

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	γ II Kristallin NAD ⁺ -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 λ 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 ⁻¹)	$k_{trans \rightarrow cis}$ (s ⁻¹)
NAc-Pro-OMe ^a	17,3	4,8	0,0121	0,0025
NAc-(4 <i>R</i>)-F-Pro-OMe ^a	12,8	6,8	0,0260	0,0038
NAc-(4 <i>S</i>)-F-Pro-OMe ^a	28,5	2,5	0,0148	0,0059
NAc-(4)-diF-Pro-OMe ^a	23,0	3,4	0,0535	0,0160
Suc-Ala-Ser-Pro-Phe-pNA	15,4 ^b	5,5 ^c	0,0083 ^d	0,0015 ^e
Suc-Ala-Ser-(4 <i>R</i>)-F-Pro-Phe-pNA	11,0 ^b	8,1 ^c	0,0122 ^d	0,0015 ^e
Suc-Ala-Ser-(4 <i>S</i>)-F-Pro-Phe-pNA	22,0 ^b	3,6 ^c	0,0113 ^d	0,0032 ^e

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

^b 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.

^c 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.

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

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

Fortsetzung Tabelle 3 Thermodynamische und kinetische Parameter von Barstar und Varianten

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

Fortsetzung Tabelle 3 Thermodynamische und kinetische Parameter von Barstar und Varianten

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

^a (Shastry *et al.*, 1994)

^b (Schreiber & Fersht, 1993)

^c (Golbik *et al.*, 1999; Nölting *et al.*, 1995; Nölting *et al.*, 1997)

^d (Golbik *et al.*, 1999; Nölting *et al.*, 1997)

^e (Golbik *et al.*, 1999; Nölting *et al.*, 1997)

^f 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 $\Delta G_{U_f \rightarrow N} = -RT \cdot \ln K_{N/U_f}$

^g experimentelle Bestimmung in kinetischen Experimenten aus der Transitionskurve der Amplitude für I_N (Schreiber & Fersht, 1993)

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

ⁱ Berechnung aus der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten nach EYRING, unter der Voraussetzung ΔH^\ddagger gleich konstant

^j 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

^k 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 ^a				Thermische Denaturierung ^b		
	[D] _{0,5} (mol l ⁻¹)	<i>m</i> (kcal mol ⁻² l ⁻¹)	ΔG_{N-D}^0 ^c (kcal mol ⁻¹)	$\Delta\Delta G_{N-D}^0$ ^d (kcal mol ⁻¹)	<i>T</i> _m (K)	ΔH_m (kcal mol ⁻¹)	ΔS_m (kcal mol ⁻¹)
<i>pseudo</i> -Wildtyp ^{e,1}	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 ^e - (4R)-FPro48 ²	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 ^e - (4S)-FPro48 ³	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 ^f	1,26	3,59 ± 0,10 ^f	0,13 ± 0,11			
<i>pseudo</i> -Wildtyp ^e - (4)-diFPro48 ⁴	2,95 ± 0,05	1,26	3,72 ± 0,05	0	337,30 ± 0,10	38,80 ± 0,80	115,00 ± 2,40

^a Die Gleichgewichtsdenaturierung der Proteine mit Harnstoff wurde durch Fern-UV Circular dichroismus bei 222 nm¹, bei 228 nm^{3,4} und bei 230 nm² gemessen. Die Temperatur betrug 20 °C.

^b Die thermische Denaturierung der Proteine wurde durch Fern-UV Circular dichroismus bei 222 nm gemessen.

^c 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]_{0,5} bestimmt.

^d 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.

^e Der *pseudo*-Wildtyp bezeichnet die Variante Barstar C40A/C82A/P27A.

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

^a 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 M¹, 5 M^{2,4} and 6 M³ Harnstoff denaturiertem Protein bei einer Temperatur von 25 °C gestartet wurde. Die Endkonzentration an Denaturans war 1.6 M^{1,2,3,4} oder 2.5 M³ Harnstoff (*pretransition*). Alle Experimente wurden 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8,0 durchgeführt.

^b 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^a (Yu, 2003)

Chemische Verbindung	(mol ⁻¹ l s ⁻¹)					
	Cyp18	FKBP12	Pin1	<i>EcoPar10</i>	<i>EcoTF</i>	<i>hPar14</i>
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

^a 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).