproteine	47
6.1. Allgemeine Erkenntnisse	47
6.2. Barstar	47
7. Zusammenfassung der Forschungsergebnisse an Barstar	54
7.1. Barstar C40A/C82A/P27A (Barstar <i>pseudo</i> –Wildtyp) als Modellprotein der Prolylisomerisierung	54

7.2.	Formierung struktureller Elemente im Faltungsprozeß von Barstar <i>pseudo</i> -Wildtyp	55
7.3.	<i>Protein engineering</i> nichtkanonischer Aminosäuren in Barstar <i>pseudo</i> -Wildtyp durch SPI ( <i>selective pressure incorporation</i> , Einbau durch Selektionsdruck)	60
7.4.	Wirkung von PPlasen auf die Konformationsfaltung von Barstar <i>pseudo</i> -Wildtyp und von Varianten mit 4-substituierten Fluorprolinanaloga	63
7.5.	Fibrillenbildung von Barstar <i>pseudo</i> -Wildtyp	64
8.	Zusammenfassung der Forschungsergebnisse zur apikalen Domäne von GroEL	67
8.1.	Thermodynamische Stabilität und Faltung von Fragmenten des Chaperonins GroEL (apikale Domäne, Minichaperone)	67
8.2.	Bindung von <i>bis</i> -ANS – hydrophobe Bereiche	69
8.3.	Chaperonaktivität löslicher und immobilisierter ( <i>column refolding</i> ) Minichaperone	71
9.	Zusammenfassung der Untersuchungen zu Kollagen IV	72
9.1.	Struktur und Faltung von Kollagen	72
9.2.	Kollagen IV als Bestandteil der Basalmembran	73
9.3.	Untersuchungen zur thermischen Stabilität des Bindungsbereiches des Integrins $\alpha_1\beta_1$ (VLA1) an Kollagen IV	74
9.4.	Bestimmung des Rasters der Kollagenketten im Bereich der Bindungsstelle des Integrins $\alpha_1\beta_1$ (VLA1) mittels Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET)	75
10.	Literaturverzeichnis	77
11.	Tabellen	103
12.	Schemata	115
13.	Anhang (Publikationen)	119

## 1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ANS	1-Anilino-naphthalen-8-sulfonsäure (Natriumsalz)
<i>bis</i> -ANS	4,4'-Dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-disulfonsäure (Dinatriumsalz)
CI2	Chymotrypsininhibitor 2
CFIS-Modell	<i>chain-folding initiation site</i> –Modell (Modell der Faltung einer Polypeptidkette, beginnend an einer bestimmten Stelle oder einem bestimmten Bereich)
DSC	<i>differential scanning calorimetry</i>
FRET	Fluoreszenzresonanzenergietransfer
Gl.	Gleichung(en)
ISP	isomerspezifische Proteolyse
ITC	isothermale Kalorimetrie
LFE	lineare freie Enthalpiebeziehung
MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laserdesorptions / Ionisations-Massenspektrometrie ( <i>matrix-assisted laser desorption / ionisation mass spectrometry</i> )
PDlase	Protein-Disulfidisomerase
PPlase	Peptidyl-prolyl- <i>cis</i> / <i>trans</i> -Isomerase
RNAse	Ribonuklease
SPI	<i>selective pressure incorporation</i> (Einbau nichtkanonischer Aminosäuren in Proteine durch Selektionsdruck)
TS	Übergangszustand
UV	ultraviolett
VLA1	Integrin $\alpha_1\beta_1$ ( <i>very late antigene 1</i> )

Die in der Fachliteratur allgemein verwendeten Abkürzungen für chemische oder biochemische Sachverhalte und Begriffe sind nicht im Abkürzungsverzeichnis

enthalten. Die im Text verwendeten Anglizismen sind durch kursive Schreibweise gekennzeichnet. Sie sind auch genannt, wenn ein äquivalenter deutscher Ausdruck oder Fachbegriff existiert. Teilweise sind diese Anglizismen Bestandteil der deutschen Fachsprache in zusammengesetzten Wörtern und sind in diesen ebenfalls durch kursive Schreibweise gekennzeichnet.

Die mit **(R)** markierten Referenzen befinden sich im Anhang der Habilitationsschrift.

## 2. EINLEITUNG

Die Chemie und Biochemie von Proteinen ist ein Zweig der naturwissenschaftlichen Forschung, dem eine immer größere Bedeutung in der menschlichen Gesellschaft zukommt. Proteine sind ein integraler Bestandteil der uns bekannten Lebensformen. Die vorliegende Habilitationsschrift enthält Beiträge zur Stabilität, Faltung und Funktionalisierung von Proteinen, mit denen sich der Autor im Rahmen seiner wissenschaftlichen Arbeiten beschäftigt hat. Die behandelten Fragestellungen sind von der Thematik und bezüglich der untersuchten Objekte sehr heterogen. Die Habilitationsschrift enthält in den Zusammenfassungen der Forschungsergebnisse die wissenschaftliche Abhandlung von Beiträgen, die wesentlich für das jeweils dargestellte Projekt waren. Im Anhang sind die wissenschaftlichen Publikationen kumulativ zusammengefaßt.

Das Verständnis, wie eine Proteinkette nach ihrer Synthese am Ribosom ihre native, funktionelle Struktur erreicht, ist bis heute eine der ungelösten wissenschaftlichen Fragestellungen in die Natur. Es sind heute 32 unterschiedliche Typen der Architektur von Proteindomänen (*folds*) bekannt (Thornton *et al.*, 1999). Wu publizierte 1931 eine erste Arbeit zur Theorie der Denaturierung von Proteinen (Wu, 1931; Wu, 1995). Die Bedeutung nichtkovalenter Wechselwirkungen bei der thermodynamischen Behandlung der Stabilität von Proteinen wurde wesentlich durch die Arbeiten von LINDERSTRØM-LANG, LUMRY, KLOTZ und KAUZMANN in den fünfziger Jahren des vorigen Jahrhunderts herausgearbeitet. KAUZMANN postulierte, daß der hydrophobe Effekt die treibende Kraft des Faltungsprozesses sei (Kauzmann, 1959). Das Problem der Proteinfaltung wurde von ANFINSEN 1973 formuliert (Anfinsen, 1973). Er stellte fest, daß reduzierte und denaturierte Ribonuklease A vollständig renaturierbar ist. Der Schlüssel für die korrekte Faltung einer Polypeptidkette muß daher in ihrer Aminosäuresequenz enthalten sein (Faltungscode). Diese These wird als ANFINSEN-Postulat bezeichnet und beinhaltet eine thermodynamische Kontrolle der Proteinfaltung (Yon, 2002). Die fundamentale Frage, wie die Aminosäuresequenz die Faltung eines Proteins codiert ist der Inhalt des *foldings problems*.

Daß der Faltungsprozeß gerichtet sein muß, ist auch durch das von LEVINTHAL 1968 aufgestellte Paradoxon ersichtlich (Levinthal, 1968). Danach würde die Zeit für eine statistische Suche der richtigen bzw. funktionellen Konformation ausgehend von

der entfalteten Polypeptidkette viel zu lange dauern, um Lebensprozesse zu ermöglichen. Diese Betrachtung von LEVINTHAL und auch von WETLAUFER (Wetlaufer, 1973) begreift den Faltungsprozeß mehr unter kinetischer Kontrolle. Eine zufällige Suche nach der richtigen Konformation scheint deshalb unrealistisch.

Proteine können einen nativen, gefalteten und einen denaturierten, ungefalteten Zustand einnehmen, wobei letzterer einen statistischen Mittelwert von Zuständen beschreibt, die sich enthalpisch und entropisch stark voneinander unterscheiden können. Die thermodynamische Stabilität eines Proteins beschreibt die Energiedifferenz zwischen diesen beiden Zuständen und beträgt für die meisten bisher untersuchten Proteine nur zwischen 3 bis 15 kcal mol<sup>-1</sup> (Fersht, 1999). Diese Energiedifferenzen werden experimentell anhand thermisch oder chemisch induzierter Übergänge vom nativen in den denaturierten Zustand bestimmt (Tanford, 1968a; Tanford, 1968b; Tanford, 1970). Die zur Auswertung der experimentellen Daten dieser Übergänge erforderlichen thermodynamischen Grundlagen und daraus abgeleitete Gleichungssysteme sind von verschiedenen Autoren ausgearbeitet worden (Bolen & Santoro, 1988; Clarke & Fersht, 1993; Makhatadze & Privalov, 1995; Pace, 1986; Privalov, 1992; Privalov & Pothekin, 1986; Santoro & Bolen, 1988). Grundlegende Arbeiten zur thermodynamischen Stabilität von Proteinen und zur chemischen Denaturierung (Wechselwirkung von Denaturanzien mit der Polypeptidkette) sind von SCHELLMAN publiziert worden (Becktel & Schellman, 1987; Schellman, 1987a; Schellman, 1987b; Schellman, 1994; Schellman, 1997; Schellman, 2002; Schellman, 2003; Schellman *et al.*, 1981; Timasheff, 2002).

**Übersicht thermodynamischer Beziehungen der chemischen und thermischen Entfaltung von Proteinen nach einem Zweizustandsmodell.**

Gl.1a

$$K_{U/N} = \frac{[U]}{[N]}$$

$$\Delta G_{N \rightarrow U} = -RT \cdot \ln K_{U/N}$$

$$\Delta G_{N \rightarrow U} = \Delta G_{N \rightarrow U}^0 - m \cdot [D]$$

$$\Delta G_{N \rightarrow U}^0 = m \cdot [D]_{0,5}$$

$$\Delta G_{N \rightarrow U} = \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) \cdot \Delta H_m + \Delta C_p \cdot \left(T - T_m - T \cdot \ln \frac{T}{T_m}\right)$$

$$\Delta G_{N \rightarrow U} = \Delta H_m - T_m \cdot \Delta S_m = 0$$

$$\Delta S_m = \frac{\Delta H_m}{T_m}$$

$[U]$	<b>Konzentration des entfalteten Proteins</b>	$\Delta G_{N \rightarrow U}$	<b>Differenz der freien Enthalpien von entfaltetem und nativem Protein</b>
$[N]$	<b>Konzentration des nativen Proteins</b>	$\Delta G_{N \rightarrow U}^0$	<b>Differenz der freien Enthalpien von entfaltetem und nativem Protein ohne Denaturans</b>
$K_{U/N}$	<b>Gleichgewichtskonstante zwischen nativem und entfaltetem Protein</b>	$T_m$	<b>absolute Temperatur am Wendepunkt der</b>
$R$	<b>universelle Gaskonstante</b>		<b>Transitionskurve der</b>
$T$	<b>absolute Temperatur</b>		<b>thermischen Denaturierung</b>
$[D]$	<b>Konzentration (Aktivität) des Denaturans</b>	$\Delta H_m$	<b>Differenz der Enthalpien von entfaltetem und nativem Protein</b>
$[D]_{0,5}$	<b>Konzentration (Aktivität) des Denaturans am Wendepunkt der Transitionskurve</b>		<b>am Wendepunkt der Transitionskurve der</b>
$m$	<b>Anstieg am Wendepunkt der Transitionskurve</b>	$\Delta S_m$	<b>thermischen Denaturierung</b>
$\Delta C_p$	<b>spezifische Wärmekapazität des Proteins</b>		<b>Differenz der Entropien von entfaltetem und nativem Protein am Wendepunkt der</b>
			<b>Transitionskurve der thermischen Denaturierung</b>

Die thermische Entfaltung eines Proteins ist ein Zusammenspiel enthalpischer und entropischer Beiträge. Im entfaltetem Zustand sind die hydrophoben Oberflächen der

Polypeptidkette exponiert und die Moleküle des Lösungsmittels (Wasser) bilden ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken, was deren Entropie und Enthalpie vermindert. Faltet sich die Polypeptidkette, so erhöht sich der entropische Beitrag der Lösungsmittelmoleküle durch deren Freisetzung und kompensiert den Verlust an konformationeller Entropie der Polypeptidkette.

Die spezifische Wärmekapazität  $\Delta C_p$  eines Proteins ist die Differenz zwischen der Wärmekapazität des entfalteten und gefalteten Zustandes.

**Definition der spezifischen Wärmekapazität eines Proteins.**

**Gl.1b**

$$\Delta C_p = C_p^U - C_p^N$$

$\Delta C_p$       **spezifische Wärmekapazität des Proteins**

$C_p^N$       **Wärmekapazität des Proteins im nativen Zustand**

$C_p^U$       **Wärmekapazität des Proteins im entfalteten Zustand**

Die spezifische Wärmekapazität des entfalteten Zustandes ist hoch, daher ist  $\Delta C_p$  eines Proteins positiv, wird jedoch bei höheren Temperaturen kleiner. Eine Abschätzung ergibt  $\Delta C_p$  von  $12 \text{ cal deg}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  pro Aminosäurerest (Fersht, 1999; Kim *et al.*, 1994; Makhatadze & Pace, 1990; Privalov & Makhatadze, 1990).

**Beziehungen thermodynamischer Parameter der thermischen Entfaltung von Proteinen bei zwei verschiedenen Temperaturen (Zweizustandsmodell).**

**Gl.1c**

$$\Delta G_{N \rightarrow U} = \Delta H_{N \rightarrow U} - T \cdot \Delta S_{N \rightarrow U}$$

$$\Delta H_{N \rightarrow U}^{T_2} = \Delta H_{N \rightarrow U}^{T_1} + \Delta C_p \cdot (T_2 - T_1)$$

$$\Delta S_{N \rightarrow U}^{T_2} = \Delta S_{N \rightarrow U}^{T_1} + \Delta C_p \cdot \ln \frac{T_2}{T_1}$$

$$\Delta G_{N \rightarrow U}^{T_2} = \Delta H_{N \rightarrow U}^{T_1} + \Delta C_p \cdot (T_2 - T_1) - T_2 \cdot \left( \Delta S_{N \rightarrow U}^{T_1} + \Delta C_p \cdot \ln \frac{T_2}{T_1} \right)$$

$\Delta G_{N \rightarrow U}$	Differenz der freien Enthalpien von entfaltetem und nativem Protein
$\Delta G_{N \rightarrow U}^{T_2}$	Differenz der freien Enthalpien von entfaltetem und nativem Protein bei der absoluten Temperatur $T_2$
$\Delta H_{N \rightarrow U}$	Differenz der Enthalpien von entfaltetem und nativem Protein
$\Delta H_{N \rightarrow U}^{T_1}$	Differenz der Enthalpien von entfaltetem und nativem Protein bei der absoluten Temperatur $T_1$
$\Delta H_{N \rightarrow U}^{T_2}$	Differenz der Enthalpien von entfaltetem und nativem Protein bei der absoluten Temperatur $T_2$
$\Delta S_{N \rightarrow U}$	Differenz der Entropien von entfaltetem und nativem Protein
$\Delta S_{N \rightarrow U}^{T_1}$	Differenz der Entropien von entfaltetem und nativem Protein bei der absoluten Temperatur $T_1$
$\Delta S_{N \rightarrow U}^{T_2}$	Differenz der Entropien von entfaltetem und nativem Protein bei der absoluten Temperatur $T_2$
$T$	absolute Temperatur
$T_1$	absolute Temperatur $T_1$
$T_2$	absolute Temperatur $T_1$
$\Delta C_p$	spezifische Wärmekapazität des Proteins

Entsprechend Gleichung 1c wird die Enthalpie der Entfaltung  $\Delta H_{N \rightarrow U}$  bei höheren Temperaturen positiver, begünstigt daher den nativen Zustand. Die physikalische Interpretation ist, daß die Enthalpie des entfalteten Zustandes  $H^U$  mit höherer Temperatur steigt. Im Gegensatz dazu wird die Entropie der Entfaltung  $\Delta S_{N \rightarrow U}$  mit steigender Temperatur größer, begünstigt daher den denaturierten Zustand. Erreicht die freie Enthalpie  $\Delta G_{N \rightarrow U}$  durch den Term  $T \cdot \Delta S_{N \rightarrow U}$  über  $\Delta H_{N \rightarrow U}$  einen positiven Wert, erfolgt die thermische Entfaltung eines Proteins. Daher ist die thermische Entfaltung durch die Dominanz der Entropie des entfalteten Zustandes  $S^U$  bei hoher Temperatur bedingt (Fersht, 1999). Bedingt durch den hohen Wert von  $\Delta C_p$  zeigen Proteine das Phänomen der Kältedenaturierung (*cold unfolding*). Bei niedriger Temperatur sinkt die Enthalpie der Entfaltung  $\Delta H_{N \rightarrow U}$  nach Gleichung 1c und die freie Enthalpiedifferenz  $\Delta G_{N \rightarrow U}$  wird wiederum durch den entropischen Term  $T \cdot \Delta S_{N \rightarrow U}$  bestimmt. Die Transitionstemperatur für die Kältedenaturierung  $T_c$  ist gegeben durch die Gleichung 1d (Fersht, 1999).

**Beziehungen thermodynamischer Parameter zur Berechnung der Transitionstemperatur der Kältedenaturierung von Proteinen (Zweizustandsmodell).**

**Gl.1d**

$$T_c = T_m + \frac{T_m^2}{2 \cdot \left( \frac{\Delta H_m}{\Delta C_p} \right)}$$

$\Delta C_p$       **spezifische Wärmekapazität des Proteins**

$T_m$       **absolute Temperatur am Wendepunkt der Transitionskurve der thermischen Denaturierung**

$T_c$       **absolute Temperatur am Wendepunkt der Transitionskurve der Kältedenaturierung**

$\Delta H_m$       **Differenz der Enthalpien von entfaltetem und nativem Protein am Wendepunkt der Transitionskurve der thermischen Denaturierung**

Es kann aus diesen mathematischen Beziehungen abgeleitet werden, daß Proteine mit einem kleinen Wert von  $\Delta H_m$  und einem großen Wert von  $\Delta C_p$  eine Kältedenaturierung bei höheren Temperaturen zeigen. Der Zusatz von Denaturanzien senkt  $T_m$ , sowie  $\Delta H_m$  und erhöht  $\Delta C_p$ , so daß dieses Phänomen unter diesen Bedingungen auch für stabilere Proteine beobachtet werden kann.

Die Faltung kleiner Proteine (Molekulargewicht bis etwa 20 kDa) läßt sich oft nach dem in Gleichung 1 abgehandelten Zweizustandsmodell (*two-state approximation, two-state model*) quantitativ beschreiben, wonach in Abhängigkeit von den Bedingungen nur ein Gleichgewicht zwischen dem nativen und denaturierten Zustand vorliegt. FERSHT nennt Kriterien der Anwendbarkeit dieses Modells auf die Faltung eines Proteins (Fersht, 1999). Das Konzentrationsverhältnis zwischen nativem und denaturiertem Zustand kann durch Änderungen optischer (Absorption, Fluoreszenz, Circular dichroismus) oder hydrodynamischer Eigenschaften (Sedimentationsverhalten) des Proteins gemessen werden. Für viele kleine und reversibel faltende Proteine ist dieses Modell sowohl für chemisch, als auch thermisch induzierte Faltung angewandt worden und steht nicht im Widerspruch zum Auftreten von Zwischenstufen, sogenannten Faltungsintermediaten (*folding intermediates*). Diese Intermediate sind in der Regel instabil und unter

Gleichgewichtsbedingungen wenig populiert (nur in geringer Konzentration vorhanden). Eine Unterscheidung zwischen denaturiertem und nativem Zustand, die sich durch ihre Zugänglichkeit der Amidprotonen der Peptidbindungen der Polypeptidkette unterscheiden, kann durch die Messung der Geschwindigkeit des Austausches mit deuteriertem Lösungsmittel mittels NMR-Spektroskopie erfolgen (für praktische Aspekte siehe (Scholtz & Robertson, 1995)). Im entfalteten Zustand eines Proteins erfolgt der Austausch sehr schnell, in dessen gefaltetem Zustand sind die Geschwindigkeitskonstanten des Austausches von der Lösungsmittelzugänglichkeit und der Einbindung der Amidprotonen in Sekundärstrukturelemente abhängig. Der *protection factor* für die einzelnen Amidprotonen eines gefalteten Proteins ist dafür eine quantitative Größe (Fersht, 1999). Somit bietet diese Technik neben den oben genannten optischen und hydrodynamischen Methoden eine sehr gute Möglichkeit der Detektion von Faltungsintermediaten, da in Verbindung mit *quenched-flow*-Techniken (*pulse labeling*) strukturelle Informationen über transient auftretende Intermediate mit kleiner Lebensdauer erhalten werden können (Bai *et al.*, 1995; Baldwin, 1993; Dobson, 1991; Roder *et al.*, 1988; Rumbley *et al.*, 2001; Udgaonkar & Baldwin, 1988).

Die Reaktion einer entfalteten Polypeptidkette zum gefalteten Zustand wird mathematisch allgemein als eine Folge von reversiblen chemischen Reaktionen 1. Ordnung beschrieben, wobei auch Parallelreaktionen möglich sind. Assoziationen von entfalteten Polypeptidketten oder von gefalteten Monomeren bei der Oligomerisierung sind Reaktionen höherer Ordnung innerhalb der Reaktionsfolge und von der Konzentration der Reaktanden abhängig (Garel, 1992; Jaenicke, 1996; Jaenicke & Lilie, 2000). Die mathematische Beschreibung der Reaktionsfolge einer entfalteten Polypeptidkette zum nativen Zustand eines Proteins (allgemein die Kinetik der Faltungsreaktionen) unter definierten Reaktionsbedingungen umfaßt die Bestimmung aller mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten für die Bildung und den Zerfall der dabei auftretenden Intermediate aus beobachteten oder apparenten Geschwindigkeitskonstanten und Amplituden, soweit diese durch die verwendeten Methoden detektiert werden können. Dabei gilt das für einfache chemische Reaktionen aufgestellte Prinzip der mikroskopischen Reversibilität (*principle of detailed balance*). Generell verlaufen die Faltung und die Entfaltung von Proteinen über die gleichen Intermediate und Übergangszustände (Fersht, 1999). Die Kinetik von Faltungsreaktionen kann durch Änderungen der Eigenschaften (optisch,

hydrodynamisch, NMR-Spektrum) der Polypeptidkette beobachtet werden. Signalamplituden setzen sich oftmals aus den Amplituden mehrerer in der Reaktionsfolge auftretender Spezies zusammen. Die Amplitude einer in der Reaktionsfolge auftretenden Spezies ist ihrer aktuellen Konzentration proportional. Komplexe Reaktionsfolgen (Assoziationen, Parallelreaktionen) komplizieren die mathematische Bestimmung der mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten aus beobachtbaren Größen und erfordern die Definition von Rahmenbedingungen, die für die Lösung der Problemstellung hinreichend sind. Eine sehr gute Übersicht über die mathematische Beschreibung komplexer kinetischer Reaktionen wurde von NÖLTING publiziert (Nölting, 1999).

Domänen sind strukturelle Einheiten im gefalteten Zustand von großen Polypeptidketten. Eine Domäne ist ein Teil des Proteins, welcher eine kompakte globuläre Substruktur und mehr Wechselwirkungen innerhalb als mit anderen Teilen der Polypeptidkette bildet (Garel, 1992). Für die elementare (mechanistische) und physikochemische Abhandlung des Problems der Faltung einer Polypeptidkette hat sich experimentell die Verwendung von Eindomänenproteinen (*single domain protein*), wie zum Beispiel Chymotrypsininhibitor aus Gerste (CI2) (Jackson & Fersht, 1991), Barnase (Fersht *et al.*, 1992), Ribonuklease A (Garel & Baldwin, 1973; Krebs *et al.*, 1983; Raines, 1998) u.a., als Untersuchungssysteme bewährt. Für die Beschreibung des Faltungsweges eines solchen monomeren Proteins werden experimentell dessen Stabilität sowie die Entfaltung (vom nativen oder gefalteten Zustand in den denaturierten oder entfalteten Zustand) und die Rückfaltung (umgekehrte Reihenfolge) mit einem umfangreichen Repertoire an Methoden untersucht, um möglichst umfassende Informationen über die zeitliche Abfolge von Konformationszuständen und Konformationsänderungen der Polypeptidkette zu erhalten. Diese Strategie schließt die energetische und „strukturelle Beschreibung“ der während der Faltungsreaktionen durchlaufenen Übergangszustände ein (siehe unten sowie Gleichung 3 und Gleichung 4) (Fersht, 1999).

Die Stabilität eines Proteins kann durch chemische und thermische Denaturierung bestimmt werden. Chemische Denaturanzien, wie Harnstoff, Guanidiniumhydrochlorid oder Guanidiniumthiocyanat, reagieren (komplexieren) mit dem Polypeptidrückgrat über Wasserstoffbrücken und stabilisieren den entfalteten Zustand (Schellman, 1987a; Schellman, 2002). Die Wirkung von Denaturanzien auf die Stabilität kann mathematisch durch eine lineare freie Enthalpiebeziehung (LFE-Beziehung, *linear*

*free energy relationship*) beschrieben werden (Gleichung 1). Diese ist auch die Grundlage für die Auswertung von Transitionskurven der reversiblen chemischen Denaturierung nach einem Zweizustandsmodell (Pace, 1986). Durch Zufuhr von thermischer Energie können Proteine ebenfalls denaturiert werden. Dieser Prozess kann durch das Aufschmelzen von Sekundärstrukturelementen (Circulardichroismus im Fern-UV) oder mittels Kalorimetrie (DSC, *differential scanning calorimetry*) gemessen werden. Durch eine mathematische Auswertung von reversiblen Transitionskurven, die aus indirekten Methoden (optische Methoden) erhalten werden, nach einem Zweizustandsmodell erhält man die van't Hoff Enthalpie (entspricht  $\Delta H_m$  in Gleichung 1a). Die Auswertung reversibler kalorimetrischer Transitionskurven ist wesentlich präziser, besonders für die Detektion von energetischen Beiträgen durch das Auftreten von Gleichgewichtsintermediaten, und ergibt die kalorimetrische Enthalpie als quantitatives Maß der Stabilität des Proteins. Stimmen die aus beiden Methoden gewonnenen thermodynamischen Parameter überein, gilt das als Beweis für die Faltung des untersuchten Proteins nach einem Zweizustandsmodell, was für viele Eindomänenproteine gezeigt worden ist (Fersht, 1999).

Das Auftreten von Phasierungen analytischer Größen bei kinetischen Untersuchungen des Faltungsprozesses von Proteinen belegt die Population von transienten Intermediaten. Für Eindomänenproteine erfolgt die Auswertung der kinetischen Transitionen in der Regel nach einer Kombination von Reaktionen 1. Ordnung, wonach die gemessenen Signalamplituden und apparenten Geschwindigkeitskonstanten auf der Grundlage sinnvoller Modelle zur Berechnung mikroskopischer Geschwindigkeitskonstanten dienen. Transiente Intermediate werden auch für Proteine gefunden, die sich thermodynamisch nach einem Zweizustandsmodell verhalten. Der direkte Vergleich thermodynamischer und kinetischer Daten ist eine relativ zuverlässige Methode zur Validierung des Zweizustandsmodells der Faltung eines Proteins (Kiefhaber, 1995). Experimentell werden kinetische Messungen der Faltung einer Polypeptidkette durch schnelle Änderungen von Zustandsgrößen realisiert, zum Beispiel eine Änderung der Temperatur (Temperatursprung) oder der Konzentration des Denaturans (Konzentrationssprung). Da die bei verschiedenen Konzentrationen des Denaturans bestimmte Gleichgewichtskonstante zwischen nativem und entfaltetem Zustand

eines Proteins einer LFE folgt, trifft dies auch auf die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten zu (Fersht, 1999).

Nach EYRING ist die Geschwindigkeitskonstante einer chemischen Reaktion der freien Aktivierungsenthalpie zum Erreichen des Übergangszustandes (*transition state*, TS) umgekehrt proportional (Eyring, 1938a; Eyring, 1938b; Laidler, 1987; Wigner, 1938). Diese Barriere umfaßt ein Ensemble von Strukturen, wobei es eine kleine Gruppe von ähnlichen Strukturen oder eine Ansammlung von nichtähnlichen Strukturen sein kann. Für multiple, parallele Reaktionen repräsentiert der beobachtete TS den Durchschnitt des Ensembles der geschwindigkeitsbestimmenden Schritte über alle Reaktionswege, einen apparenten TS. Obgleich in der Literatur die Auswertung experimenteller Daten nach der Theorie des Übergangszustandes dominierend ist, liefert die Dynamik der flüssigen Phasen nach KRAMERS (Kramers, 1940) vergleichbare Ergebnisse, da beide Theorien ähnliche Formen haben und langsame Prozesse durch das Auftreten von Energiebarrieren erklären. Nach KRAMERS ist die Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion in Lösung durch die freie Aktivierungsenthalpie und die Diffusion der Teilchen bestimmt, somit von der Viskosität des Mediums abhängig. Durch die Auswertung kinetischer Transitionen (Amplituden, Geschwindigkeitskonstanten) können die Differenzen der freien Enthalpien für detektierbare Intermediate und die freien Aktivierungsenthalpien der Übergangszustände zur Differenz der freien Enthalpien von nativem und entfaltetem Zustand des Proteins entlang der Reaktionskoordinaten in Beziehung gesetzt werden (Kuwajima, 1995). Eine sehr übersichtliche Darstellung theoretischer Grundlagen und einfacher kinetischer Modelle und zur Beschreibung der Faltung von Proteinen (gezeigt am Beispiel der Faltung von Lysozym) einschließlich der Berücksichtigung der Theorie von KRAMERS wurde von BIERI und KIEFHABER publiziert (Bieri & Kiefhaber, 2000).

Das Auftreten von Sekundärstrukturen in frühen Phasen des Faltungsprozesses ist für einige Proteine gezeigt worden (Kim & Baldwin, 1982; Kim & Baldwin, 1990; Ptitsyn, 1995). Die Bildung von gefalteten und flexiblen Intermediaten wurde von PTITSYN und RASHIN 1973 (Ptitsyn & Rashin, 1973) aus theoretischen Betrachtungen postuliert. Von OGUSHI und WADA wurde 1983 (Ohgushi & Wada, 1983) der Begriff des *molten globule* eingeführt. Von PTITSYN *et al.* (Ptitsyn *et al.*, 1990) wurde vorgeschlagen, daß der *molten globule* –Zustand eines Proteins ein generelles Faltungsintermediat ist, er wird daher auch als denaturierter Zustand unter

physiologischen Bedingungen betrachtet (Fersht, 1999). Nach einer Definition von GOLDBERG *et al.* (Goldberg *et al.*, 1990) ist ein *molten globule* ein eher kompaktes Intermediat mit einem hohen Gehalt an nativer Sekundärstruktur, aber einer fluktuierenden Tertiärstruktur. Die ausgeprägten hydrophoben Oberflächen binden den Fluoreszenzfarbstoff ANS (oder *bis*-ANS). Die aromatischen Aminosäurereste rotieren in diesem Intermediat in einer eher chiralen Umgebung, daher zeigt der *molten globule*-Zustand keinen Circular dichroismus im Nah-UV. Für einige Proteine, wie zum Beispiel Lysozym und  $\beta$ -Lactoglobulin, ist gezeigt worden, daß die in frühen Faltungsphasen auftretenden Elemente der Sekundärstruktur nicht-native Strukturen sind. Im Falle des Lysozyms, welches aus einer  $\alpha$ -Domäne ( $\alpha$ -Helices) und einer  $\beta$ -Domäne ( $\beta$ -Faltblatt) besteht, unterliegen diese im Faltungsprozeß einer Reorganisation (Dobson *et al.*, 1998; Radford *et al.*, 1992).

*Protein engineering* bezeichnet eine zumeist mit molekularbiologischen oder proteinchemischen Verfahren durchgeführte Methode zur gezielten Veränderung der Primärstruktur eines Proteins. Mit dieser Methode können gezielt Reste oder Regionen des Proteins verändert werden und man mißt die Änderungen der Faltungs- und Entfaltungsgeschwindigkeiten der Varianten im Vergleich zur Auswirkung des Aminosäureaustausches auf die Gesamtstabilität des Proteins (Matouschek & Fersht, 1991). Mutationen und / oder Veränderungen der äußeren Bedingungen können die Energiefläche umgestalten und einzelne Schritte der Faltungsreaktion verändern, indem sie die Balance zwischen der effektiven Energie und der Konformationsentropie so verändern, daß der Übergangsbereich verschoben wird (Dobson *et al.*, 1998). Die Kontakte zwischen einzelnen Aminosäuren der Polypeptidkette im Faltungsprozeß können durch energetische Terme beschrieben werden. Die Bestimmung der Energie der Wechselwirkung (Bindungsenergie) zwischen den funktionellen Gruppen von zwei Aminosäuren im nativen Zustand eines Proteins gelingt für geeignete Systeme durch einen *double mutant cycle* (Carter *et al.*, 1984; Horovitz, 1996; Horovitz & Fersht, 1990; Horovitz & Fersht, 1992). Die Stabilität von im Faltungsprozeß auftretenden Intermediaten oder von Übergangszuständen kann durch gezielte Mutationen des Proteins (Perturbationen) verändert werden, um globale und / oder lokale Ereignisse des Faltungsprozesses zu sondieren sowie durch energetische Terme zu quantifizieren (Daggett & Fersht, 2000; Dalby *et al.*, 1998a; Dalby *et al.*, 1998b; Matouschek & Fersht, 1993; Matouschek *et al.*, 1990; Matouschek *et al.*, 1995).

**Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der Faltung und Entfaltung eines Proteins von der Konzentration (Aktivität) des Denaturans.**

**Gl.2**

$$\ln k_f = \ln k_f^0 - m_f \cdot [D]$$

$$\ln k_u = \ln k_u^0 + m_u \cdot [D]$$

$k_f$	<b>Geschwindigkeitskonstante der Faltung eines Proteins bei einer bestimmten Konzentration (Aktivität) des Denaturans</b>
$k_f^0$	<b>Geschwindigkeitskonstante der Faltung eines Proteins ohne Denaturans</b>
$k_u$	<b>Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung eines Proteins bei einer bestimmten Konzentration (Aktivität) des Denaturans</b>
$k_u^0$	<b>Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung eines Proteins ohne Denaturans</b>
$m_f$	<b>Anstieg des „Faltungssastes“ im <i>chevron</i> -Plot</b>
$m_u$	<b>Anstieg des „Entfaltungssastes“ im <i>chevron</i> -Plot</b>
$[D]$	<b>Konzentration (Aktivität) des Denaturans</b>

Die logarithmische Auftragung der aus den Transitionen (Kinetiken) der Entfaltung und Rückfaltung von Eindomänenproteinen bestimmten apparenten Geschwindigkeitskonstanten lassen sich nach einer LFE in einem *chevron*-Plot darstellen (Fersht, 1999). Ein symmetrisches Bild der beiden Äste des Plots wird für Proteine beobachtet, die kinetisch nach einem idealen Zweizustandsmodell falten, wie zum Beispiel CI2 (Jackson & Fersht, 1991). Abweichungen von der Symmetrie können im Faltungsteil, im Entfaltungsteil oder in beiden Teilen des *chevron*-Plots auftreten und werden als *roll-over* bezeichnet (Bieri & Kiefhaber, 2000; Fersht, 1999). Diese Abweichungen sind Indikationen für das Auftreten von Intermediaten oder die Folge einer (allgemeinen) Verschiebung der Lage des Übergangszustandes in Abhängigkeit von der Konzentration an Denaturans (Myers & Oas, 2002). Aus den Anstiegen (extrapoliert) der beiden Äste des *chevron*-Plots läßt sich der Wert  $\beta_T$  (TANFORD- $\beta$ -Wert) definieren, der ein Maß für die Lösungsmittelzugänglichkeit (*solvent accessibility*) des TS im Vergleich zum denaturierten Zustand darstellt. Er wird oft aus Entfaltungskinetiken bestimmt (Fersht, 1999). Ein Wert  $\beta_T^f = 1$  zeigt den TS mit einer geringen Lösungsmittelzugänglichkeit der Aminosäuren wie im

gefalteten Zustand, ein Wert  $\beta_T^f = 0$  indiziert eine Lösungsmittelzugänglichkeit des TS wie im entfalteten Zustand.

**Beziehungen thermodynamischer und kinetischer Parameter zur Definition von  $\beta_T$  (TANFORD- $\beta$ -Wert).**

Gl.3

$$\alpha = \frac{m_u}{m_u - m_f}$$

$$\beta_T^f = 1 - \frac{m_u}{m_u - m_f} = \frac{m_f}{m_f - m_u} = \frac{m_{U \rightarrow TS}}{m} = 1 - \frac{m_{N \rightarrow TS}}{m}$$

$$m = \frac{\delta \Delta G_{N \rightarrow U}}{\delta [D]} = RT \cdot (m_u - m_f)$$

$$m_{N \rightarrow TS} = \frac{\delta \Delta G_{N \rightarrow TS}}{\delta [D]} = -RT \cdot m_u$$

$$m_{U \rightarrow TS} = \frac{\delta \Delta G_{U \rightarrow TS}}{\delta [D]} = -RT \cdot m_f$$

$$\ln k_f = \ln k_f^0 - m_f \cdot [D]$$

$$\Delta G_{U \rightarrow TS} = \Delta G_{U \rightarrow TS}^0 + m_{U \rightarrow TS} \cdot [D]$$

$$-m_f = \frac{m_{U \rightarrow TS}}{RT}$$

$$\ln k_u = \ln k_u^0 + m_u \cdot [D]$$

$$\Delta G_{N \rightarrow TS} = \Delta G_{N \rightarrow TS}^0 - m_{N \rightarrow TS} \cdot [D]$$

$$-m_u = \frac{m_{N \rightarrow TS}}{RT}$$

- $\alpha$  Grad der „Zugänglichkeit“ des Übergangszustandes für die Entfaltung
- $\beta_T^f$  Grad der „Zugänglichkeit“ des Übergangszustandes für die Faltung (TANFORD- $\beta$ -Wert)
- $m_f$  Anstieg des „Faltungsastes“ im *chevron*-Plot
- $m_u$  Anstieg des „Entfaltungsastes“ im *chevron*-Plot
- $m_{U \rightarrow TS}$  Änderung der „Zugänglichkeit“ beim Übergang vom entfalteten Zustand zum Übergangszustand während der Faltung
- $m_{N \rightarrow TS}$  Änderung der „Zugänglichkeit“ beim Übergang vom nativen Zustand zum Übergangszustand während der Entfaltung
- $m$  Anstieg am Wendepunkt der Transitionskurve (chemische Denaturierung)
- $k_f$  Geschwindigkeitskonstante der Faltung eines Proteins bei einer bestimmten Konzentration (Aktivität) des Denaturans
- $k_f^0$  Geschwindigkeitskonstante der Faltung eines Proteins ohne Denaturans
- $k_u$  Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung eines Proteins bei einer bestimmten Konzentration (Aktivität) des Denaturans
- $k_u^0$  Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung eines Proteins ohne Denaturans

$\Delta G_{U \rightarrow TS}$	Differenz der freien Enthalpien des Übergangszustandes und des entfalteten Zustandes des Proteins bei einer bestimmten Konzentration (Aktivität) des Denaturans
$\Delta G_{U \rightarrow TS}^0$	Differenz der freien Enthalpien des Übergangszustandes und des entfalteten Zustandes des Proteins ohne Denaturans
$\Delta G_{N \rightarrow TS}$	Differenz der freien Enthalpien des Übergangszustandes und des nativen Zustandes des Proteins bei einer bestimmten Konzentration (Aktivität) des Denaturans
$\Delta G_{N \rightarrow TS}^0$	Differenz der freien Enthalpien des Übergangszustandes und des nativen Zustandes des Proteins ohne Denaturans
$[D]$	Konzentration (Aktivität) des Denaturans
$R$	universelle Gaskonstante
$T$	absolute Temperatur

Der TANFORD- $\beta$ -Wert beträgt für die meisten Proteine  $\approx 0,7 \pm 0,1$ . Dieser Betrag zeigt, daß der Übergangszustand bezüglich der Lösungsmittelzugänglichkeit dem nativen Zustand ähnelt. Eine Bewegung des TS entlang der Reaktionskoordinaten durch Veränderung der Lösungsbedingungen nach Zusatz von Denaturanzien ist nicht ungewöhnlich und kann einen *roll-over* von *chevron*-Plots bedingen, der nicht auf die Population von Intermediaten zurückzuführen ist (siehe oben) (Myers & Oas, 2002; Otzen *et al.*, 1999). Nach HAMMOND ähnelt der Übergangszustand einer Konversion von zwei Zuständen strukturell demjenigen Zustand, zu dem er eine geringere Energiedifferenz hat (Hammond, 1955). Das bedeutet, daß eine destabilisierende Mutation den TS in Richtung nativen Zustand bewegt. Veränderungen von  $\beta_T$  als Folge von Mutationen können jedoch sowohl mit einem Hammond-Effekt oder einem *anti*-Hammond-Effekt verbunden sein, was diesem Wert nur eine begrenzte Aussagefähigkeit zur Struktur des Übergangszustandes der Faltung eines Proteins zuschreibt (Myers & Oas, 2002).

Ogleich die Messungen des thermodynamischen Gleichgewichtes zwischen nativem und entfaltetem Zustand und der Kinetik der Faltungsreaktionen eine globale, über ein Ensemble von Zuständen gemittelte energetische Beschreibung der beiden Grundzustände und des Übergangszustandes ergeben, erlauben diese keine detaillierten strukturellen Aussagen. Ein experimenteller Ansatz hierzu ist die oben genannte Methode des *protein engineering*. Die theoretischen und experimentellen

Pionierarbeiten zu diesem Verfahren sind von FERSHT *et al.* geleistet und in zahlreichen Veröffentlichungen dokumentiert worden (zusammenfassende Darstellungen (Daggett & Fersht, 2000; Fersht, 1993; Fersht, 1999)). Mutationen werden an bestimmten Stellen des interessierenden Proteins eingeführt, wobei im Zuge einer Vermeidung von gravierenden Störungen der nativen Struktur vorzugsweise größere Reste gegen kleinere ausgetauscht werden. Gleichgewichtsmessungen zeigen den Effekt der Mutation auf die thermodynamische Stabilität der Variante, kinetische Messungen den auf TS oder populierte Intermediate. Experimentell werden dabei die oben beschriebenen Verfahren angewandt. Sie erlauben die Bestimmung des energetischen Beitrages von individuellen Seitenketten im Faltungsprozeß. Die Auswertung der Daten erfolgt durch Bestimmung des Wertes  $\phi$ , welcher das Verhältnis des Effektes der Mutation auf den Übergangszustand (oder den Zustand eines Intermediates) zu dem auf den Grundzustand definiert (Fersht, 1999).

Die Indizes am Symbol definieren den betrachteten Faltungsweg (Faltung oder Entfaltung) und die Zustände (Übergangszustand oder Intermediat). Jede Mutation ist ein Sensor dafür, was während des Faltungsweges an der Seite der Mutation geschieht. Ein Wert  $\phi_{\ddagger}^{\ddagger} = 0$  bedeutet, daß beim Übergang vom entfalteten in den gefalteten Zustand die Energie des Übergangszustandes an der Seite der Mutation in gleichem Maße geändert ist wie im entfalteten Zustand, d.h. die Struktur an der Seite der Mutation liegt wie im entfalteten Zustand vor. Die Wechselwirkungen sind *unfolded-like*. Ein Wert  $\phi_{\ddagger}^{\ddagger} = 1$  bedeutet, daß beim Übergang vom entfalteten in den gefalteten Zustand die Energie des Übergangszustandes an der Seite der Mutation in gleichem Maße geändert ist wie im gefalteten Zustand, d.h. die Struktur an der Seite der Mutation liegt wie im nativen Zustand vor. Die Wechselwirkungen sind *native-like*. Mit der Methode des *double mutant cycle* (siehe oben) kann gesichert werden, daß durch die Mutation keine anderen Wechselwirkungen als die betrachteten dominieren. Die Analyse von Faltungswegen auf der Grundlage von  $\phi$ -Werten erlaubt eine strukturelle Interpretation definierter Bereiche während des Faltungsprozesses von Proteinen, vor allem des Übergangszustandes (Fulton *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 1993; Main *et al.*, 1999; Martinez & Serrano, 1999; Otzen *et al.*, 1994; Riddle *et al.*, 1999; Villegas *et al.*, 1998).

**Definition des  $\phi$  -Wertes für den Übergangszustand der Faltung eines Proteins.**

**GI.4**

$$\begin{aligned}
 \Delta G_{U \rightarrow N}^{\text{wt}} &= G_N^{\text{wt}} - G_U^{\text{wt}} \\
 \Delta G_{U \rightarrow N}^{\text{var}} &= G_N^{\text{var}} - G_U^{\text{var}} \\
 \Delta \Delta G_{U \rightarrow N} &= \Delta G_{U \rightarrow N}^{\text{wt}} - \Delta G_{U \rightarrow N}^{\text{var}} \\
 k_f^{\text{wt}} &= \kappa \cdot \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot e^{-\frac{\Delta G_{U \rightarrow \text{TS}}^{\text{wt}}}{RT}} \\
 k_f^{\text{var}} &= \kappa \cdot \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot e^{-\frac{\Delta G_{U \rightarrow \text{TS}}^{\text{var}}}{RT}} \\
 \Delta G_{U \rightarrow \text{TS}}^{\text{wt}} &= G_{\text{TS}}^{\text{wt}} - G_U^{\text{wt}} \\
 \Delta G_{U \rightarrow \text{TS}}^{\text{var}} &= G_{\text{TS}}^{\text{var}} - G_U^{\text{var}} \\
 \Delta \Delta G_{U \rightarrow \text{TS}} &= \Delta G_{U \rightarrow \text{TS}}^{\text{wt}} - \Delta G_{U \rightarrow \text{TS}}^{\text{var}} = RT \cdot \ln \frac{k_f^{\text{var}}}{k_f^{\text{wt}}} \\
 \phi_f^\ddagger &= \frac{\Delta \Delta G_{U \rightarrow \text{TS}}}{\Delta \Delta G_{U \rightarrow N}}
 \end{aligned}$$

$\Delta G_{U \rightarrow N}^{\text{wt}}$	<b>Differenz der freien Enthalpien des nativen und entfalteten Zustandes des Wildtyps eines Proteins</b>
$\Delta G_{U \rightarrow N}^{\text{var}}$	<b>Differenz der freien Enthalpien des nativen und entfalteten Zustandes einer Variante eines Proteins</b>
$\Delta \Delta G_{U \rightarrow N}$	<b>Differenz der Differenzen der freien Enthalpien des nativen und entfalteten Zustandes des Wildtyps und der Variante eines Proteins</b>
$k_f^{\text{wt}}$	<b>Geschwindigkeitskonstante der Faltung des Wildtyps eines Proteins</b>
$k_f^{\text{var}}$	<b>Geschwindigkeitskonstante der Faltung einer Variante eines Proteins</b>
$\kappa$	<b>präexponentieller Faktor</b>
$k_B$	<b>Boltzmann-Konstante</b>
$h$	<b>Planck'sche Konstante</b>
$R$	<b>universelle Gaskonstante</b>
$T$	<b>absolute Temperatur</b>
$\Delta G_{U \rightarrow \text{TS}}^{\text{wt}}$	<b>Differenz der freien Enthalpien des Übergangszustandes und des entfalteten Zustandes des Wildtyps eines Proteins</b>
$\Delta G_{U \rightarrow \text{TS}}^{\text{var}}$	<b>Differenz der freien Enthalpien des Übergangszustandes und des entfalteten Zustandes einer Variante eines Proteins</b>
$\Delta \Delta G_{U \rightarrow \text{TS}}$	<b>Differenz der Differenzen der freien Enthalpien des Übergangszustandes und des entfalteten Zustandes des Wildtyps und der Variante eines Proteins</b>
$\phi_f^\ddagger$	<b><math>\phi</math> -Wert des Übergangszustandes der Faltung</b>

Die Analyse mittels  $\phi$ -Werten ist sowohl in theoretischer, als auch experimenteller Hinsicht sehr elegant, jedoch auch umstritten (Myers & Oas, 2002). Die in der experimentellen Praxis für kleine Proteine verwendeten LFEs sind empirisch und es gibt bisher noch keine theoretische Grundlage über deren Validierung. Strukturuntersuchungen können Veränderungen des nativen Zustandes durch Mutationen zeigen, schwierig ist dies für entfaltete Zustände. Experimentell werden für viele Proteine fraktionelle  $\phi$ -Werte bestimmt, wobei verschiedene Interpretationen möglich sind (Myers & Oas, 2002).

1. partielle Aufweichung des Übergangszustandes an den mutierten Wechselwirkungsseiten
2. Aufweichung oder kompletter Verlust von einzelnen Wechselwirkungen innerhalb eines Satzes
3. Auftreten paralleler Faltungswege; ein Satz von Wechselwirkungen, der durch die Mutation entfernt wurde, ist in einem anderen möglichen Faltungsweg noch vorhanden
4. Kombinationen von 1. - 3.

Das Auftreten paralleler Faltungswege kann mit einem Brønsted-Plot  $\Delta k_f = f(\Delta \ln K_{U/N})$  oder  $\Delta \Delta G_{U \rightarrow TS} = f(\Delta \Delta G_{U \rightarrow N})$  (Definitionen siehe Gl.1a und Gl.4) analysiert werden. Das Bild einer Kurvatur zeigt parallele Faltungswege an. Das Vorliegen multipler Faltungswege mit Kombinationen partieller und ausgeprägter Wechselwirkungen kann auch einen *quasi*-linearen Plot ergeben und ist daher kein Beweis für das Vorliegen nur eines Faltungsweges. Eine signifikante Abweichung von der Linearität im Brønsted-Plot kann nur bei Werten von  $\Delta G_{N \rightarrow U} > 4 \text{ kcal mol}^{-1}$  sicher beurteilt werden.  $\phi$ -Werte  $< 0$  oder  $> 1$  können aus multiplen, parallelen Faltungswegen resultieren. Allgemein können Proteine Deletionen auf TS oder Intermediate kompensieren und deren destabilisierenden Effekt minimieren, was eine größere Strukturiertheit bedingt, als die  $\phi$ -Werte anzeigen. Für Proteine mit  $\phi_f^z$  zwischen 0 und 0,5 beträgt der TANFORD- $\beta$ -Wert  $\beta_T^f$  auch etwa 0,7. Die Lösungsmittelzugänglichkeit des Übergangszustandes zeigt ein stärkeres Maß der Kompaktheit, als  $\phi_f^z$  in diesem Falle erwarten läßt (Myers & Oas, 2002). Nach den in Gleichung 4 dargestellten mathematischen Zusammenhängen relativiert  $\phi_f^z$  die Konsolidierung an Struktur im Übergangszustand relativ zum entfalteten Zustand.

Wenn Struktur in diesem Zustand vorhanden ist (*residual structure*), dann hat  $\phi_i^{\ddagger} = 0$  eine andere Bedeutung.

Die Theorie des Übergangszustandes ist eine feste Grundlage für experimentelle Untersuchungen der Faltungsreaktionen von Proteinen. Wenn auch nicht unumstritten haben daraus abgeleitete Parameter in Kombination mit *protein engineering* zu strukturellen Vorstellungen der Übergangszustände und von Intermediaten des Faltungsweges von Proteinen geführt. Neben der Verbesserung experimenteller Techniken zur Detektion früher Faltungsphasen (Myers & Oas, 2002; Roder *et al.*, 2000) werden auch die theoretischen Ansätze durch die Berücksichtigung anderer Theorien auf molekularer Ebene eine Erweiterung erfahren (Fersht, 2004).

### 3. MODELLE DER PROTEINFALTUNG UND DETERMINANTEN

Der vorliegende experimentelle Datensatz stützt die Vorstellung einer hierarchischen Natur der Faltung von Proteinen, auf der generell auch die bisher vorgeschlagenen Modelle aufbauen (Tabelle 1). Viele Erkenntnisse konnten aus Untersuchungen der Stabilität und Faltung kleiner Proteine (RNase A, RNase T<sub>1</sub>, Nuklease aus *Staphylococcus aureus*, Chymotrypsininhibitor 2 aus Gerste, Barnase und Barstar aus *Bacillus amyloliquefaciens*, Apomyoglobin, SH3-Domänen, Cytochrom c, Tendmistat, p53, Csp B) als vergleichsweise einfache Modelle gewonnen werden. Für Proteine, die nach einem Zweizustandsmodell falten (*two-state folder*), fand man eine Korrelation zwischen der Kontaktordnung (*contact order*), ein Maß des durchschnittlichen Abstandes kontaktierender Reste in der Sequenz nativer Proteine, und den gemessenen Geschwindigkeiten der Faltung (Myers & Oas, 2002; Plaxco *et al.*, 1998). Die Stärke dieser Korrelation zeigt, daß die Topologie des Proteins eine wichtige Determinante ist. Helikale Sekundärstrukturen bilden mehr lokale Kontakte als  $\beta$ -Faltblätter, daher tendieren helikale Proteine zu höheren Geschwindigkeiten der Faltung. Circulare Permutationen eines Proteins, die in eine ähnliche dreidimensionale Struktur, jedoch mit veränderter Topologie aufweisen, zeigen in diesem Zusammenhang, daß die Kontaktordnung nicht allein die Geschwindigkeit der Faltung bestimmt, sondern auch Kontakte der Aminosäurereste über längere Distanzen (Myers & Oas, 2002). Die Primärstruktur (Sequenz) eines Proteins ist die wesentliche Determinante seiner Faltung (Anfinsen, 1973). Nicht-native Strukturelemente können transient während der Faltung von Proteinen auftreten (Radford *et al.*, 1992). Die artifizielle Einführung solcher Elemente in natürliche Sequenzen vermindert erwartungsgemäß die thermodynamische Stabilität dieser Konstrukte, hat aber nur einen geringen Effekt auf die Geschwindigkeit der Faltung bzw. auf den Übergangszustand.

Die Rolle von Intermediaten als Determinanten wird in der Literatur zum Teil kontrovers diskutiert. Auch wenn sich Proteine bei Messungen der thermodynamischen Stabilität und der Kinetik nach einem Zweizustandsmodell verhalten, kann die Existenz von Intermediaten nicht ausgeschlossen werden, da alle Konformationen nach einer Boltzmann-Verteilung in geringen Konzentrationen populiert sein können. Die Beobachtbarkeit (bzw. strukturelle Charakterisierung mittels *pulse-labeling*) von Intermediaten hängt von deren freier Enthalpie relativ zu den Grundzuständen des Proteins ab. Zudem zeigt die experimentelle

Charakterisierung dieser nach einem Zweizustandsmodell faltenden Proteine, daß der Zustand des *molten globule* nicht für alle Proteine von Bedeutung ist. Die Energiebeträge für die Faltung eines Proteins können durch Perturbationen geändert werden. Durch destabilisierende Mutationen konnten für Ubiquitin, dessen Wildtyp nach einem Dreizustandsmodell faltet, Varianten erzeugt werden, die nach einem Zweizustandsmodell falten. Nach Stabilisierung dieser Varianten mit Natriumsulfat (Hofmeister-Effekt) ist das Intermediat wieder detektierbar (Dreizustandsmodell) (Khorasanizadeh *et al.*, 1996). Nach FERSHT ist der Faltungsweg eines Proteins dann hinreichend vollständig verstanden, wenn alle auftretenden Intermediate und Übergangszustände in ihrer energetischen Beziehung zueinander charakterisiert werden können (Fersht, 1999). Erweiternd dazu wird von MYERS & OAS vorgeschlagen, daß auch bei kleinen Proteinen, die nach einem Zweizustandsmodell falten, das Ensemble der wenig populierten Zustände aus strukturellen bzw. energetischen Neigungen (*bias*) des entfalteten Zustandes vorbestimmt ist (Myers & Oas, 2002). Damit ist auch der entfaltete Zustand als Ausgangspunkt der Faltung eine Determinante. Residuelle Mikrostrukturen, die während des Entfaltungsprozesses persistent bleiben, wurden erstmals von NERI als hydrophobe Cluster des 434 Repressors im chemisch entfalteten Zustand mittels NMR detektiert (Neri *et al.*, 1992). Das Auftreten lokaler Reststrukturen im entfalteten Zustand wurde für FkBP (Logan *et al.*, 1994), Dihydrofolatreductase (Garvey *et al.*, 1989) und Nuklease aus *Staphylococcus aureus* (Shortle & Meeker, 1989) gezeigt. Experimentelle Untersuchungen mittels NMR an Peptiden (Case *et al.*, 1994; Kemmink & Creighton, 1995; Nardi *et al.*, 1997; Yao *et al.*, 1994a; Yao *et al.*, 1994b) und Proteinfragmenten zeigen die Bildung von Wendebögen (*turns*) oder fluktuierenden Helices, die mit Zufallsknäueln (*random coil conformation*) in einem schnellen Gleichgewicht stehen können (Zeitbasis 10 ns bis 100 ns). Es kann davon ausgegangen werden, daß diese Strukturneigung von Polypeptidketten im entfalteten Zustand eine wesentliche Determinante bei der Ausbildung lokaler Kontakte im Faltungsprozeß von Proteinen ist und daher das von LEVINTHAL aufgestellte Paradoxon als solches nicht existiert (Levinthal, 1968). Eine „lokale Neigung“ kann die Konkurrenz zwischen multiplen kinetischen Wegen, wie zum Beispiel produktive Faltung und Aggregation, modulieren (Myers & Oas, 2002).

Verschiedene Modellvorstellungen über die Faltung von Proteinen sind auf der Grundlage experimenteller Daten und theoretischer Ansätze entwickelt worden. Man

faßt unter dem ‚*old view*‘ die klassischen Modelle zur Faltung von Proteinen, unter dem ‚*new view*‘ Modelle der Beschreibung des Prozesses mittels Energietrajektorien (Faltungstrichter, *foldng funnel*) zusammen. Bezüglich der Struktur des Übergangszustandes wird auch zwischen homogenen und heterogenen Mechanismen unterschieden. Elementar beschreiben erstere einen einzelnen Übergangszustand mit sehr eingeschränkter konformationeller Heterogenität, zweitere einen Übergangszustand als eine Ansammlung von divergierenden Zuständen (Myers & Oas, 2002). In Tabelle 1 sind die wesentlichen Modellvorstellungen zusammengefaßt.

Nukleationen stellen die initialen Faltungsschritte der Polypeptidkette dar, die auch als hydrophober Kollaps (*hydrophobic collapse*) bezeichnet werden. Die meisten Modelle gehen von einer Vielzahl nicht-nativer Konformationen der Polypeptidkette aus, deren Verteilung im Verlaufe des Faltungsprozesses abnimmt (Entropieabnahme), während die Verteilung nativähnlicher Konformationen in der Zeiteinheit zunimmt.

## 4. CIS / TRANS -ISOMERISIERUNG VON PEPTIDYL-PROLYL-BINDUNGEN ALS LANGSAME KONFORMATIONSÄNDERUNGEN UND DEREN KATALYSE DURCH PEPTIDYL-PROLYL-CIS / TRANS -ISOMERASEN

### 4.1. Eigenschaften von Peptidyl-prolyl-bindungen (Prolylbindungen)

Peptidbindungen sind elementare Verknüpfungsstellen der Aminosäuren für die Ausbildung der Primärstruktur eines Proteins. Die Distanz der C-N-Bindung ist um 0,15 Å kürzer als für eine normale Einfachbindung erwartet. Daher besitzen Peptidbindungen einen partiellen Doppelbindungscharakter und sind planar (Pauling, 1960). Wie auch für Amide gezeigt (Stewart & Siddall III, 1970) können die flankierenden Kohlenstoffatome daher in *cis*- oder *trans*-Konformation vorliegen (dihedraler Winkel  $\omega = 0^\circ$  oder  $180^\circ$ ). Aus theoretischen Berechnungen (Jorgensen & Gao, 1988; Ramachandran & Mitra, 1976) und Messungen von *cis/trans*-Gleichgewichten von nicht-Prolylbindungen in Oligopeptiden mittels  $^1\text{H-NMR}$  (Scherer *et al.*, 1998) ist der Gehalt des entsprechenden *cis*-Isomers kleiner als 1 %. Daher ist der Anteil dieses Konformers in gefalteten Proteinen sehr klein (Reimer, 1998).

Für Prolylbindungen ist die freie Enthalpiedifferenz zwischen *cis*- und *trans*-Konformer (auch als Rotamere bezeichnet) wesentlich geringer, da sowohl das  $\text{C}\alpha$ -, als auch  $\text{C}\gamma$ -Atom des Pyrrolidinringes zum N-terminalen  $\text{C}\alpha$ -Atom in *cis*-Stellung lokalisiert ist (Balbach & Schmid, 2000). In vielfältigen Untersuchungen an Modellpeptiden mittels NMR-Spektroskopie ist gezeigt worden, daß der Gehalt an *cis*-Isomer einer Prolylbindung von der Art der N-terminal zum Prolinrest befindlichen Aminosäure abhängt (Reimer *et al.*, 1998). Eine lokale Kontrolle der Konformation durch Stabilisierung der *cis*-Prolylbindung wird durch Wechselwirkungen aromatischer Aminosäuren N-terminal zum Prolinrest gemessen (Reimer *et al.*, 1998; Thornton, 1992; Wu & Raleigh, 1998). Durch diese Wechselwirkung der aromatischen Aminosäuren mit dem alicyclischen Pyrrolidinring kann das Gleichgewicht der Rotamere in Modellpeptiden stärker zum *cis*-Isomer verschoben sein, als dies für eine entsprechende nichtaromatische Aminosäure gemessen wird (siehe auch Erläuterungen unten). Für die Rotationsbarrieren der Prolylbindung unstrukturierter Polypeptide werden unter physiologischen Bedingungen freie Aktivierungsenthalpien  $\Delta G_{\text{cis}\leftrightarrow\text{trans}}^\ddagger$  von 75 – 90  $\text{kJ mol}^{-1}$  (17,9 – 21,5  $\text{kcal mol}^{-1}$ ) gemessen (Schmid, 1992).

Die Werte für die Gleichgewichtskonstanten  $K_{cis/trans} = \frac{[cis-Konformer]}{[trans-Konformer]}$

sekundärer Amidbindungen in Oligopeptiden und entfalteten Polypeptidketten sind wesentlich kleiner als 0,01 (Scherer *et al.*, 1998; Schiene-Fischer & Fischer, 2001), die von Prolylbindungen in Abhängigkeit von der N-terminalen Aminosäure des Prolinrestes betragen 0,1 bis 1 (Reimer *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 1994b).

Recherchen aus verfügbaren Strukturen der *Brookhaven Protein Database* zeigen, daß etwa 6-7 % aller Prolylbindungen in nativen Proteinen in *cis*-Konformation vorliegen (Wu & Raleigh, 1998), sowie 43 % von 1435 nicht-redundanten Proteinstrukturen wenigstens eine Prolylbindung in *cis*-Konformation besitzen (Balbach & Schmid, 2000). Der Gehalt an *cis*-Rotamer steigt auf 12-17 %, wenn der Aminosäurerest N-terminal zum Prolinrest ein aromatischer Rest ist. In nativen Proteinen wird die höchste Neigung für das *cis*-Rotamer für die Sequenz Tyr-Pro (20-25 %) gefunden, für Phe-Pro nur 6-9 % (Wu & Raleigh, 1998). Die Sequenz Trp-Pro liegt nicht als *cis*-Rotamer in nativen Proteinen vor, wobei der erfaßte Anteil der Sequenz Trp-Pro in Proteinen der *Brookhaven Protein Database* sehr klein ist (Hessling, 2003). Es gibt noch keine wissenschaftlich eindeutige Erklärung, weshalb der prozentuale Anteil an *cis*-Isomer für die Sequenz Tyr-Pro dreimal größer ist, als für die strukturell ähnliche Sequenz Phe-Pro, auch bezüglich des Einflusses von Unterschieden der lokalen Umgebung (*local environment*). Für dieses Motiv enthaltende Modellpeptide konnte gezeigt werden, daß das Gleichgewicht der Rotamere nach Zusatz von 8 M Harnstoff (Bedingungen der chemischen Denaturierung von Proteinen) nicht beeinflusst wird (Wu & Raleigh, 1998).

Diese lokalen Wechselwirkungen sind sehr bedeutsam in der Stabilisierung von Wendebögen (*turns*). Von WRIGHT, DYSON und Mitarbeitern konnte für kleine Peptide der Struktur X-Ar-*cis* Pro-Ar-Asp-X (Ar für einen aromatischen Aminosäurerest, X für einen beliebigen Aminosäurerest) gezeigt werden, daß diese in Lösung bevorzugt einen Typ VI-Wendebogen (*type VI turn*) ausbilden, der neben Ladungswechselwirkungen der N-terminalen Aminosäure X mit Asp auch durch Bildung eines Clusters der beiden aromatischen Seitenketten mit dem Pyrrolidinring des Pro stabilisiert wird (Yao *et al.*, 1994a).

Es ist zu erwarten, daß lokale Interaktionen, die das *cis/trans*-Gleichgewicht von Aminosäuren beeinflussen und dadurch ein Rotamer gegenüber dem anderen durch

van der Waal's oder ionische Wechselwirkungen stabilisieren können, einen signifikanten Einfluß auf die Struktur(en) des entfalteten Zustandes und die Faltungsreaktionen von Proteinen haben. Es ist für viele prolinhaltige Proteine in Experimenten gezeigt worden, daß die Isomerisierung von Prolylbindungen geschwindigkeitsbestimmend sein kann (Schmid, 1986; Schmid, 1992; Wedemeyer *et al.*, 2002).

Die thermodynamischen Daten zum *cis/trans*-Gleichgewicht von Peptiden der Struktur Gly-Ar-Pro-Gly (Ar für einen aromatischen Aminosäurerest) im protischen ( $D_2O$ ) und dipolar aprotischen Lösungsmittel (DMSO- $d_6$ ) wurden veröffentlicht (Wu & Raleigh, 1998). Peptide dieser Sequenz bilden keinen Typ VI-Wendebogen, sondern zeigen im NMR-Spektrum  $^3J_{HN\alpha}$ -Kopplungskonstanten des aromatischen Restes in der *cis*-Konformation (7,0-7,5 Hz) für einen Zufallsknäuel (*random coil*). Sie dienen daher als Modelle für das Studium der Wechselwirkungen zwischen dem aromatischen und alicyclischen Ringsystem. Das Ausmaß der Wechselwirkung zwischen dem aromatischen Ring und dem Pyrrolidinring kann aus dem Effekt auf das *cis/trans*-Gleichgewicht quantifiziert werden. Eine Beschreibung des Gleichgewichtes der beiden Rotamere durch ein einfaches Zweizustandsmodell ist schon aus theoretischen Erwägungen zu vereinfacht, da sowohl das *cis*-, also auch das *trans*-Isomer eine Heterogenität der Konformationen zeigen. Für das *cis*-Rotamer sind zwei Konformationen mit *syn*- und *anti*-Anordnung des Arylrestes des aromatischen Aminosäurerestes zum Pyrrolidinring des Prolinrestes möglich, wobei die *syn*-Anordnung wesentlich stärker populiert ist. Es gilt die in Gleichung 5 dargestellte mathematische Beziehung, wobei  $K_{trans/cis}$  die apparente Gleichgewichtskonstante der beiden Rotamere ist.

**Definition der Gleichgewichtskonstante der Prolylisomerisierung unter Berücksichtigung von Wechselwirkungen des Pyrrolidinringes mit aromatischen Seitenketten.**

Gl.5

$$K_{cis/trans} = \frac{[cis - \text{Isomer}]}{[trans - \text{Isomer}]}$$

$$[cis - \text{Isomer}] = [cis_s - \text{Isomer}] + [cis_r - \text{Isomer}]$$

$$K_{cis_r/trans} = \frac{[cis_r - \text{Isomer}]}{[trans - \text{Isomer}]} \quad K_{cis_s/cis_r} = \frac{[cis_s - \text{Isomer}]}{[cis_r - \text{Isomer}]}$$

$$K_{cis/trans} = K_{cis_r/trans} \cdot (1 + K_{cis_s/cis_r})$$

$K_{cis/trans}$	<b>apparente Gleichgewichtskonstante der beiden Rotamere der Prolylbindung</b>
$[cis - \text{Isomer}]$	<b>totale Konzentration an <i>cis</i> -Isomer</b>
$[trans - \text{Isomer}]$	<b>totale Konzentration an <i>trans</i> -Isomer</b>
$[cis_s - \text{Isomer}]$	<b>Konzentration an <i>cis</i> -Isomer mit stabilisierender Wechselwirkung</b>
$[cis_r - \text{Isomer}]$	<b>Konzentration an <i>cis</i> -Isomer ohne stabilisierende Wechselwirkung</b>
$K_{cis_r/trans}$	<b>Gleichgewichtskonstante der Rotamere ohne stabilisierende Wechselwirkung</b>
$K_{cis_s/cis_r}$	<b>Gleichgewichtskonstante der Subpopulationen der <i>cis</i> -Isomere mit und ohne stabilisierende Wechselwirkung</b>

Die Subpopulation an Isomer  $cis_r$  bezeichnet die Konzentration an *cis* -Isomer ohne stabilisierende Wechselwirkung mit dem aromatischen System,  $cis_s$  die mit stabilisierender Wechselwirkung.  $K_{cis_s/cis_r}$  ist die Gleichgewichtskonstante für und  $K_{cis_r/trans}$  ohne diese Wechselwirkung. Für das *cis* -Isomer des betrachteten Modellpeptides wurden bei Tryptophan für 76 %, bei Tyrosin für 67 % und bei Phenylalanin für 60 % der Moleküle stabilisierende Wechselwirkungen mittels NMR auf der Basis der *J* -Kopplungskonstanten nachgewiesen. Die stabilisierenden Wechselwirkungen sind auch bei 8 M Harnstoff persistent, was deren Bedeutung für die Strukturbildung im entfalteten Zustand von diese Struktur motive enthaltenden Proteinen unterstreicht.

Die elementare Reaktion der *cis* / *trans* –Isomerisierung beinhaltet eine Rotation um eine partielle Doppelbindung. Die Energiebarriere ist vorwiegend enthalpischer Natur mit Aktivierungsenthalpien um  $20 \text{ kcal mol}^{-1}$  und kleinen Aktivierungsentropien. Im Übergangszustand erfolgt nur eine geringe Umorientierung des Solvens. Die Reaktion ist schneller in apolaren Lösungsmitteln. Dieser experimentelle Befund wird mit einer weniger polaren Natur des Übergangszustandes der Isomerisierung durch einen Verlust der Resonanz zwischen Carbonylgruppe und Stickstoff erklärt (Balbach & Schmid, 2000; Stein, 1993). Einflüsse, die den Charakter der Einfachbindung der Prolylbindung verstärken (Protonierung am Stickstoff, Reste mit starken induktiven Effekten am Pyrrolidinring in Prolinanaloga), erhöhen die Geschwindigkeitskonstante der Isomerisierung. Einflüsse, die den Doppelbindungscharakter der Prolylbindung durch Verstärkung der Resonanz erhöhen (Protonierung am Carbonylsauerstoff durch starke Säuren oder Wasserstoffbrückenbindungen), erniedrigen die Geschwindigkeitskonstante (Schmid & Baldwin, 1978). Allgemein sind die Geschwindigkeitskonstanten der Prolylisomerisierung vom pH-Wert und der Konzentration eines Denaturans unabhängig, gemessene Abhängigkeiten beobachteter Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{\text{obs}}$ ) bei Faltungsreaktionen von Proteinen ergeben sich in der Regel aus der Kombination mikroskopischer Geschwindigkeitskonstanten von Elementarschritten.

Von REIMER *et al.* (Reimer *et al.*, 1998) sind die thermodynamischen Parameter und mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten (bei  $T = 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , experimentelle Limitationen) der Prolylisomerisierung in polarem Lösungsmittel für einen Satz von N- und C-terminal geschützten Pentapeptiden der Form  $\text{Ac-Ala-X}_{\text{aa}}\text{-Pro-Ala-Lys-NH}_2$  mittels  $^1\text{H-NMR}$  gemessen worden, wobei für  $X_{\text{aa}}$  alle 20 kanonischen Aminosäuren substituiert wurden. Die Bildung von Wendebogen-Strukturen (*type VI turns*) als stabilisierende Elemente der *cis* –Konformation wurde für diese Peptidserie durch Untersuchung der für diese Motive typischen Kopplungskonstanten von  $^3J_{\text{HN}\alpha}$  und mittels Fern-UV Circular dichroismus ausgeschlossen. Die aromatischen Aminosäuren Phe, Tyr, Trp und auch His für  $X_{\text{aa}}$  zeigen in der Serie einen höheren Anteil an *cis* –Rotamer an, wobei im Rahmen dieser Untersuchungen keine Unterscheidung zwischen stabilisierter Konformation *cis<sub>s</sub>* und nichtstabilisierter Konformation *cis<sub>f</sub>* gemacht wurde (siehe oben). REIMER *et al.* konnten in diesen Untersuchungen zeigen, daß die Aminosäure His für  $X_{\text{aa}}$  bei  $\text{pH} = 3,5$  beide Teilreaktionen der Prolylisomerisierung wesentlich beschleunigen kann (Reimer *et*

*al.*, 1998). Wird Pro für X<sub>aa</sub> substituiert, verhalten sich beide Iminosäurereste bezüglich der Population der möglichen und nachweisbaren Rotamere und der Geschwindigkeitskonstanten ihrer Konversion im Rahmen eines thermodynamischen Zyklus autonom. Die thermodynamischen und kinetischen Daten zur Prolylisomerisierung aus dieser Serie von Modellpeptiden sind nur bedingt auf die Faltung von Proteinen übertragbar (entfalteter Zustand als Start des Faltungsprozesses), da die lokalen Wechselwirkungen im entfalteten Zustand eine wesentliche Komponente auch für vergleichsweise langsame Reaktionen dieses Prozesses darstellt (siehe oben).

#### *4.2. Effekte von Substituenten am Pyrrolidinring von Prolinresten auf das Gleichgewicht und die Konversion von Rotameren*

Die thermodynamischen und kinetischen Parameter der Isomerisierung von Prolylbindungen sind durch Untersuchungen an Modellpeptiden durch systematische Variation des zum Prolinrest N-terminalen Aminosäurerestes erhalten worden. Der Einbau von Konfigurationsisomeren (D-Aminosäuren) erlaubte Aussagen zu stereochemischen Aspekten der Isomerisierung (Schiene *et al.*, 1998). Für eine systematische Untersuchung der Konversion von Rotameren im molekularen Detail kamen Analoga des Prolins zur Anwendung. Die synthesechemischen Verfahren zur Herstellung dieser Analoga zielen zum einen auf die Einführung von Substituenten am Pyrrolidinring oder dessen Modifizierung (*pseudo*-Proline,  $\Psi$ Pro), zum anderen auf die chemische Modifizierung der Peptidbindung N-terminal zum Prolinrest durch eine Thiocarbonylgruppe (Thioxogruppe). Beide Verfahren kommen auch kombiniert zur Anwendung (Kern *et al.*, 1997; Schutkowski *et al.*, 1995; Schutkowski *et al.*, 1994). Die Konformationseigenschaften dieser Prolinanaloga in Peptidsequenzen werden bezüglich der Verschiebung der Gleichgewichtskonstanten und der mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten (Gleichung 6) im Vergleich zur parentalen (nichtmodifizierten) Sequenz verglichen.

$$K_{cis/trans} = \frac{[cis - \text{Isomer}]}{[trans - \text{Isomer}]} = \frac{k_{trans \rightarrow cis}}{k_{cis \rightarrow trans}}$$

$K_{cis/trans}$	<b>apparente Gleichgewichtskonstante der beiden Rotamere der Prolylbindung</b>
$[cis - \text{Isomer}]$	<b>totale Konzentration an <i>cis</i> -Isomer</b>
$[trans - \text{Isomer}]$	<b>totale Konzentration an <i>trans</i> -Isomer</b>
$k_{trans \rightarrow cis}$	<b>mikroskopische Geschwindigkeitskonstante der <i>trans</i> → <i>cis</i>-Isomerisierung der Prolylbindung</b>
$k_{cis \rightarrow trans}$	<b>mikroskopische Geschwindigkeitskonstante der <i>cis</i> → <i>trans</i>-Isomerisierung der Prolylbindung</b>

Aus diesem experimentellen Ansatz steht ein großer Datensatz zur Verfügung, der auch für Faltungsreaktionen von Bedeutung ist. Jede mögliche Monosubstitution am Pyrrolidinring des Prolins bedingt die Einführung eines neuen Asymmetriezentrums, woraus diastereomere chemische Verbindungen resultieren, die bezüglich der thermodynamischen und kinetischen Parameter der Rotamerengleichgewichte nach Einbau in Peptidsequenzen Unterschiede aufweisen können (siehe unten).

Es ist abzusehen, daß die Einführung von Thioverbindungen als Bausteine von modifizierten bzw. artifiziellen Proteinsequenzen mit modernen Methoden der chemischen Ligation (*chemical ligation*) gelingen wird (Bordusa, 2000). Für Modellpeptide wurde gezeigt, daß  $k_{cis \rightarrow trans}$  für die Thioverbindungen um den Faktor 25 – 125 langsamer ist als für die Kontrollsubstanzen (Oxoverbindungen), was auf eine um etwa 1,9 bis 2,9 kcal mol<sup>-1</sup> größere Rotationsbarriere um die C-N-Bindung zurückzuführen ist (Schutkowski *et al.*, 1994). Die Thermodynamik dieser *cis* → *trans* Konversion zeigt einen enthalpischen Beitrag vergleichbar mit den Kontrollsubstanzen, jedoch einen ungünstigen negativen entropischen Beitrag. Der Gehalt an *cis*-Konformer im dipolar aprotischen Lösungsmittel unterscheidet sich für die entsprechend analogen Peptide in beiden Verbindungsklassen nicht (Schutkowski *et al.*, 1996).

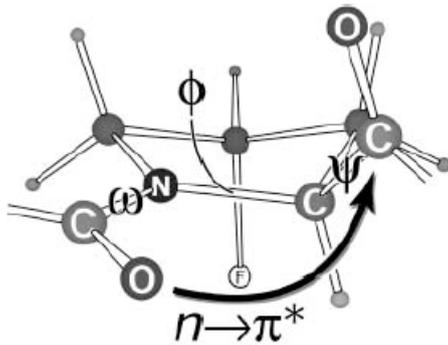
Die Gleichgewichtskonstante der Konformere in *pseudo*-Proline enthaltenden Peptiden hängt von der Substitution und der Chiralität des  $\delta$ -Kohlenstoffatoms ab. An diesem Atom disubstituierte Prolin- und *pseudo*-Prolinreste favorisieren das *cis*-Konformer, während unsubstituierte dieselbe Präferenz wie ein Prolinrest haben (Cavelier *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 1992).

Untersuchungen mittels  $^1\text{H-NMR}$  und Fern-UV Circular dichroismus an geschützten Dipeptiden, die einen (2*S*,5*R*)-5-*tert*-Butyl-prolyl-rest enthalten, zeigten durch die Präferenz der Bildung eines Typ VI Wendebogens im polaren, dipolar aprotischen und apolaren Lösungsmittel einen sehr hohen Gehalt an *cis*-Konformer (67 - 90 %) im Vergleich zur Kontrollsubstanz (14 - 30 %) (Halab & Lubell, 1999). Dieser Substituent beeinflusst die Energiebarriere der Amidrotation und verkleinert den dihedralen Winkel  $\psi$  aus sterischen Gründen. Das Analogon  $\gamma$ -(Dimethylsila)-prolin [4-(Dimethylsila)-prolin] als Baustein eines Modellpeptides (Tetrapeptid) zeigte in  $\text{DMSO-}d_6$  keinen Unterschied des Gehaltes an *cis*-Konformer im Vergleich zur Kontrollsubstanz (14 - 17 %) (Cavelier *et al.*, 2002). Das Analogon 2,4-Methanoprolin (2,4-methylenverbrücktes Prolin) fixiert in Modellpeptiden die Prolylbindung in *trans*-Konformation. Die Energiedifferenz der Grundzustände der Rotamere dieses Analogons beträgt  $5 \text{ kcal mol}^{-1}$  (Piela *et al.*, 1987; Talluri *et al.*, 1987). Von der Gruppe um SCHERAGA wurde 1999 das Analogon  $\delta,\delta$ -Dimethylprolin (5,5-Dimethylprolin) eingeführt, welches nach Einbau in Peptidsequenzen den substituierten Prolinrest in der *cis*-Konformation fixiert (An *et al.*, 1999).

In Position 4 oder  $\text{C}_\gamma$  substituierte Prolinreste sind Bausteine von Biomolekülen, wie Kollagen. Dessen Tripelhelix ist aus drei Einzelketten der Sequenz  $-(\text{Gly-Pro-(4R)-Hyp})_n-$  aufgebaut, wobei die Prolylbindungen in *trans*-Konformation vorliegen (Bächinger *et al.*, 1978; Bella *et al.*, 1994; Rich & Crick, 1961; Traub & Piez, 1971). Durch eine Monosubstitution eines L-Prolinrestes sind zwei diastereomere Verbindungen zugänglich, L-(4*R*)-Hyp und L-(4*S*)-Hyp, wobei nur ersterer Baustein die Tripelhelix stabilisiert (Jenkins & Raines, 2002; Mooney *et al.*, 2002). Die Substitution von Fluor in Position 4 von Prolinresten brachte wesentliche Erkenntnisse über dessen Konformationseigenschaften. Der Pyrrolidinring kann in Lösung zwei Ringkonformationen einnehmen, die als *pucker* bezeichnet werden. Es werden ein *endo-pucker* und ein *exo-pucker* unterschieden.

Die Lösungsstruktur von Modellpeptiden der Art  $-(\text{Gly-Pro}_x\text{-Pro}_y)_n-$  zeigte, daß hier  $\text{Pro}_x$  vorwiegend als *endo-pucker*,  $\text{Pro}_y$  als *exo-pucker* vorliegt (Bella *et al.*, 1994; DeRider *et al.*, 2002; Jenkins & Raines, 2002; Persikov *et al.*, 2003). Wesentliche Erkenntnisse zur Stabilität von tripelhelikalen Strukturen der Polyprolin-II-Helices wurden durch an Position 4 fluoridierte Prolinderivate, L-(4*R*)-FPro und L-(4*S*)-FPro, und deren Einbau in kollagene Modellpeptide erhalten. In organischen Verbindungen gebundenes Fluor hat einen sehr starken elektronegativen Effekt und bildet keine Wasserstoffbrückenbindungen aus. Die  $\text{pK}_a$ -Werte am Stickstoff der konjugierten Säure betragen für L-Pro 10,80, für L-(4*R*)-Hyp 9,68 und für L-(4*R*)-FPro 9,23 (Jenkins & Raines, 2002). Daher wird durch die genannten Substitutionen die Elektronendichte am Stickstoff verändert (stärkerer  $\text{sp}^3$ -Charakter). Die Einführung von L-(4*R*)-FPro in kollagene Modellpeptide hat eine extreme Erhöhung, die von L-(4*S*)-FPro eine extreme Verminderung der thermodynamischen (konformationellen) Stabilität zur Folge (Barth *et al.*, 2004; Jenkins & Raines, 2002).

Die Ursache dieser extremen Unterschiede resultiert aus einem Zwischenspiel verschiedener Faktoren und ist im sogenannten *gauche*-Effekt begründet, der den *pucker* der substituierten Pyrrolidinringe bestimmt (Panasik *et al.*, 1994). Er beschreibt ein bei organischen Verbindungen auftretendes Phänomen, wonach bei zwei vicinalen Kohlenstoffatomen mit elektronegativen Substituenten diese in der Konformation *gauche* ( $60^\circ$ ) zueinander stehen (O'Hagan *et al.*, 2000). Dadurch ist eine maximale Überlappung zwischen den bindenden Orbitalen der mehr elektropositiven Substituenten und den antibindenden Orbitalen der mehr elektronegativen Substituenten möglich. Diese Wechselwirkung ist besonders stark zwischen einem Fluor und dem Stickstoff einer Amidgruppe. Die Manifestierung des *gauche*-Effektes in L-(4*R*)-Hyp und L-(4*R*)-FPro bedingt deren vorwiegende Konformation im *exo-pucker* (Gerig & McLeod, 1973). Der dihedrale Winkel  $\phi$  ist eine Funktion des *puckers*. Ein Winkel  $\psi = 150^\circ$  erlaubt eine optimale Überlappung zwischen dem nichtbindenden Elektronenpaar des Carbonylsauerstoffs der Prolylbindung ( $\text{O}'_{i-1}$ ) und einem antibindenden  $\pi$ -Orbital des Amidkohlenstoffs  $\text{C}'_i$  (Abbildung 1).



**Abb.1 Wechselwirkung ( $n \rightarrow \pi^*$ ) zwischen dem Carbonylsauerstoff der Prolylbindung und dem C-terminalen Amidkohlenstoff für die Stabilisierung der *trans*-Konformation der Prolylbindung (aus (Jenkins & Raines, 2002)).**

Diese  $n \rightarrow \pi^*$ -Wechselwirkung stabilisiert zusätzlich die *trans*-Konformation der Prolylbindung, die eine Voraussetzung der Bildung tripelhelikaler Strukturen wie in Kollagen ist. In der *cis*-Konformation würde  $C\alpha'_{i-1}$  proximal zu  $C'_i$  stehen, wodurch keine zusätzliche Stabilisierung durch eine  $n \rightarrow \pi^*$ -Wechselwirkung möglich ist. Der Torsionswinkel  $\omega$  als Kennzeichen des entsprechenden Rotamers ist daher direkt mit dem *pucker* des Pyrrolidinringes verbunden. Je stärker die Elektronegativität eines (*R*)-Substituenten an Position 4, desto größer ist die Stabilisierung der *trans*-Konformation. Dementsprechend ist in L-(4*S*)-FPro enthaltenden Verbindungen die *cis*-Konformation stärker stabilisiert.

Die Substitution von L-(4*R*)-Aminoprolin für L-(4*R*)-Hyp in tripelhelikalen Modellpeptiden resultierte durch den *gauche*-Effekt ebenfalls in einer thermodynamischen Stabilisierung im Vergleich zum Kontrollpeptid, wobei prototrope Gleichgewichte der Aminogruppe Mischeffekte in Abhängigkeit vom pH des Mediums bedingen (Jenkins & Raines, 2002).

Von RENNER *et al.* (Renner *et al.*, 2001) sind die thermodynamischen Parameter der Gleichgewichte und die Geschwindigkeitskonstanten der Konversion der Rotamere von N-acetyl-L-(4*R*)-FPro-OMe, N-acetyl-L-(4*S*)-FPro-OMe und N-acetyl-4-L-diFPro-OMe untersucht worden (Tabelle 2). Diese Daten stehen im Kontext zu den oben dargelegten Ausführungen. Daher ist auch erklärbar, weshalb *cis*-Prolylbindungen in kristallinen Proteinen einen *endo-pucker* des Pyrrolidinringes zeigen.

Durch moderne Verfahren des *protein engineering*s (*selective pressure incorporation, protein splicing, chemical ligation*) ist es möglich (isosterische) Prolinanaloga in Proteine einzubauen. Die Isomerisierungen von Prolinresten sind oft für langsame Faltungsreaktionen von Proteinen verantwortlich. Die gezielte

Substitution von Prolinresten der Primärstruktur, die im nativen Zustand von Proteinen in der Regel nur eine der möglichen Konformationen realisieren, erlaubt experimentell eine gezielte Beeinflussung von Faltungsreaktionen und der thermodynamischen Stabilität.

#### *4.3. Isomerisierung von Prolylbindungen als langsame Faltungsreaktionen von Proteinen*

Die Isomerisierung von Prolylbindungen als Bestandteil der Faltung von prolinhaltigen Proteinen ist seit der Entdeckung, daß entfaltete Ribonuklease A (RNase A) aus einer heterogenen Mischung von Molekülen besteht, Gegenstand zahlreicher experimenteller Untersuchungen (Garel & Baldwin, 1973). BRANDTS *et al.* entdeckten 1975, daß langsame Faltungsphasen von Proteinen zum Erreichen der nativen Konformation durch die *cis / trans* –Isomerisierung von Prolylbindungen bedingt sein können (Brandts *et al.*, 1975). Die in diesen frühen Arbeiten festgelegte Terminologie ist bis heute für die Problematik beibehalten worden. Die für Peptide gemessenen Gleichgewichte der Rotamere und experimentelle Daten zu Sequenz- und Substituenteneffekten können generell auf entfaltete Proteinketten übertragen werden, wenn nicht durch Disulfidbrücken eine entropische Destabilisierung des entfalteten Zustandes eintritt, der auch das Gleichgewicht der Konformere von Prolylbindungen einschließen kann. Im nativen Zustand wird in der Regel nur ein Konformer der Prolylbindung realisiert (Ausnahme Nuklease aus *Staphylococcus aureus* (Evans *et al.*, 1987; Fox *et al.*, 1986)). Ausgehend davon bezeichnet man die Fraktion entfalteter Moleküle als  $U_f$  (Index von *fast*, schnell faltend), deren Konformation der Prolylbindung der des nativen Zustandes entspricht. Sie falten direkt in die native Konformation zurück. Die Fraktion entfalteter Moleküle, deren Konformation nicht der des nativen Zustandes entspricht, bezeichnet man als  $U_s$  (Index von *slow*, langsam faltend). Sie falten nur unter Reisomerisierung der nicht-nativen Prolylbindung in die native Konformation zurück (Kiefhaber *et al.*, 1992; Schmid, 1986; Schmid, 1992). Bei Vorhandensein mehrerer Prolylbindungen, für die meisten Proteine die Regel, teilen sich diese Fraktionen gemäß den thermodynamischen Stabilitäten der Rotamere weiter auf (Gleichgewichte der Subpopulationen), so daß aus diesen multiplen Gleichgewichten im entfalteten Zustand neben regulär konsekutiven auch parallele Faltungswege resultieren können. Die optischen Eigenschaften (Absorption, Fluoreszenz,

Circulardichroismus) der Rotamere der Polypeptidkette sind im vollständig entfalteten Zustand gleich, eine differenzierte Charakterisierung ist durch Kernresonanzspektroskopie möglich (Grathwohl & Wüthrich, 1981; Reimer & Fischer, 2002; Wüthrich & Grathwohl, 1974). Die prozentualen Anteile der beiden Hauptfraktionen  $U_f$  und  $U_s$  sind von der Konformation des (der) Prolinrestes (Prolinreste) im nativen Zustand abhängig. Das *cis*-Isomer eines Prolinrestes besitzt eine höhere Energie des Grundzustandes im Vergleich zum *trans*-Isomer und ist daher in geringeren Konzentrationen für Polypeptide in Lösung nachweisbar. Nehmen Proline im nativen Zustand eines Proteins eine *cis*-Konformation ein, ist die Konzentration an  $U_s$  im Gleichgewicht größer als  $U_f$ , weil  $U_f$  eine höhere Energie des Grundzustandes als  $U_s$  besitzt. Die Geschwindigkeitskonstanten der Prolylisomerisierung können theoretisch größer, etwa gleich oder viel kleiner in Bezug auf die der Konsolidierung der Elemente der Sekundär- und / oder Tertiärstruktur (Hauptfaltungsphase, *main folding phase*) sein.

Von KIEFHABER und SCHMID sind in einer klassischen Publikation Fallunterscheidungen der Prolylisomerisierung im Vergleich zur Konformationsfaltung eines Proteins, auch für mehrere essentielle Prolylbindungen, in mathematischen Modellen abgehandelt worden (Kiefhaber *et al.*, 1992). Faltungsprozesse, die durch Prolylisomerisierungen limitiert sind, können durch mathematische Auswertung der gemessenen Reaktionen nach Modellen (Amplituden, Geschwindigkeitskonstanten), die Methode des Doppelsprungs (*double-jump assay*, *double-mixing assay*), die Katalyse der Isomerisierung durch PPlasen sowie die Substitution von Prolinresten durch andere Derivate (kanonische oder nicht-kanonische Aminosäuren) mittels *protein engineering* untersucht werden (Balbach & Schmid, 2000; Schmid, 1986). Oft werden diese Methoden in Kombination angewandt.

Experimentell werden Parameter von Faltungsreaktionen zumeist durch kinetische Messungen der chemischen Entfaltung aus dem nativen Zustand und der Faltung aus dem chemisch entfalteten Zustand bei verschiedenen Konzentrationen an Denaturans gemessen. Reine Faltungsprozesse (ohne Assoziationen als bimolekulare Schritte) sind Reaktionen 1. Ordnung. Langsame Faltungsprozesse, wie Isomerisierungen von Prolylbindungen, können Phasierungen der Progresskurven bedingen, deren mathematische Auswertung die apparenten Geschwindigkeitskonstanten und Amplituden liefern (Kiefhaber & Schmid, 1992).

Der Nachweis der Isomerisierung von Prolylbindungen im entfalteten Zustand gelingt mit der Methode des Doppelsprungs ausgehend vom nativen Zustand des Proteins. Nach einem ersten Sprung in Entfaltungsbedingungen isomerisiert die Prolylbindung von  $U_f$  zu  $U_s$ . Durch einen zweiten, analytischen Sprung nach bestimmten Inkubationszeiten unter Entfaltungsbedingungen (*delay time*) zu Faltungsbedingungen kann die Konzentration von  $U_f$  durch die Amplitude der schnellen Rückfaltungsphase bestimmt werden. Die Amplitude der langsamen Phase ist der Konzentration an  $U_s$  proportional.

Die Hauptfaltungsphase (*main folding phase*) oder Konformationsfaltung (*conformational folding*) eines Proteins beschreibt die Formierung dessen wesentlicher Strukturelemente. Aus experimentellen Datensätzen zur Faltung von Proteinen, die durch Änderungen analytischer Meßsignale (Absorption, Fluoreszenz, Circular dichroismus) sehr gut untersucht werden kann, ist gezeigt worden, daß die Konformationsfaltung auch beim Vorliegen nicht-nativer Prolylbindungen erfolgt. Der native Zustand mit korrekten Prolylbindungen bildet sich aus einem Intermediat, das nativ-ähnliche Struktur besitzt und als nativ-ähnliches (*native-like*) Intermediat  $I_N$  bezeichnet wird. Der Nachweis eines solchen Intermediates gelingt mit der Methode des Doppelsprungs ausgehend vom entfalteten Zustand mit  $U_f$  und  $U_s$  im Gleichgewicht. Der erste Sprung erfolgt zu Faltungsbedingungen des Proteins. Da nativ-ähnliche Intermediate instabiler sind als der native Zustand, kann durch einen zweiten, analytischen Sprung nach bestimmten Inkubationszeiten unter Faltungsbedingungen (*delay time*) zu Entfaltungsbedingungen die Konzentration des Proteins im nativen Zustand und die von  $I_N$  durch Auswertung der Signalamplituden bestimmt werden. Die Isomerisierung nichtessentieller Prolinreste eines Proteins (vorwiegend in *trans*-Konformation im nativen Zustand) muß sich nicht als langsame Faltungsphase manifestieren.

Umfassende experimentelle Untersuchungen zur Isomerisierung von Prolylbindungen als Bestandteil des Faltungsprozesses von strukturell sehr verschiedenen Proteinen sind in zahlreichen Originalarbeiten und Reviews publiziert worden. Es wird in diesem Rahmen auf eine zusammenfassende Darlegung verzichtet und auf einschlägige Referenzen verwiesen (Kiefhaber & Schmid, 1992; Wedemeyer *et al.*, 2002). Als Modellproteine zu dieser Thematik sind Ribonuklease A aus Schweinepankreas und die mikrobielle Ribonuklease T1

etabliert worden. Beide Proteine enthalten je vier Prolinreste, davon je zwei Prolylbindungen in *trans*- und je zwei in *cis*- Konformation im nativen Zustand. RNase A enthält vier Disulfidbrücken, RNase T1 nur zwei.

In RNase A wurden (*cis*)Pro93, (*cis*)Pro114 und (*trans*)Pro117 als essentielle Prolinreste identifiziert. Kinetische Modelle der Entfaltung und Faltung sind durch die möglichen Konformerengleichgewichte im entfalteten Zustand sehr komplex (*box*-Modelle). Durch die Kombination verschiedener Methoden und den Einbezug von rationalen Varianten (Tyr → Phe, Tyr → Trp) wurde die Einteilung der Fraktionen entfalteter Moleküle erweitert. Im Faltungsprozeß resultiert die nicht-native Konformation der Prolylbindung Tyr92-Pro93 in der Population eines nativ-ähnlichen Intermediates. In RNase A sind Konformationsfaltung und Prolylisomerisierung korreliert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen finden ihren Niederschlag im CFIS-Modell (*chain-folding initiation site*) der Faltung (siehe Tabelle 1).

Spezifische Eigenschaften von RNase T1 und von Varianten des Proteins haben dieses System als Modellprotein zur Untersuchung der Prolylisomerisierung und deren Katalyse durch PPlasen etabliert (Balbach & Schmid, 2000; Fischer & Aumüller, 2003; Scholz *et al.*, 1997a). Der native bzw. entfaltete Zustand von reduzierter (und carboxymethylierter) RNase T1 kann durch Variation der Ionenstärke erreicht werden, was die Untersuchung von Faltungsprozessen ohne Denaturanzien ermöglicht. Der native Zustand wird durch hohe Ionenstärken stabilisiert. Durch die *cis* → *trans* Isomerisierung von (*cis*)Pro39 und (*cis*)Pro55 haben nur 2 - 4 % der Moleküle die native *cis*- Konformation dieser Prolylbindungen im entfalteten Zustand. Auf der Basis des insbesondere durch die Methode des Doppelsprungs erhaltenen umfangreichen experimentellen Datensatzes wurden kinetische Modelle der Entfaltung und Faltung von RNase T1 formuliert. Es konnte gezeigt werden, daß auch für dieses Protein Konformationsfaltung und Prolylisomerisierung stark korreliert sind. Im zentralen nativ-ähnlichen Intermediat der Faltung sind die Prolylbindungen von Pro39 und Pro55 in *trans*- Konformation, die geschwindigkeitsbestimmend in die native *cis*- Konformation isomerisieren (Mayr *et al.*, 1996).

#### 4.4. Katalyse der Isomerisierung von Prolylbindungen durch Peptidyl-prolyl-*cis* / *trans*-Isomerasen (PPlasen)

Im Jahre 1984 entdeckten FISCHER *et al.* eine neue Klasse von Enzymen, die die Isomerisierung von Prolylbindungen katalysieren (Fischer *et al.*, 1984b). Diese Entdeckung der PPlasen geht einher mit der Entwicklung einer Nachweismethode dieser enzymatischen Aktivität *in vitro* unter Ausnutzung der isomerspezifischen Proteolyse (ISP-Test) von Modellpeptiden der Form Suc-X<sub>aa</sub>-Y<sub>aa</sub>-Pro-Z<sub>aa</sub>-pNA (X<sub>aa</sub>, Y<sub>aa</sub>, Z<sub>aa</sub> Aminosäure; -pNA 4-Nitroanilid). Die Serinprotease Chymotrypsin spaltet die chromophore Gruppe eines Modellpeptides (Z<sub>aa</sub> = Phe) unter Freisetzung von 4-Nitroanilin nur dann, wenn die Prolylbindung in *trans*-Konformation vorliegt (Lin & Brandts, 1979; Lin & Brandts, 1985). Die isomerspezifische Proteolyse wird auch dann beobachtet, wenn sich die isomerisierende Bindung nicht unmittelbar neben der proteolytisch gespaltenen Bindung befindet (Fischer *et al.*, 1984a). Daher wird bei Überschuß an Protease die Fraktion der Moleküle in *trans*-Konformation sehr schnell gespalten (*burst*-Phase), während die nachfolgende Isomerisierung *cis* → *trans* der Prolylbindung der verbleibenden Fraktion des Modellpeptides als langsame Phase detektierbar ist. Ein gekoppelter optischer Test mit diesem System ist möglich, wenn die Protease die native PPlase proteolytisch nicht angreift. Die erste nachgewiesene PPlase von FISCHER *et al.* war Cyclophilin (Cyp18) (Fischer *et al.*, 1984b).

Das methodische Repertoire hat seit der Etablierung des ISP-Tests eine enorme Weiterentwicklung erfahren und ist auch um den Nachweis allgemeiner Peptidyl-peptidyl-*cis* / *trans*-isomerisierungen und die *cis* / *trans*-Isomerisierung von *pseudo*-Peptidbindungen erweitert worden (Hübner *et al.*, 1991; Janowski *et al.*, 1997; Kern *et al.*, 1995; Kofron *et al.*, 1991; Meyer *et al.*, 1994; Schiene-Fischer & Fischer, 2001). Sehr gute Übersichten dazu sind von FISCHER (Fischer, 1994; Fischer, 2000) und FISCHER & AUMÜLLER (Fischer & Aumüller, 2003) publiziert worden.

PPlasen (E.C. 5.1.8.) sind ubiquitäre Enzyme und wurden bei allen Organismen und in den zellulären Kompartimenten nachgewiesen. Die humanen Isomerasen der Peptidbindung werden in humane Peptidyl-prolyl-*cis* / *trans*-Isomerasen (PPlasen) und humane Isomerasen der sekundären Amid-Peptidbindung (APlasen, ATP-abhängig) eingeteilt (Fischer & Aumüller, 2003), wobei die erste Gruppe im Rahmen der Thematik dieser Arbeit zur Anwendung kam. Die humanen Peptidyl-prolyl-*cis* / *trans*-Isomerasen werden in drei Klassen eingeteilt, Cyclophiline

(Molekulargewicht 18 kDa), FK506-bindende Proteine (FKBP12) (Molekulargewicht 12 kDa) und Parvuline (Molekulargewicht 10 kDa). Die dreidimensionale Struktur vieler Vertreter ist gelöst worden, FKBP12 und Parvuline zeigen gemeinsame Struktur motive (FKBP-*superfold*) (Fischer & Aumüller, 2003). Die katalytischen Effizienzen  $\frac{k_{cat}}{K_M}$  dieser Enzyme wurden mit verschiedenen Modellpeptiden (artifizielle Substrate) gemessen. Die Enzyme zeigen sehr unterschiedliche Substratspezifitäten. Cyclophiline haben eine relativ geringe Substratspezifität, FKBP12 und Parvulin haben eine Präferenz für hydrophobe Aminosäuren des N-terminalen Teils der Prolylbindung (Balbach & Schmid, 2000). PIN1, welches zur Gruppe der Parvuline gehört, hat eine Präferenz für phosphorylierte Ser-Pro-Sequenzen (Yaffe *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2000).

Der Triggerfaktor (Molekulargewicht 48 kDa) ist ein mit der 50 S ribosomalen Untereinheit assoziiertes Multidomänenprotein aus Bakterien mit PPlase-Aktivität (Stoller *et al.*, 1995). Die N-terminale Domäne (Molekulargewicht 13 kDa) vermittelt die Assoziation zur ribosomalen Untereinheit (Hesterkamp *et al.*, 1997). Die Aktivität als Prolylisomerase wird durch die mittlere, die sogenannte FKBP-Domäne (Molekulargewicht 12 kDa), realisiert (Hesterkamp & Bukau, 1996). Die nachgewiesene Aktivität des Triggerfaktors als molekulares Chaperon (siehe nachfolgendes Kapitel) wird durch die C-terminale Domäne (Molekulargewicht 23 kDa) vermittelt (Scholz *et al.*, 1997b). Die isolierten Domänen des Triggerfaktors sind stabil und lassen sich rekombinant und in Kombination herstellen (Zarndt *et al.*, 1997). Aus der Lokalisation des Triggerfaktors ist ein Einfluß auf die Faltung naszierender Polypeptidketten ableitbar (Hesterkamp *et al.*, 1996). Die katalytische Effizienz dieser PPlase auf Proteinsubstrate, wie auf die für diese Art von Untersuchungen etablierte RCM-(-P55)-RNase T1 [reduzierte und carboxymethylierte Form der Variante S54G/P55N von RNase T1], ist größer als auf Modellpeptide (Balbach & Schmid, 2000). Homologe Domänen zu Prolylisomerasen werden auch in anderen Proteinen gefunden, die eine Isomeraseaktivität zeigen (Balbach & Schmid, 2000).

Die Katalyse von Cyclophilin auf die Faltung von Proteinen wurde zuerst 1987 auf die leichte Kette von Immunoglobulin der Maus und auf RNase untersucht (Lang *et al.*, 1987; Schmid, 1993). Prolylimitierte Phasen der Faltung vieler weiterer Proteine wurden auf eine Katalyse durch PPlasen untersucht (Balbach & Schmid, 2000), unter

anderen auch die Bildung tripelhelikaler Strukturen im Reifungsprozeß von Kollagen III (Bächinger, 1987) und Kollagen IV (Davies *et al.*, 1989). Diese mechanistischen Untersuchungen *in vitro* sind auf zellbiologische Systeme *in vivo* stark erweitert worden und umfassen auch *knock-out*-Techniken (Fischer & Aumüller, 2003).

Die Eigenschaft der Prolylbindung, in zwei stabilen Konformationen mit geringer Differenz der freien Enthalpien des Grundzustandes und hoher freier Aktivierungsenthalpien ihrer Konversion zu existieren, wird auch als molekularer Schalter (*molecular switch*) begriffen. Die Kopplung dieses konformationellen Gleichgewichtes und hoher Resistenz der Konversion der Reaktionspartner mit schnellen nachfolgenden Stufen kann eine transiente Diskriminierung oder Auswahl von Konformeren in der Gesamtreaktion zur Folge haben. Dieser Sachverhalt wird als Isomerspezifität bezeichnet (Fischer & Aumüller, 2003). PPIasen katalysieren ausschließlich die Konversion der Rotamere von Prolylbindungen. Allgemein fungieren sie als Unterstützung der Konformationsfaltung von Proteinen durch Beschleunigung prolinlimitierter Schritte (*assisted protein folding, folding helper*) (Schmid *et al.*, 1993). Es werden zudem eine Funktion im Sinne eines ‚Festhaltens‘ (Klammern, Fixierung) von entfalteten Polypeptidketten (*holding*), eine Funktion bei der ‚Bereitstellung‘ physiologischer Liganden und eine prolingerichtete Bindungsfunktion diskutiert (Fischer & Aumüller, 2003).

Die gemessenen katalytischen Effizienzen  $\frac{k_{cat}}{K_M}$  von PPIasen auf verschiedene Proteinsubstrate reflektieren die energetischen Erfordernisse (Stereochemie, *subsites*) der Bildung und die monomolekulare Umwandlung der beiden Michaelis-Komplexe für die Rotamere. Die Konzentrationsverhältnisse der beiden Spezies in Lösung ist keine Voraussetzung für diesen Effekt. Die intrinsische Gleichgewichtskonstante der beiden enzymgebundenen Rotamere (Gleichgewichtskonstante der Michaelis-Komplexe) kann stark von der Gleichgewichtskonstanten der ungebundenen Rotamere abweichen (Kern *et al.*, 1995). Aus der Bestimmung katalytischer Parameter von Cyp18 in Abhängigkeit verschiedener Bedingungen und von Isotopieeffekten (sekundäre und Lösungsmittelisotopieeffekte) wurde von HARRISON & STEIN (Harrison & Stein, 1990; Harrison & Stein, 1992) ein Mechanismus der ‚Katalyse durch Verdrehung oder Verbiegung‘ (*catalysis by distortion, conformational twist mechanism*) vorgeschlagen,

der mechanistisch einen nichtkovalenten Übergangszustand postuliert. Bei diesem Mechanismus würde die festere Bindung des Übergangszustandes im aktiven Zentrum des Enzyms, der einen Winkel  $\omega \approx 90^\circ$  an der Prolylbindung aufweist, die Absenkung der freien Aktivierungsenthalpie  $\Delta G^\ddagger$  bewirken (Fischer, 1994). Wesentliche Erkenntnisse zum Mechanismus von Cyp18 gelangen mittels dynamischer NMR-Spektroskopie. Die beiden Konformere binden an das Enzym mit ähnlicher Affinität (Kern *et al.*, 1995). Die Isomerisierung erfolgt durch Rotation des C-terminalen Teils des Modellpeptides, während der N-terminale Teil an Cyp18 gebunden bleibt. Die Veränderung der Dynamik des Proteinrückgrates (*backbone dynamics*) wurde durch Messung von Autokorrelationsparametern abgeschätzt (Eisenmesser *et al.*, 2002). Die Änderung der Parameter für das katalytisch essentielle Arg55 in Cyp18 erfolgt in Einklang mit den Geschwindigkeiten des Substratumsatzes. Durch diese Experimente (auch mit dem HIV-1-Hüllprotein als Proteinsubstrat (Bosco *et al.*, 2002)) wurde eine Änderung der Dynamik des Proteinrückgrates bei der Bildung des Übergangszustandes und die Beteiligung von Arg55 in Cyp18 an der Katalyse gezeigt (Fanghänel, 2003).

## 5. MOLEKULARE CHAPERONE (GroEL)

Faltungshelferproteine (*foldinɡ helper*) zur Unterstützung der Konformationsfaltung von Proteinen werden in Faltungskatalysatoren (Enzyme) und molekulare Chaperone eingeteilt (Bukau *et al.*, 1999). Zu den Faltungskatalysatoren gehören zum Beispiel die Protein-Disulfidisomerasen (PDIsen) und die im vorangegangenen Kapitel abgehandelten Peptidyl-prolyl-*cis* / *trans*-Isomerasen (PPIasen). Sie beeinflussen bestimmte geschwindigkeitsbestimmende Schritte der Konformationsfaltung von Proteinen durch unbegrenzte Katalyseschritte und bewirken keine Änderung der Produktzusammensetzung bzw. der Gleichgewichtslage. Der Terminus ‚*molecular chaperone*‘ wurde für eine weitverzweigte Gruppe von Proteinen geprägt, die bei der Faltung und Assemblierung von Polypeptidketten in der Zelle assistieren (Ellis, 1987). Der Begriff ist historisch für einen sauren *nucleosome assembly factor* von LASKEY *et al.* geprägt worden (Laskey *et al.*, 1978). PELHAM erkannte aus Untersuchungen von prokaryontischen und eukaryontischen Hitzeschockproteinen, daß molekulare Chaperone eine Klasse von Proteinen sind, die die korrekte Faltung und Oligomerisierung anderer Proteine ermöglichen (Pelham, 1986). Die Zahl der Proteine, denen eine Funktion als Chaperon zugeschrieben wird, wächst ständig (Bukau *et al.*, 1999). Die treffendste Definition für molekulare Chaperone ist, daß sie bei der Strukturbildung von Proteinen assistieren und unproduktive Nebenreaktionen verhindern, ohne Teil der finalen Struktur zu sein (Ellis, 1987; Hemmingsen *et al.*, 1988). Sie katalysieren (beschleunigen) keine Faltungsreaktionen, sondern erhöhen die Konzentration der Moleküle auf einem produktiven Faltungsweg (Faltungsausbeute) (Bukau *et al.*, 1999; Fischer, 1996). Chaperone assoziieren transient mit nicht-nativen Konformeren von Proteinen durch Erkennung hydrophober Bereiche (*hydrophobic patches*), sie unterscheiden sich bezüglich der molekularen Mechanismen der Substraterkennung (Bukau *et al.*, 1999). Ein weiteres Kennzeichen der molekularen Chaperone ist die Regulation ihrer funktionellen Aktivität durch ATP (Bose *et al.*, 1999). Einige Chaperone agieren in Zyklen in Verbindung mit der katalytischen Aktivität als ATPase (Hsp70, Hsp90, Hsp104 / ClpB), andere unabhängig von der Spaltung an ATP (Hsp47).

Das prokaryontische Chaperonin GroEL (Hsp60, *Escherichia coli chaperonin 60*) ist eine ATPase und fungiert im Komplex mit seinem Cochaperonin GroES (*Escherichia coli chaperonin 10*). GroEL (Hsp60) besteht aus 14 Untereinheiten und ist aus zwei siebengliedrigen Ringen aufgebaut. Das elektronenmikroskopische Bild (Chen *et al.*,

1994) und die Kristallstruktur (Braig *et al.*, 1994) zeigen das Molekül als ‚Tonne‘, deren Abmessungen vom Status des ATP-Zyklus variieren. Eine Untereinheit hat ein Molekulargewicht von 60 kDa und besteht aus einer apikalen, intermediären und äquatorialen Domäne. Die generelle Funktionalität der Aminosäurereste von GroEL ist durch systematische Mutagenese aufgeklärt worden (Fenton *et al.*, 1994). Die apikale Domäne vermittelt die Substraterkennung durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der entfalteten Polypeptidkette eines Proteinsubstrates (Motojima *et al.*, 2004). Die äquatoriale Domäne ist für die ATPase-Aktivität und den Kontakt mit der äquatorialen Domäne der entsprechenden Untereinheit des zweiten Ringes verantwortlich. Beide Domänen werden durch die intermediäre Domäne über zwei *hinge*-Regionen verbunden. Der ATP-abhängige Zyklus ist im mechanistischen Detail durch experimentelle Datensätze sowohl enzymatischer (Fersht, 1999; Ranson & Clarke, 1999; Todd *et al.*, 1994), als auch struktureller Methoden (Elektronenmikroskopie) (Burston & Saibil, 1999; Schmidt *et al.*, 1994) dokumentiert worden.

## 6. FALTUNG UND STABILITÄT GLOBULÄRER EINDOMÄNENPROTEINE

### 6.1. Allgemeine Erkenntnisse

Die Aufklärung des Faltungsweges eines Proteins umfaßt die komplette Beschreibung des Ausgangs- (entfaltet) und Endzustandes (gefaltet) und die während des Prozesses auftretenden Intermediate in struktureller bzw. energetischer Beziehung zueinander (Fersht, 1999; Mayor *et al.*, 2003; Mayor *et al.*, 2000). Als einfache Modellproteine für experimentelle und auch theoretische Studien sind Eindomänenproteine (*small single-chain proteins, one-domain proteins*) und mittels *protein engineering* erzeugte Varianten als Standards etabliert worden (siehe Kapitel 2), woraus ein großer experimenteller Datensatz von Parametern zu deren Stabilität und Faltung resultiert (Pfeil, 1998; Pfeil, 2001). Viele Vorstellungen über Determinanten und Modelle des Faltungsprozesses von Proteinen sind aus diesen Daten abgeleitet worden (siehe Kapitel 3). Es wird für die Suche nach diesen Determinanten generell angestrebt, die Systeme der Untersuchungen so einfach wie möglich zu gestalten, daher Modellproteine zu verwenden, die nach einem ‚idealen‘ Zweizustandsmodell falten. Disulfidbrücken oder Prolylbindungen haben oft die Bildung von Intermediaten zu Folge. Eindomänenproteine falten daher nach einer Zweizustands- (*two-state kinetics*) oder Dreizustands-Kinetik (*three-state kinetics*), wobei in Abhängigkeit der Bedingungen Übergänge möglich sind. Eine Übersicht thermodynamischer und kinetischer Daten zur Faltung etablierter Eindomänenproteine wurde von JACKSON publiziert (Jackson, 1998). Die Heterogenität der experimentellen Daten läßt aber auch hier noch keine Erkenntnis nach einem ‚generellen Trend‘ oder ursächlichen Determinanten zu, ausgenommen die Erkenntnis der hierarchischen Natur des Faltungsprozesses (Jaenicke & Seckler, 1999).

### 6.2. Barstar

Barstar ist der intrazelluläre Inhibitor der extrazellulären Ribonuklease Barnase aus *Bacillus amyloliquefaciens* (Hartley, 1989). Barstar besteht aus 89 Aminosäuren und ist ein Eindomänenprotein. Er enthält zwei Cysteine (Cys42 und Cys80), die in der aktiven, inhibitorischen Funktion auf Barnase in reduzierter Form vorliegen. Barnase ist rekombinant in *Escherichia coli* als prokaryontischem *host*-Organismus nur durch Coexpression mit Barstar zu produzieren (Hartley, 1988). Die Variante C40A/C82A

von Barstar repräsentiert ein permanent reduziertes und aktives Protein und wurde ursächlich als *pseudo*-Wildtyp\* bezeichnet (Schreiber & Fersht, 1993b).

Um Klarheit in der Bezeichnung zu gewährleisten wird die Variante Barstar C40A/C82A (doppelte Mutation) im folgenden Text als *pseudo*-Wildtyp\* bezeichnet.

Die Variante Barstar C40A/C82A/P27A (dreifache Mutation) wird im folgenden Text, wie in der Literatur etabliert, als *pseudo*-Wildtyp bezeichnet (Nölting *et al.*, 1995). Auf dessen Grundlage wurden weitere Varianten durch *protein engineering* hergestellt. Untersuchungen zur Faltung dieser Proteine sind Inhalt der in der Habilitationsschrift vorgestellten experimentellen Arbeiten.

Es wurden die Röntgenkristallstruktur dieses Proteins in isolierter Form und im Komplex mit Barnase (Buckle *et al.*, 1994), sowie die Lösungsstruktur durch NMR-Spektroskopie bestimmt (Lubienski *et al.*, 1994). Der PDB-code ist 1BTA. Das Protein enthält zwei Proline, wobei Pro27 in *trans*-Konformation und Pro48 in *cis*-Konformation im nativen Zustand vorliegen. Barstar ist ein  $\alpha/\beta$ -Protein der nachfolgenden Anordnung der Elemente der Sekundärstruktur.

Met0 →  $\beta$ -Faltblatt 1 (Lys1 bis Asn6) → Schleife 1 →  $\alpha$ -Helix 1 (Ser14 bis Ala25) → Schleife 2 (enthält Pro27) →  $\alpha$ -Helix 2 (Asn33 bis Gly43, enthält Trp38) → Schleife 3 (enthält Trp44, Tyr47 und Pro48) →  $\beta$ -Faltblatt 2 (Leu49 bis Arg54, enthält Trp53) → Schleife 4 →  $\alpha$ -Helix 3 (Gln55 bis Thr63) → Schleife 5 →  $\alpha$ -Helix 4 (Glu68 bis Gly81) → Schleife 6 →  $\beta$ -Faltblatt 3 (Asp83 bis Ser89)

Der Prozeß der Faltung ist durch Änderungen der intrinsischen Fluoreszenz der Tryptophanreste (blau) detektierbar. Im nativen Zustand liegt Pro27 in *trans*-Konformation, Pro48 in *cis*-Konformation vor. Die Prolinreste und dazugehörige Strukturelemente von Barstar sind rot gekennzeichnet.

Die Wechselwirkung von Pro27 (alicyclischer Ring) mit Trp38 (aromatischer Ring) führt zu einer Aufweitung der C-terminalen Schleife der  $\alpha$ -Helix 2 (Lubienski *et al.*, 1994).

Barstar *pseudo*-Wildtyp\* kann rekombinant durch heterologe Genexpression in *Escherichia coli* als prokaryontischem *host*-Organismus produziert werden (Hartley, 1988; Schreiber & Fersht, 1993b). Das rekombinant gewonnene und durch Chromatographie gereinigte Protein enthält N-terminal einen Methioninrest (Met0), der durch die Methionyl-aminopeptidase von *Escherichia coli* proteolytisch nicht gespalten wird, da das folgende Lys1 eine basische Aminosäure ist. Das Expressionsprodukt wurde seinerzeit nicht durch N-terminale Sequenzierung und MALDI-MS analysiert, so daß die veröffentlichten Strukturen diesbezüglich inkorrekt sind (Guillet *et al.*, 1993). Die Hemmwirkung des rekombinant hergestellten Proteins

auf Barnase konnte eindeutig gezeigt werden, Met0 erzeugt keine strukturelle Perturbation (Mossakowska *et al.*, 1989).

Die Struktur des *pseudo*-Wildtyps\* entspricht im wesentlichen der des reduzierten Wildtyps von Barstar, Unterschiede werden in der Dynamik des Peptidrückgrates für die Variante Barstar C82A aus NMR-Messungen beschrieben (Ratnaparkhi *et al.*, 1998). Die Wechselwirkung von Barstar und Barnase ist vorwiegend elektrostatischer Natur, wobei im äquimolaren Komplex negativ geladene Aminosäurereste von Helix 2 und Schleife 2 von Barstar in der positiv geladenen Bindungstasche von Barnase binden (Buckle *et al.*, 1994). Die individuellen Energiebeiträge der an dieser Wechselwirkung beteiligten Aminosäuren wurden durch thermodynamische (ITC) und kinetische (Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation) Messungen in Kombination mit *protein engineering* ermittelt (Frisch *et al.*, 1997; Schreiber & Fersht, 1993a; Schreiber & Fersht, 1995). Die Wechselwirkung von Barstar und Barnase sind als ein Modellsystem für Proteinwechselwirkungen (*protein-protein interaction*) und Proteinerkennung (*protein recognition*) etabliert (Schreiber & Fersht, 1996).

Die thermodynamischen Stabilitäten des Wildtyps (Agashe & Udgaonkar, 1995) und *pseudo*-Wildtyps\* (Martinez *et al.*, 1995) von Barstar wurden durch thermische Denaturierung gemessen. Der von AGASHE *et al.* publizierte thermodynamische Parameter  $\Delta C_p = 1460 \pm 70 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  für den Wildtyp ist relativ klein. Die Auswertung der thermodynamischen Parameter auf der Basis einer linearen freien Enthalpiebeziehung (LFE) ergab eine Wechselwirkung des Denaturans mit der Polypeptidkette im entfalteten Zustand, daher ändert sich die Wärmekapazität  $\Delta C_p$  in Abhängigkeit von der Konzentration des Denaturans. Für GuHCl beträgt dieser Wert  $\Delta C_{pi} = 53 \pm 36 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$  (Agashe & Udgaonkar, 1995). Barstar zeigt in Gegenwart von Denaturanzien *cold unfolding* bei Temperaturen  $T > 273 \text{ K}$  (Agashe & Udgaonkar, 1995). Verlässlichere Datensätze für Barstar Wildtyp und die Variante C82A wurden von SCHÖPPE *et al.* publiziert (Schöppe *et al.*, 1997), die zudem die globale Anwendung des Zweizustandsmodells validieren. Barstar erfährt durch eine höhere Ionenstärke des Lösungsmittels eine thermodynamische Stabilisierung (Wintrode *et al.*, 1995).

Die Untersuchungen zur Thermodynamik und Kinetik der Faltung und Entfaltung von Barstar (und Varianten) sind sehr umfangreich und ergeben ein relativ

komplexes Bild. Experimentell wurden die Datensätze durch chemische Denaturierung mit Denaturanzien gemessen, wobei für den Wildtyp vorwiegend Guanidiniumchlorid (GuHCl), für den *pseudo*-Wildtyp\* Harnstoff zur Anwendung kamen. Durch die oben genannte Stabilisierung des nativen Zustandes durch eine höhere Ionenstärke des Lösungsmittels wird die Verwendung von Harnstoff als Denaturans bevorzugt. Die Transitionen der Gleichgewichtsentfaltung (Fern-UV Circular dichroismus und intrinsische Fluoreszenz) wurden nach einem Zweizustandsmodell ausgewertet und ergaben für beide Proteine moderate thermodynamische Stabilitäten um  $4,9 \text{ kcal mol}^{-1}$  (Tabelle 3).

Die Faltungskinetik von Barstar kann aus Änderungen struktureller Parameter nach Konzentrationsänderungen von Denaturanzien gemessen werden, wobei diese Konzentrations sprünge methodisch in den Transitionsbereich, den *post*- und *prä*-Transitionsbereich erfolgen (Schmid, 1992). Durch die Präsenz von zwei Prolinresten unterschiedlicher Konformation im nativen Zustand ist für Barstar als Eindomänenprotein eine Dreizustands-Kinetik als Minimalmodell zu erwarten. Die mittels *stopped-flow*-Technik gemessenen Progresskurven zeigen im Transitionsbereich der Gleichgewichtsentfaltung einen zweiphasigen Verlauf, wobei sich die zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten um mehr als zwei Größenordnungen unterscheiden (Schreiber & Fersht, 1993b; Shastry *et al.*, 1994). Das Auftreten langsamer Faltungsphasen ist oft durch die Isomerisierung essentieller Prolybindungen bedingt und Ausdruck der Kopplung von Konformationsfaltung und Prolylisomerisierung eines Proteins (siehe Kapitel 4.3). Durch die Methode des Doppelsprungs konnte eine Prolylisomerisierung im entfalteten Zustand (Bildung von  $U_f$  und  $U_s$ ) und in einem nativ-ähnlichen Intermediat  $I_N$  nachgewiesen werden (Schreiber & Fersht, 1993b; Shastry *et al.*, 1994). Da in Barstar *pseudo*-Wildtyp\* die optischen Eigenschaften des nativen Zustandes und des nativ-ähnlichen Intermediates gleich sind, wurde die Stabilität von  $I_N$  aus der Auswertung kinetischer Amplituden bestimmt. Der originäre Ursprung der langsamen Phase der Faltungskinetik von Barstar aus einer Prolylisomerisierung wurde zusätzlich durch deren Beschleunigung durch Cyp18 nachgewiesen (Schreiber & Fersht, 1993b). Die Auswertung der kinetischen Daten führte zu einem ersten Modell (Schema 1) der Faltung von Barstar *pseudo*-Wildtyp\*, wobei die Berücksichtigung thermodynamischer Stabilitäten die Population weiterer Intermediate (Schema 3) vermuten ließ (Schreiber & Fersht, 1993b). Eine Zusammenfassung

thermodynamischer und kinetischer Daten zur Faltung von Barstar Wildtyp und Barstar *pseudo*-Wildtyp\* enthält Tabelle 3.

Das aus diesen experimentellen Daten in den Schemata 2 und 3 vorgeschlagene Modell ist insofern inkorrekt, als die langsame Phase der Faltung nur der Prolylisomerisierung von Tyr47-(*trans*)Pro48 des nativ-ähnlichen Intermediates in die native *cis*-Konformation zugeschrieben wird (Schreiber & Fersht, 1993b). Auch für die native Peptidbindung von Leu26-(*trans*)Pro27 stellt sich im entfalteten Zustand ein Gleichgewicht der Rotamere ein, so daß vier Spezies zu berücksichtigen sind ( $U_{27cis}^{48cis}$ ,  $U_{27trans}^{48cis}$ ,  $U_{27trans}^{48trans}$ ,  $U_{27cis}^{48trans}$ ). Ausgehend von im Gleichgewicht entfaltetem Barstar *pseudo*-Wildtyp\* ergaben eine Wiederholung der Messungen des Einflusses von Cyp18 auf die langsame Phase der Faltung einen Hinweis auf die Ausbildung eines zweiten nativ-ähnlichen Intermediates. Die Amplitude dieser Phase wird nur zu etwa 60 % durch die enzymatische Aktivität dieser PPlase beschleunigt, 40 % der Amplitude sind unbeeinflusst. Die enzymatisch unbeeinflusste langsame Phase setzt sich daher aus zwei parallel ablaufenden Prozessen mit ähnlicher Geschwindigkeitskonstante zusammen.

**Das Modell der Faltung von Barstar *pseudo*-Wildtyp\* ist in Schema 1 (Dreizustandsmodell) und in Schema 2 dargestellt (Anhang). Es berücksichtigt die Bildung eines nativ-ähnlichen Intermediates nur für die Bindung Tyr47-Pro48 in *trans*-Konformation.**

Der Vergleich der gemessenen und aus thermodynamischen Beziehungen berechneten mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten der Prolylisomerisierung bei der Konversion der entfalteten Spezies ( $U_f \rightarrow U_s, U_s \rightarrow U_f$ ) und der nativen bzw. nativ-ähnlichen Spezies ( $I_N \rightarrow N, N \rightarrow I_N$ ) von Barstar Wildtyp und Barstar *pseudo*-Wildtyp\* zeigt fast gleiche Werte (Tabelle 3). Die Geschwindigkeitskonstanten der Konversion von Rotameren der Prolylbindung in einem intermediären Zustand der Faltung eines Proteins können sich durch konformationelle Zwänge schon gefalteter Strukturelemente (*long-range*-, *short-range*- Wechselwirkungen) zum Teil erheblich von denen freier Polypeptidketten unterscheiden (Reimer & Fischer, 2002).

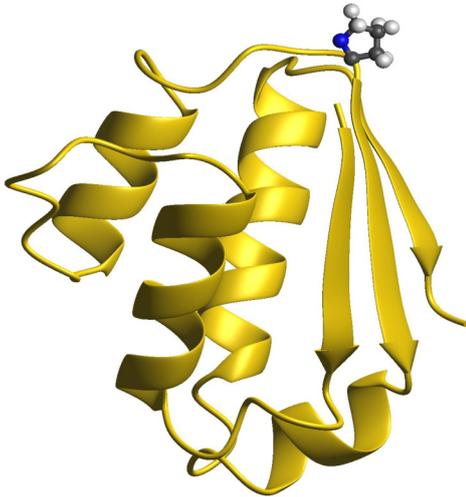
Viele Publikationen der Gruppe um UDGAONKAR haben experimentelle Untersuchungen zu dynamischen Aspekten der Struktur und zum Faltungsweg von Barstar Wildtyp zum Inhalt. Im Rahmen der Habilitationsschrift soll nur auf diejenigen Aspekte dieser Publikationen eingegangen werden, die für die eigene

wissenschaftliche Arbeit wesentlich waren. Der  $\beta_T$ -Wert für die Faltung von Barstar *pseudo*-Wildtyp\*, berechnet für die Hauptfaltungsphase aus dem *chevron*-Plot, beträgt 0,87 (Jackson, 1998). Der Übergangszustand der Reaktion ähnelt strukturell dem nativen Zustand. Die Strukturkonsolidierung während der Faltung von Barstar Wildtyp ist kinetisch mit Fern-UV Circular dichroismus (Sekundärstruktur), Nah-UV Circular dichroismus und intrinsischer Fluoreszenz (Tertiärstruktur) und durch die Bindung von ANS (Detektion hydrophober Oberflächen) untersucht worden, wobei mittels *stopped-flow*-Techniken die Detektion früher Intermediate gelang (Shastry & Udgaonkar, 1995). Die Faltung von Barstar Wildtyp beginnt mit einem hydrophoben Kollaps innerhalb der ersten 4 ms nach Initiation der Faltung vor der Bildung von Elementen der Sekundärstruktur (Agashe *et al.*, 1995). Der hydrophobe Kern (*hydrophobic core*) von Barstar Wildtyp wird durch aliphatische (Leu) und aromatische Aminosäuren (aromatischer Cluster Phe56, Phe74, Trp53; Abbildung 4) gebildet (Nölting *et al.*, 1997a; Wong & Daggett, 1998). Der Hauptfaltungsweg des Proteins verläuft neben  $U_f \rightarrow I \rightarrow N$  nach der Sequenz  $U_s \rightarrow I_{M1} \rightarrow I_{S1} \rightarrow I_N \rightarrow N$  (Shastry & Udgaonkar, 1995). Das Intermediat  $I_{M1}$  repräsentiert ein ‚strukturloses‘ kugelartiges Molekül mit unspezifischen hydrophoben Kontakten und keiner optisch aktiven Sekundärstruktur. Die Bindung von ANS ist möglich, aber nicht kooperativ. Das folgende Intermediat  $I_{S1}$  ist ein *molten-globule*-ähnliches Intermediat. Es wird durch produktive hydrophobe Kontakte stabilisiert, enthält partielle Elemente der Sekundär- und Tertiärstruktur und bindet ANS. Das nativ-ähnliche Intermediat  $I_N$  unterscheidet sich in der generellen Strukturkonsolidierung vom nativen Zustand nur durch die *trans*-Konformation der Prolylbindung Tyr47-Pro48. Während des Faltungsweges auftretende Intermediate haben eine unterschiedliche thermodynamische Stabilität und werden abhängig von der Konzentration des Denaturans in unterschiedlichem Ausmaß (partielle Konzentrationen) populiert. Kinetische Messungen zeigten sowohl einen zweiten, parallel auftretenden Weg der Faltung nach  $U_s \rightarrow I_{M2} \rightarrow I_{S2} \rightarrow N$  (Bhuyan & Udgaonkar, 1999; Rami & Udgaonkar, 2001; Shastry & Udgaonkar, 1995), als auch der Entfaltung von Barstar Wildtyp (Agashe *et al.*, 1997; Sridevi & Udgaonkar, 2002). Das Auftreten multipler Intermediate und Übergangszustände bei der Entfaltung des Proteins wurde eindrucksvoll durch Amplitudenauswertungen der bei unterschiedlichen Temperaturen gemessenen Kinetiken und thermodynamischen Stabilitäten des Wildtyps im Vergleich mit einer durch *protein engineering* verfügbaren doppelt

mutierten Variante W38F/W44F gezeigt (Zaidi *et al.*, 1997). Diese Variante hat eine mit dem Wildtyp vergleichbare thermodynamische Stabilität, enthält jedoch nur Trp53 im hydrophoben Kern (nicht austauschbar durch andere kanonische Aminosäuren) als optische Sonde der intrinsischen Fluoreszenz. Der Strukturverlust bei der Entfaltung von Barstar erfolgt in Umkehrung der Faltung stufenweise (*incrementally*) nach dem Prinzip der mikroskopischen Reversibilität. Nach einer kürzlich erschienenen Publikation allerdings ist ein Vergleich der Ergebnisse der Faltungskinetiken der doppelt mutierten Variante mit denen des Wildtyps unsicher (Sridevi *et al.*, 2004).

## 7. ZUSAMMENFASSUNG DER FORSCHUNGSERGEBNISSE AN BARSTAR

### 7.1. Barstar C40A/C82A/P27A (Barstar pseudo-Wildtyp) als Modellprotein der Prolylisomerisierung



**Abb.2** Dreidimensionale Struktur von Barstar C40A/C82A/P27A (Barstar pseudo-Wildtyp), gestaltet mit dem Programm MOLSCRIPT (Kraulis, 1991).

Der Prolinrest 48 am Beginn des  $\beta$ -Faltblatts 2 ist gekennzeichnet. Die Abbildung wurde mir von Dr. Nediljko Budisa (MPI für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung gestellt.

Das Eindomänenprotein Barstar ist ein geeignetes Objekt für Studien zur Faltung von Proteinen. Wissenschaftliche Aufmerksamkeit im Zusammenhang mit Forschungen zur Prolylisomerisierung hat dieses globuläre Protein dem Umstand zu verdanken, daß es zwei Prolinreste besitzt, von denen Pro27 in *trans* – und Pro48 in *cis* –Konformation im nativen Zustand vorliegen (Buckle *et al.*, 1994; Guillet *et al.*, 1993; Lubienski *et al.*, 1994). Die lösungsmittelzugängliche Oberfläche von Pro27 beträgt als Teil der Schleife 2 (Bindungsschleife zu Barnase)  $9 \text{ \AA}^2$ , die von Pro48 am Beginn von  $\beta$ -Faltblatt 2 ist  $84 \text{ \AA}^2$ . Diese Werte zeigen, daß Pro27 strukturell stärker integriert ist und wesentlich weniger exponiert vorliegt als Pro48. Die Kinetiken der Faltung von Barstar Wildtyp und Barstar pseudo-Wildtyp\* sind sowohl für die Konformationsfaltung, als auch die Prolylisomerisierung komplex (siehe Kapitel 6.2). Um die Prolylisomerisierung als Teil der Faltung zum nativen Zustand von Proteinen mit möglichst einfachen Systemen und  $I_N \rightarrow N$  als einzelne Teilreaktion zu untersuchen, wurden die Prolinreste von Barstar pseudo-Wildtyp\* durch *protein engineering* mit ortsgerichteter Mutagenese zu Ala bzw. Leu mutiert. Nur die Mutagenese zu Ala ergab durch heterologe Genexpression im prokaryontischen *host* -Organismus (*Escherichia coli*) ein Expressionsprodukt. Dieses lag sowohl für Barstar pseudo-Wildtyp\*P27A, als auch Barstar pseudo-Wildtyp\*P48A als

Einschlußkörper (*inclusion bodies*) vor. Nach Klonierung der mutierten Gene in den Expressionsvektor pKK223-2 und Expression unter Kontrolle des *tac*-Promotors wurde eine Optimierung der Proteinausbeuten erreicht. Die Präparation von löslichem, gefaltetem Protein gelang durch Denaturierung der Einschlußkörper mit chemischen Denaturanzien, weitgehende Abtrennung der Nukleinsäuren, Renaturierung durch Gleichgewichtsdialyse und abschließende chromatographische Reinigung (Anionenaustauschchromatographie, Gelfiltration) (**R1**). Barstar *pseudo*-Wildtyp\***P27A** (Barstar C40A/C82A/P27A, im folgenden Text als Barstar *pseudo*-Wildtyp bezeichnet; siehe begriffliche Definitionen Kapitel 6.2) liegt anhand einer chromatographischen Analyse (analytische Gelfiltration) als monomeres Protein, Barstar *pseudo*-Wildtyp\***P48A** als Dimer vor.

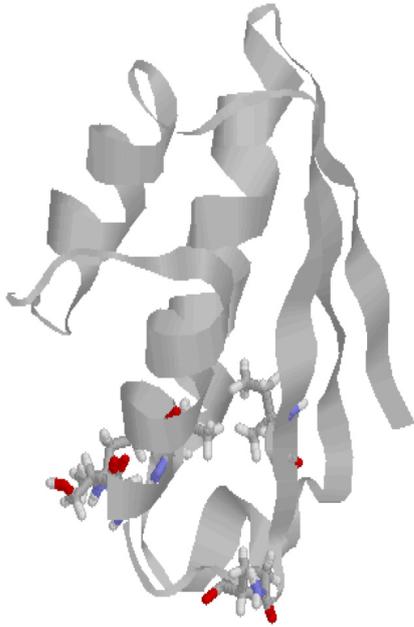
Barstar *pseudo*-Wildtyp stellt eine dreifach mutierte Variante von Barstar Wildtyp mit nur einer Prolylbindung (Tyr47-Pro48) in *cis*-Konformation im nativen Zustand des Proteins dar. Die thermodynamische Stabilität und kinetische Parameter der Faltung wurden nach etablierten Methoden bestimmt und sind in Tabelle 3 denen des Wildtyps und Barstar *pseudo*-Wildtyps\* zusammenfassend gegenübergestellt. Im Vergleich zu diesen ist Barstar *pseudo*-Wildtyp zwar stark destabilisiert, zeigt jedoch bei physiologischen Temperaturen alle Charakteristika eines nativen Proteins. Die starke Hemmwirkung auf Barnase beweist dessen strukturelle Integrität (**R1**). Die gesamte Amplitude der langsamen Phase der Faltung von Barstar *pseudo*-Wildtyp konnte eindeutig der Isomerisierung der Prolylbindung von *trans* → *cis* zugeordnet werden, da diese Phase durch Cyp18 stark beschleunigt wird (**R1**). Die während der Prolylisomerisierung dieses Proteins auftretenden lokalen strukturellen Änderungen wurden auch mit Kernresonanzspektroskopie in Echtzeit (*real-time*-NMR) gemessen (Killick *et al.*, 1999). Es konnte direkt gezeigt werden, daß die langsame Phase der Faltung Aminosäurereste und Strukturbereiche um Pro48 erfaßt.

## 7.2. Formierung struktureller Elemente im Faltungsprozeß von Barstar *pseudo*-Wildtyp

Barstar *pseudo*-Wildtyp zeigt durch seine geringere thermodynamische Stabilität einen zu höheren Temperaturen verschobenen Transitionsmittelpunkt der Kältedenaturierung (*cold unfolding*), der durch Zusatz von Denaturans noch weiter in diese Richtung verschoben werden kann (Übersicht (Nölting, 1999)). Dadurch erwies sich das Protein, zusammen mit den günstigen Eigenschaften der

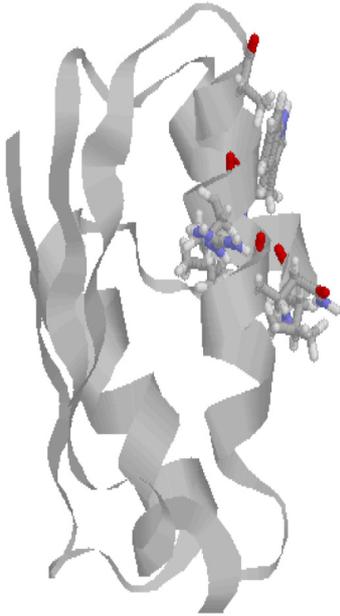
intrinsischen Fluoreszenz, als geeignet für kinetische Messungen der Faltung mittels Relaxationsmethoden (Temperatursprung) (**R2**). Diese Technik erlaubt die Messung sehr früher Faltungsphasen mit Zeitkonstanten im Bereich von Mikrosekunden bis Millisekunden (Fersht, 1999; Nölting, 1999). Auf der Grundlage der verfügbaren strukturellen Parameter von Barstar wurde eine rationale Auswahl von Mutationen geplant, die als Indikatoren der Konsolidierung der strukturellen Elemente während des Faltungsprozesses dienen sollten. Durch *protein engineering* und etablierte proteinchemische Techniken waren die vierfach mutierten Varianten von Barstar *pseudo*-Wildtyp verfügbar. Es wurden deren thermodynamische Stabilitäten (Übersicht (Pfeil, 1998; Pfeil, 2001)) und mittels Temperatursprung die Faltungskinetiken gemessen (**R3**). Dieser experimentelle Datensatz ermöglichte eine Analyse der  $\phi$ -Werte der Übergangszustände und auftretenden transienten Intermediate (siehe Kapitel 2). Daraus konnte das folgende Bild der Konsolidierung von Strukturelementen von Barstar *pseudo*-Wildtyp abgeleitet werden (**R3**), welches bereits in ausführlicher Form mehrfach publiziert wurde (Fersht, 1999; Nölting, 1999).

In den ersten **500  $\mu$ s** (Abbildung 3a) nach Initiation der Faltungsreaktion kollabiert das Molekül unter Ausschluß von 20 % des Lösungsmittels (Lösungsmittelzugängliche Oberfläche vermindert). Wechselwirkungen der Sekundär- und Tertiärstruktur von  $\beta$ -Faltblatt 2, Schleife 1 und Helix 1 bilden sich aus und umfassen die Aminosäurereste Ile5, Gln9, Ile13, Ser14, Leu16 und Gln18. Die Bildung eines hydrophoben Kerns umfaßt die Aminosäurereste Ile5, Ile13, Leu16 und Leu34.



**Abb.3a** Bereiche der Strukturkonsolidierung von Barstar *pseudo*-Wildtyp in den ersten 500  $\mu$ s nach Initiation der Faltung. Die Abbildung wurde mit dem Programm RASMOL gestaltet.

Nach etwa **1 ms** (Abbildung 3b) nach Initiation der Faltungsreaktion kondensiert das Molekül unter weiteren 20 % Ausschluß des Lösungsmittels und bildet ein **Intermediat** mit signifikanter Sekundärstruktur von Helix 4 unter Beteiligung der Aminosäurereste Gln72, Arg75 und Ala79. Die Wechselwirkungen der Tertiärstruktur sind ausgeprägt zwischen Helix 1, Helix 2 und Helix 4 unter Einbezug der Aminosäurereste Leu34, Leu37 und Trp38. Die thermodynamische Stabilität des Intermediates ist etwa 20 % der des nativen Zustandes. Wechselwirkungen der Tertiärstrukturelemente entstehen zwischen  $\beta$ -Faltblatt 1, Schleife 1 und Helix 1, auch zwischen Helix 1 und Helix 4.



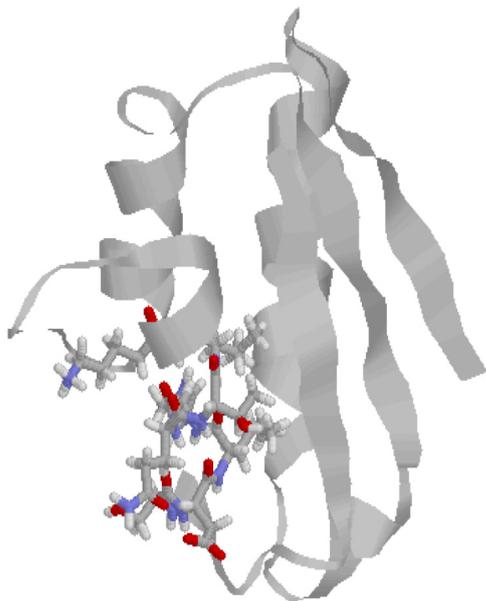
**Abb.3b** Bereiche der Strukturkonsolidierung von Barstar *pseudo*-Wildtyp von 500  $\mu$ s bis 1 ms nach Initiation der Faltung. Die Abbildung wurde mit dem Programm RASMOL gestaltet.

Eine weitere Konsolidierung des kollabierten, aber noch aufgeweichten Moleküls erfolgt in **100 ms** nach dem Passieren des zweiten Übergangszustandes der Faltung mit etwa 50 % struktureller Konsolidierung. Die Faltung ist im wesentlichen an den Aminosäureresten Ser14 und Leu16 in Helix 2 und an Arg75 in Helix 4 abgeschlossen. Alle Elemente der Sekundärstruktur zeigen eine signifikante Konsolidierung, ausgenommen Helix 3 und Teile des  $\beta$ -Faltblatts 2. Helix 3 verzögert die Faltung aufgrund sterischer Behinderung zum Beispiel an Leu62. Der N-terminale Teil von Barstar hat eine ausgeprägte Tendenz der Strukturbildung, Mutationen bewirken hier zum Teil drastische Stabilitätsverluste bzw. Fehlfaltungen.

Etwa 70 % der faltenden Moleküle enthalten die einzige Prolylbindung in *trans*-Konformation, was zur Bildung eines nativ-ähnlichen Intermediates führt (siehe oben). Dieses enthält alle Elemente der Sekundärstruktur, aber eine nicht-native Konformation von Schleife 3 zwischen Helix 2 und  $\beta$ -Faltblatt 2. Der native Zustand des Proteins bildet sich nach dem Passieren des Übergangszustandes der Prolylisomerisierung und zeigt deren enge Kopplung mit der Konformationsfaltung.

Die Änderung der Oberflächenausprägung für jeden Zustand des Faltungsprozesses kann aus der Sensitivität jeder Geschwindigkeitskonstante im Vergleich zur Sensitivität der allgemeinen Gleichgewichtskonstante der Faltung auf die Konzentration des Denaturans abgeschätzt werden. Der erste Übergangszustand zeigt 20 %, das erste Intermediat 50 % und der zweite Übergangszustand 90 % der Kompaktheit des nativen Zustandes. Der Faltungsweg

von Barstar *pseudo*-Wildtyp steht im wesentlichen in Einklang mit einem Nukleations-Kondensations-Modell der Faltung (Tabelle 1). Der Nukleus des Proteins wird durch die Aminosäurereste von Ser14 bis Gly43 repräsentiert (Abbildung 3c).



**Abb.3c** Nukleus von Barstar *pseudo*-Wildtyp (Ser14 bis Gly43). Die Abbildung wurde mit dem Programm RASMOL gestaltet.

NMR-Messungen von kältedenaturiertem Barstar *pseudo*-Wildtyp\* ergaben drei Regionen mit beobachtbaren Reststrukturen. Das Element Ser14 bis Lys21 der Helix 1 und das die Helix 2 einschließende Element von Tyr29 bis Glu46 sind nativ-ähnlich. Das dritte Element von Leu51 bis Phe56 ist Teil von  $\beta$ -Faltblatt 2 und der Schleife 4 (Wong *et al.*, 1996). Mittels Circular dichroismus konnte das Auftreten von Reststrukturen auch in entfaltetem Barstar *pseudo*-Wildtyp wahrscheinlich gemacht werden (**R4**).

Die Untersuchung der Strukturbildung von aus der Primärstruktur von Barstar abgeleiteten Peptiden durch Kernresonanzspektroskopie (Arg11-Tyr29 für Helix 1, Glu28-Trp44 für Schleife 2 und Helix 2, Asn33-Trp44 für Helix 2, Ser14-Gly43 für den Nukleus aus Helix 1 – Schleife 2 – Helix 2) zeigten eine Instabilität der Helices in Abwesenheit von *long-range* –Wechselwirkungen (**R3**).

Die Bildung des Nukleus in Barstar ist ein kooperativer Prozeß. Die Analyse der  $\phi$  – Werte wurde auch auf sehr frühe Ereignisse der Faltung von Barstar *pseudo*-Wildtyp, die mit Relaxationstechniken gemessen wurden, angewandt. Trotz der in Kapitel 2 angeführten Einschränkungen und kritischen Betrachtungen dieser Methode konnte der hierarchische Charakter der Strukturkonsolidierung des Proteins gezeigt werden.

### 7.3. Protein engineering nichtkanonischer Aminosäuren in Barstar pseudo-Wildtyp durch SPI (selective pressure incorporation, Einbau durch Selektionsdruck)

Die Eigenschaften von Proteinen können durch den Einbau nichtkanonischer Aminosäuren gezielt verändert werden, da diese durch ihre chemischen Eigenschaften eine Veränderung spezifischer Wechselwirkungen der Strukturkonsolidierung zur Folge haben können. Diese Methode des *protein engineering* eröffnet die Möglichkeit der Einführung lokaler Perturbationen in ein Protein durch Änderungen der chemischen Eigenschaften funktioneller Gruppen oder der Einführung neuer Substituenten in die kanonische Aminosäure (Atommutation). Erwünscht ist eine Inkorporation dieser Derivate ohne Verlust der strukturellen Integrität des Proteins. Die Methode der SPI ist von BUDISA ausgearbeitet und optimiert worden. Der Einbau nichtkanonischer Aminosäuren in rekombinant herstellbare Proteine wird durch die Expression der Gene unter Verwendung auxotropher (in der Regel prokaryontischer) *host* –Organismen realisiert. Er gelingt aufgrund einer geringen Substratspezifität der tRNA-Synthetasen und deren Toleranz gegenüber bestimmten Substitutionen der Aminosäurederivate (Budisa *et al.*, 1999). Der Vorteil von SPI gegenüber anderen Methoden (*protein splicing*, Intein-Methode) liegt, einen erfolgreichen Einbau vorausgesetzt, in der wesentlich größeren Ausbeute an der entsprechenden Variante. Die Methode erlaubt durch die Verwendung geeigneter Derivate auch Veränderungen proteinchemischer Eigenschaften (pH-Profil) und eine systematische Variation von Substituenten an Aminosäureresten des Proteins. Dadurch ist ein Katalog verfügbar, der durch neue Analoga von Aminosäuren und eine Optimierung der Bedingungen der Genexpression (Kultivierung der Zellen, enzymkinetische Parameter der tRNA-Synthetasen) eine ständige Erweiterung erfährt.

Als Modellproteine für den Einbau nichtkanonischer Aminosäuren mit SPI sind Annexin V (**R5**, **R6**), GFP (grün fluoreszierendes Protein, *green fluorescent protein*) (Bae *et al.*, 2004; Bae *et al.*, 2003) und Barstar pseudo-Wildtyp etabliert worden (**R6**, **R7**). Rekombinant im prokaryontischen Expressionssystem wird Barstar pseudo-Wildtyp als Einschlusskörper (*inclusion bodies*) produziert. Dies ist besonders bei der Inkorporation toxischer Derivate vorteilhaft, da nur eine verminderte schädigende Interferenz mit essentiellen Stoffwechselprozessen des prokaryontischen *host* –Organismus stattfindet. Barstar pseudo-Wildtyp faltet als kleines Protein (Molekulargewicht 10251 Da) reversibel, ist vergleichsweise leicht zu kristallisieren

und die strukturelle Integrität bezüglich der Hemmwirkung auf Barnase leicht zu analysieren (Mossakowska *et al.*, 1989). Dieses Modellprotein hat sich als eines der besten Systeme für die SPI nichtkanonischer Aminosäuren erwiesen (Budisa *et al.*, 1999).

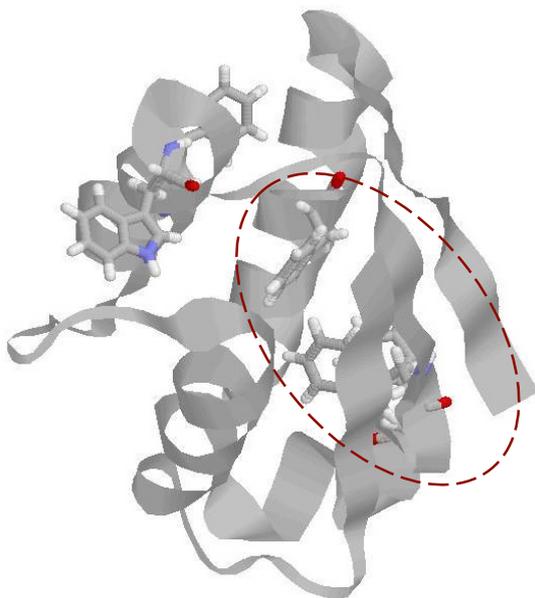
Barstar *pseudo*-Wildtyp war das erste globuläre Protein, in welches der Einbau 4-fluorsubstituierter Prolinanaloge gelang (Renner *et al.*, 2001). Die in Kapitel 4.2 erläuterten Eigenschaften dieser Analoga in Modellverbindungen (thermodynamische Parameter der Grundzustände der Konformere, Aktivierungsparameter der *cis* / *trans* -Isomerisierung) bestimmen auch die thermodynamischen Eigenschaften der entsprechenden Varianten von Barstar *pseudo*-Wildtyp. Die thermodynamischen Parameter der Stabilität und die Geschwindigkeitskonstanten der Isomerisierung  $I_N \rightarrow N$  für die Varianten sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 dargestellt. Da in Barstar *pseudo*-Wildtyp im nativen Zustand die *cis* -Konformation der einzigen Prolylbindung realisiert ist, ist im Vergleich dazu die thermodynamische Stabilität der L-(4S)-FPro enthaltenden Variante größer. So auch die der L-(4)-diFPro enthaltenden Variante, da diese auch das L-(4S)-F-Motiv enthält. Da der *exo-pucker* von L-(4R)-FPro enthaltenden Derivaten die *trans* -Konformation der Prolylbindung begünstigt, ist die thermodynamische Stabilität der das Derivat enthaltenden Variante im Vergleich zu Barstar *pseudo*-Wildtyp geringer.

Die Auswertung der Geschwindigkeitskonstanten der Prolylisomerisierung als Teil der Konformationsfaltung  $I_N \rightarrow N$  zeigt auch mittels der Doppelsprungtechnik, daß die das L-(4S)-F-Motiv enthaltenden Varianten L-(4S)-FPro- und L-(4)-diFPro-Barstar *pseudo*-Wildtyp den dreifachen Wert der Prolylisomerisierung im Vergleich zu Barstar *pseudo*-Wildtyp und zur L-(4R)-FPro-Variante zeigen (Tabelle 5). Die starke Elektronegativität des Fluors (Elektronegativitätswert 4,0) als Substituent in (4S)-Position hat einen stark polarisierenden Effekt auf die Prolylbindung im Übergangszustand der Isomerisierung und erhöht deren Charakter einer Einfachbindung. Dieser Effekt ist stereoselektiv und senkt die Aktivierungsbarriere. Das Maximum der relativen Amplitude der langsamen Phase der Faltung von L-(4)-diFPro-Barstar *pseudo*-Wildtyp beträgt nur noch etwa 25 % (75 % schnelle Phase). Die Substitution an Pro48 durch L-(4)-diFPro verschiebt das Gleichgewicht der Isomeren der entfalteten Polypeptidkette zum *cis* -Konformer und bedingt eine Erhöhung der Konzentration von  $U_f$ . Zu den anderen Varianten liegen diesbezüglich

keine umfassenden Datensätze vor, daher wird auf eine vergleichende Betrachtung dieses Aspektes verzichtet.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen in Einklang zu Untersuchungen an mit L-(4)-Pro substituierten kollagenen Peptiden (Barth *et al.*, 2004; Jenkins & Raines, 2002) die thermodynamische Stabilisierung von Proteinen durch bevorzugte Konformationen. Im Gegensatz zu Barstar *pseudo*-Wildtyp werden kollagene Peptide durch Substitutionen von L-(4*R*)-FPro extrem stabilisiert und von L-(4*S*)-FPro extrem destabilisiert, da die Prolylbindungen in nativem Kollagen durch die Polyprolin II-Helices essentiell in *trans* –Konformation vorliegen.

In Barstar bilden Phe56 und Phe74 mit Trp53 einen aromatischen Cluster (Abbildung 4).



**Abb.4 Aromatischer Cluster der Aminosäurereste Phe56, Trp53 und Phe74 in Barstar *pseudo*-Wildtyp. Die Abbildung wurde mit dem Programm RASMOL gestaltet.**

**Der Cluster ist gekennzeichnet. Die Aminosäurereste Trp38 und Trp44 sind exponiert.**

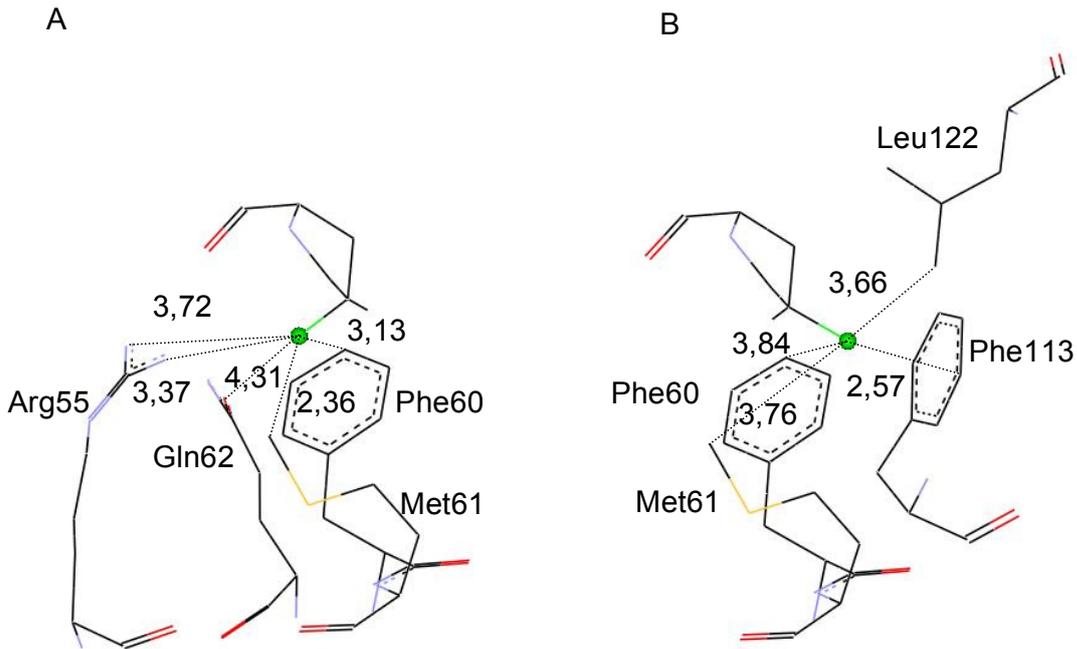
Von den drei Tryptophanresten der Primärstruktur können, auch in Barstar *pseudo*-Wildtyp, nur Trp38 und Trp44 einzeln oder doppelt mutiert werden (Zaidi *et al.*, 1997). Das Repertoire des für die Aminosäure Tryptophan codierenden Triplets UGG ist bei *protein engineering* mit SPI durch neue translational aktive chromophore Verbindungen erweitert worden, die alle auch in Barstar *pseudo*-Wildtyp eingebaut werden konnten (Minks *et al.*, 1999). Dazu gehören 4-Fluor-tryptophan, 5-Fluor-tryptophan, 6-Fluor-tryptophan, 7-Aza-tryptophan, 5-Hydroxy-tryptophan,  $\beta$ -(Thienopyrrolyl)alanine oder  $\beta$ -Selenolo[3,2-*b*]pyrrolyl-alanin. Neben dem genannten 5-Hydroxy-tryptophan konnten auch 4-Hydroxy-tryptophan, 5-Amino-tryptophan und 4-Amino-tryptophan eingesetzt werden. Die spektroskopischen Eigenschaften der

eingebauten aminosubstituierten Tryptophananaloga sind pH-sensitiv und machen diese Varianten als optische pH-Sensoren auf Proteinbasis interessant (**R7**).

#### *7.4. Wirkung von PPlasen auf die Konformationsfaltung von Barstar pseudo-Wildtyp und von Varianten mit 4-substituierten Fluorprolinanaloga*

Die Prolylisomerisierung von Barstar *pseudo*-Wildtyp kann durch die PPlase Cyp18 beschleunigt werden (**R1**). Die Ergebnisse zur Prolylisomerisierung von L-(4)-Pro substituierten Varianten zeigten eine stereoselektive Beeinflussung der Reaktion (Kapitel 7.3). Es war von mechanistischem Interesse, ob auch die enzymatische Reaktion der Prolylisomerisierung durch die L-(4)-Pro-Substitution unterschiedlich beeinflusst wird.

Die enzymatischen Aktivitäten der verwendeten PPlasen wurden von CHAO YU (Max-Planck-Forschungsgruppe „Enzymologie der Proteinfaltung“, Halle/Saale) im Rahmen seiner Dissertation mit Modellsubstraten bei verschiedenen Konzentrationen von Denaturans gemessen und nach dem in (**R1**) beschriebenen Verfahren auf 0 M Denaturans extrapoliert (Yu, 2003). Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt und lassen sehr unterschiedliche katalytische Effizienzen der PPlasen gegenüber den Peptidsubstraten erkennen. Mechanistische Vorstellungen über den stereochemischen Einfluß der elektronegativen Substituenten an Pro48 sind aus Modellierungen nach bekannten Strukturen von Enzym-Substrat-Komplexen oder Enzym-Inhibitor-Komplexen der PPlasen möglich (Kallen *et al.*, 1998; Kallen & Walkinshaw, 1992; Zhao & Ke, 1996). Für einen modellierten Komplex mit Cyp18 würde das L-(4*S*)-F-Motiv einen kleineren Abstand zur Prolylbindung und zum katalytisch essentiellen Arg55 aufweisen als das L-(4*R*)-F-Motiv (Abbildung 5). Es konnte auch experimentell gezeigt werden, daß durch eine stereoselektive 4-Substitution oder eine 4-Disubstitution des stark elektronegativen Fluors am Pyrrolidinring von Pro48 in Barstar *pseudo*-Wildtyp eine unterschiedliche enzymatische Aktivität von PPlasen auf die langsame Phase der Faltung im Vergleich zu Barstar *pseudo*-Wildtyp auftritt.



**Abb. 5** Schematische Präsentation von Abständen (Zahlen in Ångstrom) zu allen Aminosäureresten von Cyp18 innerhalb von 4,5 Å zum Fluorsubstituenten von (A) (4S)-Fluorproline und (B) (4R)-Fluorproline eines gebundenen Oligopeptidsubstrates. Das Fluoratom ist grün gekennzeichnet. Diese Abbildung wurde mir von Dr. Cordelia Schiene-Fischer mit dem Programm WebLab Viewer Pro auf der Grundlage der Struktur von Cyp18 im Komplex mit Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (PDB code 1RMH) gestaltet (Zhao & Ke, 1996).

### 7.5. Fibrillenbildung von Barstar pseudo-Wildtyp

Bei pH-Werten unterhalb des isoelektrischen Punktes von 5,6 bildet Barstar *molten globule*-ähnliche Strukturen aus (Juneja *et al.*, 2002). Diese repräsentieren nicht-native, partiell gefaltete Zustände (A-Zustand, A-state). Barstar pseudo-Wildtyp bildet bei physiologischen Temperaturen unter diesen Bedingungen und hoher Ionenstärke Assoziate höherer Molekulargewichte aus. Eine weitere Destabilisierung der Struktur gelingt bei pH 2,0 und 75 mM NaCl durch Temperaturerhöhung auf 70 °C. Dadurch erfolgt die Transformation der Polypeptidkette in ein Ensemble von Konformationen, die bei moderaten Ionenstärken zur Bildung amyloider Fibrillen (Fibrillen Typ 1) fähig sind. Diese sind bei 20 °C stabil und können sich in Abwesenheit von NaCl durch Erwärmen auf 70 °C in Fibrillen Typ 2 umwandeln. Eine direkte Umwandlung vom A-Zustand in Fibrillen Typ 2 gelingt mit moderaten Ionenstärken bei einer Temperatur von 80 °C. Durch Elektronenmikroskopie,

dynamische Lichtstreuung und Fern-UV Circular dichroismus konnte diese Fibrillenbildung quantitativ untersucht und modelliert werden (Modler, 2003). Die Transformation erfolgt irreversibel nach der Sequenz

A - Zustand  $\rightarrow$  Fibrillen Typ 1  $\rightarrow$  Fibrillen Typ 2 (**R8**)

Die Fibrillen Typ 2 bestehen aus drei individuellen Protofilamenten in paralleler Anordnung. Der Prozeß der Fibrillenbildung schließt monomolekulare und bimolekulare Schritte sowie Intermediate ein. Er ist mit einer Zunahme des Prozentsatzes an  $\beta$ -Faltblatt (*cross  $\beta$ -Struktur*) verbunden, der durch Fern-UV Circular dichroismus detektiert werden konnte. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Umwandlung der Konformation(en) ergab im Arrhenius-Plot eine Aktivierungsbarriere  $\Delta G^\ddagger$  von  $19,2 \pm 2,0 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Es soll in diesem Zusammenhang angemerkt werden, daß dieser Wert etwa der Aktivierungsbarriere der Isomerisierung einer Prolylbindung entspricht. Eine langsame konformationelle Umwandlung zwischen den Rotameren der Prolylbindung von Pro48, lokalisiert am Beginn von  $\beta$ -Faltblatt 2, unter den verwendeten (unphysiologischen) Bedingungen könnte durchaus als ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Fibrillenbildung diskutiert werden, da die Prolylisomerisierung über weite Bereiche pH-unabhängig ist. Obwohl dies für Barstar *pseudo*-Wildtyp explizit nicht gezeigt worden ist, kann hier davon ausgegangen werden, da Tyr47 mit einem  $pK_a$  von etwa 10 auch bei optimalem pH-Wert von 8,0 wie unter sauren Bedingungen protoniert vorliegt.

Eine Mutation von Pro48 zu Ala in Barstar *pseudo*-Wildtyp\* führt zur Bildung von Dimeren. Es liegen noch keine thermodynamischen Daten und genaue strukturellen Informationen zu dieser Variante vor. Aufgrund der großen zugänglichen Oberfläche von  $84 \text{ \AA}^2$  hat Pro48 keine essentiellen Wechselwirkungen des Pyrrolidinringes mit anderen Strukturelementen in Barstar, seine Funktion beschränkt sich, unterstützt durch die Wechselwirkung mit Tyr47, auf die Stabilisierung der *cis*-Konformation der Prolylbindung. Eine Mutation P48A stabilisiert für die Bindung Tyr47-Ala48 sehr wahrscheinlich die *trans*-Konformation und verschiebt damit das Gleichgewicht von  $N'$  zu einem nativ-ähnlichen Intermediat  $I_N$ . Dies könnte die Bildung nicht-nativer Strukturelemente zur Folge haben, die zu Assoziation und Fibrillenbildung neigen.

Daher ist eine experimentelle Untersuchung der Variante Barstar *pseudo*-Wildtyp\*P48A für diese Problematik als Ausblick interessant.

## 8. ZUSAMMENFASSUNG DER FORSCHUNGSERGEBNISSE ZUR APIKALEN DOMÄNE VON GROEL

### 8.1. Thermodynamische Stabilität und Faltung von Fragmenten des Chaperonins GroEL (apikale Domäne, Minichaperone)

Durch limitierte Proteolyse mit Thermolysin konnten 1993 erstmals stabile Fragmente (Molekulargewicht 34 kDa, Fragment 150-456) des Chaperonins GroEL hergestellt werden, die die Faltung von Rhodanase auch ohne Cochaperonin GroES und Hydrolyse von ATP unterstützen (Makino *et al.*, 1993). Verschiedene Fragmente der apikalen Domäne von GroEL mit unterschiedlichem Molekulargewicht können rekombinant in *Escherichia coli* produziert werden, wie die Fragmente 191-376, 191-345 (**R8**) und 193-335 (Kobayashi *et al.*, 1999; Tanaka & Fersht, 1999). Diese werden auch als Minichaperone bezeichnet und sind monomere Proteine. Die Kristallstruktur des Minichaperons 191-376 wurde mit einer Auflösung von 1,7 Å gelöst und entspricht im wesentlichen der apikalen Domäne in GroEL (Braig *et al.*, 1994; Buckle *et al.*, 1997).

GroEL vermittelt die Faltung zytosolischer Proteine in *Escherichia coli*, wobei eine Wechselwirkung mit etwa 300 Proteinen nachgewiesen wurde (Houry *et al.*, 1999). Die Messung der funktionellen Aktivität des Chaperonins GroEL auf die Faltung von Proteinsubstraten ist für Rhodanase (auch ohne Hydrolyse von ATP) und Malat-Dehydrogenase (Hydrolyse von ATP) etabliert (Mendoza *et al.*, 1992). Durch Kernresonanzspektroskopie war gezeigt worden, daß die durch GroEL mögliche reversible Faltung der PPlase Cyp18 auf einer Wechselwirkung von dessen entfalteter Polypeptidkette mit der apikalen Domäne des Chaperonins beruht (Nieba-Axmann *et al.*, 1997; Zahn *et al.*, 1994). Die Minichaperone können wegen des Fehlens der basalen Domäne kein ATP hydrolysieren. Die Bestimmung ihrer funktionellen Aktivität wurde aus diesem Grund mit Rhodanase (Horovitz, 1995) und Cyp18 (Zahn *et al.*, 1994) untersucht und dadurch bestätigt, daß die durch GroEL unterstützte Faltung dieser Substratproteine auch ohne Hydrolyse von ATP erfolgen kann (**R9**).

Das Chaperonin GroEL ist ein Tetradekamer, bestehend aus zwei heptameren Ringen (Braig *et al.*, 1994). Von ELLIS wurde 1991 das Modell des ANFINSEN-Käfigs (ANFINSEN-*cage*) aufgestellt (Ellis, 1996). Die Bildung des Binärkomplexes der Polypeptidkette mit dem Chaperonin erfolgt an multiplen Bindungsstellen im Inneren

des Moleküls (Hohlzylinder). Nach heutigen strukturellen und mechanistischen Erkenntnissen umfaßt der ANFINSEN-*cage* im engeren Sinne nur einen heptameren Ring des Chaperonins und sieben Moleküle des Cochaperonins GroES (GroEL<sub>7</sub>GroES<sub>7</sub>). Verschiedene heterooligomere Zustände des Chaperonins im Komplex mit dem Cochaperonin sind nachgewiesen worden, so auch GroEL<sub>14</sub>(GroES<sub>7</sub>)<sub>2</sub> (Azem *et al.*, 1994). Es wurde durch analytische Ultrazentrifugation gezeigt, daß die Minichaperone 191-376 und 191-345 als Monomere vorliegen und keinen ANFINSEN-Käfig bilden (**R10**). Daher ist auch eine Aktivität dieser Fragmente gegenüber Proteinsubstraten die essentiell unter Hydrolyse von ATP im ANFINSEN-Käfig falten, wie zum Beispiel Malat-Dehydrogenase und Citrat-Synthase, nicht zu erwarten (Coyle *et al.*, 1997; Ellis & Hartl, 1999).

Die Minichaperone 191-376 und 191-345 enthalten in ihrer Primärstruktur keine Tryptophanreste. Messungen zur Faltung dieser Proteine konnten durch Detektion der intrinsischen Tyrosinfluoreszenz (Tyr199 in einer loop-Region, Tyr203 in einer <sub>310</sub>-Helix, Tyr360 in Helix K) durchgeführt werden (**R10**). Die Detektion der Änderungen der Tertiärstruktur erfolgte auch mittels Nah-UV, die der Sekundärstruktur mittels Fern-UV Circular dichroismus. Die thermodynamische Stabilität der Minichaperone 191-376 und 191-345 wurde durch chemische Denaturierung mit Harnstoff und durch thermische Denaturierung gemessen. Die Faltung der hier beschriebenen Fragmente von GroEL ist reversibel. Die Auswertung der Daten der chemischen Denaturierung nach einem Zweizustandsmodell ergab eine thermodynamische Stabilität von 5,7 kcal mol<sup>-1</sup> (Fern-UV Circular dichroismus). Das Minichaperon 191-376 umfaßt neben der apikalen Domäne von GroEL die Helix K (H12), die Teil der intermediären Domäne ist. Durch thermische Denaturierung und Detektion der Änderungen der Sekundärstruktur mittels Fern-UV Circular dichroismus wurde gezeigt, daß diese zusätzliche Helix eine wesentlich geringere Stabilität besitzt und als isoliertes Sekundärstrukturelement reversibel faltet (**R10**).

Die Kinetiken der Entfaltung und Faltung der Minichaperone 191-376 und 191-345 wurden nach Konzentrationsänderungen von Harnstoff mittels intrinsischer Fluoreszenz gemessen. Die Primärstruktur der Fragmente enthält sieben Prolinreste, die alle in *trans*-Konformation im nativen Zustand vorliegen (Buckle *et al.*, 1997). Die Population eines transienten Intermediates konnte durch die Analyse

der Hauptfaltungsphase der Fragmente gezeigt werden (*chevron*-Plots). Diese Eindomänenproteine falten nach einem Dreizustandsmodell (**R10**). Der TANFORD- $\beta_T$ -Wert für die Faltung des Minichaperons 191-345 beträgt 0,78 (Jackson, 1998).

## 8.2. Bindung von *bis*-ANS – hydrophobe Bereiche

Die volle Kompetenz als Chaperon erreicht GroEL nach Ausbildung des ANFINSEN-Käfigs im *cis*-Komplex (GroEL<sub>7</sub>GroES<sub>7</sub> – 7 ATP). Der molekulare Mechanismus der Chaperonaktivität umfaßt eine Kopplung von alternierenden Konformationsänderungen des Heterooligomers mit der Hydrolyse von ATP (Fersht, 1999; Rye & Horwich, 1997; Schmidt *et al.*, 1994; Todd *et al.*, 1994). Das Heterooligomer ist durch die Ausbildung des *cis*- bzw. *trans*-Komplexes funktionell asymmetrisch. Untersuchungen zu mechanistischen Details dieses Prozesses zeigten eine Bindung potentieller Substrate (Peptide, Proteine) an die apikale Domäne des Chaperonins (Corrales & Fersht, 1996). Zur Untersuchung der Spezifität dieser Wechselwirkungen und der daran beteiligten Strukturelemente bzw. Aminosäurereste wurde eine Serie von Fragmenten des GroEL's untersucht, die dessen apikale Domäne als zentrales Element enthalten (Minichaperone). Die Exponierung hydrophober Bereiche der apikalen Domäne war eine grundlegende These zur Erklärung ihrer Funktionalität (Motojima *et al.*, 2004). Der Nachweis hydrophober Bereiche (*hydrophobic patches*) eines Makromoleküls gelingt durch Bindungsstudien mit Fluoreszenzfarbstoffen. Für diese Untersuchungen kam *bis*-ANS zur Anwendung. Es konnte die Ausbildung hydrophober Bereiche der apikalen Domäne zweifelsfrei gezeigt werden (**R10**). Weiterhin wurden durch chemische Denaturierung Stabilitätsuntersuchungen der mit *bis*-ANS gesättigten Fragmente 191-345 und 191-376 durchgeführt, die bei beiden Proteinen bei 2,5 M Harnstoff die Population eines Intermediates mit stärker ausgeprägter Hydrophobizität zeigten. Daher muß der durch den Fluoreszenzindikator detektierte Bereich Strukturelemente umfassen, die beiden Proteinen gemeinsam sind. Dieses Intermediat ist auch kinetisch nachweisbar (**R10**).

Da die Faltungskompetenz der Minichaperone auch biotechnologisch interessant war, wurde deren strukturelle, funktionelle und physikochemische Charakterisierung in verschiedenen Arbeitsgruppen fortgesetzt. Es war einerseits von Interesse, welche Bereiche der Sekundärstruktur der apikalen Domäne von GroEL welche Sequenzen von potentiellen Substraten binden (Chatelier *et al.*, 1999; Chen & Sigler,

1999; Kobayashi *et al.*, 1999; Tanaka & Fersht, 1999) und andererseits, ob eine oligomere Struktur in Anlehnung an den nativen Komplex die Funktionalität verändert (Chatelier *et al.*, 2000a; Chatelier *et al.*, 2000b). Dazu sind auch durch *protein engineering* veränderte Varianten der Minichaperone untersucht worden (Wang *et al.*, 1999). Da der Autor dieser Arbeit an diesen umfangreichen Untersuchungen nicht beteiligt war, sollen nur die wesentlichen Ergebnisse genannt und zu den eigenen Datensätzen gewertet werden. Die Bindung von *bis*-ANS an das Fragment 191-345 wurde quantitativ reevaluiert und mit GroEL verglichen (Smoot *et al.*, 2001). Der Fluoreszenzfarbstoff bindet kooperativ an die apikale Domäne mit einem Hill-Koeffizienten von 2 und einem  $K_D$ -Wert von  $17,36 \pm 0,58 \mu\text{M}$ . GroEL hat zwei Bindungsseiten für *bis*-ANS,  $K_{D1}$  von  $0,56 \mu\text{M}$  (1,7 Mol Farbstoff pro Mol Untereinheit) und  $K_{D2}$  von  $10,57 \mu\text{M}$  (8,5 Mol Farbstoff pro Mol Untereinheit). Die apikale Domäne hat relativ wenig hydrophobe Oberfläche in der unbeeinflussten (*unperturbed*) Struktur. Die Bindung von *bis*-ANS destabilisiert die native Struktur des Fragmentes und induziert die Ausbildung hydrophober Oberflächen. Bei steigenden Konzentrationen an *bis*-ANS nimmt die thermodynamische Stabilität dieses Minichaperons ab, sie beträgt  $5,20 \pm 0,66 \text{ kcal mol}^{-1}$  bei 0 M *bis*-ANS und  $2,88 \pm 1,08 \text{ kcal mol}^{-1}$  bei  $30 \mu\text{M}$  *bis*-ANS. Der letztere Wert entspricht der Energiedifferenz des Intermediates zum entfalteten Zustand, da bei sättigenden Konzentrationen an *bis*-ANS gemessen wurde und ist mit dem kinetisch bestimmten Wert der thermodynamischen Stabilität des Intermediates vergleichbar (**R10**). Die Modulation hydrophober Oberflächen der apikalen Domäne erfolgt durch eine Perturbation der Tertiärstruktur (Smoot *et al.*, 2001). Die systematische Untersuchung der Bindung von Peptiden aus einer Peptidbibliothek (*randomly selected peptides*) an die apikale Domäne von GroEL zeigte deren Plastizität als Basis für die geringe Substratspezifität (*substrate diversity*) (Chen & Sigler, 1999). In den Kristallstrukturen dieser Komplexe (Chen & Sigler, 1999) und auch aus deren Untersuchungen mittels Kernresonanzspektroskopie (Kobayashi *et al.*, 1999) sind Helix H und Helix I die Bindungsstellen von potentiellen Substraten. Beide Helices sind sowohl in Fragment 191-345, als auch 191-376 realisiert.

### 8.3. Chaperonaktivität löslicher und immobilisierter (*column refolding*) Minichaperone

Von YOSHIDA und Mitarbeitern wurde 1994 von einem kovalent immobilisierten Fragment (Molekulargewicht 54 kDa) von *cpn60* aus *Thermus thermophilus* eine 10 %ige Aktivität als Chaperon auf die Faltung von Rhodanase berichtet (Taguchi *et al.*, 1994). Nach dem Beweis der funktionellen Aktivität der Minichaperone in Lösung (**R9**) war es für praktische Aspekte von Interesse, deren Funktionalität in immobilisierter Form zu untersuchen. Die Fragmente 191-345 und 191-376 der apikalen Domäne von GroEL wurden sowohl an Ni-NTA-Agarose, als auch an CNBr-aktivierter Sepharose immobilisiert. Die funktionelle Aktivität des immobilisierten Minichaperons wurde im *batch*-Verfahren mit Cyp18 und im säulenchromatographischen Verfahren mit IGPS(49-252) (Fragment der Indol-3-glycerinphosphat-Synthase) als Proteinsubstrate gezeigt (**R11**) (Fersht, 1999). Durch diese Verfahren ist es möglich, durch Lagerung partiell inaktiviertes Cyp18, was als humanes Protein kein natürliches Substrat von GroEL ist, zu reaktivieren.

Das Verfahren des *column refolding* wurde patentiert und auf die Renaturierung anderer Proteine, wie des Skorpion-Toxins Cn5, erfolgreich angewandt (Altamirano *et al.*, 1999). Es ist eingeschränkt auf Substrate, die allein durch Wechselwirkung mit der Substratbindungsstelle (induzierte Konformationsänderung) eine unterstützende Faltung oder Entfaltung erfahren. Der Komplex von GroEL ist unter physiologischen Bedingungen *in vivo* durch die koordinierte Hydrolyse von ATP reguliert (Bindung von GroES, Ausbildung des ANFINSEN-Käfigs), daher schränkt die Deletion der für die allosterische Kontrolle des Chaperonins wichtigen Bereiche das Substratspektrum naturgemäß ein.

## 9. ZUSAMMENFASSUNG DER UNTERSUCHUNGEN ZU KOLLAGEN IV

### 9.1. Struktur und Faltung von Kollagen

Kollagene sind Proteine eukaryontischer Organismen, die aus drei Polypeptidketten aufgebaut sind. Sie werden in verschiedene Typen eingeteilt, die in unterschiedlichen Geweben und Organen vorkommen (Kielty *et al.*, 1993). Die Primärstruktur dieser Ketten ist eine Folge von Triplets der Form  $-\text{[Gly-Pro-Hyp]}_n-$ . Eine einzelne Kollagenkette bildet eine linksgängige Polyprolin-II-Helix (Sekundärstruktur). Drei Kollagenketten bilden als Tertiärstruktur eine Kollagentripelhelix, die eine rechtsgängige Schraube mit einer Ganghöhe (*pitch*) von 8 nm darstellt. Die Seitenketten der Aminosäuren X und Y auf der Oberfläche der Tripelhelix (Zylindermantel) bilden wiederum eine linksgängige Schraube mit einem Durchmesser von 1,5 nm und einer Ganghöhe von 0,9 nm (Eble, 1994; Traub & Piez, 1971). Die Struktur der Tripelhelix wurde von RICH und CRICK 1955 vorgeschlagen (Rich & Crick, 1955). Die Analyse der Kristallstruktur eines kollagenen Peptides (Auflösung 1,9 Å) durch die Gruppe um Helen BERMAN bestätigte 1994 eindrucksvoll die originalen Koordinaten (Bella *et al.*, 1994).

Die Tripelhelix von Kollagenen zeigt einen charakteristischen Circular dichroismus im Fern-UV mit einem positiven Extremum bei 221 nm (Engel, 1987). Nach thermischer Denaturierung von Kollagen wird eine Inversion des Signals gemessen, so daß die Faltung durch Messung des Circular dichroismus bei dieser Wellenlänge analysiert werden kann (**R12**).

Die Seitenketten der Tripelhelix sind stark zum Lösungsmittel exponiert. Der Modus der Stabilisierung der Tripelhelix ist bis heute noch nicht vollständig verstanden. Es werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Gly der einen Kette und Pro in der X-Position der angrenzenden Ketten, Stabilisierungen durch hochgeordnete Wasserbrücken (*water bridges*) und induktive Effekte der Hydroxylgruppen der Hydroxyproline vorgeschlagen (Stetefeld *et al.*, 2003). Das *crosslinking* der selektierten Kollagenketten durch trimere Oligomerisierungsdomänen (NC-Domänen, nicht-kollagene Domänen) (Engel, 2004; Engel & Kammerer, 2000) oder Disulfidbrücken (Barth *et al.*, 2003a; Barth *et al.*, 2003b) begünstigt deren Stabilisierung und die Einstellung des Kettenregisters.

Allgemein beginnt die Faltung der Tripelhelix mit einer durch die Oligomerisierungsdomänen begünstigten Nukleation (trimolekulare Reaktion), was eine sehr hohe effektive Konzentration der Ketten bedingt (Boudko *et al.*, 2002). Die

Geschwindigkeit der Faltung von Kollagen ist durch die *cis* → *trans*-Isomerisierung der Prolylbindungen bestimmt, da in der intakten Tertiärstruktur nur die *trans*-Konformation vorliegt (Bächinger *et al.*, 1980). Die hohe Lösungsmittelzugänglichkeit der Seitenketten der Prolinreste ließ eine Beschleunigung der Kollagenfaltung durch PPlasen (Cyp18) erwarten (Bächinger, 1987). Aus Experimenten zur limitierten Proteolyse faltender Kollagenketten konnte gezeigt werden, daß die Faltung der Tripelhelix vom C- zum N-Terminus verläuft, wobei Nukleationen auch an beiden Termini auftreten können (Frank *et al.*, 2003). Von PROCKOP und ENGEL wurde ein Reißverschlußmodell der Kollagenfaltung (*zipper-like model*) vorgeschlagen (Engel & Prockop, 1991).

Transitionskurven der thermischen und chemischen Entfaltung von Kollagen und kollagenen Peptiden zeigten, daß dieser Prozeß kooperativ und meist reversibel ist (Ausnahme zum Beispiel Col2 von Kollagen XIV, **R13**). Die Transitionskurven der Entfaltung und Faltung zeigen jedoch eine Hysterese. Aus systematischen Untersuchungen der Faltung von Kollagen III und daraus hergestellten tryptischen kollagenen Peptiden verschiedener Kettenlänge zeigten ENGEL und BÄCHNIGER, daß der langsame Prozeß der Nukleation (*annealing*) und die Hysterese auf sehr langsame Schritte der Umlagerung / Umorientierung mißgefalteter Regionen des Moleküls zurückzuführen sind. Mit kürzerer Kettenlänge der Fragmente nimmt die Hysterese ab (Engel & Bächinger, 2000).

### 9.2. Kollagen IV als Bestandteil der Basalmembran

Die Basalmembran ist eine spezielle schichtartige Struktur der extrazellulären Matrix und trennt in allen Organen den Parenchymanteil (Epithel- und Endothelzellen, Muskelzellen und Muskelfasern, Nervengewebe) vom organspezifischen Bindegewebe (Stroma) ab. Hauptbestandteile der Basalmembran sind Kollagen IV, Laminin, Nidogen / Entaktin und Perlecan. Kollagen IV hat eine Länge von ca. 400 nm und ist ein Glykoprotein. Die heteromere Tripelhelix wird aus zwei  $\alpha$ 1-Ketten und einer  $\alpha$ 2-Kette gebildet, wobei auch andere Isoformen bekannt sind. Die einzige N-glykosidisch verknüpfte Kohlenhydratkette befindet sich in der N-terminalen 7S-Domäne. Die Tripelhelix von Kollagen IV besitzt einen sehr hohen Glykosylierungsgrad, wobei  $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-(1 → 2)-D-galactopyranosyl-Reste O-glykosidisch an 5-Hydroxylysinreste gebunden sind. Lysinreste in Y-Stellung

werden zu 95 % von Lysin-5-hydroxylase hydroxyliert, von denen 80-90 % glykosyliert werden (Eble, 1994; Kielty *et al.*, 1993).

Kollagen IV unterscheidet sich von interstitiellen Kollagenen durch die Ausbildung netzartiger Strukturen. Am N-Terminus werden in der 30 nm langen 7S-Domäne vier Tripelhelices durch intermolekulare Disulfidbrücken kovalent vernetzt. Diese Verknüpfungen werden durch intermolekulare Aldolnetzungsprodukte ergänzt, die aus Lysin- und 5-Hydroxylysinresten nach deren Oxidation durch Lysyloxidase entstehen. Die Tripelhelix von Kollagen IV hat eine Länge von 360 nm. Am C-Terminus befindet sich die NC1-Domäne, die aus zwei NC1 $\alpha$ 1-Untereinheiten und einer NC1 $\alpha$ 2-Untereinheit aufgebaut ist (Eble, 1994; Kielty *et al.*, 1993). Die Struktur dieser Domäne wurde 2002 aufgeklärt (Than *et al.*, 2002). Die NC1-Domänen zweier Tripelhelices können kovalent über eine ungewöhnliche Met-Lys-Brücke verbunden werden und bilden ein sogenanntes Dimer. Ferner können die Tripelhelices von Kollagen IV lateral assoziieren (Eble, 1994). Das aus diesen Möglichkeiten der Verknüpfung der Ketten resultierende Netzwerk von Kollagen IV bildet das Grundgerüst der *Lamina densa* der Basalmembran.

### 9.3. Untersuchungen zur thermischen Stabilität des Bindungsbereiches des Integrins $\alpha_1\beta_1$ (VLA1) an Kollagen IV

Integrine sind membranständige Zelladhäsionsmoleküle, die Zell-Matrix-Kontakte gewährleisten und bestehen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit (Eble, 1994; Humphries *et al.*, 2003). Das Integrin  $\alpha_1\beta_1$  (VLA1) bindet an Kollagen IV (Vandenberg *et al.*, 1991). Untersuchungen der Bindung dieses Integrins an durch limitierte Proteolyse hergestellte Fragmente von Kollagen IV (F1, F2, F3, F4 und TL1) zeigten, daß diese Wechselwirkung durch die Aminosäuren Asp461 der beiden  $\alpha_1$  und Arg461 der  $\alpha_2$ -Kette essentiell bestimmt wird (**R14**). Der Bindungsbereich des Integrins  $\alpha_1\beta_1$  (VLA1) an Kollagen IV liegt daher im N-terminalen Teil des Moleküls zwischen zwei Disulfidknoten [Disulfidknoten I der  $\alpha_1$ -Ketten (Cys454), Disulfidknoten II der  $\alpha_1$ -Ketten (Cys487, Cys490) und  $\alpha_2$ -Ketten (Cys486, Cys488)].

Die Untersuchung der thermischen Stabilität der proteolytischen Fragmente F1, F4 und TL1 wurde mittels Fern-UV Circular dichroismus untersucht (**R14**). Das Fragment F1 zeigte zwei Transitionen des Entfaltungsprozesses mit  $T_m^1 = 37$  °C und  $T_m^2 = 49$  °C. Die Faltung des thermisch denaturierten Fragmentes F1 zeigte

ebenfalls zwei Transitionen, wobei eine Hysterese zur Entfaltung nur für den ersten Transitionsbereich gemessen wurde. Das Fragment F4 entspricht dem tripelhelikalen Teil zwischen den beiden Disulfidknoten und zeigt bei der thermischen Entfaltung nur noch die Transition mit  $T_m = 51$  °C. Somit konnten erstmals stabilere lokale Bereiche der Tripelhelix von Kollagen IV nachgewiesen werden, die keine Hysterese der Faltung im Vergleich zur Entfaltung aufweisen. Das Fragment TL1 entspricht der C-terminalen Hälfte des Fragmentes F4. Trotz tripelhelikaler Struktur besitzt es eine geringere thermische Stabilität. Untersuchungen der thermischen Stabilität von Modellpeptiden von Kollagen IV, die auf der Grundlage der Struktur der Bindungsstelle der Integrine synthetisiert wurden, konnten die Messungen und Interpretationen der Ergebnisse der natürlichen Präparate bestätigen (Sacca *et al.*, 2002a).

#### *9.4. Bestimmung des Rasters der Kollagenketten im Bereich der Bindungsstelle des Integrins $\alpha_1\beta_1$ (VLA1) mittels Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) (R15)*

Für die Synthese von Modellpeptiden zur Inhibition der Bindung von Integrinen an Kollagen IV war es von Interesse, den Raster der drei Einzelketten der Tripelhelix im Bereich des Disulfidknotens zu bestimmen. Kollagen IV besitzt zwischen den Disulfidknoten der Integrinbindungsstelle nur einen Tryptophanrest in der  $\alpha_2$ -Kette in Position 479. Aus Betrachtungen der Primärstruktur und bekannten Daten zum FRET zwischen den intrinsischen Fluorophoren von Proteinen wurden die Phe461 der beiden  $\alpha_1$ -Ketten als Donormoleküle und Trp479 der  $\alpha_2$ -Kette als Akzeptormolekül für einen FRET im Fragment F2 in Betracht gezogen. Kollagen ist ein relativ starres Molekül. Es konnte gezeigt werden, daß zwischen den im Fragment F2 vorhandenen Tyrosinresten und Trp479 kein FRET besteht. Die vorhandenen Tyrosinreste wurden nitriert um eine optische Perturbation einzuschränken. Der mittlere Abstand zwischen den beiden Donoren und dem Akzeptor wurde nach Messung der Energietransfereffizienz nach FÖRSTER bestimmt (Förster, 1948). Aus dem Modell der Tripelhelix von Kollagen und den Übergangsmomenten der Aromaten konnte der Orientierungsfaktor  $\kappa$  der Förster'schen Gleichung spezifiziert werden, was eine genauere Abschätzung der Abstände der FRET-Paare erlaubte und die konformative Anordnung  $\alpha_1'\alpha_1\alpha_2$  favorisierte. Die Anordnung  $\alpha_1\alpha_2\alpha_1'$  konnte definitiv ausgeschlossen werden. Die Anordnung  $\alpha_2\alpha_1'\alpha_1$  ähnelt konformativ der Anordnung  $\alpha_1'\alpha_1\alpha_2$ .

Neuere Studien der Bestimmung des Kettenregisters mit Modellpeptiden konnten diese Messungen im wesentlichen bestätigen (Sacca *et al.*, 2002a). Die Tripelhelix der Modellpeptide mit dem Register  $\alpha 1\alpha 2\alpha 1'$  zeigte eine geringere Thermostabilität. Damit wurde eine wesentliche Grundlage zum rationalen Wirkstoffdesign der Integrinbindung an Kollagen IV mit Relevanz zu medizinischen Aspekten der Wundheilung und Tumorinvasion geschaffen (Sacca *et al.*, 2002b).

## 10. LITERATURVERZEICHNIS

- Agashe, V.R., Schmid, F.X. & Udgaonkar, J.B. (1997). Thermodynamics of the complex protein unfolding reaction of barstar. *Biochemistry*, **36**, 12288-12295.
- Agashe, V.R., Shastry, M.C.R. & Udgaonkar, J.B. (1995). Initial hydrophobic collapse in the folding of barstar. *Nature*, **377**, 754-757.
- Agashe, V.R. & Udgaonkar, J.B. (1995). Thermodynamics of denaturation of barstar: evidence for cold denaturation and evaluation of the interaction with guanidine hydrochloride. *Biochemistry*, **34**, 3286-3299.
- Altamirano, M.M., Garcia, C., Possani, L.D. & Fersht, A.R. (1999). Oxidative refolding chromatography: folding of the scorpion toxin Cn5. *Nature Biotechnology*, **17**, 187-191.
- Altamirano, M.M., Golbik, R., Zahn, R., Buckle, A.M. & Fersht, A.R. (1997). Refolding chromatography with immobilized mini-chaperones. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **94**, 3576-3578.
- An, S.S.A., Lester, C.C., Peng, J.-L., Li, Y.-J., Rothwarf, D.M., Welker, E., Thannhauser, T.W., Zhang, L.S., Tam, J.P. & Scheraga, H.A. (1999). Retention of the *cis* proline conformation in tripeptide fragments of bovine pancreatic ribonuclease A containing a non-natural proline analogue, 5,5-dimethylproline. *Journal of the American Chemical Society*, **121**, 11558-11566.
- Anfinsen, C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, **181**, 223-230.
- Azem, A., Kessel, M. & Goloubinoff, P. (1994). Characterization of a functional GroEL<sub>14</sub>(GroES<sub>7</sub>)<sub>2</sub> chaperonin hetero-oligomer. *Science*, **265**, 653-656.
- Bächinger, H.P. (1987). The influence of peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase on the *in vitro* folding of type III collagen. *Journal of Biological Chemistry*, **262**, 17144-17148.
- Bächinger, H.P., Bruckner, P., Timpl, R. & Engel, J. (1978). The role of *cis-trans* isomerization of peptide bonds in the coil-triple helix conversion of collagen. *European Journal of Biochemistry*, **90**, 605-613.

- Bächinger, H.P., Bruckner, P., Timpl, R. & Engel, J. (1980). Folding mechanism of the triple helix in type-III collagen and type-III pN-collagen. Role of disulfide bridges and peptide bond isomerization. *European Journal of Biochemistry*, **106**, 619-632.
- Bae, J.H., Pal, P.P., Moroder, L., Huber, R. & Budisa, N. (2004). Crystallographic evidence for isomeric chromophores in 3-fluorotyrosyl-green fluorescent protein. *ChemBioChem*, **5**, 720-722.
- Bae, J.H., Rubini, M., Jung, G., Wiegand, G., Seifert, M.H.J., Azim, M.K., Kim, J.-S., Zumbusch, A., Holak, T.A., Moroder, L., Huber, R. & Budisa, N. (2003). Expansion of the genetic code enables design of a novel "gold" class of green fluorescent protein. *Journal of Molecular Biology*, **328**, 1071-1081.
- Bai, Y., Sosnick, T.R., Mayne, L. & Englander, S.W. (1995). Protein folding intermediates: native-state hydrogen exchange. *Science*, **269**, 192-197.
- Balbach, J. & Schmid, F.X. (2000). Proline isomerization and its catalysis in protein folding. In *Mechanisms of Protein Folding*, Pain, R.H. (ed), Vol. 32. pp. 212-249. Frontiers in Molecular Biology. Oxford University Press: Oxford.
- Baldwin, R.L. (1993). Pulse H/D exchange studies of folding intermediates. *Current Opinion in Structural Biology*, **3**, 84-91.
- Barth, D., Kyrieleis, O., Frank, S., Renner, C. & Moroder, L. (2003a). The role of cystine knots in collagen folding and stability, part II. Conformational properties of (Pro-Hyp-Gly)<sub>n</sub> model trimers with N- and C-terminal collagen type III cystine knots. *Chemistry - A European Journal*, **9**, 3703-3714.
- Barth, D., Milbradt, A.G., Renner, C. & Moroder, L. (2004). A (4R)- or a (4S)-fluoroproline residue in position Xaa of the (Xaa-Yaa-Gly) collagen repeat severely affects triple-helix formation. *ChemBioChem*, **5**, 79-86.
- Barth, D., Musiol, H.J., Schütt, M., Fiori, S., Milbradt, A.G., Renner, C. & Moroder, L. (2003b). The role of cystine knots in collagen folding and stability, part I. Conformational properties of (Pro-Hyp-Gly)<sub>5</sub> and (Pro-(4S)-FPro-Gly)<sub>5</sub> model trimers with an artificial cystine knot. *Chemistry - A European Journal*, **9**, 3692-3702.
- Becktel, W.J. & Schellman, J.A. (1987). Protein stability curves. *Biopolymers*, **1987**, 1859-1877.
- Bella, J., Eaton, M., Brodsky, B. & Berman, H.M. (1994). Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution. *Science*, **266**, 75-81.

- Bhuyan, A.K. & Udgaonkar, J.B. (1999). Observation of multistate kinetics during the slow folding and unfolding of barstar. *Biochemistry*, **38**, 9158-9168.
- Bieri, O. & Kiefhaber, T. (2000). Kinetic models in protein folding. In *Mechanisms of Protein Folding*, Pain, R.H. (ed), Vol. 32. pp. 34-64. Frontiers in Molecular Biology. Oxford University Press: Oxford.
- Bolen, D.W. & Santoro, M.M. (1988). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 2. Incorporation of  $\Delta G_{N-U}$  values in a thermodynamic cycle. *Biochemistry*, **27**, 8069-8074.
- Bordusa, F. (2000). Non-conventional CN-ligation catalysis: Programming of enzyme specificity by substrate mimetics. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **33**, 469-485.
- Bosco, D.A., Eisenmesser, E.Z., Pochapsky, S., Sundquist, W.I. & Kern, D. (2002). Catalysis of cis/trans isomerization in native HIV-1 capsid by human cyclophilin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **99**, 5247-5252.
- Bose, S., Ehrnsperger, M. & Buchner, J. (1999). 27. Mechanisms of ATP-independent vs. ATP-dependent chaperones. In *Molecular Chaperones and Folding Catalysts. Regulation, Cellular Function and Mechanisms*, Bukau, B. (ed) pp. 637-660. Harwood Academic Publishers: Australia, Canada, China, France, Germany, India, Japan, Luxembourg, Malaysia, The Netherlands, Russia, Singapore, Switzerland.
- Boudko, S., Frank, S., Kammerer, R.A., Stetefeld, J., Schulthess, T., Landwehr, R., Lustig, A., Bächinger, H.P. & Engel, J. (2002). Nucleation and propagation of collagen triple helix in single-chain and trimerized peptides: transition from third to first order kinetics. *Journal of Molecular Biology*, **317**, 459-470.
- Braig, K., Otwinowski, Z., Hedge, R., Biosvert, D.C., Joachimiak, A., Horwich, A.L. & Sigler, P.B. (1994). The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature*, **371**, 578-586.
- Brandts, J.F., Halvorson, H.R. & Brennan, M. (1975). Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation is due to the cis-trans isomerism of proline residues. *Biochemistry*, **14**, 4953-4963.
- Brown, J.C., Golbik, R., Mann, K. & Timpl, R. (1994). Structure and stability of the triple-helical domains of human collagen XIV. *Matrix Biology*, **14**, 287-295.

- Buckle, A.M., Schreiber, G. & Fersht, A.R. (1994). Protein-protein recognition: crystal structural analysis of a barnase-barstar complex at 2.0 Å resolution. *Biochemistry*, **33**, 8878-8889.
- Buckle, A.M., Zahn, R. & Fersht, A.R. (1997). A structural model for GroEL-polypeptide binding recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **94**, 3571-3575.
- Budisa, N., Alefelder, S., Bae, J.H., Golbik, R., Minks, C., Huber, R. & Moroder, L. (2001). Proteins with  $\beta$ -(thienopyrrolyl)alanines as alternative chromophores and pharmaceutically active amino acids. *Protein Science*, **10**, 1281-1292.
- Budisa, N., Huber, R., Golbik, R., Minks, C., Weyher, E. & Moroder, L. (1998). Atomic mutations in annexin V. Thermodynamic studies of isomorphous protein variants. *European Journal of Biochemistry*, **253**, 1-9.
- Budisa, N., Minks, C., Alefelder, S., Wenger, W., Dong, F., Moroder, L. & Huber, R. (1999). Toward the experimental codon reassignment *in vivo* : protein building with an expanded amino acid repertoire. *FASEB Journal*, **13**, 41-51.
- Budisa, N., Rubini, M., Bae, J.H., Weyher, E., Wenger, W., Golbik, R., Huber, R. & Moroder, L. (2002). Global replacement of tryptophan with aminotryptophans generates non-invasive protein-based optical pH sensors. *Angewandte Chemie International Edition*, **41**, 4066-4069.
- Bukau, B., Schmid, F.X. & Buchner, J. (1999). 1. Assisted protein folding. In *Molecular Chaperones and Folding Catalysts. Regulation, Cellular Function and Mechanisms*, Bukau, B. (ed) pp. 3-10. Harwood Academic Publishers: Australia, Canada, China, France, Germany, India, Japan, Luxembourg, Malaysia, The Netherlands, Russia, Singapore, Switzerland.
- Burston, S.G. & Saibil, H.R. (1999). 23. The relationship between chaperonin structure and function. In *Molecular Chaperones and Folding Catalysts. Regulation, Cellular Function and Mechanisms*, Bukau, B. (ed) pp. 523-553: Australia, Canada, China, France, Germany, India, Japan, Luxembourg, Malaysia, The Netherlands, Russia, Singapore, Switzerland.
- Carter, P.J., Winter, G., Wilkinson, A.J. & Fersht, A.R. (1984). The use of double mutants to detect structural changes in the active site of the tyrosyl-tRNA synthetase. *Cell*, **38**, 835-840.

- Case, D.A., Dyson, H.J. & Wright, P.E. (1994). Use of chemical shift and coupling constants in nuclear magnetic resonance structural studies on peptides and proteins. *Methods in Enzymology*, **239**, 392-416.
- Cavelier, F., Vivet, B., Martinez, J., Aubry, A., Didierjean, C., Vicherat, A. & Marraud, M. (2002). Influence of silaprolin on peptide conformation and bioactivity. *Journal of the American Chemical Society*, **124**, 2917-2923.
- Chatelier, J., Buckle, A.M. & Fersht, A.R. (1999). GroEL recognises sequential and non-sequential linear structural motifs compatible with extended  $\beta$ -strands and  $\alpha$ -helices. *Journal of Molecular Biology*, **292**, 163-172.
- Chatelier, J., Hill, F. & Fersht, A.R. (2000a). From minichaperone to GroEL 2: importance of avidity of the multistate ring structure. *Journal of Molecular Biology*, **304**, 883-896.
- Chatelier, J., Hill, F., Foster, N., Goloubinoff, P. & Fersht, A.R. (2000b). From minichaperone to GroEL 3: properties of an active single-ring mutant of GroEL. *Journal of Molecular Biology*, **304**, 897-910.
- Chen, L. & Sigler, P.B. (1999). The crystal structure of a GroEL/peptide complex; plasticity as a basis for substrate diversity. *Cell*, **99**, 757-768.
- Chen, S., Roseman, A.M., Hunter, A.S., Wood, S.P., Burston, S.G., Ranson, N.A., Clarke, A.R. & Saibil, H.R. (1994). Location of a folding protein and shape changes in GroEL-GroES complexes imaged by cryo-electron microscopy. *Nature*, **371**, 261-264.
- Clarke, J. & Fersht, A.R. (1993). Engineered disulfide bonds as probes of the folding pathway of barnase: increasing the stability of proteins against the rate of denaturation. *Biochemistry*, **32**, 4322-4329.
- Corrales, F.J. & Fersht, A.R. (1996). Toward a mechanism for GroEL:GroES chaperone activity: an ATPase-gated and pulsed folding and annealing cage. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **93**, 4509-4512.
- Coyle, J.E., Jaeger, J., Groß, M., Robinson, C.V. & Radford, S.E. (1997). Structural and mechanistic consequences of polypeptide binding by GroEL. *Folding & Design*, **2**, R93-R104.
- Daggett, V. & Fersht, A.R. (2000). Transition states in protein folding. In *Mechanisms of Protein Folding*, Pain, R.H. (ed), Vol. 32. pp. 174-211. Frontiers in Molecular Biology. Oxford University Press: Oxford.

- Dalby, P.A., Clarke, J., Johnson, C.M. & Fersht, A.R. (1998a). Folding intermediates of wild-type and mutants of barnase. II. Correlation of changes in equilibrium amide exchange kinetics with the population of the folding intermediate. *Journal of Molecular Biology*, **276**, 647-656.
- Dalby, P.A., Oliveberg, M. & Fersht, A.R. (1998b). Folding intermediates of wild-type and mutants of barnase. I. Use of  $\phi$ -value analysis and  $m$ -values to probe the cooperative nature of the folding pre-equilibrium. *Journal of Molecular Biology*, **276**, 625-646.
- Davies, J.M., Boswell, B.A. & Bächinger, H.P. (1989). Thermal stability and folding of type IV procollagen and effect of peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase on the folding of the triple helix. *Journal of Biological Chemistry*, **264**, 8956-8962.
- DeRider, M.L., Wilkens, S.J., Waddell, M.J., Bretscher, L.E., Weinhold, F., Raines, R.T. & Markley, J.L. (2002). Collagen stability: insights from NMR spectroscopic and hybrid density functional computational investigations of the effect of electronegative substituents on prolyl ring conformations. *Journal of the American Chemical Society*, **124**, 2497-2505.
- Dobson, C.M. (1991). Characterization of protein folding intermediates. *Current Opinion in Structural Biology*, **1**, 22-27.
- Dobson, C.M., Sali, A. & Karplus, M. (1998). Proteinfaltung aus theoretischer und experimenteller Sicht. *Angewandte Chemie*, **110**, 908-935.
- Eble, J.A. (1994). Die dreidimensionale Struktur der Erkennungsregion des  $\alpha_1\beta_1$ -Integrins im Typ IV-Kollagen. In *Fakultät für Chemie und Pharmazie*. Ludwig-Maximilians-Universität München: München.
- Eble, J.A., Golbik, R., Mann, K. & Kühn, K. (1993). The  $\alpha_1\beta_1$  integrin recognition site of the basement membrane collagen molecule  $[\alpha_1(\text{IV})]_2\alpha_2(\text{IV})$ . *EMBO Journal*, **12**, 4795-4802.
- Eisenmesser, E.Z., Bosco, D.A., Akke, M. & Kern, D. (2002). Enzyme dynamics during catalysis. *Science*, **295**, 1520-1523.
- Ellis, J. (1987). Proteins as molecular chaperones. *Nature*, **328**, 378-379.
- Ellis, J. (1996). Revisiting the Anfinsen cage. *Folding & Design*, **1**, R9-R15.
- Ellis, R.J. & Hartl, F.U. (1999). Principles of protein folding in the cellular environment. *Current Opinion in Structural Biology*, **9**, 102-110.
- Engel, J. (1987). Folding and unfolding of collagen triple helices. *Advances in Meat Research*, **4**, 145-161.

- Engel, J. (2004). Role of oligomerization domains in thrombospondins and other extracellular matrix proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **36**, 997-1004.
- Engel, J. & Bächinger, H.P. (2000). Cooperative equilibrium transitions coupled with a slow annealing step explain the sharpness and hysteresis of collagen folding. *Matrix Biology*, **19**, 235-244.
- Engel, J. & Kammerer, R.A. (2000). What are oligomerization domains good for ? *Matrix Biology*, **19**, 283-288.
- Engel, J. & Prockop, D. (1991). The zipper-like folding of collagen triple-helices and the effect of mutations that disrupt the zipper. *Annual Reviews of Biophysics and Biophysical Chemistry*, **20**, 137-152.
- Evans, P.A., Kautz, R.A., Fox, R.O. & Dobson, C.M. (1987). Proline isomerism in staphylococcal nuclease characterized by NMR and site-directed mutagenesis. *Nature*, **329**, 266-270.
- Eyring, H. (1938a). The calculation of activation energies. *Transactions of the Faraday Society*, **34**, 3-11.
- Eyring, H. (1938b). The theory of absolute reaction rates. *Transactions of the Faraday Society*, **34**, 41-48.
- Fanghänel, J. (2003). Enzymatic catalysis of the peptidyl-prolyl bond rotation: are transition state formation and enzyme dynamics directly linked ? *Angewandte Chemie International Edition*, **42**, 490-492.
- Fenton, W.A., Kashi, Y., Furtak, K. & Horwich, A.L. (1994). Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature*, **371**, 614-619.
- Fersht, A.R. (1993). Protein folding and stability: the pathway of folding of barnase. *FEBS Letters*, **325**, 5-16.
- Fersht, A.R. (1999). *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*. W.H. Freeman and Company: New York, Houndmills, Basingstroke.
- Fersht, A.R. (2004). Relationship of Leffler (Bronsted)  $\alpha$  values and protein folding  $\phi$  values to position of transition-state structures on reaction coordinates. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **101**, 14338-14342.
- Fersht, A.R., Matouschek, A. & Serrano, L. (1992). The folding of an enzyme. 1. Theory of protein engineering analysis of stability and pathway of protein folding. *Journal of Molecular Biology*, **224**, 771-782.

- Fischer, G. (1994). Über Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen und ihre Effektoren. *Angewandte Chemie*, **106**, 1479-1501.
- Fischer, G. (1996). Peptidyl-prolyl-cis/trans-Isomerasen: prolinspezifische Bindeproteine oder Faltungskatalysatoren ? *Biospektrum*, **2**, 43-47.
- Fischer, G. (2000). Chemical aspects of peptide bond isomerization. *Chemical Society Reviews*, **29**, 119-127.
- Fischer, G. & Aumüller, T. (2003). Regulation of peptide bond *cis/trans* isomerization by enzyme catalysis and its implication in physiological processes. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, **148**, 105-150.
- Fischer, G., Bang, H., Berger, E. & Schellenberger, A. (1984a). Konformationsspezifität von Chymotrypsin gegenüber prolinhaltigen Substraten. *Biochimica Biophysica Acta*, **791**, 87-97.
- Fischer, G., Bang, H. & Mech, C. (1984b). Nachweis einer Enzymkatalyse für die *cis-trans* Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden. *Biomedica Biochimica Acta*, **43**, 1101-1111.
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, **2**, 55-75.
- Fox, R.O., Evans, P.A. & Dobson, C.M. (1986). Multiple conformations of a protein demonstrated by magnetization transfer NMR spectroscopy. *Nature*, **320**, 192-194.
- Frank, S., Boudko, S., Mizuno, K., Schulthess, T., Engel, J. & Bächinger, H.P. (2003). Collagen triple helix formation can be nucleated at either end. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 7747-7750.
- Frisch, C., Schreiber, G., Johnson, C.M. & Fersht, A.R. (1997). Thermodynamics of the interaction of barnase and barstar: changes in free energy *versus* changes in enthalpy on mutation. *Journal of Molecular Biology*, **267**, 696-706.
- Fulton, K.F., Main, E.R., Daggett, V. & Jackson, S.E. (1999). Mapping the interactions present in the transition state for unfolding / folding of FKBP12. *Journal of Molecular Biology*, **291**, 445-461.
- Garel, J.-R. (1992). Folding of large proteins: multidomain and multisubunit proteins. In *Protein Folding*, Creighton, T.E. (ed) pp. 405-454. W.H. Freeman and Company: New York.
- Garel, J.-R. & Baldwin, R.L. (1973). Both the fast and slow refolding reactions of ribonuclease A yield native enzyme. *Biochemistry*, **70**, 3347-3351.

- Garvey, E.P., Swank, J. & Matthews, C.R. (1989). A hydrophobic cluster forms early in the folding of dihydrofolate reductase. *Proteins Structure Function and Genetics*, **6**, 259-266.
- Gast, K., Modler, A.J., Damaschun, H., Kröber, R., Lutsch, G., Zirwer, G., Golbik, R. & Damaschun, G. (2003). Effect of environmental conditions on aggregation and fibril formation of barstar. *European Biophysics Journal*, **32**, 710-723.
- Gerig, J.T. & McLeod, R.S. (1973). Conformations of *cis*- and *trans*-4-fluoro-L-proline in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society*, **95**, 5725-5729.
- Golbik, R., Eble, J.A., Ries, A. & Kühn, K. (2000). The spatial orientation of the essential amino acid residues arginine and aspartate within the  $\alpha 1\beta 1$  integrin recognition site of collagen IV has been resolved using fluorescence resonance energy transfer. *Journal of Molecular Biology*, **297**, 501-509.
- Golbik, R., Fischer, G. & Fersht, A.R. (1999). Folding of barstar C40A/C82A/P27A and catalysis of the peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerization by human cytosolic cyclophilin. *Protein Science*, **8**, 1505-1514.
- Golbik, R., Zahn, R., Harding, S.E. & Fersht, A.R. (1998). Thermodynamic stability and folding of GroEL minichaperones. *Journal of Molecular Biology*, **276**, 505-515.
- Goldberg, M.E., Semisotnov, G., Friguet, B., Kuwajima, K., Ptitsyn, O.B. & Sugai, S. (1990). An early immunoreactive folding intermediate of the tryptophan synthetase beta subunit is a 'molten globule'. *FEBS Letters*, **263**, 51-56.
- Grathwohl, C. & Wüthrich, K. (1981). NMR studies of the rates of proline *cis-trans* isomerization in oligopeptides. *Biopolymers*, **20**, 2623-2633.
- Guillet, V., Laphorn, A., Fourniat, J., Benoit, J.P., Hartley, R.W. & Maughen, Y. (1993). Crystallization and preliminary X-ray investigation of barstar, the intracellular inhibitor of barnase. *Proteins Structure Function and Genetics*, **17**, 325-328.
- Halab, L. & Lubell, W.D. (1999). Use of steric interactions to control peptide turn geometry. Synthesis of type VI b-turn mimics with 5-*tert*-butylproline. *Journal of Organic Chemistry*, **64**, 3312-3321.
- Hammond, G.S. (1955). A correlation of reaction rates. *Journal of the American Chemical Society*, **77**, 334-338.

- Harrison, R.K. & Stein, R.L. (1990). Mechanistic studies of peptidyl prolyl cis-trans isomerase. Evidence for catalysis by distortion. *Biochemistry*, **29**, 1684-1689.
- Harrison, R.K. & Stein, R.L. (1992). Mechanistic studies of enzymic and nonenzymic prolyl cis-trans isomerization. *Journal of the American Chemical Society*, **114**, 3464-3471.
- Hartley, R.W. (1988). Barnase and barstar. Expression of its cloned inhibitor permits expression of a cloned ribonuclease. *Journal of Molecular Biology*, **202**, 913-915.
- Hartley, R.W. (1989). Barnase and barstar: two small proteins to fold and fit together. *Trends in Biochemical Sciences*, **14**, 450-454.
- Hemmingsen, S.M., Woolford, C., van der Vries, S.M., Tilly, K., Dennis, D.T., Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W. & Ellis, R.J. (1988). Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature*, **333**, 330-334.
- Hessling, M. (2003). Untersuchungen zur Faltung des Ribonucleaseinhibitors Barstar. In *Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg: Halle/Saale.
- Hesterkamp, T. & Bukau, B. (1996). Identification of the prolyl isomerase domain of *Escherichia coli* trigger factor. *FEBS Letters*, **385**, 67-.
- Hesterkamp, T., Deuerling, E. & Bukau, B. (1997). The aminoterminal 118 amino acids of *Escherichia coli* trigger factor constitute a domain that is necessary and sufficient for binding to ribosomes. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 21865-21871.
- Hesterkamp, T., Hauser, S., Lutcke, H. & Bukau, B. (1996). *Escherichia coli* trigger factor is a prolyl isomerase that associates with nascent polypeptide chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **93**, 4437-4441.
- Horovitz, A. (1996). Double-mutant cycles: a powerful tool for analyzing protein structure and function. *Folding & Design*, **1**, R121-R126.
- Horovitz, A. & Fersht, A.R. (1990). Strategy for analysing the co-operativity of intramolecular interactions in peptides and proteins. *Journal of Molecular Biology*, **214**, 613-617.
- Horovitz, A. & Fersht, A.R. (1992). Co-operative interactions during protein folding. *Journal of Molecular Biology*, **224**, 733-740.

- Horovitz, P.M. (1995). Chaperonin-assisted protein folding of the enzyme rhodanese by GroEL / GroES. In *Protein Stability and Folding - Theory and Practice*, Shirley, B.A. (ed), Vol. 40. pp. 361-368. Humana Press: Totowa, New Jersey.
- Houry, W.A., Frishman, D., Eckerskorn, C., Lottspreich, F. & Hartl, F.U. (1999). Identification of *in vivo* substrates of the chaperonin GroEL. *Nature*, **402**, 147-154.
- Hübner, D., Drakenberg, T., Forsen, S. & Fischer, G. (1991). Peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase activity as studied by dynamic proton NMR spectroscopy. *FEBS Letters*, **284**, 79-81.
- Humphries, M.J., Symonds, E.J.H. & Mould, A.P. (2003). Mapping functional residues onto integrin crystal structures. *Current Opinion in Structural Biology*, **13**, 236-243.
- Jackson, S.E. (1998). How do small single proteins fold ? *Folding & Design*, **3**, R81-R91.
- Jackson, S.E., elMasry, N. & Fersht, A.R. (1993). Structure of the hydrophobic core in the transition state for folding of chymotrypsin inhibitor 2: a critical test of the protein engineering method of analysis. *Biochemistry*, **32**, 11270-11278.
- Jackson, S.E. & Fersht, A.R. (1991). Folding of chymotrypsin inhibitor-2. 1. Evidence for a two-state transition. *Biochemistry*, **30**, 10428-10435.
- Jaenicke, R. (1996). Protein folding and association: *in vitro* studies for self-organization and targeting in the cell. In *Current Topics in Cellular Regulation*, Stadtman, E.R. & Boon Chock, P. (eds), Vol. 34. Academic Press, Inc.: New York.
- Jaenicke, R. & Lilie, H. (2000). Folding and association of oligomeric and multimeric proteins. *Advances in Protein Chemistry*, **53**, 329-401.
- Jaenicke, R. & Seckler, R. (1999). 19. Spontaneous *versus* assisted protein folding. In *Molecular Chaperones and Folding Catalysts. Regulation, Cellular Function and Mechanisms*, Bukau, B. (ed) pp. 407-436. Harwood Academic Publishers: Australia, Canada, China, France, Germany, India, Japan, Luxembourg, Malaysia, The Netherlands, Russia, Singapore, Switzerland.
- Janowski, B., Wöllner, S., Schutkowski, M. & Fischer, G. (1997). A protease-free assay for peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases using standard peptide substrates. *Analytical Biochemistry*, **252**, 299-307.

- Jenkins, C.L. & Raines, R.T. (2002). Insights on the conformational stability of collagen. *Natural Product Reports*, **19**, 49-59.
- Jorgensen, W.L. & Gao, J. (1988). Cis-trans energy difference for the peptide bond in the gas phase and aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society*, **110**, 4212-4216.
- Juneja, J., Bhavesh, N.S., Udgaonkar, J.B. & Hosur, R.V. (2002). NMR identification and characterization of flexible regions in the 160 kDa molten globule-like aggregate of barstar at low pH. *Biochemistry*, **41**, 9885-9899.
- Kallen, J., Mikol, V., Taylor, P. & Walkinshaw, M.D. (1998). X-ray structures and analysis of 11 cyclosporin derivatives complexed with cyclophilin A. *Journal of Molecular Biology*, **283**, 435-449.
- Kallen, J. & Walkinshaw, M.D. (1992). The X-ray structure of a tetrapeptide bound to the active site of human cyclophilin A. *FEBS Letters*, **300**, 286-290.
- Kauzmann, I. (1959). Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Advances in Protein Chemistry*, **14**, 1-67.
- Kemmink, J. & Creighton, T.E. (1995). The physical properties of local interactions of tyrosine residues in peptides and unfolded proteins. *Journal of Molecular Biology*, **245**, 251-260.
- Kern, A., Eble, J.A., Golbik, R. & Kühn, K. (1993). Interaction of type IV collagen with the isolated integrins  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 2$ . *European Journal of Biochemistry*, **215**, 151-159.
- Kern, D., Kern, G., Drakenberg, T. & Fischer, G. (1995). Kinetic analysis of cyclophilin-catalyzed prolyl *cis/trans* isomerization by dynamic NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **34**, 13594-13602.
- Kern, D., Schutkowski, M. & Drakenberg, T. (1997). Rotational barriers of *cis/trans* isomerization of proline analogues and their catalysis by cyclophilin. *Journal of the American Chemical Society*, **119**, 8403-8408.
- Khorasanizadeh, S., Peters, I.D. & Roder, H. (1996). Evidence for a three-state model of protein folding from kinetic analysis of ubiquitin variants with altered core residues. *Nature Structural Biology*, **3**, 193-205.
- Kiefhaber, T. (1995). Protein folding kinetics. In *Protein Stability and Folding - Theory and Practice*, Shirley, B.A. (ed), Vol. 40. pp. 313-341. Methods in Molecular Biology. Humana Press: Totowa, New Jersey.

- Kiefhaber, T., Kohler, H.-H. & Schmid, F.X. (1992). Kinetic coupling between protein folding and prolyl isomerization. I. Theoretical models. *Journal of Molecular Biology*, **224**, 217-229.
- Kiefhaber, T. & Schmid, F.X. (1992). Kinetic coupling between protein folding and prolyl isomerization. II. Folding of ribonuclease A and ribonuclease T<sub>1</sub>. *Journal of Molecular Biology*, **224**, 231-240.
- Kielty, C.M., Hopkinson, I. & Grant, M.E. (1993). Collagen: The collagen family: structure, assembly, and organization in the extracellular matrix. In *Connective Tissue and Its Heritable Disorders. Molecular, Genetic and Medical Aspects*, Royce, P.M. & Steinmann, B. (eds) pp. 103-147. Wiley-Liss: New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Killick, T.R., Freund, S.M.V. & Fersht, A.R. (1999). Real-time NMR studies on a transient folding intermediate of barstar. *Protein Science*, **8**, 1286-1291.
- Kim, D., Kim, C. & Park, C. (1994). Engineered tyrosine residues serve as local probes to detect a kinetic intermediate in the folding of ribose-binding protein. *Journal of Molecular Biology*, **240**, 385-395.
- Kim, P.S. & Baldwin, R.L. (1982). Specific intermediates in the folding process of small proteins and the mechanism of protein folding. *Annual Reviews of Biochemistry*, **51**, 459-489.
- Kim, P.S. & Baldwin, R.L. (1990). Intermediates in the folding reaction of small proteins. *Annual Reviews of Biochemistry*, **59**, 631-660.
- Kobayashi, N., Freund, S.M.V., Chatelier, J., Zahn, R. & Fersht, A.R. (1999). NMR analysis of the binding of a rhodanese peptide to a minichaperone in solution. *Journal of Molecular Biology*, **292**, 181-190.
- Kofron, J.L., Kuzmic, P., Kishore, V., Colon-Bonilla, E. & Rich, D.H. (1991). Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl cis-trans isomerases by an improved spectrophotometric assay. *Biochemistry*, **30**, 6127-6134.
- Kramers, H.A. (1940). Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. *Physica*, **7**, 284-304.
- Kraulis, P.J. (1991). MOLSCRIPT: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, **24**, 946-950.

- Krebs, H., Schmid, F.X. & Jaenicke, R. (1983). Folding of homologous proteins. The refolding of different ribonucleases is independent of sequence variations, proline content and glycosylation. *Journal of Molecular Biology*, **169**, 619-635.
- Kuwajima, K. (1995). Circular dichroism. In *Protein Stability and Folding - Theory and Practice*, Shirley, B.A. (ed), Vol. 40. pp. 115-135. Methods in Molecular Biology. Humana Press: Totowa, New Jersey.
- Laidler, K.J. (1987). *Chemical Kinetics*. HarperCollinsPublishers: New York.
- Lang, K., Schmid, F.X. & Fischer, G. (1987). Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature*, **329**, 268-270.
- Laskey, R.A., Honda, B.M., Mills, A.D. & Finch, J.T. (1978). Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature*, **275**, 416-420.
- Levinthal, C. (1968). Are there pathways for protein folding ? *Journal Chimique et Physique*, **65**, 44-45.
- Liang, G.B., Rito, C. & Gellman, S.H. (1992). Variations in the turn-forming characteristics of N-acyl-proline units. *Biopolymers*, **32**, 293-301.
- Lin, L.N. & Brandts, J.F. (1979). Evidence suggesting that some proteolytic enzymes may cleave only the *trans* form of the peptide bond. *Biochemistry*, **18**, 43-47.
- Lin, L.N. & Brandts, J.F. (1985). Isomer-specific proteolysis of model substrates: influence that the location of the proline residue exerts on *cis/trans* specificity. *Biochemistry*, **24**, 6533-6538.
- Logan, T.M., Thierault, Y. & Fesik, S.W. (1994). Structural characterization of the FK 506 binding protein unfolded in urea and guanidine hydrochloride. *Journal of Molecular Biology*, **236**, 637-648.
- Lubienski, M.J., Bycroft, M. & Freund, S.M.V. (1994). Three-dimensional solution structure and <sup>13</sup>C assignments of barstar using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, **33**, 8866-8877.
- Main, E.R., Fulton, K.F. & Jackson, S.E. (1999). Folding pathway of FKBP12 and characterisation of the transition state. *Journal of Molecular Biology*, **291**, 429-444.
- Makhatadze, G.I. & Pace, C.N. (1990). Heat capacity of proteins. I. Partial molar heat capacity of individual amino acid residues in aqueous solution: hydration effects. *Journal of Molecular Biology*, **213**, 385-391.

- Makhatadze, G.I. & Privalov, P. (1995). Energetics of protein structure. *Advances in Protein Chemistry*, **47**, 307-425.
- Makino, Y., Taguchi, H. & Yoshida, M. (1993). Truncated GroEL monomer has the ability to promote folding of rhodanese without GroES and ATP. *FEBS Letters*, **336**, 363-367.
- Martinez, J.C., Filimonov, V.V., Mateo, P.L., Schreiber, G. & Fersht, A.R. (1995). A calorimetric study on thermal stability of barstar and its interaction with barnase. *Biochemistry*, **34**, 5224-5233.
- Martinez, J.C. & Serrano, L. (1999). The folding transition state between SH3 domains is conformationally restricted and evolutionarily conserved. *Nature Structural Biology*, **6**, 1010-1016.
- Matouschek, A. & Fersht, A.R. (1991). Protein engineering in analysis of protein folding and stability. *Methods in Enzymology*, **202**, 82-112.
- Matouschek, A. & Fersht, A.R. (1993). Application of physical organic chemistry to engineered mutants of proteins - Hammond postulate behavior in the transition state of protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **90**, 7814-7818.
- Matouschek, A., Kellis, J.T., Serrano, L., Bycroft, M. & Fersht, A.R. (1990). Transient folding intermediates characterized by protein engineering. *Nature*, **346**, 440-445.
- Matouschek, A., Otzen, D.E., Itzhaki, L.S., Jackson, S.E. & Fersht, A.R. (1995). Movement of the position of the transition state in protein folding. *Biochemistry*, **34**, 13656-13662.
- Mayor, U., Guydosh, N.R., Johnson, C.M., Grossmann, J.G., Sato, S., Jas, G.S., Freund, S.M.V., Alonso, D.O.V., Daggett, V. & Fersht, A.R. (2003). The complete folding pathway of a protein from nanoseconds to microseconds. *Nature*, **421**, 863-867.
- Mayor, U., Johnson, C.M., Daggett, V. & Fersht, A.R. (2000). Protein folding and unfolding in microseconds to nanoseconds by experiment and simulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **97**, 13518-13522.
- Mayr, L.M., Odefey, C., Schutkowski, M. & Schmid, F.X. (1996). Kinetic analysis of the unfolding and refolding of ribonuclease T<sub>1</sub> by stopped-flow double-mixing technique. *Biochemistry*, **35**, 5550-5561.

- Mendoza, J.A., Butler, M.C. & Horovitz, P.M. (1992). Characterisation of a stable, reactivable complex between chaperonin-60 and mitochondrial rhodanese. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 24648-24654.
- Meyer, S., Jabs, A., Schutkowski, M. & Fischer, G. (1994). Separation of *cis/trans* isomers of a prolyl peptide bond by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, **15**, 1151-1157.
- Minks, C., Huber, R., Moroder, L. & Budisa, N. (1999). Atomic mutations at the singel tryptophan residue of human recombinant annexin V: effects on structure, stability and activity. *Biochemistry*, **38**, 10649-10659.
- Modler, A.J. (2003). Studien zur Kinetik der Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen. In *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I*. Humboldt-Universität Berlin: Berlin.
- Mooney, S.D., Kollamn, P.A. & Klein, T.E. (2002). Conformational preferences of substituted prolines in the collagen triple helix. *Biopolymers*, **64**, 63-71.
- Mossakowska, D.E., Nyberg, K. & Fersht, A.R. (1989). Kinetic characterization of the recombinant ribonuclease from *Bacillus amyloliquefaciens* (barnase) and investigation of key residues in catalysis by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, **28**, 3843-3850.
- Motojima, F., Chaudhry, C., Fenton, W.A., Farr, G.W. & Horwich, A.L. (2004). Substrate polypeptide presents a load on the apical domains of the chaperonin GroEL. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **101**, 15005-15012.
- Myers, J.K. & Oas, T.G. (2002). Mechanism of fast protein folding. *Annual Reviews of Biochemistry*, **71**, 783-815.
- Nardi, F., Worth, G.A. & Wade, R.C. (1997). Local interactions of aromatic residues in short peptides in aqueous solution: a combined database and energetic analysis. *Folding & Design*, **2**, S62-S68.
- Neri, D., Billeter, M., Wider, G. & Wüthrich, K. (1992). NMR determination of residual structures in an urea denatured protein, the 434 repressor. *Science*, **257**, 1559-1563.
- Nieba-Axmann, S.E., Ottiger, M., Wüthrich, K. & Plückthun, A. (1997). Multiple cycles of global unfolding of GroEL-bound cyclophilin A evidenced by NMR. *Journal of Molecular Biology*, **271**, 803-818.

- Nölting, B. (1999). *Protein Folding Kinetics*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York: Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hong Kong, London, Milan, Paris, Singapore, Tokyo.
- Nölting, B., Golbik, R. & Fersht, A.R. (1995). Submillisecond events in protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **92**, 10668-10672.
- Nölting, B., Golbik, R., Neira, J.L., Soler-Gonzalez, A.S., Schreiber, G. & Fersht, A.R. (1997a). The folding pathway of a protein at high resolution from microseconds to seconds. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **94**, 826-830.
- Nölting, B., Golbik, R., Soler-Gonzalez, A.S. & Fersht, A.R. (1997b). Circular dichroism of denatured barstar suggests residual structure. *Biochemistry*, **36**, 9899-9905.
- O'Hagan, D., Bilton, C., Howard, J.A.K., Knight, L. & Tozer, D.J. (2000). The preferred conformation of N-b-fluoroethylamides. Observation of the fluorine amide *gauche* effect. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 605-607.
- Ohgushi, M. & Wada, A. (1983). Molten globule state: a compact form of a protein with mobile side-chains. *FEBS Letters*, **164**, 20-24.
- Otzen, D.E., Itzhaki, L.S., elMasry, N., Jackson, S.E. & Fersht, A.R. (1994). Structure of the transition state for the folding / unfolding of the barley chymotrypsin inhibitor 2 and its simplifications for mechanisms of protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **91**, 10422-10425.
- Otzen, D.E., Kristensen, O., Proctor, M. & Fersht, A.R. (1999). Structural change in the transition state of protein folding: alternative interpretations of curved chevron plots. *Biochemistry*, **38**, 6499-6511.
- Pace, C.N. (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. In *Enzyme Structure*, Hirs, C.H.W. & Timasheff, S.N. (eds), Vol. 131. pp. 266-280. Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich, Publishers: Orlando, San Diego, New York, Austin, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto.
- Panasik, N., Eberhardt, E.S., Edson, A.S., Powell, D.R. & Raines, R.T. (1994). Inductive effects on the structure of proline residues. *International Journal of Peptide and Protein Research*, **44**, 262-269.

- Pauling, L. (1960). *The Nature of the Chemical Bond*. Cornell University Press: Ithaca, New York.
- Pelham, H.R.B. (1986). Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell*, **46**, 959-961.
- Persikov, A.V., Ramshaw, J.A.M., Kirkpatrick, A. & Brodsky, B. (2003). Triple-helix propensity of hydroxyproline and fluoroproline: comparison of host-guest and repeating tripeptide collagen models. *Journal of the American Chemical Society*, **125**, 11500-11501.
- Pfeil, W. (1998). *Protein Stability and Folding. A Collection of Thermodynamic Data*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York: Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hong Kong, London, Milan, Paris, Santa Clara, Singapore, Tokyo.
- Pfeil, W. (2001). *Protein Stability and Folding. Supplement 1. A Collection of Thermodynamic Data*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York: Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hong Kong, London, Milan, Paris, Santa Clara, Singapore, Tokyo.
- Piela, L., Nemethy, G. & Scheraga, H.A. (1987). Conformational properties of 2,4-methanoproline (2-carboxy-2,4-methanopyrrolidine) in peptides: theoretical conformational energy analysis of restriction of the polypeptide chain conformation. *Journal of the American Chemical Society*, **109**, 4477-4485.
- Plaxco, K.W., Simons, K.T. & Baker, D. (1998). Contact order, transition state placement and the refolding rates of single domain proteins. *Journal of Molecular Biology*, **277**, 985-994.
- Privalov, P. (1992). Physical basis of the stability of the folded conformations of proteins. In *Protein Folding*, Creighton, T.E. (ed) pp. 83-126. W.H. Freeman and Company: New York.
- Privalov, P. & Makhatadze, G.I. (1990). Heat capacity of proteins. II. Partial molar heat capacity of the unfolded polypeptide chain of proteins: protein unfolding effects. *Journal of Molecular Biology*, **213**, 385-391.
- Privalov, P. & Potekhin, S.A. (1986). Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. In *Enzyme Structure*, Hirs, C.H.W. & Timasheff, S.N. (eds), Vol. 131. pp. 4-51. Methods in Enzymology. Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich, Publishers: Orlando, San Diego, New York, Austin, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto.

- Ptitsyn, O.B. (1995). Molten globule and protein folding. *Advances in Protein Chemistry*, **47**, 83-229.
- Ptitsyn, O.B., Pain, R., Semisotnov, G., Zerovnik, E. & Razgulyaev, O.I. (1990). Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding. *FEBS Letters*, **26**, 21-24.
- Ptitsyn, O.B. & Rashin, A.A. (1973). Stagewise mechanism of protein folding. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, **213**, 473-475.
- Radford, S.E., Dobson, C.M. & Evans, P.A. (1992). The folding of hen lysozyme involves partially structured intermediates and multiple pathways. *Nature*, **358**, 302-307.
- Raines, R.T. (1998). Ribonuclease A. *Chemical Reviews*, **98**, 1045-1065.
- Ramachandran, G.N. & Mitra, A.K. (1976). An explanation for the rare occurrence of *cis* peptide units in proteins and polypeptides. *Journal of Molecular Biology*, **107**, 85-92.
- Rami, B.R. & Udgaonkar, J.B. (2001). pH-jump-induced folding and unfolding studies of barstar: evidence for multiple folding and unfolding pathways. *Biochemistry*, **40**, 15267-15279.
- Ranson, N.A. & Clarke, A.R. (1999). 22. The ATPase cycle of the GroE molecular chaperones. In *Molecular Chaperones and Folding Catalysts. Regulation, Cellular Function and Mechanisms*, Bukau, B. (ed) pp. 491-522. Harwood Academic Publishers: Australia, Canada, China, France, Germany, India, Japan, Luxembourg, Malaysia, The Netherlands, Russia, Singapore, Switzerland.
- Ratnaparkhi, G.S., Ramachandran, S., Udgaonkar, J.B. & Varadarajan, R. (1998). Discrepancies between the NMR and X-ray structures of uncomplexed barstar: analysis suggests that packing densities of protein structures determined by NMR are unreliable. *Biochemistry*, **37**, 6958-6966.
- Reimer, U. (1998). NMR-Untersuchungen zur Struktur und Dynamik des Peptidrückgrates in der Nachbarschaft von Prolinresten. In *Max-Planck-Forschungsgruppe "Enzymologie der Proteinfaltung"*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg: Halle/Saale.
- Reimer, U. & Fischer, G. (2002). Local structural changes caused by peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerization in the native state of proteins. *Biophysical Chemistry*, **96**, 203-212.

- Reimer, U., Scherer, G., Drewello, M., Kruber, S., Schutkowski, M. & Fischer, G. (1998). Side-chain effects on peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerisation. *Journal of Molecular Biology*, **279**, 449-460.
- Renner, C., Alefelder, S., Bae, J.H., Budisa, N., Huber, R. & Moroder, L. (2001). Fluorproline als Werkzeuge für gezieltes Proteindesign. *Angewandte Chemie*, **113**, 949-951.
- Rich, A. & Crick, F.H.C. (1955). The structure of collagen. *Nature*, **176**, 915-916.
- Rich, A. & Crick, F.H.C. (1961). The molecular structure of collagen. *Journal of Molecular Biology*, **3**, 483-506.
- Riddle, D.S., Grantcharova, V.P., Santiago, J.V., Alm, E., Ruczinski, I. & Baker, D. (1999). Experiment and theory highlight role of native state topology in SH3 folding. *Nature Structural Biology*, **6**, 1016-1024.
- Roder, H., Elöve, G.A. & Englander, S.W. (1988). Structural characterization of folding intermediates in cytochrome c by H-exchange labelling and proton NMR. *Nature*, **335**, 700-704.
- Roder, H., Elöve, G.A. & Ramachandra Shastry, M.C. (2000). Early stages of protein folding. In *Mechanisms of Protein Folding*, Pain, R.H. (ed), Vol. 32. pp. 65-104. Frontiers in Molecular Biology. Oxford University Press: Oxford.
- Rumbley, J., Hoang, L., Mayne, L. & Englander, S.W. (2001). An amino acid code for protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **98**, 105-112.
- Rye, H.S. & Horwich, A.L. (1997). Distinct actions of *cis* and *trans* ATP within the double ring of the chaperonin GroEL. *Nature*, **388**, 792-798.
- Sacca, B., Renner, C. & Moroder, L. (2002a). The chain register in heterotrimeric collagen peptides affects triple helix stability and folding kinetics. *Journal of Molecular Biology*, **324**, 309-318.
- Sacca, B., Sinner, E.-K., Kaiser, J., Lübken, J., Eble, J.A. & Moroder, L. (2002b). Binding and docking of synthetic heterotrimeric collagen Type IV peptides with  $\alpha 1\beta 1$  integrin. *ChemBioChem*, **9**, 904-907.
- Santoro, M.M. & Bolen, D.W. (1988). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl  $\alpha$ -chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry*, **27**, 8063-8068.
- Schellman, J.A. (1987a). Selective binding and solvent denaturation. *Biopolymers*, **26**, 549-559.

- Schellman, J.A. (1987b). The thermodynamic stability of proteins. *Annual Reviews of Biophysics and Biophysical Chemistry*, **16**, 115-137.
- Schellman, J.A. (1994). The thermodynamics of solvent exchange. *Biopolymers*, **34**, 1015-1026.
- Schellman, J.A. (1997). Temperature, stability, and the hydrophobic interaction. *Biophysical Journal*, **73**, 2960-2964.
- Schellman, J.A. (2002). Fifty years of solvent denaturation. *Biophysical Chemistry*, **96**, 91-101.
- Schellman, J.A. (2003). Protein stability in mixed solvents: a balance of contact interaction and excluded volume. *Biophysical Journal*, **85**, 108-125.
- Schellman, J.A., Lindorfer, M., Hawkes, R. & Grutter, M. (1981). Mutations and protein stability. *Biopolymers*, **20**, 1989-1999.
- Scherer, G., Kramer, M.L., Schutkowski, M., Reimer, U. & Fischer, G. (1998). Barriers to rotation of secondary amide peptide bonds. *Journal of the American Chemical Society*, **120**, 5568-5574.
- Schiene, C., Reimer, U., Schutkowski, M. & Fischer, G. (1998). Mapping the stereospecificity of peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases. *FEBS Letters*, **432**, 202-206.
- Schiene-Fischer, C. & Fischer, G. (2001). Direct measurement indicates a slow *cis/trans* isomerization at the secondary amide bond of glycylglycine. *Journal of the American Chemical Society*, **123**, 6227-6231.
- Schmid, F.X. (1986). Fast-folding and slow-folding forms of unfolded proteins. *Methods in Enzymology*, **131**, 70-82.
- Schmid, F.X. (1992). Kinetics of unfolding and refolding of single-domain proteins. In *Protein Folding*, Creighton, T.E. (ed) pp. 197-241. W.H. Freeman and Company: New York.
- Schmid, F.X. (1993). Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions. *Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular Structure*, **22**, 123-143.
- Schmid, F.X. & Baldwin, R.L. (1978). Acid catalysis of the formation of the slow folding species of RNase A: evidence that the reaction is proline isomerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **75**, 4764-4768.

- Schmid, F.X., Mayr, L.M., Mücke, M. & Schönbrunner, E.R. (1993). Prolyl isomerases: role in protein folding. *Advances in Protein Chemistry*, **44**, 25-66.
- Schmidt, M., Rutkat, K., Rachel, R., Pfeifer, G., Jaenicke, R., Viitanen, P., Lorimer, G. & Buchner, J. (1994). Symmetric complexes of GroE chaperonins a part of the functional cycle. *Science*, **265**, 656-659.
- Scholtz, J.M. & Robertson, A.D. (1995). Hydrogen exchange techniques. In *Protein Stability and Folding - Theory and Practice*, Shirley, B.A. (ed), Vol. 40. pp. 291-311. Humana Press: Totowa, New Jersey.
- Scholz, C., Rahfeld, J.-U., Fischer, G. & Schmid, F.X. (1997a). Catalysis of protein folding by parvulin. *Journal of Molecular Biology*, **273**, 752-762.
- Scholz, C., Stoller, G., Zarndt, T., Fischer, G. & Schmid, F.X. (1997b). Cooperation of enzymatic and chaperone functions of trigger factor in the catalysis of protein folding. *EMBO Journal*, **16**, 54-58.
- Schöppe, A., Hinz, H.-J., Agashe, V.R., Ramachandran, S. & Udgaonkar, J.B. (1997). DSC studies of the conformational stability of barnase wild-type. *Protein Science*, **6**, 2196-2202.
- Schreiber, G. & Fersht, A.R. (1993a). Interaction of barnase with its polypeptide inhibitor barstar studied by protein engineering. *Biochemistry*, **32**, 5145-5150.
- Schreiber, G. & Fersht, A.R. (1993b). The refolding of *cis*- and *trans*-peptidylprolyl isomers of barstar. *Biochemistry*, **32**, 11195-11203.
- Schreiber, G. & Fersht, A.R. (1995). Energetics of protein-protein interactions: analysis of the barnase-barstar interface by single mutations and double mutant cycles. *Journal of Molecular Biology*, **248**, 478-486.
- Schreiber, G. & Fersht, A.R. (1996). Rapid, electrostatically assisted association of proteins. *Nature Structural Biology*, **3**, 427-431.
- Schutkowski, M., Mrestani-Klaus, C. & Neubert, K. (1995). Synthesis of dipeptide 4-nitroanilides containing non-proteinogenic amino acids. *International Journal of Peptide and Protein Research*, **45**, 257-265.
- Schutkowski, M., Neubert, K. & Fischer, G. (1994). Influence on proline-specific enzymes of a substrate containing the thioxoaminoacyl-prolyl peptide bond. *European Journal of Biochemistry*, **221**, 455-461.
- Schutkowski, M., Wöllner, S. & Fischer, G. (1996). Inhibition of peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase activity by substrate analog structures: Thioxo tetrapeptide-4-nitroanilides. *Biochemistry*, **34**, 13016-13026.

- Shastri, M.C.R., Agashe, V.R. & Udgaonkar, J.B. (1994). Quantitative analysis of the kinetics of denaturation and renaturation of barstar in the folding transition zone. *Protein Science*, **3**, 1409-1417.
- Shastri, M.C.R. & Udgaonkar, J.B. (1995). The folding mechanism of barstar: evidence for multiple pathways and multiple intermediates. *Journal of Molecular Biology*, **247**, 1013-1027.
- Shortle, D. & Meeker, A.K. (1989). Residual structure in large fragments of staphylococcal nuclease: effect of amino acid substitutions. *Biochemistry*, **28**, 963-944.
- Smoot, A.L., Panda, M., Brazil, B.T., Buckle, A.M., Fersht, A.R. & Horovitz, P.M. (2001). The binding of bis-ANS to the isolated GroEL apical domain fragment induces the formation of a folding intermediate with increased hydrophobic surface not observed in tetradecameric GroEL. *Biochemistry*, **40**, 4484-4492.
- Sridevi, K., Lakshmikanth, G.S., Krishnamoorthy, G. & Udgaonkar, J.B. (2004). Increasing stability reduces conformational heterogeneity in a protein folding intermediate ensemble. *Journal of Molecular Biology*, **337**, 699-711.
- Sridevi, K. & Udgaonkar, J.B. (2002). Unfolding rates of barstar determined in native and low denaturant conditions indicate the presence of intermediates. *Biochemistry*, **41**, 1568-1578.
- Stein, R.L. (1993). Mechanism of enzymatic and nonenzymatic prolyl *cis-trans* isomerization. *Advances in Protein Chemistry*, **44**, 1-24.
- Stetefeld, J., Frank, S., Jenny, M., Schulthess, T., Kammerer, R.A., Boudko, S., Landwehr, R., Okuyama, K. & Engel, J. (2003). Collagen stabilization at atomic level: crystal structure of designed (GlyProPro)<sub>10</sub> foldon. *Structure*, **11**, 339-346.
- Stewart, W.E. & Siddall III, T.H. (1970). Nuclear magnetic resonance studies of amides. *Chemical Reviews*, **70**, 517-551.
- Stoller, G., Rücknagel, K.-P., Nierhaus, K., Schmid, F.X., Fischer, G. & Rahfeld, J.-U. (1995). Identification of the peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase bound to the *Escherichia coli* ribosome as the trigger factor. *EMBO Journal*, **14**, 4939-4948.
- Taguchi, H., Makino, Y. & Yoshida, M. (1994). Monomeric chaperonin-60 and its 50-kDa fragment possess the ability to interact with non-native proteins, to suppress aggregation, and to promote protein folding. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 8529-8534.

- Talluri, S., Montelione, G.T., van Duyne, G., Piela, L., Clardy, J. & Scheraga, H.A. (1987). Conformational properties of 2,4-methanoproline (2-carboxy-2,4-methanopyrrolidine) in peptides: evidence for 2,4-methanopyrrolidine asymmetry based on solid-state x-ray crystallography, proton NMR in aqueous solution, and CNDO/2 conformational energy calculation. *Journal of the American Chemical Society*, **109**, 4473-4477.
- Tanaka, N. & Fersht, A.R. (1999). Identification of substrate binding site of GroEL minichaperone in solution. *Journal of Molecular Biology*, **292**, 173-180.
- Tanford, C. (1968a). Protein denaturation. Part A. Characterization of the denatured state. *Advances in Protein Chemistry*, **23**, 121-217.
- Tanford, C. (1968b). Protein denaturation. Part B. The transition from native to denatured state. *Advances in Protein Chemistry*, **1968**, 218-282.
- Tanford, C. (1970). Protein denaturation. Part C. Theoretical models for the mechanism of denaturation. *Advances in Protein Chemistry*, **24**, 1-95.
- Than, M.E., Henrich, S., Huber, R., Ries, A., Mann, K., Kühn, K., Timpl, R., Bourenkov, G.P., Bartunik, H.D. & Bode, W. (2002). The 1.9-Å crystal structure of the noncollagenous (NC1) domain of human placenta collagen IV shows stabilization via a novel type of covalent Met-Lys cross-link. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **99**, 6607-6612.
- Thornton, J.M. (1992). Protein structures: the end point of the folding pathway. In *Protein Folding*, Creighton, T.E. (ed) pp. 59-81. W.H. Freeman and Company: New York.
- Thornton, J.M., Orengo, C.A., Todd, A.E. & Pearl, F.M. (1999). Protein folds, functions and evolution. *Journal of Molecular Biology*, **293**, 333-342.
- Timasheff, S.N. (2002). Thermodynamic binding and site occupancy in the light of the Schellman exchange concept. *Biophysical Chemistry*, **101-102**, 99-111.
- Todd, M.J., Viitanen, P. & Lorimer, G. (1994). Dynamics of the chaperonin ATPase cycle: implications for facilitated protein folding. *Science*, **265**, 659-666.
- Traub, W. & Piez, K.A. (1971). The chemistry and structure of collagen. *Advances in Protein Chemistry*, **25**, 243-352.
- Udgaonkar, J.B. & Baldwin, R.L. (1988). NMR evidence for an early framework intermediate on the folding pathway of ribonuclease A. *Nature*, **335**, 694-699.

- Vandenberg, P., Kern, A., Luckenbill-Edds, L., Mann, K. & Kühn, K. (1991). Characterization of a type IV collagen major cell binding site with affinity to the  $\alpha 1\beta 1$  and the  $\alpha 2\beta 1$  integrins. *Journal of Cell Biology*, **113**, 1475-1483.
- Villegas, V., Martinez, J.C., Avides, F.X. & Serrano, L. (1998). Structure of the transition state in the folding process of human procarboxypeptidase A<sub>2</sub> activation domain. *Journal of Molecular Biology*, **283**, 1027-1036.
- Wang, Q., Buckle, A.M., Foster, N., Johnson, C.M. & Fersht, A.R. (1999). Design of highly stable functional GroEL minichaperones. *Protein Science*, **8**, 2186-2193.
- Wedemeyer, W.J., Welker, E. & Scheraga, H.A. (2002). Proline cis-trans isomerization and protein folding. *Biochemistry*, **41**, 14637-14644.
- Wetlaufer, D.B. (1973). Nucleation, rapid folding and globular interchain regions in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **70**, 697-701.
- Wigner, E.P. (1938). The transition state method. *Transactions of the Faraday Society*, **34**, 29-41.
- Wintrode, P.L., Griko, Y.V. & Privalov, P. (1995). Structural energetics of barstar studied by differential scanning calorimetry. *Protein Science*, **4**, 1528-1534.
- Wong, K.-B. & Daggett, V. (1998). Barstar has a highly dynamic hydrophobic core: evidence from molecular dynamics simulations and nuclear magnetic resonance relaxation data. *Biochemistry*, **37**, 11182-11192.
- Wong, K.-B., Freund, S.M.V. & Fersht, A.R. (1996). Cold denaturation of barstar: <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C NMR assignment and characterisation of residual structure. *Journal of Molecular Biology*, **259**, 805-818.
- Wu, H. (1931). Studies of denaturation of proteins. A theory of denaturation. *Chinese Journal of Physiology*, **5**, 321-341.
- Wu, H. (1995). Studies on denaturation of proteins. A theory of denaturation. *Advances in Protein Chemistry*, **46**, 6-26.
- Wu, W.-J. & Raleigh, D.P. (1998). Local control of peptide conformation: stabilization of cis proline peptide bonds by aromatic proline interactions. *Biopolymers*, **45**, 381-394.
- Wüthrich, K. & Grathwohl, C. (1974). A novel approach for studies of the molecular conformations in flexible polypeptides. *FEBS Letters*, **43**, 337-340.

- Yaffe, M.B., Schutkowski, M., Shen, M.H., Zhou, X.Z., Stukenberg, P.T., Rahfeld, J.-U., Xu, J., Kuang, J., Kirschner, M.W., Fischer, G., Cantley, L.C. & Lu, K.P. (1997). Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization - a potential mitotic regulatory mechanism. *Science*, **278**, 1957-1960.
- Yao, J., Dyson, H.J. & Wright, P.E. (1994a). Three-dimensional structure of a type VI turn in a linear peptide in water solution: evidence for stacking of aromatic rings as a major stabilizing factor. *Journal of Molecular Biology*, **243**, 754-766.
- Yao, J., Feher, V.A., Espejo, B.F., Raymond, M.T., Wright, P.E. & Dyson, H.J. (1994b). Stabilisation of a type VI turn in a family of linear peptides in water solution. *Journal of Molecular Biology*, **243**, 736-753.
- Yon, J.M. (2002). Protein folding in the post-genomic era. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **6**, 307-327.
- Yu, C. (2003). Matrix-bound peptides modeling protein-protein interactions. In *Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg: Halle/Saale.
- Zahn, R., Buckle, A.M., Perrett, S., Johnson, C.M., Corrales, F.J., Golbik, R. & Fersht, A.R. (1996). Chaperone activity and structure of monomeric polypeptide binding domains of GroEL. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **93**, 15024-15029.
- Zahn, R., Spitzfaden, C., Ottiger, M., Wüthrich, K. & Plückthun, A. (1994). Destabilization of the complete protein secondary structure on binding to the chaperone GroEL. *Nature*, **368**, 261-265.
- Zaidi, F.N., Nath, U. & Udgaonkar, J.B. (1997). Multiple intermediates and transition states during protein unfolding. *Nature Structural Biology*, **4**, 1016-1024.
- Zarndt, T., Tradler, T., Stoller, G., Scholz, C., Schmid, F.X. & Fischer, G. (1997). Modular structure of the trigger factor required for high activity in protein folding. *Journal of Molecular Biology*, **271**, 827-837.
- Zhao, Y. & Ke, H. (1996). Crystal structure implies that cyclophilin predominantly catalyzes the *trans* to *cis* isomerization. *Biochemistry*, **35**, 7356-7361.
- Zhou, X.Z., Korps, O., Werner, A., Lu, P.J., Shen, M.H., Stoller, G., Küllertz, G., Stark, M., Fischer, G. & Lu, K.P. (2000). Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Molecular Cell*, **6**, 873-883.

## 11. TABELLEN

Tabelle 1 Modellvorstellungen der Faltung von Proteinen

Tabelle 2 Parameter der *cis* / *trans* –Isomerisierung von Prolin und (4)-Fluorprolin enthaltenden Verbindungen

Tabelle 3 Thermodynamische und kinetische Parameter von Barstar und Varianten

**Die in dieser Tabelle verwendeten Bezeichnungen der auftretenden Spezies, Symbole und thermodynamischen Parameter sind in Kapitel 2, Kapitel 4.3 und Kapitel 6.2 erklärt bzw. definiert.**

Tabelle 4 Thermodynamische Eigenschaften von Barstar C40A/C82A/P27A und L-(4)-FPro48 Varianten

**Die in dieser Tabelle verwendeten Symbole und thermodynamischen Parameter sind in Kapitel 2 erklärt bzw. definiert.**

Tabelle 5 Kinetik der *trans* → *cis*-Isomerisierung von Pro48 in Barstar C40A/C82A/P27A und L-(4)-FPro48 Varianten

Tabelle 6 Katalytische Effizienzen von Peptidyl-prolyl *cis/trans* -Isomerasen auf die *cis* → *trans*-Isomerisierung von Prolin und (4)-Fluorprolin enthaltenden Peptiden

Tabelle 1 Modellvorstellungen der Faltung von Proteinen

Name	Charakteristik	Protein	Referenzen
Mechanismus der klassischen Nukleation ( <i>classical nucleation</i> )	<p>einige benachbarte Reste der Sequenz bilden native Sekundärstrukturen und dienen als Nukleus, aus dem die native Struktur stufenweise fortschreitet</p> <p>Tertiärstruktur bildet sich als Konsequenz der Formierung der Sekundärstruktur</p> <p>stark lokalisierter Nukleus (zwei oder drei <i>turns</i> einer Helix)</p> <p>Strukturbildung erwächst aus dem Nukleus</p> <p>Strukturformation folgt der Nukleation</p> <p>keine Existenz von Intermediaten</p>		(Fersht, 1999)
Mechanismus der Nukleation-Kondensation ( <i>nucleation-condensation</i> )	<p>weicher, lokaler Nukleus</p> <p>stabilisierende Wechselwirkungen über größere Abstände bilden einen ausgedehnten Nukleus</p> <p>Konsolidierung des Nukleus im Zuge der Strukturformation</p> <p>Konsolidierung des Nukleus und ausgedehnte Strukturformation sind gleichlaufend</p> <p>keine Existenz von Intermediaten</p>	Chymotrypsininhibitor 2 Barstar	(Fersht, 1999)
modulares Modell ( <i>modular model</i> )	Domänen als Faltungseinheiten bilden strukturell gefaltete Module, die bei Assemblierung die native Struktur erzeugen	$\gamma$ II Kristallin NAD <sup>+</sup> -bindende Domäne von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	(Wetlaufer, 1973)

Fortsetzung Tabelle 1 Modellvorstellungen der Faltung von Proteinen

Name	Charakteristik	Protein	Referenzen
Rahmenmodell <i>(framework model)</i> Diffusions-Kollisions-Modell <i>(diffusion-collision model)</i> CFIS-Modell <i>(chain-folding initiation site mechanism)</i>	Strukturbildung stufenweise über Intermediate (Substrukturen) oder <i>foldons</i> (stabile Einheit eines Proteins ohne Beteiligung anderer Module) lokale Elemente der nativen lokalen Sekundärstruktur formieren sich unabhängig von der Tertiärstruktur ( <i>framework model</i> ) diese Elemente durchdringen sich bis sie zusammentreffen, erfolgreich aneinander haften und zur Tertiärstruktur verschmelzen ( <i>diffusion-collision model</i> ) Existenz von Intermediaten	monomerer $\lambda$ Repressor RNase A	(Fersht, 1999) (Wedemeyer <i>et al.</i> , 2002)
Modell des hydrophoben Kollaps <i>(hydrophobic collapse model)</i>	schnelle Kollabierung des Proteins um seine hydrophoben Seitenketten und nachfolgende Umordnung aus dem durch Intermediate besetzten eingeschränkten Konformationsraum nativ-ähnliche tertiäre Wechselwirkungen geleiten die Sekundärstruktur Existenz von Intermediaten	Barstar Barnase	(Fersht, 1999)
Puzzlemodell <i>(jigsaw model)</i>	jedes Molekül des Proteins faltet nach einem unterschiedlichen, bestimmten Weg		(Fersht, 1999) (Harrison & Durbin, 1985)

Fortsetzung Tabelle 1 Modellvorstellungen der Faltung von Proteinen

Name	Charakteristik	Protein	Referenzen
<p>Modell des Faltungstrichters (<i>folding funnel, new view</i>)</p>	<p>progressive Organisation von Ensembles von partiell gefalteten Strukturen über multiple Wege</p> <p>Beschreibung des thermodynamischen und kinetischen Verhaltens der Transformation eines Ensembles von entfalteten Molekülen zum (vorwiegend) nativen Zustand mittels Energietrajektorien (<i>energy landscapes</i>)</p> <p>Rationalisierung des Puzzlemodells, parallele und alternative Faltungswege</p> <p>Übergangszustand der Faltungsreaktion ist eine Verteilung von Strukturen</p> <p>Existenz von Intermediaten</p> <p>ersetzt klassisches Modell der hierarchischen und sequentiellen Faltung</p>		<p>(Wolynes <i>et al.</i>, 1995)</p>

Tabelle 2 Parameter der *cis* / *trans* –Isomerisierung von Prolin und (4)-Fluorprolin enthaltenden Verbindungen

Chemische Verbindung	Gehalt an <i>cis</i> - Konformer (%)	<i>K</i>	$k_{cis \rightarrow trans}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{trans \rightarrow cis}$ (s <sup>-1</sup> )
NAc-Pro-OMe <sup>a</sup>	17,3	4,8	0,0121	0,0025
NAc-(4 <i>R</i> )-F-Pro-OMe <sup>a</sup>	12,8	6,8	0,0260	0,0038
NAc-(4 <i>S</i> )-F-Pro-OMe <sup>a</sup>	28,5	2,5	0,0148	0,0059
NAc-(4)-diF-Pro-OMe <sup>a</sup>	23,0	3,4	0,0535	0,0160
Suc-Ala-Ser-Pro-Phe-pNA	15,4 <sup>b</sup>	5,5 <sup>c</sup>	0,0083 <sup>d</sup>	0,0015 <sup>e</sup>
Suc-Ala-Ser-(4 <i>R</i> )-F-Pro-Phe-pNA	11,0 <sup>b</sup>	8,1 <sup>c</sup>	0,0122 <sup>d</sup>	0,0015 <sup>e</sup>
Suc-Ala-Ser-(4 <i>S</i> )-F-Pro-Phe-pNA	22,0 <sup>b</sup>	3,6 <sup>c</sup>	0,0113 <sup>d</sup>	0,0032 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Parameter wurden aus thermodynamischen Daten berechnet, die mittels NMR gemessen wurden (Renner *et al.*, 2001).

<sup>b</sup> Geschwindigkeitskonstanten der *cis* → *trans*-Isomerisierung wurden durch ISP bestimmt. Die Peptide wurden in DMSO in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 µl der Stocklösung an Peptid zu 1.2 ml 35 mM HEPES buffer, pH 7.8 gestartet, die 0.83 mg/ml Chymotrypsin enthielt. Die Endkonzentration an Peptid war 25 µg/ml. Die Temperatur betrug 10 °C. Die relative Amplitude der *burst*-Phase zur totalen Amplitude entspricht dem Gehalt an *trans*-Konformer. Die relative Amplitude der *cis* → *trans*-Isomerisierung zur totalen Amplitude entspricht dem Gehalt an *cis*-Konformer.

<sup>c</sup> Die Gleichgewichtskonstante ist definiert als  $K = \frac{[trans]}{[cis]}$ , wobei  $[trans]$  und  $[cis]$  die Konzentrationen des *trans* - und des *cis* –Konformers im Gleichgewicht sind. Diese Konzentrationen wurden durch Auswertung der entsprechenden Amplituden der Kinetik wie oben beschrieben bestimmt.

<sup>d</sup> Die Geschwindigkeitskonstanten der *cis* → *trans*-Isomerisierung wurden durch Fitten der Progresskurven der ISP nach einer einfach exponentiellen Reaktion 1. Ordnung bestimmt.

<sup>e</sup> Die Geschwindigkeitskonstanten der *trans* → *cis*-Isomerisierung  $k_{trans \rightarrow cis}$  wurden auf der Basis der Gleichgewichtskonstanten  $K = \frac{[trans]}{[cis]} = \frac{k_{cis \rightarrow trans}}{k_{trans \rightarrow cis}}$  und der Geschwindigkeitskonstanten der *cis* → *trans*-Isomerisierung  $k_{cis \rightarrow trans}$  berechnet.

Tabelle 3 Thermodynamische und kinetische Parameter von Barstar und Varianten

Parameter	Barstar Wildtyp <sup>a</sup>	Barstar C40A/C82A <sup>b</sup>	Barstar P27A/C40A/C82A <sup>c</sup>
$\Delta G_{N \rightarrow U}^0$	4,90 kcal mol <sup>-1</sup>	4,84 kcal mol <sup>-1</sup>	3,08 kcal mol <sup>-1</sup> (15 °C) <sup>d</sup> 3,33 kcal mol <sup>-1e</sup>
$[D]_{0,5}$	1,90 M GuHCl	3,87 M Harnstoff	2,64 M Harnstoff
$m$	2,60 kcal mol <sup>-2</sup> l <sup>-1</sup>	1,25 kcal mol <sup>-2</sup> l <sup>-1</sup>	1,26 kcal mol <sup>-2</sup> l <sup>-1</sup>
$k_f^0$ (für N)	37 s <sup>-1</sup>	31 s <sup>-1</sup>	21 s <sup>-1</sup>
$k_f^0$ (für N, extrapoliert)	k. A.	794 s <sup>-1</sup>	277 s <sup>-1</sup>
$k_f^0$ (für I <sub>N</sub> )	37 s <sup>-1</sup>	32 s <sup>-1</sup>	n. b.
$k_u^0$ (für N)	0,096 s <sup>-1</sup>	0,068 s <sup>-1</sup>	0,420 s <sup>-1</sup>
$k_u^0$ (für I <sub>N</sub> )	0,24 s <sup>-1</sup>	0,87 s <sup>-1</sup>	n. b.
$k_{slow}^1 = k_{U_s \rightarrow U_f} + k_{U_f \rightarrow U_s}$	0,017 s <sup>-1</sup>	0,022 s <sup>-1</sup>	0,027 s <sup>-1</sup> (ber.)
$k_{slow}^2 = k_{U_s \rightarrow U_f}$	0,0053 s <sup>-1</sup> 0,0052 s <sup>-1</sup> (ber.)	0,0075 s <sup>-1</sup>	0,0080 s <sup>-1</sup>
$k_{U_f \rightarrow U_s}$	0,0118 s <sup>-1</sup> (ber.)	0,0145 s <sup>-1</sup> (ber.)	0,0186 s <sup>-1</sup> (ber.)
$K_{N \rightarrow U}^{app} = \frac{[U]}{[N]}$ U = U <sub>f</sub> + U <sub>s</sub>	2,54 · 10 <sup>-4</sup>	2,81 · 10 <sup>-4</sup>	5,00 · 10 <sup>-3</sup> (15 °C) <sup>d</sup> 3,61 · 10 <sup>-3e</sup>

Fortsetzung Tabelle 3 Thermodynamische und kinetische Parameter von Barstar und Varianten

Parameter	Barstar Wildtyp <sup>a</sup>	Barstar C40A/C82A <sup>b</sup>	Barstar P27A/C40A/C82A <sup>c</sup>
$K_{U_s/U_f} = \frac{[U_s]}{[U_f]}$	2,23	1,78	2,33
$K_{U_s/U_f} = \frac{k_{U_f \rightarrow U_s}}{k_{U_s \rightarrow U_f}}$	2,10	1,93	2,33
$K_{iso}^U = \frac{1}{K_{U_s/U_f}}$	0,42	0,52	0,43
$\Delta G_{U_s \rightarrow U_f}$	0,51 kcal mol <sup>-1</sup>	0,39 kcal mol <sup>-1</sup>	0,50 kcal mol <sup>-1</sup>
$\Delta G_{U_f \rightarrow N}$	-5,62 kcal mol <sup>-1</sup> (ber.) <sup>f</sup>	-5,54 kcal mol <sup>-1</sup> (ber.) <sup>f</sup> -5,48 kcal mol <sup>-1</sup> <sup>g</sup>	-4,04 kcal mol <sup>-1</sup> (ber.) <sup>f</sup> -3,84 kcal mol <sup>-1</sup> (ber.) <sup>h</sup>
$\Delta G_{I_N \rightarrow N}$	k. A.	-2,00 kcal mol <sup>-1</sup>	-1,40 kcal mol <sup>-1</sup> (15 °C) <sup>d</sup>
$K_{iso}^f = \frac{[N]}{[I_N]}$	k. A.	29,32	11,56 (15 °C) <sup>d</sup>
$k_{I_N \rightarrow N}$	0,016 s <sup>-1</sup>	0,010 s <sup>-1</sup>	0,003 s <sup>-1</sup> (15 °C) <sup>i</sup> 0,010 s <sup>-1</sup> <sup>e</sup>
$k_{N \rightarrow I_N}$	k. A.	0,00034 s <sup>-1</sup> (ber.) <sup>j</sup>	0,00026 s <sup>-1</sup> (15 °C) (ber.) <sup>j</sup>

Fortsetzung Tabelle 3 Thermodynamische und kinetische Parameter von Barstar und Varianten

Parameter	Barstar Wildtyp <sup>a</sup>	Barstar C40A/C82A <sup>b</sup>	Barstar P27A/C40A/C82A <sup>c</sup>
$\Delta G_{U_s \rightarrow I_N}$		-2,84 kcal mol <sup>-1</sup> K	
$\Delta G_{I \rightarrow I_N}$		-2,13 kcal mol <sup>-1</sup> K	
$\Delta \Delta G = \Delta G_{U_s \rightarrow I_N} - \Delta G_{I \rightarrow I_N}$		-0,74 kcal mol <sup>-1</sup> K	

<sup>a</sup> (Shastry *et al.*, 1994)

<sup>b</sup> (Schreiber & Fersht, 1993)

<sup>c</sup> (Golbik *et al.*, 1999; Nölting *et al.*, 1995; Nölting *et al.*, 1997)

<sup>d</sup> (Golbik *et al.*, 1999; Nölting *et al.*, 1997)

<sup>e</sup> (Golbik *et al.*, 1999; Nölting *et al.*, 1997)

<sup>f</sup> Berechnung nach der Beziehung  $K_{app} = K_{U_f/N} \cdot (1 + K_{U_s/U_f}) = \frac{1}{K_{N/U_f}} \cdot \left(1 + \frac{1}{K_{iso}^u}\right)$  und  $\Delta G_{U_f \rightarrow N} = -RT \cdot \ln K_{N/U_f}$

<sup>g</sup> experimentelle Bestimmung in kinetischen Experimenten aus der Transitionskurve der Amplitude für I<sub>N</sub> (Schreiber & Fersht, 1993)

<sup>h</sup> Berechnung aus extrapolierten Werten der Entfaltung und Faltung für N des *chevron*-Plots und der Beziehung  $\Delta G_{U_f \rightarrow N} = -RT \cdot \ln \frac{k_f^0}{k_u^0}$

<sup>i</sup> Berechnung aus der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten nach EYRING, unter der Voraussetzung  $\Delta H^\ddagger$  gleich konstant

<sup>j</sup> Berechnung aus der Gleichgewichtskonstanten  $K_{iso}^f = \frac{[N]}{[I_N]} = \frac{k_{I_N \rightarrow N}}{k_{N \rightarrow I_N}}$  und  $k_{I_N \rightarrow N}$

---

Fortsetzung Tabelle 3 Thermodynamische und kinetische Parameter von Barstar und Varianten

---

<sup>k</sup> experimentelle Bestimmung der thermodynamischen Werte in kinetischen Experimenten aus der Transitionskurve der Amplitude für N (Schreiber & Fersht, 1993);  $\Delta G_{I \rightarrow N} = -RT \cdot \ln \frac{k_f^0}{k_u^0} \neq \Delta G_{U_i \rightarrow N}$  durch Population eines Faltungsintermediates  $U_s \rightarrow I \rightarrow I_N$

n. b. nicht bestimmt

k. A. keine Angabe

ber. berechnet

Die Berechnung der thermodynamischen Parameter beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf eine Temperatur von 25 °C.

---

Tabelle 4 Thermodynamische Eigenschaften von Barstar C40A/C82A/P27A und L-(4)-FPro48 Varianten

Variante von Barstar	Chemische Denaturierung mit Harnstoff <sup>a</sup>				Thermische Denaturierung <sup>b</sup>		
	[D] <sub>0,5</sub> (mol l <sup>-1</sup> )	<i>m</i> (kcal mol <sup>-2</sup> l <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{N-D}^0$ <sup>c</sup> (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta\Delta G_{N-D}^0$ <sup>d</sup> (kcal mol <sup>-1</sup> )	<i>T</i> <sub>m</sub> (K)	$\Delta H_m$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S_m$ (kcal mol <sup>-1</sup> )
<i>pseudo</i> -Wildtyp <sup>e,1</sup>	2,69 ± 0,03	1,26	3,39 ± 0,04	0,32 ± 0,06	337,40 ± 0,03	41,40 ± 0,50	122,70 ± 1,50
<i>pseudo</i> -Wildtyp <sup>e</sup> - (4R)-FPro48 <sup>2</sup>	2,43 ± 0,04	1,26	3,07 ± 0,05	0,65 ± 0,07	334,60 ± 0,20	33,00 ± 1,80	98,50 ± 5,20
<i>pseudo</i> -Wildtyp <sup>e</sup> - (4S)-FPro48 <sup>3</sup>	2,87 ± 0,09	1,26	3,61 ± 0,10	0,10 ± 0,11	342,60 ± 0,10	35,00 ± 0,70	102,20 ± 2,00
	2,85 ± 0,09 <sup>f</sup>	1,26	3,59 ± 0,10 <sup>f</sup>	0,13 ± 0,11			
<i>pseudo</i> -Wildtyp <sup>e</sup> - (4)-diFPro48 <sup>4</sup>	2,95 ± 0,05	1,26	3,72 ± 0,05	0	337,30 ± 0,10	38,80 ± 0,80	115,00 ± 2,40

<sup>a</sup> Die Gleichgewichtsdenaturierung der Proteine mit Harnstoff wurde durch Fern-UV Circular dichroismus bei 222 nm<sup>1</sup>, bei 228 nm<sup>3,4</sup> und bei 230 nm<sup>2</sup> gemessen. Die Temperatur betrug 20 °C.

<sup>b</sup> Die thermische Denaturierung der Proteine wurde durch Fern-UV Circular dichroismus bei 222 nm gemessen.

<sup>c</sup> Die freie Enthalpie der Entfaltung ohne Denaturans wurde durch Multiplikation des durchschnittlichen Wertes für  $m \left( \frac{\partial \Delta G}{\partial [D]} \right) = 1,26 \text{ kcal mol}^{-2} \text{ l}^{-1}$  mit [D]<sub>0,5</sub> bestimmt.

<sup>d</sup> Die Differenz der freien Enthalpien der Entfaltung ohne Denaturans ist definiert als  $\Delta\Delta G_{N-D}^0 = \Delta G_{N-D}^0(\text{Variante}) - \Delta G_{N-D}^0(\text{Wildtyp})$  und bezieht sich auf *pseudo*-Wildtyp-(4)-diFPro48 in diesem Zusammenhang.

<sup>e</sup> Der *pseudo*-Wildtyp bezeichnet die Variante Barstar C40A/C82A/P27A.

<sup>f</sup> Dieser Wert wurde aus der Gleichgewichtsdenaturierung mit Harnstoff und Detektion der intrinsischen Fluoreszenz bei  $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em}} = 320 \text{ nm}$  bestimmt. Die Temperatur betrug 20 °C.

Tabelle 5 Kinetik der *trans* → *cis*-Isomerisierung von Pro48 in Barstar C40A/C82A/P27A und L-(4)-FPro48 Varianten

Variante von Barstar	$k_{\text{trans} \rightarrow \text{cis}}^{\text{a}}$ (s <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{\text{N} \rightarrow \text{N}}^{\#}$ (kcal mol <sup>-1</sup> )
<i>pseudo</i> -Wildtyp <sup>b,1</sup>	0,0084 ± 0,0003	20,25 ± 0,03
<i>pseudo</i> -Wildtyp <sup>b</sup> -(4R)-FPro48 <sup>2</sup>	0,0073 ± 0,0003	20,34 ± 0,03
<i>pseudo</i> -Wildtyp <sup>b</sup> -(4S)-FPro48 <sup>3</sup>	0,0296 ± 0,0017	19,51 ± 0,04
<i>pseudo</i> -Wildtyp <sup>b</sup> -(4)-diFPro48 <sup>4</sup>	0,0301 ± 0,0025	19,50 ± 0,06

<sup>a</sup> Die Geschwindigkeitskonstante der Isomerisierung  $k_{\text{trans} \rightarrow \text{cis}}$  of Pro48 (bzw. substituiertes Pro48) in der entsprechenden Variante von Barstar C40A/C82A/P27A wurde in Faltungsexperimenten bestimmt, wobei von in 4 M<sup>1</sup>, 5 M<sup>2,4</sup> and 6 M<sup>3</sup> Harnstoff denaturiertem Protein bei einer Temperatur von 25 °C gestartet wurde. Die Endkonzentration an Denaturans war 1.6 M<sup>1,2,3,4</sup> oder 2.5 M<sup>3</sup> Harnstoff (*pretransition*). Alle Experimente wurden 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8,0 durchgeführt.

<sup>b</sup> Der *pseudo*-Wildtyp bezeichnet die Variante Barstar C40A/C82A/P27A.

Tabelle 6 Katalytische Effizienzen von Peptidyl-prolyl *cis/trans* -Isomerasen auf die *cis* → *trans*-Isomerisierung von Prolin und (4)-Fluorprolin enthaltenden Peptiden<sup>a</sup> (Yu, 2003)

Chemische Verbindung	(mol <sup>-1</sup> l s <sup>-1</sup> )					
	Cyp18	FKBP12	Pin1	EcoPar10	EcoTF	hPar14
Suc-Ala-Ser-Pro-Phe-pNA	3550000	19000	<10000	368000	78000	<10000
Suc-Ala-Ser-(4 <i>R</i> )-F-Pro-Phe-pNA	111000	<10000	<10000	112000	<10000	<10000
Suc-Ala-Ser-(4 <i>S</i> )-F-Pro-Phe-pNA	865000	26100	<10000	6800	11300	<10000

<sup>a</sup> Die Geschwindigkeitskonstanten der *cis* → *trans*-Isomerisierung wurden mittels ISP sowohl mit, als auch ohne PPIase bestimmt. Das Peptid wurde in DMSO bei einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 µl der Stocklösung des Peptides zu 1,2 ml 35 mM HEPES-Puffer, pH 7,8, der die Protease enthielt (0,83 mg/ml Chymotrypsin oder 50 µg/ml Trypsin), gestartet. Die Endkonzentration des Peptides war 25 µg/ml. Die Temperatur betrug 10 °C. Die Progresskurven wurden nach einer einfach exponentiellen Reaktion 1. Ordnung gefittet. Die Berechnung der katalytischen Effizienz erfolgte nach (Fischer, 1996; Fischer et al., 1984).

Die Namen der verwendeten PPIasen wurden gemäß den Regeln zur Nomenklatur abgekürzt (Fischer, 1996).

## 12. SCHEMATA

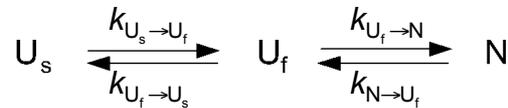
Die in den Schemata verwendeten Bezeichnungen der auftretenden Spezies, Symbole und thermodynamischen Parameter sind in Kapitel 2, Kapitel 4.3 und Kapitel 6.2 erklärt bzw. definiert. Die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Teilreaktionen sind als solche kenntlich gemacht.

Schema 1 Konformationsfaltung und Prolylisomerisierung eines Proteins nach einem Dreizustandsmodell - apparente und mikroskopische Geschwindigkeitskonstanten

Schema 2 Konformationsfaltung und Prolylisomerisierung eines Proteins unter Bildung eines nativ-ähnlichen Intermediates - apparente und mikroskopische Geschwindigkeitskonstanten

Schema 3 Erweiterung des Modells der Faltung von Barstar durch das Auftreten multipler Intermediate der Faltung und Entfaltung (vereinfachte Darstellung)

Schema 1 Konformationsfaltung und Prolylisomerisierung eines Proteins nach einem Dreizustandsmodell - apparente und mikroskopische Geschwindigkeitskonstanten (SHASTRY, HAGERMANN und BALDWIN)



$$K_{N \rightarrow U}^{\text{app}} = \frac{[U]}{[N]} \quad U = U_f + U_s$$

$\lambda_1 + \lambda_2 = k_{N \rightarrow U_f} + k_{U_f \rightarrow N} + k_{U_f \rightarrow U_s} + k_{U_s \rightarrow U_f}$   
 $\lambda_1 \cdot \lambda_2 = k_{U_s \rightarrow U_f} \cdot k_{U_f \rightarrow N} + k_{N \rightarrow U_f} \cdot (k_{U_s \rightarrow U_f} + k_{U_f \rightarrow U_s})$   
 wobei  $\lambda_1$  die beobachtete Geschwindigkeitskonstante der langsamen (Prolylisomerisierung) und  $\lambda_2$  die der schnellen Phase der Faltung sind;

$$K_{U_f/N} = \frac{[U_f]}{[N]} = \frac{k_{N \rightarrow U_f}}{k_{U_f \rightarrow N}} \text{ und ist abhängig von der Denaturationskonzentration;}$$

$$K_{U_s/U_f} = \frac{[U_s]}{[U_f]} = \frac{k_{U_f \rightarrow U_s}}{k_{U_s \rightarrow U_f}} \text{ und ist unabhängig von der Denaturationskonzentration;}$$

Unter der Bedingung, daß die Prolylisomerisierung sehr viel langsamer als die Hauptfaltungsphase ist, gilt  $\lambda_1 \gg \lambda_2$  und  $k_{N \rightarrow U_f}, k_{U_f \rightarrow N} \gg k_{U_f \rightarrow U_s}, k_{U_s \rightarrow U_f}$  und die Gleichungen vereinfachen sich zu:

$$\lambda_1 = k_{U_s \rightarrow U_f} + \frac{k_{U_f \rightarrow U_s}}{1 + \frac{k_{U_f \rightarrow N}}{k_{N \rightarrow U_f}}} = k_{U_s \rightarrow U_f} + \frac{k_{U_f \rightarrow U_s}}{1 + \frac{1}{K_{U_f/N}}} = k_{U_s \rightarrow U_f} + \frac{k_{U_f \rightarrow U_s}}{1 + K_{N/U_f}}$$

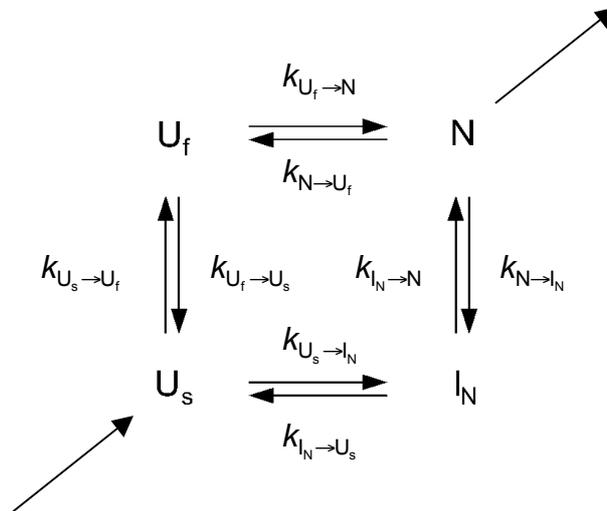
$$\lambda_2 = k_{U_f \rightarrow N} + k_{N \rightarrow U_f}$$

Die Fraktion  $f_N$  des nativen Proteins ergibt sich aus der folgenden Gleichung:

$$f_N = \frac{1}{1 + K_{U_f/N} \cdot (1 + K_{U_s/U_f})} = \frac{1}{1 + K_{N \rightarrow U}^{\text{app}}} = \frac{k_{U_s \rightarrow U_f} \cdot k_{U_f \rightarrow N}}{\lambda_1 \cdot \lambda_2}$$

$$K_{N \rightarrow U}^{\text{app}} = K_{U_f/N} \cdot (1 + K_{U_s/U_f})$$

Schema 2 Konformationsfaltung und Prolylisomerisierung eines Proteins unter Bildung eines nativ-ähnlichen Intermediates - apparente und mikroskopische Geschwindigkeitskonstanten



$$k_{slow}^2 = k_{U_s \rightarrow U_f}$$

$$k_{slow}^1 = k_{U_s \rightarrow U_f} + k_{U_f \rightarrow U_s}$$

$$K_{N \rightarrow U}^{app} = \frac{[U_0]}{[N_0]} \quad U_0 = U_f + U_s \quad N_0 = N + I_N$$

$$K_{iso}^u = \frac{1}{K_{U_s/U_f}} = \frac{k_{U_s \rightarrow U_f}}{k_{U_f \rightarrow U_s}}$$

$$K_{U_s/U_f} = \frac{[U_s]}{[U_f]} = \frac{k_{U_f \rightarrow U_s}}{k_{U_s \rightarrow U_f}}$$

$$K_1 = \frac{[N]}{[U_f]} = \frac{k_{U_f \rightarrow N}}{k_{N \rightarrow U_f}}$$

$$K_2 = \frac{[I_N]}{[U_s]} = \frac{k_{U_s \rightarrow I_N}}{k_{I_N \rightarrow U_s}}$$

$$K_{iso}^f = \frac{[N]}{[I_N]} = \frac{k_{I_N \rightarrow N}}{k_{N \rightarrow I_N}}$$

In Barstar haben sowohl N und  $I_N$ , als auch  $U_f$  und  $U_s$  gleiche optische Eigenschaften. Da  $I_N$  als transientes Intermediat unter nativen Bedingungen wenig populiert ist, reduziert sich das System auf ein Dreizustandsmodell.

$$\frac{K_1}{K_2} = \frac{K_{iso}^u}{K_{iso}^f}$$

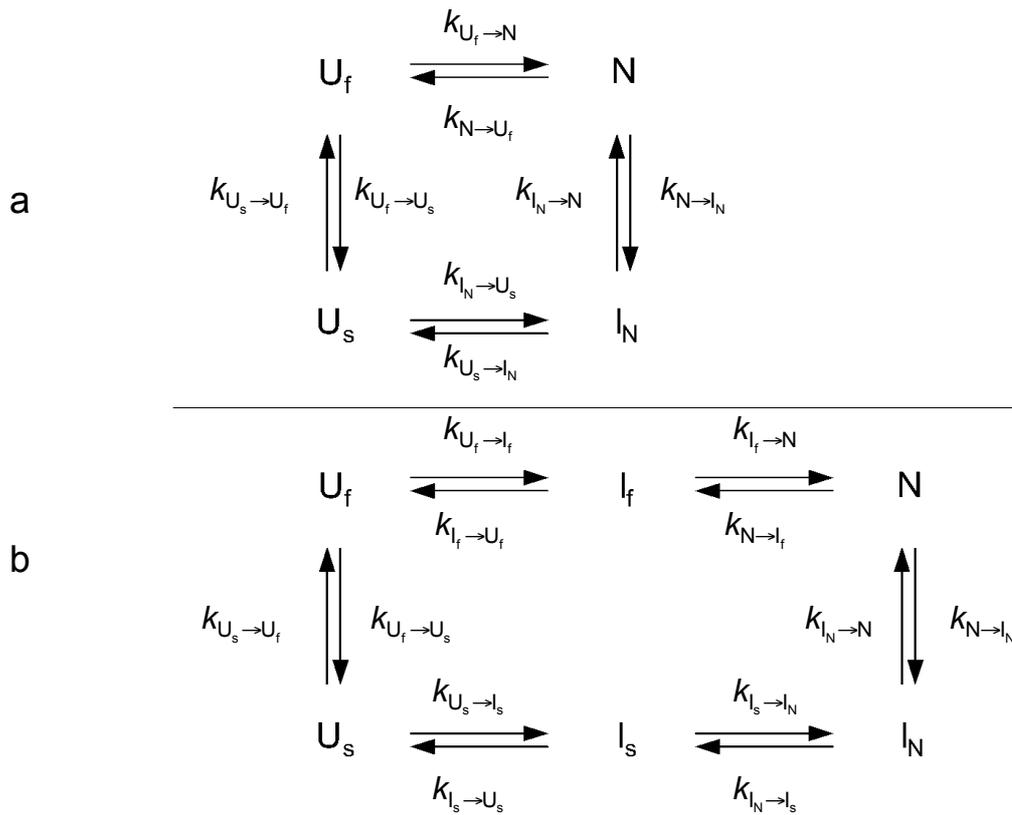
$$K_2 \cdot K_{iso}^u = K_1 \cdot K_{iso}^f$$

$$\Delta G_2 + \Delta G_{iso}^u = \Delta G_1 + \Delta G_{iso}^f$$

Die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten und Gleichgewichtskonstanten nach obigem Modell wurden aus kinetischen Messungen erhalten und sind in Tabelle 3 für Barstar Wildtyp, Barstar C40A/C82A und Barstar C40A/C82A/P27A (Barstar *pseudo*-Wildtyp) vergleichend dargestellt.

Schema 3 Erweiterung des Modells der Faltung von Barstar durch das Auftreten multipler Intermediate der Faltung und Entfaltung (vereinfachte Darstellung)

- a Modell ohne zusätzliche Intermediate analog Schema 2
- b Modell unter Berücksichtigung zusätzlicher Intermediate



## 13. ANHANG

- R1** (Golbik *et al.*, 1999)
- R2** (Nölting *et al.*, 1995)
- R3** (Nölting *et al.*, 1997a)
- R4** (Nölting *et al.*, 1997b)
- R5** (Budisa *et al.*, 1998)
- R6** (Budisa *et al.*, 2001)
- R7** (Budisa *et al.*, 2002)
- R8** (Gast *et al.*, 2003)
- R9** (Zahn *et al.*, 1996)
- R10** (Golbik *et al.*, 1998)
- R11** (Altamirano *et al.*, 1997)
- R12** (Kern *et al.*, 1993)
- R13** (Brown *et al.*, 1994)
- R14** (Eble *et al.*, 1993)
- R15** (Golbik *et al.*, 2000)

## *curriculum vitae*

**Name:** Dr.rer.nat. Ralph Peter Golbik  
**Geburtsdatum:** 20. November 1959  
**Geburtsort:** Schlema  
**Nationalität:** Deutschland  
**Eltern:** Gudrun und Peter Golbik  
**Familienstand:** ledig

**Adresse:** Offenbachstraße 1  
Halle/Saale  
06124  
Telefon 0345 8063256

**Tätigkeit:** Assistent  
Institut für Biochemie/Biotechnologie  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Fachbereich Biochemie, Abteilung Enzymologie  
Kurt-Mothes-Straße 3  
Halle/Saale  
06120  
Telefon 0345 55 24829  
Fax 0345 55 27011

1966-1974 Polytechnische Oberschule (1.-8. Klasse) in Zwönitz (Erzg.)  
1974-1978 Erweiterte Polytechnische Oberschule (9.-12. Klasse) in Aue (Sachsen)  
1978-1985 Studium in der Fachrichtung Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
1978-1983 reguläres Studium (Diplomprüfung 1983)  
1982-1985 Forschungsstudium  
seit 1985 Assistent am Institut für Biochemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
1986 Promotion A (Dr. rer. nat.) bei Prof. Dr. A. Schellenberger über "Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen an Hefe-Pyruvatdecarboxylase" (summa cum laude)  
1987-1988 Zusatzstudium an der Lomonossow-Universität Moskau bei Prof. Dr. G. A. Kochetov (Untersuchungen zum Bindungsverhalten von Thiaminanaloga an Hefe-Transketolase)

- 1991-1993 Stipendiat am Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried) bei Prof. Dr. K. Kühn (Untersuchungen zum Stabilitäts- und Faltungsverhalten nativer und rekombinant hergestellter  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Ketten von Kollagen IV und des Einflusses der Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-isomerase Cyclophilin 18)
- 1993-1996 Stipendiat am Medical Research Council Centre bei Prof. Dr. A. R. Fersht (Untersuchungen zum Stabilitäts- und Faltungsverhalten von Barstar mittels protein engineering-Techniken und zum Einfluß von Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-isomerase auf das Faltungsverhalten von Prolin-Mutanten von Barstar, Untersuchungen zum Stabilitäts- und Faltungsverhalten der apikalen Domäne des Chaperons GroEL, Untersuchungen an RNase P und GFP)

### **Stipendien**

- 1987-1988 Auslandstipendium
- 1991-1992 Stipendium der Fritz-Thyssen-Stiftung
- 1992-1994 Adolf-Butenandt-Stipendium der Max-Planck-Gesellschaft
- 1995-1996 Stipendium der Max-Planck-Gesellschaft

## DANKSAGUNG

Für das Zustandekommen dieser Arbeit habe ich vielfältiger Unterstützung zu danken. Die Habilitationsschrift enthält wissenschaftliche Ergebnisse, die während meiner Aufenthalte an verschiedenen Institutionen erreicht worden sind. Diese Aufenthalte waren nur durch die umfassende Förderung der Max-Planck-Gesellschaft möglich und ich danke in diesem Sinne besonders Herrn Professor Dr. Gunter Fischer (MPG Forschungsgruppe „Enzymologie der Proteinfaltung“, Halle) für die Ermöglichung dieser wissenschaftlichen Laufbahn. Den Direktoren des Max-Planck-Institutes für Biochemie in Martinsried Professor Dr. Klaus Kühn, Professor Dr. Luis Moroder und Professor Dr. Wolfgang Baumeister danke ich ebenfalls für die umfassende Förderung und die Nutzung der Möglichkeiten ihrer Abteilungen. Die verstärkte Hinwendung zu biophysikalischen Ansätzen der Untersuchung der Proteinfaltung verdanke ich Professor Dr. Sir Alan R. Fersht vom MRC in Cambridge (England). Professor Dr. Gerhard Hübner gilt mein besonderer Dank für seine Unterstützung und große Toleranz, daß ich in seiner Abteilung die Problematik der Faltung von Proteinen neben der Enzymologie nach meinen Vorstellungen weiter bearbeiten konnte. Ich habe durch die vielfältigen Kooperationen und Projekte mit Menschen sehr unterschiedlichen Charakters oft über längere Zeiträume zusammengearbeitet. Die bleibenden Erinnerungen sind neben den persönlichen das wissenschaftliche Ergebnis. In diesem Sinne danke ich ganz herzlich Dr. Jürgen Peters und JP Dr. Kai Tittmann, sowie PD Dr. Nediljko Budisa, PD Dr. Johannes Eble, Albert Ries, Elisabeth Weyher-Stingl, Dr. Bengt Nölting, Dr. Klaus Gast, Dr. Margrit Killenberg-Jabs, Dr. Arndt Dietrich, Diplom-Biochemiker Michael Spinka, Dr. Hauke Lilie, Dr. Cordelia Schiene-Fischer, Professor Dr. Thomas Kriegel und PD Dr. Ralph Zahn.

Frau Johanna Brauer danke ich sehr herzlich für ihre große Unterstützung bei der täglichen Arbeit im Labor und bei der Ausbildung von Studenten. Durch ihre organisatorische und fachliche Kompetenz war es mir möglich, die Arbeiten zu dieser Habilitationsschrift neben den Verpflichtungen in Forschung und Lehre durchzuführen.

Ohne die großzügige Unterstützung meiner Eltern wäre diese Arbeit nie zustande gekommen. Daher gilt ihnen mein ganz besonderer Dank, daß sie immer an mich geglaubt haben und mir in allen Lebenslagen und schwierigen Situationen verlässliche und gute Ratgeber waren.

## EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, daß ich die vorliegende Habilitationsschrift selbständig verfaßt habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ferner erkläre ich, daß ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, eine Habilitationsschrift einzureichen oder mich dem Habilitationsverfahren zu unterziehen. Ich habe die dem angestrebten Verfahren zugrundeliegende Habilitationsordnung gelesen und zur Kenntnis genommen.

Halle/Saale, Dezember 2004

Ralph Golbik