

Untersuchungen zum Katalysemechanismus von Peptidyl-Prolyl-*cis/ trans*-Isomerasen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von Jörg Fanghänel
geboren am 7.4.1973 in Halle/Saale

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Fischer
 2. Gutachter: Prof. Dr. R. Wetzker
- verteidigt am 30.6.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009329

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009329>]

Abkürzungen, Konstanten und Symbole

ΔC_p	experimentell bestimmte Änderung der Wärmekapazität
$\Delta C_{p \text{ theor}}$	berechnete Änderung der Wärmekapazität
ΔG^\ddagger	Änderung der freien Enthalpie im Übergangszustand (kcal mol ⁻¹)
$\Delta G_{c/t}^\ddagger$	Änderung der freien Enthalpie im Übergangszustand bei der <i>cis</i> - nach <i>trans</i> -Isomerisierung von prolinhaltigen Peptiden (kcal mol ⁻¹)
ΔG_{ITC}	Mittels ITC bestimmte Änderung der freien Enthalpie (kcal mol ⁻¹)
ΔH^\ddagger	Änderung der Enthalpie im Übergangszustand (kcal mol ⁻¹)
$\Delta H_{c/t}^\ddagger$	Änderung der Enthalpie im Übergangszustand bei der <i>cis</i> - nach <i>trans</i> - Isomerisierung von prolinhaltigen Peptiden (kcal mol ⁻¹)
$\Delta H_{\text{Bindung}}$	Änderung der Enthalpie der Bindung (korrigiert um Protonierungseffekte)
ΔH_{ITC}	Mittels ITC bestimmte Änderung der Enthalpie (kcal mol ⁻¹)
ΔH_{Proton}	Änderung der Enthalpie durch Protonierungseffekte
ΔS^\ddagger	Änderung der Entropie im Übergangszustand (kcal mol K ⁻¹)
$\Delta S_{c/t}^\ddagger$	Änderung der Entropie im Übergangszustand bei der <i>cis</i> - nach <i>trans</i> -Isomerisierung von prolinhaltigen Peptiden (kcal mol ⁻¹ K ⁻¹)
ΔS_{conf}	Änderungen der Entropie durch Konformationsänderungen
ΔS_{ITC}	mittels ITC bestimmte Änderung der Entropie (kcal mol ⁻¹ K ⁻¹)
ΔS_{rt}	Änderung der Entropie durch Änderungen der Rotations- oder Translationsfreiheitsgrade
ΔS_{solv}	Änderung der Entropie durch Änderung des Solvatationsgrades
Ac-	Acetyl-
-amc	7-Amino-4-Methylcoumarin
C-N	Bindung zwischen dem Carbonylkohlenstoff und dem Amidstickstoff einer Peptidbindung
CsA	Cyclosporin A
Da	Molekulargewicht (g mol ⁻¹)
-DFA	2,4-Difluor-Anilid
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMA	N,N-Dimethylacetamid
FK506	Tacrolimus
GdmHCl	Guanidiniumhydrochlorid
h	Plancksche Konstante, 1,58·10 ⁻³⁴ cal s
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
K _A	Assoziationskonstante
k _b	Boltzmann-Konstante, 3,3·10 ⁻²⁴ cal K ⁻¹
k _{c/t}	Geschwindigkeitskonstante der <i>cis</i> - nach <i>trans</i> -Isomerisierung
k _{t/c}	Geschwindigkeitskonstante der <i>trans</i> - nach <i>cis</i> -Isomerisierung
K _D	Dissoziationskonstante
K _i	Inhibitionskonstante
k _{kat}	Michaelis-Menten-Parameter
K _M	Michaelis-Menten-Parameter
KSIE	kinetischer Lösungsmittelisotopeneffekt
L ₂ O	Protium- oder Deuteriumoxid
Me-	Methyl-
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)-ethansulfonsäure
MeVal	Methylvalin
n. b.	nicht bestimmt
OD ₆₀₀	optische Dichte, gemessen bei 600 nm
P1	Aminosäurerest N-terminal zur Prolyl-Bindung
P1'	Aminosäurerest C-terminal zur Prolyl-Bindung
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
-pNA	-4-Nitro-Anilid
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase

(p)S	an der Seitenkette phosphoryliertes Serin
(p)T	an der Seitenkette phosphoryliertes Threonin
R	allgemeine Gaskonstante
RNase A	Ribonuklease A aus Rinderpankreas
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPR	engl. <i>surface plasmon resonance</i>
T	Temperatur in Grad Celsius (°C) oder Kelvin (K)
UV	ultraviolett
Vis	engl. <i>visible</i>
w/w	Gewichtsprozent
$\Delta ASA_{\text{polar}}$	Änderung der polaren lösungsmittelzugänglichen Oberfläche
$\Delta ASA_{\text{unpolar}}$	Änderung der unpolaren lösungsmittelzugänglichen Oberfläche
λ	Wellenlänge (nm)
$\Delta H_{\text{Faltung}}$	Änderung der Enthalpie bei der Faltung von Proteinen (kcal mol ⁻¹)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Nichtenzymatische Katalyse der Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerisierung.....	2
1.1.1	Katalyse durch Lösungsmiteleinflüsse	2
1.1.2	Intramolekulare Katalyse.....	3
1.1.3	Intermolekulare Katalyse.....	5
1.2	Enzymkatalysierte Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerisierung.....	5
1.2.1	Cyclophiline	5
1.2.2	FKBP.....	11
1.2.3	Parvuline	14
2	Ziele der Arbeit.....	18
3	Material und Methoden	19
3.1	Chemikalien.....	19
3.2	Chromatographiematerialien	20
3.3	Proteine.....	20
3.4	Geräte.....	20
3.5	Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme	21
3.6	Zellanzucht und Zellaufschluss.....	21
3.7	Präparation von Cyp18 und dessen Varianten, hFKBP12 und hPin1 Δ WW	22
3.8	Analytische Methoden.....	22
3.8.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	22
3.8.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	22
3.8.3	Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen mittels MALDI-TOF-MS	23
3.8.4	CD-Spektroskopie	23
3.8.5	Kalorimetrie.....	23
3.8.5.1	hCyp18/CsA Interaktion	24
3.8.5.2	hCyp18/Suc-AFPF-pNA-Interaktion	25
3.8.5.3	hPin1/Ligand Interaktion	25
3.8.5.4	Berechnung der thermodynamischen Parameter ΔC_p und $\Delta H(60^\circ\text{C})$	25
3.8.5.5	Kinetische Untersuchungen mittels Kalorimetrie	26
3.8.5.6	RNase A-Rückfaltungsexperimente.....	26
3.8.5.7	Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerisierung von Ala-Pro (AP) und Ala-Ala-Pro (AAP).....	27
3.8.5.8	Konformationelle Umwandlung von Ac-(Pro) ₁₃ -NH ₂	28
3.8.6	NMR-spektroskopische Untersuchungen an AP und AAP	28

3.8.7	PPIase-Aktivitätstests.....	29
3.8.7.1	Bestimmung der Viskositätsabhängigkeit der PPIase-Aktivität.....	29
3.8.7.2	Bestimmung des KSIE	30
3.8.7.3	Bestimmung des K_i -Wertes für hCyp18 und dessen Varianten	30
3.8.7.4	Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter in viskosen Lösungen.....	30
3.8.7.5	Ungekoppelter/proteasefreier PPIase-Aktivitätstest	31
3.8.7.6	RNase T1 (S54G/P55N)-Proteinrückfaltungstest	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Kalorimetrische Untersuchungen.....	33
4.1.1	humanes Cyclophilin 18.....	33
4.1.1.1	Temperaturabhängigkeit der thermodynamischen Parameter	34
4.1.1.2	pH-Wert-Abhängigkeit der thermodynamischen Parameter	37
4.1.1.3	Untersuchung von Proteinvarianten des hCyp18.....	39
4.1.1.4	Thermodynamik der Interaktion von Suc-AFPF-pNA mit hCyp18	40
4.1.2	Humanes Pin1.....	41
4.1.2.1	Temperaturabhängigkeit der thermodynamischen Parameter	41
4.1.2.2	Ionenstärke-Abhängigkeit der thermodynamischen Parameter	44
4.1.2.3	pH-Wert-Abhängigkeit der Komplexbildung	46
4.1.2.4	Untersuchung von hPin1-Varianten.....	48
4.1.2.5	Thermodynamik der Interaktion von Ac-AA(p)SPR-pNA mit hPin1 Δ WW ...	49
4.2	Kinetische Untersuchungen zu PPIasen.....	49
4.2.1	Viskositätsabhängigkeit der PPIase-Aktivität.....	50
4.2.1.1	Validierung des proteasegekoppelten PPIase-Aktivitätstests.....	50
4.2.1.2	hCyp18	50
4.2.1.3	hPin1	54
4.2.1.4	<i>E. coli</i> Par10	56
4.2.1.5	hFKBP12.....	58
4.2.2	Kinetischer Lösungsmittelisotopeneffekt	59
4.2.2.1	hCyp18	59
4.2.2.2	hFKBP12, <i>E. coli</i> Par10 und hPin1	61
4.3	Kalorimetrische Detektion von langsamen Konformationsänderungen in Proteinen und Peptiden.....	64
4.3.1	Renaturierung von RNase A unter schwach nativen Bedingungen	64
4.3.2	Renaturierung von RNase A unter stark nativen Bedingungen.....	66
4.3.3	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerisierung von prolinhaltigen Peptiden	68

5	Auswertung und Diskussion.....	71
5.1	Thermodynamische Charakterisierung der hCyp18/CsA-Interaktion.....	71
5.2	Thermodynamische Charakterisierung der hPin1/Ac-Phe-DThr(PO ₃ H ₂)-Pip-Nal-Gln-NH ₂ -Interaktion.....	81
5.3	Kinetische Untersuchungen zu PPIasen.....	89
5.3.1	Die thermodynamischen und kinetischen Parameter der hCyp18-Varianten	89
5.3.2	Viskositätseffekte auf die PPIase-Aktivität.....	91
5.3.2.1	Viskositätseffekte auf die Aktivität von hCyp18.....	92
5.3.2.2	Viskositätseffekte auf die Aktivität von hPin1 und <i>E. coli</i> Par10	94
5.3.2.3	Viskositätseffekte auf die Aktivität von hFKBP12	96
5.3.3	kinetische Lösungsmittelisotopeneffekte auf PPIasen.....	96
5.3.3.1	kinetische Lösungsmittelisotopeneffekte auf die Aktivität von hCyp18.....	97
5.3.3.2	kinetische Lösungsmittelisotopeneffekte auf die Aktivität von hPin1 und <i>E. coli</i> Par10 und hFKBP12.....	102
5.4	Kalorimetrische Untersuchung von langsamen Konformationsänderungen in Proteinen und Peptiden	105
6	Zusammenfassung	112
6.1	Kalorimetrische Untersuchungen zu PPIase/Ligand Wechselwirkungen.....	112
6.2	Enzymkinetische Untersuchungen zu vier Vertretern der drei bekannten PPIasen-Familien.....	113
6.3	Beschreibung einer neuen kalorimetrischen Methode zu Analyse von langsamen Konformationsänderungen in Peptiden und Proteinen.....	114
7	Literatur	115

1 Einleitung

Linus Pauling legte vor rund einem halben Jahrhundert den Grundstein für unser heutiges Verständnis der dreidimensionalen Struktur von Proteinen und ebenso die Basis, die molekulare Funktionsweise von Enzymen zu verstehen [1]. Zwanzig Jahre später äußerte Brandts die Vermutung, dass die langsamen Entfaltungskinetiken, welche bei manchen Proteinen beobachtet wurden, mit der *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen (im Folgenden auch kurz Prolyl-Bindungen genannt) im Zusammenhang stehen könnten [2]. 1984 wurde der erste Vertreter einer neuen Enzymklasse aus Schweineleiere präpariert: dieses Enzym war in der Lage, die *cis/trans*-Isomerisierung von Prolyl-Bindungen effizient zu beschleunigen [3]. Enzyme, die dieser Klasse angehören, werden als Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen, EC 5.1.2.8) bezeichnet. Seitdem sind mehr als zwanzig Jahre vergangen, und die große Anzahl an wissenschaftlichen Arbeiten zu diesem Thema zeigt, mit welchem großem Interesse an Proteinen dieser Enzymklasse gearbeitet wird. Die am besten untersuchten Vertreter der PPIasen sind das humane Cyclophilin 18 (hCyp18) und das humane FK506-bindende Protein 12 (hFKBP12). Beide Enzyme stellen die prototypischen Vertreter der nach ihnen benannten PPIase-Familien der Cyclophiline und FKBP dar. Die Namen beider Enzyme leiten sich von ihrer hohen Affinität zu den immunsuppressiv wirkenden Substanzen Cyclosporin A und FK506 ab. Eine dritte PPIase-Familie, die Parvuline (von *parvulus*, lat. für klein), wurde nach ihrem ersten Vertreter, dem nur rund 10 kDa großen *E. coli* Par10 benannt. Am detailliertesten untersucht wurde das humane Pin1 (hPin1) aus dieser PPIase-Familie. Der Befund, dass Cyclophiline und FKBP eine entscheidende Rolle bei der CsA- und FK506-vermittelten Immunsuppression spielen, führte zu einem immensen wissenschaftlichen Interesse. Seitdem wurden PPIasen als Schlüsselenzyme für die verschiedensten physiologischen Prozesse, wie der *in vivo*-Proteinfaltung, der Hitzeschock-Antwort, der Transkription und Translation, der Ionenkanal- und Rezeptor-Regulation, der Signalweiterleitung, der Tumormetastasis, der Pathogen-Wirt-Interaktion und der Zellzykluskontrolle identifiziert [4-8]. Trotz der Vielfalt an publizierten experimentellen und theoretischen Ergebnissen ist der PPIase-Katalysemechanismus auf atomarer Ebene nur unzureichend verstanden. So ist noch nicht geklärt, ob die drei PPIase-Familien, welche untereinander keine Sequenzhomologien aufweisen, die Beschleunigung der Prolyl-Isomerisierung unter Verwendung des gleichen Katalysemechanismus erreichen. Die Einfachheit der katalysierten Reaktion ist dabei für enzymologische Untersuchungen nicht nur von Vorteil. So scheinen PPIasen zum Beispiel zur Katalyse keine Kofaktoren zu benötigen, was spektroskopische Untersuchungen erschwert. Des Weiteren sind die Unterschiede zwischen den Substraten und Produkten der PPIasen klein und besonders in höhermolekularen Substraten und

Produkten schwierig zu beobachten. In den folgenden Abschnitten werden die wichtigsten Ergebnisse in Verbindung mit dem PPIase-Katalysemechanismus dargestellt.

1.1 Nichtenzymatische Katalyse der Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung

Um den Enzymmechanismus von PPIasen besser zu verstehen, ist ein umfassendes Wissen über die chemischen Eigenschaften der Prolyl-Bindung unumgänglich. Das klassische Konzept der „Resonanzstabilisierung“ von Pauling erklärt viele der chemischen Eigenschaften der Peptidbindung durch die Delokalisierung des freien Elektronenpaares des Peptidstickstoffatoms über die gesamte Peptidbindung, wie z.B. die hohe Rotationsbarriere der C-N-Bindung, die verkürzte C-N-Bindungslänge, die Stabilität von Peptidbindungen gegenüber einem nukleophilen Angriff und die beobachteten Peaks im IR-Spektrum, [9]. Dabei wird angenommen das sich das freie Elektronenpaar entweder direkt am Stickstoffatom befindet, oder aber eine Doppelbindung zwischen dem Carbonylkohlenstoff und dem Stickstoff bildet. Die Peptidbindung ist damit durch zwei mesomere Grenzstrukturen charakterisiert. Dieses einfache Modell der „Resonanzstabilisierung“ wurde später von Wiberg durch die Einführung einer dritten mesomeren Grenzstruktur weiter verfeinert (Überblick in [10]). In dieser Grenzstruktur ist die Carbonylgruppe vollständig polarisiert, und damit der Carbonylsauerstoff negativ und der Carbonylkohlenstoff positiv geladen. Die folgenden drei Abschnitte enthalten eine kurze Zusammenfassung der in der Literatur beschriebenen Möglichkeiten, die *cis/trans*-Isomerisierung der Peptid-Bindung, speziell die der Prolyl-Bindungen, auf nichtenzymatischen Weg zu beschleunigen.

1.1.1 Katalyse durch Lösungsmiteleinflüsse

Die Peptidbindung weist in ihrer planaren Form eine größere Ladungstrennung auf, als im postulierten orthogonalen Übergangszustand, deshalb sollten unpolare Lösungsmittel die *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidbindungen beschleunigen. Übereinstimmend mit dieser Vermutung wurde eine 60fach erhöhte Geschwindigkeit der Isomerisierung von N,N-dimethylacetamid (DMA) in Cyclohexan gegenüber Wasser beobachtet [11, 12]. Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass die Geschwindigkeit der Isomerisierung von Ac-GP-OMe nicht mit der Dielektrizitätskonstante oder der Lösungsmittelpolarität korrelierte, sondern proportional zu Fähigkeit des Lösungsmittels war, Wasserstoffbrücken auszubilden [13]. Dabei ist die Höhe der C-N-Rotationsbarriere proportional zur Stärke der vom Peptidbindungssauerstoff eingegangenen Wasserstoffbrückenbindung mit dem Lösungsmittel. Berechnungen ergaben, dass die C-N-Rotationsbarriere nur um $1,3 \text{ kcal mol}^{-1}$ sinkt, wenn die Peptidbindung im vollständig desolvatisierten Zustand vorliegt [13]. Die Geschwindigkeit der *cis/trans*-Isomerisierung von DMA steigt um den Faktor 160, wenn der pH-Wert der Lösung von

7,0 auf 1,8 gesenkt wird. Die Verringerung der Rotationsbarriere wird dabei durch die Protonierung am Peptidbindungsstickstoffatom erreicht [14]. Weiterhin wurde beobachtet, dass im basischen Milieu bei pH 11,8 Hydroxid-Ionen die *cis/trans*-Isomerisierung von DMA beschleunigen können. Der entscheidende Schritt ist dabei die Bildung eines tetraedrischen Zwischenproduktes am Carbonylkohlenstoff, in welchem die Peptidresonanz aufgehoben ist [14]. Unter physiologischen Bedingungen sind solche extremen pH-Werte üblicherweise nicht zu finden. Jedoch sind Enzyme in der Lage, reaktive Hydroxid-Ionen im aktiven Zentrum unter Benutzung von enzymgebundenen Zn^{2+} -Ionen zu bilden, wie es zum Beispiel für die Carboanhydrase beschrieben ist [15]. In Lösungen mit pH-Werten im Bereich von 5 bis 9 ist die Geschwindigkeit der *cis/trans*-Isomerisierung von Prolyl-Bindungen in kurzen Peptiden annähernd konstant. Damit kann unter diesen Bedingungen eine allgemeine intermolekulare Säure/Base-Katalyse ausgeschlossen werden [16]. In diesem pH-Wert-Bereich zeigte sich, dass der zu beobachtende KSIE annähernd 1 war. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass während der Bildung des Übergangszustandes kein Protonentransfer stattfindet [17].

1.1.2 Intramolekulare Katalyse

Zum ersten Mal wurde eine Form der intramolekularen Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung von Prolyl-Bindungen in wässriger Lösung, bei der Renaturierung von entfalteter Dihydrofolatreduktase (DHFR) beobachtet. Dabei beschleunigt die Guanidiniumgruppe des Arginyl-Restes R44 durch die Interaktion mit dem Imidstickstoff der Prolyl-Bindung zwischen den Resten Q65 und P66 die *trans*- nach *cis*-Isomerisierung dieser Peptidbindung und damit die Proteinfaltung [18]. Interessanterweise zeigte eine erste Analyse der in der Proteinstrukturdatenbank (RCSB-Datenbank) hinterlegten Strukturen, dass in rund 6% aller Strukturen mindestens eine Guanidiniumgruppe innerhalb von 4 Å zu einem Imidstickstoff zu finden ist (Daten nicht gezeigt). Ein weiteres Beispiel für eine intramolekulare Katalyse ist für Oligopeptide beschrieben. Dort konnte die Ausbildung einer sogenannten 5-NH--N_a Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Imidstickstoff der Prolyl-Bindung und der benachbarten amidischen NH-Gruppe beobachtet werden [19]. Durch die Ausbildung dieser fünfzähligen Ringstruktur wird die *cis/trans*-Isomerisierung der Prolyl-Bindung in organischen Lösungsmitteln bis zu 260fach beschleunigt [19]. Auf einem ähnlichen Mechanismus beruht auch die bis zu 10fache Beschleunigung der Geschwindigkeit der *cis/trans*-Isomerisierung von Cys-Pro-Bindungen in zyklischen, disulfidverbrückten Peptiden gegenüber ihren offenkettigen Gegenstücken [20, 21]. Monte-Carlo-Simulationen dieser Reaktion ergaben, dass in den zyklischen Peptiden das NH-Proton der Peptidbindung, welches C-terminal zur Prolyl-Bindung gelegen ist, eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem freien Elektronenpaar des Imidstickstoffs im Übergangszustand eingehen konnte und auf diese Weise die Reaktion beschleunigte.

Beschleunigungen in ähnlichen Größenordnungen wurden für His-Pro-Prolyl-Bindungen in Peptiden gefunden, wenn der pH-Wert von basischen zu sauren Werten geändert wurde. Da bei dieser Reaktion ein normaler KSIE von 2 beobachtet wurde, konnte geschlussfolgert werden, dass ein direkter Protonentransfer von der protonierten Seitenkette des Histidins zum Imidstickstoff der Prolyl-Bindung während der Bildung des Übergangszustands stattfindet [22].

Der Effekt von Modifikationen der Prolyl-Bindung selbst oder einer der beiden angrenzenden Aminosäurereste auf die Geschwindigkeit der Isomerisierung wurde bis jetzt noch nicht besprochen. In der Regel beschleunigen Modifikationen, die die Elektronendichte an der Carbonylgruppe der Peptidbindung erhöhen, die Geschwindigkeit der Isomerisierung. Der entgegengesetzte Effekt tritt ein, wenn die Elektronendichte am Imidstickstoff steigt. Der Einfluss von unterschiedlichen Ringgrößen und Heteroatomsstitutionen des Prolyl-Restes auf die C-N-Rotationsbarriere in kurzen Peptiden wurde bestimmt. Dabei wurde deutlich, dass für die (S)-Azetidin-2-Karbonsäure-, (S)-Oxazolidin-4-Karbonsäure- und (R)-Thiazolidin-2-Karbonsäure-Derivate eine deutliche Erniedrigung der Barriere zu beobachten war [23]. Derselbe Effekt wurde für Fluorprolinderivate beschrieben, dabei hatte der induktive Effekt der Fluorsubstitutionen eine schwächere Resonanzstabilisierung der Amidbindung in den untersuchten Substanzen (Ac-(4R)-FPro-OMe, Ac-(4S)-FPro-OMe and Ac-4,4-F₂Pro-OMe) zur Folge [24]. Eine Erhöhung der Rotationsbarriere wurde für 3-C-alkylierte Prolinderivate beobachtet. Solche Modifikationen verlangsamten die Geschwindigkeit der Isomerisierung im wässrigen Medium, wobei die Effekte hauptsächlich von den sterischen Behinderungen der Substitution ausgehen [25]. Die Substitution des Carbonylsauerstoffs der Prolyl-Bindung gegen Schwefel in kurzen Peptiden reduziert die Geschwindigkeit der *cis/trans*-Isomerisierung um einen Faktor von 25 bis 125 [26].

Nur wenige der beschriebenen Modifikationen sind von physiologischer Relevanz, dazu gehören die Hydroxylierung von Prolin in Position 4 und die O-Glykosylierung und Phosphorylierung von Serin- und Threoninseitenketten von N-terminal zu Prolin gelegenen Aminosäureresten. Dabei konnte beobachtet werden, dass die O-Glykosylierung keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der *cis/trans*-Isomerisierung hat. Hingegen führt die Serin- bzw. Threonin-phosphorylierung zu einer rund 7fachen Verringerung der Geschwindigkeit [27-29]. Die Hydroxylierung von Prolyl-Resten (*trans*-4-Hydroxyprolin) wie sie z.B. in Kollagen beobachtet wird führt zu einem doppelt so hohem Anteil an *trans* Prolyl-Bindungen im *cis/trans*-Gleichgewicht von Dipeptiden [30]. Wohingegen sich die der *cis*-Anteil und die Geschwindigkeit der *cis/trans*-Isomerisierung in *N*-Acetyl-*trans*-4-Hydroxyprolin nur geringfügig verringert [25].

1.1.3 Intermolekulare Katalyse

Monoklonale Antikörper, hergestellt gegen Haptene mit α -Keto-dicarbonyl-Funktionen, beschleunigen die *cis/trans*-Isomerisierung in Peptiden und Proteinen. Es wurde postuliert, dass die durch die Antikörper vermittelte Katalyse auf einem kovalenten Mechanismus beruht [31]. Eine detaillierte Untersuchung dieser Antikörper zeigte jedoch, dass die niedrigen Beschleunigungsraten, die Insensitivität der Katalyse gegenüber pH-Wert-Änderungen und der erhaltene KSIE von 1 mit einem solchen Mechanismus nicht im Einklang stehen [32]. Ähnliche Beschleunigungsraten wurden durch den Einsatz von Phospholipidvesikeln und Mizellen erhalten [33]. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im Kapitel 1.2.2 beschrieben.

1.2 Enzymkatalysierte Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung

PPIasen treten als Einzel- und Mehrdomänenproteine auf. Es ist bekannt, dass Vertreter der FKBP und der Parvuline mehrere nichtidentische PPIase-Domänen in einem Enzym vereinen. Einzelne oder auch mehrfache PPIase-Domänen können durch weitere Nicht-PPIase-Domänen und Protein-Protein-Interaktionsmotive ergänzt sein, darunter sind z.B. WW-Domänen, TPR-Motive und Calmodulinbindemotive zu finden. Eine ausführliche Übersicht über den modularen Aufbau der PPIasen ist in einem aktuellem Artikel beschrieben [34]. Da sich diese Arbeit hauptsächlich mit dem molekularen Mechanismus der PPIase-Aktivität beschäftigt, soll in den folgenden drei Kapiteln nur auf die PPIase-Domänen der drei PPIase-Familien eingegangen werden. In Abbildung 1 sind verschiedene für PPIasen mögliche Katalysemechanismen aufgezeigt, welche in der Literatur beschrieben sind.

1.2.1 Cyclophiline

Nach der Entwicklung eines *in vitro*-PPIase-Aktivitätstests wurde es möglich, den Enzymmechanismus der PPIasen zu untersuchen [3]. In den letzten zwanzig Jahren wurden mit Hilfe dieses Tests mehr als 68 verschiedene Cyclophiline aus mindestens 35 verschiedenen Organismen untersucht. Fast alle untersuchten Cyclophiline zeigten dabei eine hohe Spezifitätskonstante ($k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$) von 10^5 bis $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ gegenüber dem Substrat Suc-AAPF-pNA (Tabelle 7-1). Dabei war im Falle des hCyp18 der k_{kat} -Wert relativ hoch ($>600 \text{ s}^{-1}$) und die Affinität zum Substratgrundzustand niedrig ($K_{\text{M}} > 80 \mu\text{M}$). Das Verhältnis zwischen der unkatalysierten Reaktion und den k_{kat} -Werten von Cyclophilinen liegt nur in der Größenordnung von 10^5 , andere Enzyme wie z.B. Fumarase erreichen hier deutlich höhere Beschleunigungsraten von bis zu 10^{15} (Übersicht in [35]). Jedoch muss beachtet werden, dass die beobachteten Spezifitätskonstanten bereits im Bereich von diffusionskontrollierten Reaktionen liegen, eine weitere Erhöhung der enzymatischen Effizienz also nicht ohne weiteres möglich ist. Solche Enzyme werden auch als perfekt evolviert bezeichnet.

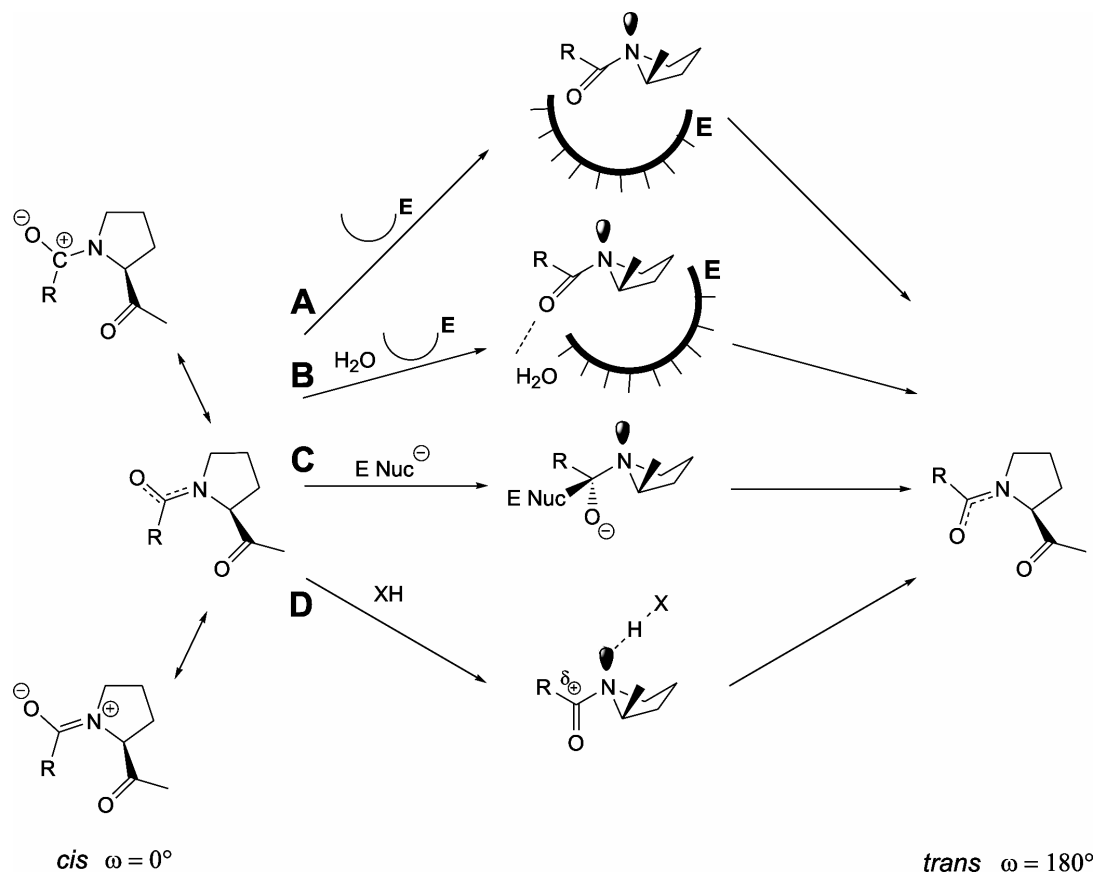


Abbildung 1: Kanonische Strukturen der Prolyl-Bindung und mögliche Mechanismen der *cis/trans*-Isomerisierung durch PPIasen. A) Katalyse durch Stabilisierung des weniger polaren orthogonalen Übergangszustandes durch das hydrophobe aktive Zentrum des Enzyms. B) Katalyse durch einen lösungsmittelunterstützten Mechanismus, bei welchem ein enzymgebundenes Wassermolekül den Übergangszustand durch eine Wasserstoffbrücke zum Carbonylsauerstoff stabilisiert. C) Nukleophile Katalyse; durch den Angriff eines Nucleophils auf den Carbonylkohlenstoff entsteht ein tetraedrales Intermediat ohne resonanzstabilisierte Peptidbindung. D) Katalyse durch eine intra- oder intermolekulare elektrophile Stabilisierung des Übergangszustandes.

Bis heute sind in der RCSB-Datenbank die Strukturen von 15 verschiedenen Cyclophilinen aus 10 verschiedenen Organismen hinterlegt (Tabelle 7-2). Alle beschriebenen Cyclophilin-Domänen haben die gleiche Grundstruktur, welche aus einer achtblättrigen, antiparallelen β -Faß-Struktur besteht, diese Faß-Struktur wird an jedem Ende durch zwei kurze α -Helices abgeschlossen. Trotz der großen Vielfalt an strukturellen Informationen sind nur vier verschiedene Cyclophiline (hCyp18, *E. coli* CypA, *E. coli* CypB und *C. elegans* Cyp3) im Komplex mit Substratmolekülen strukturell aufgeklärt [36-43]. Die erste Struktur von hCyp18 im Komplex mit einem Substrat (Ac-AAPA-amc) wurde 1992 publiziert. Es wurde beobachtet, dass die Aminosäurereste R55, I57, F60, Q63, A101, N102, Q111, F113, L122, H126 und R148 des hCyp18 im engen Kontakt mit dem Substrat stehen [39]. Die Bindetasche für den Pyrrolidinring des Prolyl-Restes des Substrates wird dabei hauptsächlich durch die hydrophoben Aminosäurereste F60, M61, F113 und L122 geformt. Von den vorhandenen Strukturen des hCyp18 im Komplex mit CsA ist

bekannt, dass die gleiche hydrophobe Tasche von dem Isopropyl-Rest des N-Methylvalin 11 (MeVal11) des hochaffinen Inhibitors besetzt wird. Die Größe und Form der Bindetasche ist dabei für die Interaktion mit einem fünfgliedrigen Ring optimiert. Die katalytische Effizienz von hCyp18 ist stark beeinträchtigt, wenn der Prolyl-Rest des Substrates durch vier- oder sechsgliedrige Derivate ersetzt wird [23, 44].

Der paarweise Vergleich der Aminosäuresequenz der in Tabelle 7-1 aufgeführten Cyclophiline zeigt, dass fast alle Aminosäurereste in unmittelbarer Umgebung des Substratmoleküls zu 100% konserviert sind; die einzigen Ausnahmen sind für die Aminosäurereste in Position 57, 102, 122, 126 und 148 (hCyp18-Zählweise) zu finden (Tabelle 7-3). Die beobachteten Austausche in Position 57 von Isoleucin zu Valin sind konservativ, reduzieren jedoch die Aktivität in vier Fällen stark. Die Seitenkette des Aminosäurerestes 102 ist nicht direkt in die Substratinteraktion involviert, sondern nur das Peptidrückgrat stellt eine Verbindung zum Substrat her. Deshalb werden die auftretenden Austausche toleriert, lediglich der im OvCyp16 vorhandene Austausch mit einem Seryl-Rest führt zu einer stark verminderten Aktivität. Die auftretende Variation des Aminosäurerestes 122 im Cyp-9 von *C. elegans* bewirkt eine deutliche Verminderung der Enzymaktivität. Dieser Rest bildet im hCyp18 einen Teil der Substratbindetasche und ist deshalb für die Funktion des Enzyms entscheidend. Die Austausche des Histidyl-Restes in Position 126 zu einem Tyrosyl-Rest scheinen die Aktivität der PPIasen nicht zu beeinflussen, da beide Cyclophiline aus *E. coli* diese Variation aufweisen und trotzdem als hochaktive Enzyme beschrieben sind [45]. Derselbe Austausch ist möglicherweise für die verringerte Aktivität des Cyp-10 aus *C. elegans* verantwortlich. Der Arginyl-Rest R148 ist nicht konserviert und für die Katalyse nicht von Bedeutung. Die Analyse von verschiedenen Proteinvarianten des hCyp18, welche durch molekularbiologische Methoden erzeugt wurden, zeigte, dass nur die Varianten mit Austauschen in Position 55, 60 und 126 weniger als 1% Restaktivität aufwiesen (Tabelle 7-4). Die aromatische Seitenkette des F60 formt einen Teil der hydrophoben Prolyl-Bindetasche und ist deshalb essentiell für die Substratbindung. Die Bedeutung des Arginyl-Restes in Position 55 wird später in diesem Abschnitt behandelt. Auf der Basis des ersten hCyp18/Substrat-Komplexes wurde spekuliert, ob der Histidyl-Rest 126 in die Katalyse der Prolyl-Bindung direkt involviert ist; spätere Untersuchungen zeigten jedoch, dass H126 weder direkt noch indirekt (via Wasser) über Wasserstoffbrücken mit dem Substrat interagiert [39, 46]. Die relativ hohe Restaktivität der Variante H126Q wurde als Nachweis dafür angesehen, dass diese Seitenkette über hydrophobe Interaktion an der Substratbindung beteiligt ist [40]. Es muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass für die hier beschriebenen Enzyme und Enzymvarianten keine Titration der aktiven Zentren durchgeführt wurde und somit die publizierten $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Werte durch einen deshalb unbekanntem Anteil an nichtaktivem Enzym verfälscht sein können.

Enzymkinetische Daten in Kombination mit molekularbiologischen Methoden zur Erzeugung von Enzymvarianten und Untersuchungen zur dreidimensionalen Proteinstruktur resultierten in einer Vielzahl von Theorien, welche die enzymatische Aktivität der Cyclophiline auf molekularer Ebene zu erklären versuchten.

Zuerst wurde auf Grundlage der beobachteten Inaktivierung von Cyp18 durch SH-Gruppen-modifizierende Agenzien eine Beteiligung eines Cysteinyl-Restes am Katalysemechanismus vorgeschlagen. Dabei sollte eine aktivierte Sulfhydrylgruppe eines Cysteins im aktiven Zentrum des Enzyms als Nukleophil den Carbonylkohlenstoff der Prolyl-Bindung des Substrates angreifen. Das entstehende tetrahedrale Zwischenprodukt würde keine Resonanzstabilisierung mehr aufweisen, womit die Rotationsbarriere um die C-N-Bindung stark reduziert wäre (Abbildung 1 Weg C) [47]. Der vorgeschlagene Mechanismus wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass der kinetische sekundäre Deuterium-Isotopeneffekt für die *cis*- nach *trans*-Isomerisierung von Suc-AG(d₂)PF-pNA von $k_H/k_D > 1$ auf 0,91 sank, wenn Cyclophilin die Reaktion katalysierte [48]. Allerdings konnte später nachgewiesen werden, dass alle vier im hCyp18 vorhandenen Cysteinyl-Reste (C52, C62, C115 und C161) für die Aktivität des Enzyms entbehrlich sind [49]. Des Weiteren ist der mit 8 Å nächste Cysteinyl-Rest (C115) zu weit von der zu isomerisierenden Prolyl-Bindung entfernt, um das vorgeschlagene kovalente Intermediat bilden zu können [39].

Harrison und Stein postulierten einen Enzymmechanismus, bei welchem die Enzym/Substrat-Komplexbildungsenergie dazu verwendet wird, im Substrat Spannungen zu erzeugen, welche zu einer verdrehten Prolyl-Bindung im Übergangszustand führen sollte [16, 17, 50]. Cyclophilin sollte demnach besonders stark Substrate binden, in denen die Peptid-Bindung schon zu einem beträchtlichen Teil aus der planaren Ebene herausgedreht vorliegt. Die hydrophobe Umgebung im aktiven Zentrum sollte einen weiteren Beitrag zur Katalyse liefern. In Übereinstimmung mit diesem Mechanismus stehen die beschriebenen geringen Aktivierungsenthalpien ($\Delta H^\ddagger = 4,3 \text{ kcal mol}^{-1}$), die großen negativen Aktivierungsentropien ($T\Delta S^\ddagger = -12,3 \text{ kcal mol}^{-1}$) bei der Cyclophilin-katalysierten Isomerisierung von kurzen Peptiden, der gemessene kinetische Lösungsmittelisotopeneffekt (KSIE) von annähernd 1 [50] und der normale temperatur-unabhängige kinetische sekundäre Deuterium-Isotopeneffekt für die Katalyse von 1,12 [17, 51]. Detaillierte thermodynamische Untersuchungen der Cyclophilin-Aktivität zeigten, dass dieses Enzym die Rotationsbarriere der Prolyl-Bindung nicht wie zuvor bestimmt um $3,1 \text{ kcal mol}^{-1}$, sondern um fast 8 kcal mol^{-1} (bei 0°C) erniedrigt [51]. Strukturelle Untersuchungen an Cyclophilin/Substrat-Komplexen konnten keine Anhaltspunkte für den von Harrison und Stein postulierten Mechanismus liefern. Weder die Kristallstrukturen noch die mittels NMR-Spektroskopie in Lösung analysierten Enzym/Substrat-Komplexe zeigten einen Hinweis auf ein

mit einer verdrehten Prolyl-Bindung enzymgebundenes Substrat [37, 38, 40, 41, 52]. Ebenso wenig konnten Inhibitoren, welche eine verdrehte Peptidbindung imitierten, hCyp18 mit großer Affinität inhibieren [53, 54]. Enzymkinetische Untersuchungen mit Peptiden, die eine Thioxy-Prolyl-Bindung enthielten, oder auch mit Peptiden mit invertierten Chiralitäten des C α -Atoms der Aminosäurereste in Position P1 oder P1' (Nomenklatur nach Schechter und Berger [55]) zeigten, dass hCyp18 nicht in der Lage ist, solche strukturellen oder elektronischen Änderungen in Substratmolekülen zu akzeptieren. Zwar wurde die Bindung der Substrate nicht beeinflusst, eine Umsetzung dieser Verbindungen fand jedoch nicht, oder nur in sehr geringem Umfang statt [26, 56]. Diese Ergebnisse widersprechen dem von Harrison und Stein vorgeschlagenen Mechanismus, da danach die Katalyse von hCyp18 nicht derart sensibel auf sterische oder elektronische Veränderungen im Substrat reagieren dürfte.

Ein weiterer Katalysemechanismus wurde aufgrund der Struktur eines hCyp18/Dipeptid-Komplexes postuliert [40]. Dabei wurde in der Kristallstruktur ein enzymgebundenes Wassermolekül identifiziert, welches aufgrund seiner Position zum Peptid einen verdrehten Übergangszustand durch eine Wasserstoffbrücke zum Carbonylsauerstoff der Prolyl-Bindung hätte stabilisieren können. Die Autoren nannten diesen Mechanismus „lösungsmittelunterstützt“ (Abbildung 1 Weg B). Später konnte allerdings nachgewiesen werden, dass das für die Untersuchungen verwendete Dipeptid kein Substrat für hCyp18 darstellt, sondern als kompetitiver Inhibitor wirkt [38]. Durch den ungeschützten C-Terminus des verwendeten Dipeptides wird eine zusätzliche negative Ladung in das aktive Zentrum eingeführt, welche eine Bindung mit der Guanidiniumgruppe des Aminosäurerests R55 eingeht. Daraus konnte geschlossen werden, dass ein Aminosäurerest C-terminal zum Prolyl-Rest des Substrates eine Voraussetzung für eine effektive Katalyse des hCyp18 ist. Die Autoren diskutieren weiter, dass der Rest R55 durch eine Wasserstoffbrückenbindung zum Imidstickstoff des Substrates die C-N Rotationsbarriere erniedrigen und somit entscheidend zur Katalyse beitragen könnte (Abbildung 1 Weg D). Das Vorhandensein eines solchen Wasserstoffbrückendonators wurde bereits von Kofron *et al.* vermutet, konnte aber nicht direkt nachgewiesen werden [51]. Die starke Verminderung der Aktivität der Variante hCyp18 R55A sowie die Erkenntnis, dass intramolekulare allgemeine Säurekatalyse in Peptiden prinzipiell möglich ist, sprechen für einen solchen Mechanismus [22, 57]. Zwar ist die Entfernung zwischen dem NH₂-Atom der Guanidiniumgruppe des Restes R55 und dem Imidstickstoffatom mit 3,3 bis 3,8 Å zu groß, als dass eine direkte Wasserstoffbrückenbindung ausgebildet werden könnte, es wurde jedoch argumentiert, dass sich dieser Abstand während der Bildung des Übergangszustandes verkleinert [37, 42]. Diese Vermutung konnte durch theoretische Arbeiten bestätigt werden [58, 59]. Dieser Mechanismus wird auch durch die im Kapitel 1.1.2 beschriebene intramolekulare Beschleunigung

der durch die Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung limitierten Faltung von DHFR durch einen Arginyl-Rest unterstützt [18]. Interessanterweise ähnelt die räumliche Anordnung dieses Arginyl-Restes zur katalysierten Prolyl-Bindung stark der Lage des Arginyl-Restes R55 von hCyp18 zur Substrat-Prolyl-Bindung. Durch NMR-spektroskopische Untersuchungen an einem hCyp18/Substrat-Komplex konnte die zentrale Rolle des Restes R55 für die Katalyse bestätigt werden. Es wurde beobachtet, dass die Änderung der Konformation des Peptidrückgrats des Restes R55 mit der gleichen Geschwindigkeit verläuft wie die Rotation des gebundenen Substrates [60].

Andere Ergebnisse lassen sich mit diesem Mechanismus nicht erklären. So wurde nachgewiesen, dass das Peptid Benzoyl-FAP, welches ebenfalls einen freien C-Terminus aufweist, durch hCyp18 katalysiert wird [61]. Weiterhin lässt sich die beobachtete pH-Wert-Abhängigkeit des k_{kat} -Wertes der hCyp18-katalysierten Reaktion nicht durch unterschiedliche Protonierungszustände des R55 erklären, da dieser Rest über den gesamten untersuchten pH-Wert-Bereich protoniert vorliegen sollte [26].

Alle bisher aufgeführten Untersuchungen verwendeten kurze Peptide, um Aussagen über den Katalysemechanismus zu erhalten. Die natürlichen Substrate von PPIasen sind jedoch keine Peptide, sondern Proteine. Die Entdeckung, dass hCyp18 mit einem Hüll-Protein des *human immunodeficiency type 1 virus* (HIV-1) interagiert, eröffnete die Möglichkeit, eine solche Enzym/Substrat-Interaktion zu studieren [62]. Es zeigte sich, dass hCyp18 spezifisch an ein G89-P90-Motiv in einer lösungsmittelzugänglichen Schleifen-Region dieses Substrates band [36, 42, 63]. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Affinität des hCyp18 zum Substrat nicht nur durch den Aminosäurerest in Position 89, sondern auch von der Gesamtlänge des zur Untersuchung verwendeten Peptides abhing [64]. Kurze Peptide scheinen demnach nicht die gesamte Substratbindetasche des hCyp18 zu nutzen. Durch Kristallstrukturuntersuchungen wurde nachgewiesen, dass das G89-P90-Motiv in der *trans*-Konformation gebunden wird [63]. Alle bis zu diesem Zeitpunkt aufgeklärten hCyp18/Substrat-Komplexe zeigten die Prolyl-Bindung des Substrates in der *cis*-Konformation. Durch Variation der Aminosäuresequenz in der vom hCyp18 erkannten Schleifenregion des HIV-Hüll-Proteins konnten Varianten erzeugt werden, die im Komplex mit hCyp18 sowohl in der *trans*- als auch in der *cis*-Konformation vorlagen [42]. Da sich beide Strukturen nur im Bereich der zu isomerisierenden Peptidbindung unterscheiden, wurde von den Autoren ein Enzymmechanismus vorgeschlagen, in dem sich der Übergangszustand nur minimal von den beiden Grundzuständen des Substrats (*cis* und *trans*) unterscheidet. Während der Katalyse soll dabei fast das gesamte Substrat relativ zum hCyp18 fixiert bleiben und im Wesentlichen nur der Carbonylsauerstoff der Prolyl-Bindung rotieren. Dass die *cis/trans*-Isomerisierung der G89-P90-Bindung im nativen Protein tatsächlich von hCyp18 katalysiert wird, konnte mittels NMR-spektroskopischen Methoden zweifelsfrei

nachgewiesen werden [65]. Inwieweit ein Teil des Substratmoleküls während der Katalyse rotiert, wird noch immer kontrovers diskutiert. So wurde durch NMR-basierte Methoden nachgewiesen, dass der C-terminal von der Prolyl-Bindung des Substrats lokalisierte Abschnitt während der Katalyse in Bewegung ist [60, 66]. Theoretische Berechnungen sowie die oben genannten kristallografischen Ergebnisse sprechen jedoch gegen eine solche Rotation und lassen vermuten, dass sich der N-terminale Teil des Substrats bewegt [42, 58].

1.2.2 FKBP

FKBP bilden eine PPIase-Familie, doch im Gegensatz zu den PPIase-Domänen der Cyclophiline sind die Aminosäuresequenzen der FKBP-Domänen weit weniger konserviert. Diese Heterogenität manifestiert sich auch in der Interaktion mit dem Inhibitor FK506. So werden einige FKBP wie z.B. der *E. coli* Trigger-Faktor oder *E. coli* SlyD nicht durch diese Substanz inhibiert [67, 68]. Ein weiterer Unterschied zur Cyclophilin-Familie ist das Auftreten von mehreren nichtidentischen PPIase-Domänen im gleichen Protein. Die physiologische Bedeutung dieser mehrfachen PPIase-Domänen ist nicht geklärt. Es wurde jedoch nachgewiesen, dass die PPIase-Aktivität hauptsächlich durch eine einzige Domäne vermittelt wird [69-71]. Bis heute ist noch unklar, ob die Inaktivität der restlichen PPIase-Domänen durch die verwendeten experimentellen Bedingungen zustande kommt, auf eventuellen autoinhibitorischen Eigenschaften dieser Proteine beruht, oder eine intrinsische Eigenschaft dieser Domänen ist. Es konnte jedoch am Beispiel des hFKBP38 nachgewiesen werden, dass die Interaktion von Calmodulin mit dem im Protein vorhandenen Calmodulinbindemotiv die PPIase-Aktivität des Enzyms beeinflusste (Edlich, F. zur Publikation eingereicht).

Die Mehrzahl der bis heute untersuchten FKBP beschleunigen die *cis/trans*-Isomerisierung von Suc-ALPF-pNA mit einer Spezifitätskonstante zwischen 10^4 und $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Tabelle 7-5). Nur für wenige Ausnahmen konnte eine sehr geringe oder keine PPIase-Aktivität nachgewiesen werden, wobei anzumerken ist, dass der native Faltungszustand dieser Proteine im *in vitro* PPIase-Aktivitätstest nicht eingehend untersucht wurde [72-75]. Obwohl bis heute insgesamt 57 Proteinstrukturen von FKBP aus 13 verschiedenen Organismen aufgeklärt wurden, ist über die Substratbindestelle der Enzyme wenig bekannt, denn keine dieser Strukturen zeigt das Enzym im Komplex mit einem Substrat (Tabelle 7-6). Deshalb wurden die Proteinstrukturen von FKBP/Inhibitor-Komplexen genutzt, um die Substratbindestelle zu identifizieren [76]. Die Kristallstruktur des Komplexes von hFKBP12 und FK506 zeigte, dass der sechsgliedrige Pipecolinyl-Rest des FK506 tief in einer hydrophoben Tasche des hFKBP12 gebunden wird. Es wurde geschlussfolgert, dass dieser Rest die Prolyl-Bindestelle des Enzyms besetzt. Übereinstimmend mit dieser Vermutung ist die Struktur des hFKBP12/GPI-1046-Komplexes, dort wird der fünfgliedrige Pyrrolidinyl-Rest des Inhibitors GPI-1046 an der gleichen Stelle im

hFKBP12 gebunden [77]. Die gesamte FK506-Bindestelle des hFKBP12 wird von 13 Aminosäureseitenketten gebildet (Y26, F36, D37, R42, F46, F48, Q53, E54, I56, W59, Y82, H87 und F99). Davon bilden vier Reste (E54, I56, Y82 und D37) Wasserstoffbrückenbindungen mit FK506 aus [76, 78, 79]. Alle Aminosäurereste, die im direkten Kontakt mit dem Pipecolinyl-Rest des FK506 stehen, besitzen aromatische Seitenketten (Y82, H87, F99). Um festzustellen, ob die für die Inhibitorwechselwirkung notwendigen Seitenketten auch für die PPIase-Aktivität der Enzyme entscheidend sind, wurde ein paarweiser Aminosäuresequenzvergleich von allen auf ihre Aktivität untersuchten FKBP mit hFKBP12 durchgeführt. Der Vergleich der entsprechenden Aminosäurereste der verschiedenen Enzyme zeigte, dass diese Reste nicht sehr stark konserviert sind (Tabelle 7-5). Für manche FKBP korreliert die geringe Übereinstimmung dieser Reste mit einer geringen PPIase-Aktivität (*A. thaliana* AtFKBP42, *M. genitalium* Trigger-Faktor, *M. jannaschii* MjFKBP26, *M. thermoautotrophicum* FKBP28,3, *P. horikoshii* PhFKBP29). Andere FKBP, wie z.B. *E. coli* Trigger-Faktor, *E. coli* SlyD, *H. cutiru-brum* HcFKBP33 oder *M. jannaschii* MjFKBP18, welche nur geringe Übereinstimmung dieser Reste aufwiesen, zeigten trotzdem hohe PPIase-Aktivitäten. Andererseits korreliert die Fähigkeit der FKBP, durch FK506 inhibiert zu werden, sehr gut mit dem Grad der Konserviertheit dieser Aminosäurereste. Dies kann als Indiz dafür gewertet werden, dass die an der Inhibitorbindung beteiligten Aminosäuren nicht unbedingt an den katalytischen Prozessen beteiligt sind. Diese Vermutung wird durch die experimentelle Beobachtung gestärkt, dass die intrinsische Fluoreszenz des hFKBP12, welche hauptsächlich durch den am Grund der putativen Substrat-Bindetasche gelegenen W59-Rest hervorgerufen wird, durch die Interaktion mit FK506 und Substraten unterschiedlich beeinflusst wird [80]. Von allen Aminosäureresten, die in die Inhibitorbindung involviert sind, zeigen in den 36 untersuchten FKBP die Reste Y26, F36, D37, I56, Y82 und F99 den höchsten Konservierungsgrad. Übereinstimmend zeigen von den 15 beschriebenen hFKBP12 Varianten (Tabelle 7-7) nur die Varianten D37L, W59A, F99Y und Y26F/Y82F eine deutlich verringerte Aktivität (<10%). Davon sind zwei Reste (Y26, F99) direkt an der Bildung der vermuteten Prolyl-Bindestelle der Enzyme beteiligt. Die beschriebene Tyrosindoppelvariante (Y26F, Y82F) scheint dabei nicht die Bildung des Michaelis-Menten-Komplexes zu beeinflussen, sondern zeigte eine deutliche Verringerung des k_{kat} -Wertes [80]. Der Einzelaustausch Y82F hat zu Folge, dass die geringe pH-Wert-Abhängigkeit der hFKBP12-Aktivität im Bereich zwischen pH 8 und 10,5 verschwindet. Deshalb wurde vorgeschlagen, dass die Hydroxylgruppe des Tyrosyl-Restes während der Katalyse eine Wasserstoffbrückenbindung zum Imidstickstoff der Prolyl-Bindung des Substrats ausbildet und dadurch die *cis/trans*-Isomerisierung unterstützt [16, 81]. Da hFKBP12 trotz des Austauschs Y82F noch zu 10% aktiv ist, erklärt dieser Mechanismus bei weitem nicht die gesamte katalytische Aktivität. Andere Varianten des hFKBP12, in denen alle Aminosäurereste, die als

potentielle Wasserstoffbrückendonatoren bzw. Nukleophile wirken können, gegen einen Alanin-Rest ausgetauscht wurden (S8A, S38A, S67A, C22A, T75A und T96A), wiesen keine deutliche Verringerung der PPIase-Aktivität auf [80]. Ebenso wenig verringerte die quantitative Modifikation der Cysteinthiolgruppen die Enzymaktivität [82]. Damit scheint ein kovalenter PPIase-Mechanismus, der durch einen nukleophilen Angriff einer Cysteinseitenkette des Enzyms vermittelt wird, ausgeschlossen.

Die Ergebnisse thermodynamischer Untersuchungen lieferten Hinweise, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der FKBP12-Katalyse nicht chemischer, sondern physikalischer Natur ist. Besonders der große entropische Beitrag ($T\Delta S^\ddagger = -13,1 \text{ kcal mol}^{-1}$) und der kleine enthalpische Beitrag ($\Delta H^\ddagger = 5,85 \text{ kcal mol}^{-1}$) zu ΔG^\ddagger wurden als Indizien dafür angesehen [78]. Daraus wurde ähnlich wie für die Cyclophiline geschlossen, dass das Enzym bevorzugt das Substrat mit einem verdrehten Übergangszustand der Prolyl-Bindung bindet, und dass die durch die Substratbindung frei werdende Bindungsenergie den Verlust der Peptidresonanz ausgleicht. Dieser Mechanismus erklärt sowohl die Unabhängigkeit der FKBP-Aktivität vom pH-Wert, den KSIE von nahezu 1 und den normalen kinetischen sekundären Isotopeneffekt, gemessen mit Suc-A(d₂)GPF-pNA als Substrat. Weitere Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit der FKBP12-Aktivität, bestimmt mit Suc-ALPF-pNA als Substrat, resultierten in Werten für $\Delta H^\ddagger = 15 \text{ kcal mol}^{-1}$ und $T\Delta S^\ddagger = -2,5 \text{ kcal mol}^{-1}$, welche sich deutlich von den zuvor bestimmten Werten unterschieden [50]. Die große Varianz in den bestimmten thermodynamischen Parametern macht ihre Interpretation bezüglich des Reaktionsmechanismus schwierig. Besonders da zur Ermittlung dieser thermodynamischen Parameter nicht die Temperaturabhängigkeit von k_{kat} sondern von k_{kat}/K_M verwendet wurde, ist eine Interpretation des entropischen Anteils von FKBP12 an der Erniedrigung von ΔG^\ddagger fragwürdig. Im Gegensatz zu den untersuchten Cyclophilinen hängt die katalytische Aktivität der FKBP sehr stark von dem Aminosäurerest in der P1-Position von Oligopeptid-Substraten ab. So werden Peptide mit großen hydrophoben Seitenketten in dieser Position bis zu 1000mal besser umgesetzt als Substrate mit geladenen oder kleinen Seitenketten [78, 80]. Der zu beobachtende Unterschied wird dabei nicht durch eine verschlechterte Substratbindung vermittelt, sondern durch geringere k_{kat} -Werte. So wurde beobachtet, dass der k_{kat} -Wert um Faktor 1000 sank, wenn der Leucyl-Rest in der P1-Position des Substrates gegen einen Glycyl-Rest ausgetauscht wurde [80].

Eine ähnliche Substratspezifität wie bei Vertretern der FKBP beobachtet wurde, wurde auch für die Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung von Prolyl-Bindungen durch Mizellen festgestellt. Mizellen sind in der Lage, die freie Enthalpie des Übergangszustandes der Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung um $1,8 \text{ kcal mol}^{-1}$ zu senken. Dabei diskriminieren sie nicht zwischen „normalen“ Peptiden und Peptiden, in denen der Carbonylsauerstoff der Prolyl-Bindung durch Schwefel

ersetzt wurde [33]. FKBP hingegen erniedrigen die freie Enthalpie des Übergangszustandes um bis zu 6,6 kcal mol⁻¹. FKBP12 ist des Weiteren nicht in der Lage, die *cis/trans*-Isomerisierung der Prolyl-Bindung in Peptiden mit D-Aminosäureresten in Position P1, P1' und P2' zu katalysieren [56]. Diese Ergebnisse deuten an, dass hFKBP12 nur einen kleinen Teil seiner katalytischen Effizienz aus der Desolvatisierung der Prolyl-Bindung im aktiven Zentrum des Enzyms bezieht, und dass für eine effektive Beschleunigung die Peptide exakt im aktiven Zentrum des Enzyms ausgerichtet sein müssen.

Theoretische Berechnungen und molekulardynamische Simulationen an hFKBP12/Substrat-Komplexen zeigten, dass verschiedene Peptide, die im putativen aktiven Zentrum von hFKBP12 gebunden sind, eine VIa- β -Wendeschleifen-Konformation einnehmen. Diese Konformation erlaubt die intramolekulare Interaktion zwischen dem Imidstickstoff und dem Peptidrückgratstickstoffproton des N-terminal folgenden Aminosäurerests des Substrats. Der damit verbundene Mechanismus wurde als enzyminduzierte Autokatalyse bezeichnet [83, 84]. Die Ausbildung einer solchen Wasserstoffbrückenbindung könnte die Resonanzstabilisierung der Prolyl-Bindung im Übergangszustand schwächen und damit zu Katalyse beitragen. Jedoch scheint ein solcher Übergangszustand unwahrscheinlich, da die Azidifizierung der NH-Donatorfunktion durch die Substituierung der Peptidbindung mit einer Thiopeptidbindung nicht zu einer Verbesserung der Enzymkatalyse führt [85]. Zusätzlich zur vermuteten intramolekularen Stabilisierung des Substratpeptides im Übergangszustand wurde eine Destabilisierung des Substrates im enzymgebundenen Grundzustand durch die unvorteilhafte Interaktion der Seitenkette des Aminosäurerestes D37 mit dem Carbonylsauerstoff der Prolyl-Bindung berechnet. Durch die Simulation wurde zusätzlich ein katalytisch relevantes Wassermolekül identifiziert. Das Wassermolekül ist so zwischen der Hydroxylgruppe des Aminosäurerests Y82 und dem Carbonylsauerstoff der Prolyl-Bindung lokalisiert, dass es den Übergangszustand durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert. Die hier aufgeführten Berechnungen und Simulationen setzen voraus, dass als Startpunkte für eine solch theoretischen Betrachtung von FKBP/Substrat-Komplexen die dreidimensionalen Strukturen der hFKBP12/FK506-Komplexe benutzt werden können. Wie in diesem Abschnitt bereits beschrieben, ist diese Voraussetzung jedoch nicht ausreichend durch experimentelle Befunde gesichert.

1.2.3 Parvuline

Der erste Vertreter dieser PPIase-Familie wurde 1994 aus *E. coli* isoliert [86]. Die Aktivität dieser PPIase konnte weder durch FK506 noch durch CsA inhibiert werden. Seitdem wurden 13 verschiedene PPIasen des Parvulintyps auf ihre Enzymaktivität untersucht (Tabelle 7-8). Aufgrund ihrer Substratspezifität können die Parvuline zu ihrer Klassifizierung in zwei

Unterfamilien aufgeteilt werden: Die Gruppe der sogenannten „phosphatspezifischen“ Parvuline bilden dabei diejenigen Enzyme, welche ihre höchste PPIase-Aktivität gegenüber Substraten mit phosphorylierten Serin- oder Threoninseitenketten in Position P1 entfalten. Alle anderen Parvuline werden zur Gruppe der „nicht phosphatspezifischen“ Parvuline zusammengefasst. Die enzymatische Aktivität aller bisher untersuchten phosphatspezifischen Parvuline liegt im Bereich zwischen 10^6 und $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, die der nicht phosphatspezifischen im Bereich von 10^3 bis $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Einen ersten Blick auf das aktive Zentrum der Parvuline erlaubte die Kristallstruktur des hPin1 im Komplex mit dem Dipeptid Ala-Pro [87]. Seitdem wurden 11 verschiedene Strukturen von PPIasen des Parvulintyps aus *H. sapiens*, *A. thaliana*, *E. coli* und *C. albicans* beschrieben (Tabelle 7-9). hPin1 gehört zu den phosphatspezifischen Parvulinen und besteht aus einer C-terminal gelegenen PPIase-Domäne und einer N-terminalen WW-Domäne. Beide Domänen interagieren mit phosphoserin- (p)S und phosphothreoninhaltigen (p)T Peptiden [88-90]. Die Aktivität der PPIase-Domäne wird nicht durch die WW-Domäne beeinflusst, wenn ein *in vitro*-PPIase-Aktivitätstest verwendet wird [91]. Die PPIase-Domäne des hPin1 wird durch ein vierblättriges, antiparalleles β -Faltblatt, welches von 4 α -Helices umgeben ist, gebildet. Das aktive Zentrum besteht aus 10 Aminosäureresten (H59, K63, R68, R69, C113, L122, M130, F134, S154 und H157). Der Prolyl-Rest des Dipeptides Ala-Pro liegt in einer hydrophoben Tasche des Enzyms, welche durch die Aminosäurereste L122, M130 und F134 gebildet wird [87]. Aufgrund dieses Komplexes wurde eine auf einem kovalenten Mechanismus beruhende Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung durch hPin1 vorgeschlagen. Als Nukleophil soll dabei die zuvor von H157 deprotonierte Sulfhydrylgruppe des Restes C113 eine kovalente Bindung mit dem Carbonylkohlenstoff der Prolyl-Bindung eingehen. Die C-N-Rotationsbarriere des Intermediates ist im Vergleich zur resonanzstabilisierten Prolyl-Bindung stark verringert. Die Aktivität der hPin1 C113A-Variante wurde, so die Autoren, in Übereinstimmung mit diesem Mechanismus 123fach und die der hPin1 H157A-Variante 17fach reduziert [89]. Mit dem vorgeschlagenen Mechanismus stimmt auch die beobachtete glockenförmige pH-Wert-Abhängigkeit mit errechneten pK_s -Werten von 5,6 und 7,5 der hPin1-Aktivität gegenüber dem Substrat Suc-AEPF-pNA überein. Weitergehende Untersuchungen bestätigen, dass der sich ändernde Protonierungsgrad des Restes H59 für die verringerte Aktivität des hPin1 unterhalb von pH 6 verantwortlich ist. Die Katalyse von Substraten ohne negative Ladung in der P1-Position liefert für hPin1 ein pH-Wert-unabhängiges k_{kat}/K_M -Profil. Dies wurde mit der relativ unspezifischen Bindung dieser Substrate im aktiven Zentrum erklärt. Für solche Substrate wurde angenommen, dass die C-N-Rotationsbarriere der Prolyl-Bindung durch die allgemeine Desolvatation im aktiven Zentrum von hPin1 erniedrigt wird [29]. hPin1 katalysiert Substrate mit phosphorylierten Seitenketten in P1-Position um Faktor 1300 effektiver als die entsprechenden

nichtphosphorylierten Substrate. Dabei konnte die effektivste Beschleunigung festgestellt werden, wenn der Phosphatrest des Substrates in seiner dianionischen Form vorlag [29]. Weitere enzymkinetische Untersuchungen zeigten, dass für eine produktive Substratbindung ein Minimum von drei Peptidbindungen im Substrat notwendig ist [92]. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen für die beiden anderen PPIase-Familien überein. Es scheint, dass eine ausgedehnte Substrat/Enzym-Interaktion im Falle der PPIasen notwendig ist, um den Übergangszustand zu stabilisieren. Ähnlich wie für hFKBP12 beschrieben, toleriert auch hPin1 die Anwesenheit von D-Aminosäureresten in der P1-Position von Substraten nicht [92].

Durch eine Ansammlung von positiv geladenen Seitenketten (K63, R68, R69) in der β 1/ α 1-Schleife wird in der Kristallstruktur des hPin1 ein Sulfat-Ion in der Nähe des aktiven Zentrums komplexiert [87]. Es wurde diskutiert, dass diese Sulfatbindestelle unter physiologischen Bedingungen von einem Phosphatrest besetzt wird. Der geringe Abstand zum aktiven Zentrum legte die Vermutung nahe, dass diese Ansammlung an positiven Seitenketten die Phosphatspezifität von hPin1 determiniert. Die bloße Anwesenheit einer negativen Ladung in der P1-Position des Substrates (wie z.B. in Suc-AEPF-pNA) reicht nicht aus, um die gesamte katalytische Aktivität von hPin1 zu entfalten [29, 89]. Enzymvarianten, bei denen die Seitenketten R68 und R69 gleichzeitig gegen Leucyl-Reste ersetzt wurden, zeigten keine Präferenz zu Substraten mit (p)S- oder (p)T-Resten in der P1-Position mehr [91]. Durch die Untersuchung der entsprechenden Einzelvarianten wurde nachgewiesen, dass der Austausch R69L die Katalyse rund 50mal so stark verringerte wie der Austausch R68L. Die Beobachtung, dass die für die Sulfat/Phosphatbindung verantwortliche β 1/ α 1-Schleife im ligandfreien Zustand aus dem aktiven Zentrum herausgedreht ist, gab Grund zu der Vermutung, dass diese Schleife während der Substratbindung und Produktfreisetzung als eine Art „Deckel“ auf- und zuklappt [90]. Diese Theorie konnte jedoch durch strukturelle Untersuchungen an hPin1 in Lösung mittels NMR-spektroskopischen Methoden nicht bestätigt werden [93].

Weitere strukturelle Untersuchungen an PPIasen des Parvulintyps haben zum Verständnis des PPIase-Mechanismus beigetragen. So zeigte die durch NMR-spektroskopische Methoden ermittelte dreidimensionale Struktur eines zu hPin1 sequenzhomologen Parvulins aus *A. thaliana* (Pin1At) deutliche Unterschiede in der Feinstruktur des aktiven Zentrums [94]. Die Seitenkette des C70 war im Gegensatz zum Rest C113 des hPin1 nicht zum aktiven Zentrum orientiert, was eine direkte Interaktion der Sulfhydrylgruppe mit dem Substrat unwahrscheinlich macht. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass die Zugabe von Substrat zum Protein nur geringe oder keine Veränderungen der chemischen Umgebung der Seitenketten L79, C70, H12 und H114 (homolog zu L122, C113, H59 und 157 in hPin1) zur Folge hatte, wie es bei einer Beteiligung dieser Reste an der Katalyse zu erwarten wäre. Aus der starken Änderung der chemischen

Verschiebung des Restes S154 nach Substratzugabe folgerten die Autoren, dass nicht die SH-Gruppe des C70, sondern die Hydroxylgruppe des S154 (homolog zu S157 in hPin1) am direkten nukleophilen Angriff auf die Prolyl-Bindung des Substrates beteiligt ist. Die Ergebnisse der Untersuchungen an *E. coli* Par10, einem Vertreter der nichtphosphatspezifischen Parvuline, widersprechen ebenfalls der Beteiligung eines Cysteinyl-Restes an der Katalyse. So konnte nachgewiesen werden, dass der enzyminaktivierende Effekt von Juglon nicht primär auf die kovalente Modifizierung des Cysteins im aktiven Zentrum zurückzuführen ist, sondern dass vielmehr eine der Modifizierung nachgeschaltete lokale Entfaltung des aktiven Zentrums zur Inaktivierung führt [95]. Die Rolle des Nucleophils kann im Falle des *E. coli* Par10 nicht durch den für Pin1At vorgeschlagenen Seryl-Rest übernommen werden, da an dieser Position in *E. coli* Par10 ein Valyl-Rest zu finden ist. Ein paarweiser Vergleich der Aminosäuresequenzen der als aktiv beschriebenen Parvuline ergab, dass sowohl C113 als auch S154 nur in den phosphatspezifischen Enzymen konserviert sind; nichtphosphatspezifische Parvuline zeigen in den entsprechenden Positionen eine deutlich größere Sequenzdiversität (Tabelle 7-8). Nur die Positionen 59, 134 und 157 (hPin1-Zählweise) sind mit Ausnahme des *E. coli* PPIID in allen Vertretern identisch.

Im Gegensatz zu den hochaktiven PPIasen *E. coli* Par10 und hPin1 besitzt der zweite humane Vertreter dieser PPIase-Familie, humanes Parvulin 14 (hPar14) nur eine geringe Aktivität gegenüber Oligopeptid-Substraten ($k_{\text{kat}}/K_M \approx 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Dabei setzt das Enzym bevorzugt Peptide mit positiv geladenen Seitenketten in P1-Position um [96]. Diese im Vergleich mit hPin1 umgekehrte Substratspezifität liegt in einer verkürzten Schleifenregion begründet, in der sich im hPin1 die positiv geladenen Seitenketten K63, R68 und R69 befinden. Zwei dieser positiv geladenen Seitenketten sind im hPar14 gegen negativ geladene Seitenketten ausgetauscht [97]. Einige der Aminosäurereste des aktiven Zentrums von hPin1 sind in diesem Enzym nicht konserviert, so sind anstelle des Restes C113 und S154 im hPar14 die Reste D74 und F120 im aktiven Zentrum zu finden.

Für diese PPIase-Familie sind bis zu heutigen Tag im Vergleich zu Cyclophilinen und FKBP nur relativ wenige enzymologische Untersuchungen durchgeführt worden. Die hier zusammengetragenen Befunde lassen noch kein eindeutiges Bild davon entstehen, wie Parvuline ihre enzymatische Aktivität entfalten.

2 Ziele der Arbeit

Wie im einleitenden Abschnitt dargelegt wurde, ist der Katalyse-Mechanismus der PPIasen noch immer nicht im Detail verstanden. Das Ziel dieser Arbeit war es, die molekulare Funktionsweise von PPIasen näher zu charakterisieren. Durch die vergleichende Untersuchung von PPIasen aller drei PPIase-Familien sollten Gemeinsamkeiten und Unterschiede der von diesen Enzymen verwendeten Katalysemechanismen festgestellt werden. Dazu sollten die verschiedenen PPIasen und davon abgeleitete Enzym-Varianten mittels enzymkinetischer Untersuchungen charakterisiert werden. Dabei sollte insbesondere auf eine etwaige Diffusionskontrolle der PPIase-katalysierten Reaktion eingegangen werden. Durch Lösungsmittelisotopenexperimente sollte versucht werden, die Struktur des Übergangszustandes der Reaktion näher zu beleuchten. Neben den enzymkinetischen Untersuchungen sollte auch die thermodynamische Charakterisierung der Interaktion von PPIasen mit peptidischen Liganden im Mittelpunkt des Interesses stehen. Der Vergleich der thermodynamischen und kinetischen Ergebnisse sollte es ermöglichen, neue Informationen über die Art und Weise zu erhalten, wie PPIasen die Rotationsbarriere so effizient erniedrigen.

Des Weiteren sollte versucht werden, eine Messmethode zu etablieren, die es ermöglicht, Strukturänderungen in Proteinen und Peptiden auf kalorimetrischer Basis zu detektieren. Diese Methode sollte in der Lage sein, sowohl langsame Faltungsprozesse der Proteinfaltung zu detektieren, als auch langsame konformationelle Änderungen in Peptiden zu registrieren. Zur Überprüfung der Methode sollten die Faltungsprozesse eines gut charakterisierten Proteins nachvollzogen und die damit verbundenen thermodynamischen und kinetischen Parameter bestimmt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Antibiotika	Roche Diagnostics (Mannheim)
Agar	Sigma-Aldrich (München)
Acetonitril	Serva (Heidelberg)
Cacodylat	Serva (Heidelberg)
Coomassie Brilliantblau R250	Serva (Heidelberg)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (München)
Essigsäure	Merk Eurolab (Darmstadt)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Glycerol	Merk Eurolab (Darmstadt)
Guanidiniumhydrochlorid	AppliChem (Darmstadt)
Hefeextrakt Select 150	Invitrogen (Karlsruhe)
HEPES	Serva (Heidelberg)
IPTG	AppliChem (Darmstadt)
Isopropanol	Merck Eurolab (Darmstadt)
Lithiumchlorid (LiCl)	Serva (Heidelberg)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck Eurolab (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg)
Natriumacetat	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
MES	Serva (Heidelberg)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Peptidsubstrate	Bachem (Heidelberg)
Pepton Select 150	Invitrogen (Karlsruhe)
Protease Inhibitor Mix	Roche Diagnostics (Mannheim)
Rohrzucker	Roth (Karlsruhe)
Sterilfilter 0,2 µM	Schleicher & Schüll (Dassel)
SDS	Calbiochem, Schwalbach
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Serva (Heidelberg)
Trifluorethanol, wasserfrei (TFE)	Sigma-Aldrich (München)
VivaSpin (6 kDa)	Sartorius (Göttingen)

3.2 Chromatographiematerialien

Fractogel EMD-DEAE-650(M)	Merck Eurolab (Darmstadt)
Fractogel EMD-SO ₃ ⁻ -650(M)	Merck Eurolab (Darmstadt)
Fractogel TSK-AF-Blue	Merck Eurolab (Darmstadt)
HiLoad Superdex 75 HR 16/60	Amersham Pharmacia (Freiburg)

3.3 Proteine

10 kDa Proteinstandard	Invitrogen (Karlsruhe)
α-Chymotrypsin	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Monomeres Rinderserumalbumin (BSA)	Boehringer Mannheim (Mannheim)
RNase A	Serva (Heidelberg)
Trypsin	Merck Eurolab (Darmstadt)

Von Dr. J. U. Rahfeld wurden folgende gereinigte Proteine zur Verfügung gestellt: *E. coli* Par10, *E. coli* Par10 C40A, *E. coli* Par10 C40D, RCM RNase T1 (S54G/P55N), und hPin1. Die hPin1-Varianten hPin1 R68A und hPin1 R69A wurden von Herrn S. Daum gereinigt. Überexpressionsklone der Cyclophilin-Varianten hCyp18 Q63N, hCyp18 Q63E hCyp18 F113A hCyp18 H126F und wurden freundlicherweise von Dr. C. Schiene-Fischer und Dr. T. Kamphausen bereitgestellt. Die Überexpressionsklone für hCyp18, hCyp18 R55A, hCyp18 H126A, hPin1 ΔWW und hFKBP12 wurden der Stammsammlung der Arbeitsgruppe entnommen. CsA wurde von Dr. Y. Zhang bereitgestellt.

3.4 Geräte

CD-Spektrometer Jasco J710	Jasco (Gross-Umstadt)
Chromatographiesystem	Amersham Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Diodenarray-Spektrometer HP8453	Agilent Technologies (Böblingen)
Elektrophorese Apperatur	Biometra (Göttingen)
Fluoreszenzspektrophotometer F-3010	Hitachi (Tokyo, Japan)
FPLC	Amersham Pharmacia (Uppsala, Schweden)
French Press	SLM Aminco (Rochester, USA)
Sorvall M120GX, Ultrazentrifuge	Kendo
pH-Meter	Mettler-Toledo (Giessen)
Feinwaage	Sartorius (Göttingen)
VP-ITC	MicroCal (Northampton, USA)

3.5 Verwendete *E. coli*-Stämme

Tabelle 3-1: Verwendete *E. coli*-Stämme und Plasmide

Stamm	Plasmid	exprimiertes Protein	Resistenz
M15	pQE70	hCyp18	Ampicillin, Kanamycin
M15	pQE70	hCyp18 R55A	Ampicillin, Kanamycin
M15	pQE70	hCyp18 H126A	Ampicillin, Kanamycin
M15	pQE70	hCyp18 H126F	Ampicillin, Kanamycin
M15	pQE70	hCyp18 Q63N	Ampicillin, Kanamycin
M15	pQE70	hCyp18 F113A	Ampicillin, Kanamycin
M15	pQE70	hCyp18 Q111T	Ampicillin, Kanamycin
BL21	pET28a	hPin1 Δ WW	Kanamycin
M15	pQE60	hFKBP12	Ampicillin, Kanamycin

3.6 Zellanzucht und Zellaufschluss

Alle im Folgenden beschriebenen Kulturmedien enthielten in Abhängigkeit vom verwendeten *E. coli*-Stamm, bzw. vom verwendeten Überexpressionsplasmid, entweder 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin (pQE70 und pQE60 in *E. coli* M15) oder 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin (pET28a in *E. coli* BL21). Die zur Überexpression verwendeten *E. coli*-Stämme wurden aus den Glycerolkulturen der Stammsammlung auf LB-Agar-Platten (10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 15 g/l Agar) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Ausgehend von einer Einzelkultur wurden am nächsten Tag 6 ml LB-Medium (10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) angeimpft, nach 6 h Wachstum bei 37°C im Schüttelinkubator bei 210 U/min wurde die Suspension zum Animpfen von 6×25 ml LB-Medium verwendet. Nach Inkubation über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C und 210 U/min wurden die Zellen durch Zentrifugation (8000 g, 10 min) sedimentiert, der Überstand verworfen und anschließend in 6×10 ml LB-Medium resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde danach zum Inokulieren von 6×1 l 2fach YT-Medium (16 g/l Pepton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) verwendet. Die Kulturen wurden beim Erreichen einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600}=0,5$ bei 37°C mit 1 mM IPTG induziert. Nach weiteren 5 h Wachstum unter denselben Bedingungen wurden die Zellen sedimentiert (8 min, 8000×g), der klare Überstand verworfen und bei -80°C aufbewahrt. Zum Zellaufschluss wurden 35 g Zellmasse in 70 ml eiskalten Puffer (20 mM Tricin-Puffer, pH 8) aufgenommen, homogenisiert und durch dreifache „French Press“-Passage mechanisch aufgeschlossen. Durch

Ultrazentrifugation (45 min, 100.000×g) wurden vom Lysat unlösliche Bestandteile abgetrennt. Der klare Überstand wurde zur weiteren Reinigung der überexprimierten Proteine verwendet.

3.7 Präparation von Cyp18 und dessen Varianten, hFKBP12 und hPin1 Δ WW

Der pH-Wert des Lysats wurde auf pH 8,0 eingestellt und anschließend auf eine mit 20 mM Tricin-Puffer (pH 8,0) äquilibrierten Fractogel EMD-DEAD-650(M)-Säule (2,5 cm×20 cm) aufgetragen. Der Durchlauf des Chromatographieschrittes wurde aufgefangen und auf eine Fractogel TSK-AF-Blue-Säule (1 cm×6 cm) aufgetragen. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte durch einen linearen KCl-Gradienten (0-3 M KCl in 200 ml 20 mM Tricin, pH 8,0). Das Eluat wurde fraktioniert aufgefangen und mittels SDS-Page analysiert. Fraktionen, die das gesuchte Protein enthielten, wurden vereinigt und zweimal gegen 2 l 35 mM HEPES (pH 7,0) dialysiert. Anschließend wurde das Proteingemisch auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Fractogel SO₃⁻-650(M)-Chromatographiesäule (1 cm×9 cm) aufgetragen. Die gebundenen Proteine konnten mit einem 0-1 M NaCl-Gradienten (in 100 ml 35 mM HEPES, pH 7,0) fraktioniert von der Säule eluiert werden. Das Eluat wurde mittels SDS-Page analysiert und diejenigen Fraktionen vereinigt, die das gesuchte Protein enthielten. Die erhaltene Proteinlösung wurde mittels „Vivaspin“-Konzentratoren auf ein Volumen von 10 ml eingeeengt und in 1 ml Aliquots auf eine HiLoad Superdex 75 HR 16/60 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Elution des Proteins erfolgte in 35 mM HEPES, pH 7,8 (100 mM NaCl). Das in der SDS-PAGE homogene Protein wurde aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Alle gereinigten Proteine wurden mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert, die erhaltenen molekularen Massen stimmten im Rahmen des Fehlers der Methode mit den aus der Primärsequenz bestimmten Massen überein.

3.8 Analytische Methoden

3.8.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Page wurde nach der von Laemmli beschriebenen Methode durchgeführt [98]. Alle Proteine wurden in einer 15%igen SDS-PAGE untersucht. Die Anfärbung der Gele erfolgte durch Coomassiefärbung [99].

3.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteingemische wurden nach der Methode von Bradford mit BSA als Standard quantifiziert [100]. Zur Ermittlung der Konzentration von homogenen Proteinproben wurden UV-Vis-Spektren im Bereich von 210 bis 500 nm aufgenommen. Die erhaltenen Proteinspektren wurden numerisch durch Subtraktion der Pufferspektren korrigiert. Alle verwendeten Lösungen wurden zuvor entgast und filtriert. Der zur Berechnung notwendige molare Extinktionskoeffizient wurde

für RNase A aus der Literatur entnommen ($9800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) oder nach der Methode von Grill und von Hippel aus der Primärsequenz der Proteine berechnet [101].

3.8.3 Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen mittels MALDI-TOF-MS

Die massenspektrometrischen Analysen wurden von Dr. A. Schierhorn (MPG, Halle) durchgeführt. Die Spektren wurden an einem Reflex-Massenspektrometer der Firma Bruker (Bremen) im linearen Modus aufgenommen. Als Matrix diente eine gesättigte Lösung Sinapinsäure in einem Acetonitril/Methanol/Wasser-Gemisch im Verhältnis 3:2:5 (v/v/v).

3.8.4 CD-Spektroskopie

Alle Spektren wurden bei 25°C in destilliertem Wasser an einem Jasco CD-Spektrometer aufgenommen. Die Proteinkonzentration von hCyp18 wurde zuvor mittels UV-Vis-Spektroskopie mit $37 \mu\text{M}$ bestimmt. Fern- und Nah-UV-Spektren wurden in Quarzglasküvetten mit 1 mm bzw. 10 mm Schichtdicke aufgenommen. Zur Bestimmung der Proteinstabilität des hCyp18 bei pH-Werten zwischen 5 und 9 wurde die gleiche wässrige Proteinlösung mittels verdünnter HCl- oder NaOH-Lösung auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt und anschließend ein Nah- und Fern-UV-Spektrum aufgezeichnet. Pufferspektren wurden benutzt, um die Proteinspektren numerisch zu korrigieren.

Die temperaturinduzierte Entfaltung und Aggregation von hCyp18 und des Komplexes hCyp18/CsA wurden bei einer Wellenlänge von 222 nm in einem Temperaturbereich von 20 bis 70°C verfolgt. Die Enzymkonzentration bzw. die Konzentration des hCyp18/CsA-Komplexes lag in beiden Experimenten bei $34 \mu\text{M}$. Der Versuch wurde in 25 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 durchgeführt. Es wurde eine Quarzglasküvette mit 1 mm Schichtdicke verwendet. Die Heizrate betrug $0,25^\circ\text{C}/\text{min}$.

3.8.5 Kalorimetrie

Allgemein: Alle Untersuchungen erfolgten mit einem VP-ITC-Kalorimeter der Firma MicroCal. Die korrekte Funktionsweise des Kalorimeters wurde in regelmäßigen Zeitintervallen von zwei Monaten wie vom Hersteller empfohlen überprüft. Die Referenzzelle des Kalorimeters wurde mit destilliertem, entgastem und sterilfiltriertem Wasser befüllt. Für Versuche zur Bestimmung der thermodynamischen Konstanten von Protein/Ligand-Interaktionen wurde das Protein zweimal gegen zwei Liter des im Ergebnisteil angegebenen Puffers für zwei Stunden dialysiert, unter Vakuum entgast und anschließend dessen Proteinkonzentration spektroskopisch bestimmt. In den Fällen, in denen die Experimente in D_2O erfolgten, wurde die Proteinlösung 5mal gegen 20 ml des entsprechenden Puffers dialysiert.

3.8.5.1 hCyp18/CsA Interaktion

Für ein typisches Experiment wurde aus einer frisch hergestellten 10 mM CsA-Stammlösung in DMSO eine 2 bis 20 μM -Lösung in dem jeweils verwendeten Puffer hergestellt. Von dieser Lösung wurden 3 ml unter Vakuum entgast und anschließend in die Messzelle des Kalorimeters gefüllt. Die Titrationsapparatur wurde mit dem zuvor dialysierten hCyp18 befüllt. Um eine Sättigung des CsA mit hCyp18 zu ermöglichen, lag die Proteinkonzentration in der Titrationsapparatur in allen Experimenten mindestens 7fach über der CsA-Konzentration in der Messzelle. Die Experimente wurden mit der CsA-Lösung in der Messzelle durchgeführt, da dieser hydrophobe Ligand in wässrigen Lösungen schlecht löslich ist. Zur schnelleren Durchmischung von hCyp18 und CsA während des Experimentes wurde die Messzelle mit 510 U/min gerührt. Die Titration erfolgte, von der Software gesteuert, automatisch; dem ersten Titrationsschritt von 2 μl folgten mindestens 15 weitere, bis das CsA in der Messzelle vollständig gesättigt war. Die einzelnen Titrationschritte wurden in einem Abstand von 300 s gestartet. Die durch die Interaktion von CsA und hCyp18 bei jedem Titrationsschritt auftretende Wärme wurde automatisch aufgezeichnet. Um etwaige unspezifische Wärmeentwicklung, hervorgerufen durch die Verdünnung des hCyp18, zu ermitteln, wurde nach Beendigung des Experiments ein Kontrollversuch unter identischen Versuchsbedingungen durchgeführt, dabei wurde hCyp18 in den zuvor zur Dialyse verwendeten Puffer titriert. Mithilfe der vom Hersteller bereitgestellten Software wurden die erhaltenen Messsignale für die hCyp18/CsA-Interaktion durch die im Kontrollversuch erhaltenen Messsignale korrigiert. Zur Bestimmung der Bindungsenthalpie (ΔH_{ITC}), der Assoziationskonstante (K_A) und der Stöchiometrie (N) der Bindung wurden die Parameter eines Bindungsmodells, das eine einzige Bindungsstelle im Enzym voraussetzt, unter Benutzung der vom Hersteller mitgelieferten Auswertungssoftware an die korrigierten Wärmemengen angepasst. Aus den erhaltenen Parametern konnte die Änderung der freien Enthalpie der Bindung (ΔG_{ITC}) und die Änderung der Entropie (ΔS_{ITC}) nach Gleichung 1 und Gleichung 2 berechnet werden.

$$\text{Gleichung 1} \quad \Delta G_{\text{ITC}} = -RT \ln K_A$$

$$\text{Gleichung 2} \quad \Delta G_{\text{ITC}} = \Delta H_{\text{ITC}} - T\Delta S_{\text{ITC}}$$

Die thermodynamischen Parameter wurden mit dem Index „ITC“ versehen, da die Experimente nicht unter den für biologische Experimente definierten Standardbedingungen (pH 7,0) durchgeführt wurden. Die Ergebnisse wurden nicht in der SI-Einheit Joule (J), sondern in Kalorien (cal) angegeben, um eine leichte Vergleichbarkeit mit Literaturwerten gewährleisten zu können. Die Varianten des hCyp18 wurden nach dem gleichen Protokoll untersucht.

3.8.5.2 hCyp18/Suc-AFPF-pNA-Interaktion

Zur Untersuchung der Substrat/Enzym-Interaktion wurde das gegen 25 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,5) dialysierte hCyp18 (320 μM) in der Messzelle vorgelegt. Das Peptid (4,3 mM) wurde gegen denselben Puffer dialysiert und anschließend in die Titrationsapparatur gefüllt. Zuvor wurde die Konzentration des Peptides mittels UV-Vis-Spektroskopie bei 390 nm bestimmt. Dazu wurden 20 μl der Peptidstammlösung mit 1960 μl 35 mM HEPES-Puffer (pH 7,8) und 20 μl Chymotrypsin (100 mg/ml) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Konzentration des Peptides ergibt sich mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten des durch die Protease freigesetzten 4-Nitro-Anilins ($13454 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Die Zugabe des Substrates zum kalorimetrischen Messansatz erfolgte automatisch in Titrationschritten zu je 8 μl . Der erste Titrationschritt von 2 μl wurde nicht zur Auswertung herangezogen. Im Übrigen erfolgte die Durchführung und Auswertung wie unter 3.8.5.1 beschrieben.

3.8.5.3 hPin1/Ligand Interaktion

Die Ligand-Stammlösung (10 mM) wurde in Wasser hergestellt und zu einer Endkonzentration von 100 μM mit dem zur Dialyse des Proteins verwendeten Puffers verdünnt. Anschließend wurde die Lösung unter Vakuum entgast und in die Titrationsapparatur gefüllt. Lösungen von hPin1 und dessen Varianten (rund 10 μM) wurden gegen die im Ergebnisteil genannten Puffer dialysiert (2 \times 2 h gegen 2 l), unter Vakuum entgast, deren Proteinkonzentration spektroskopisch bestimmt und in die Messzelle gefüllt. Der Ligand wurde während des Experiments automatisch in 18 μl -Schritten in die Messzelle titriert. Der erste Titrationschritt hatte ein Volumen von 2 μl und wurde nicht zur Auswertung verwendet. Die weitere Durchführung und Auswertung der Experimente erfolgte wie bereits unter 3.8.5.1 beschrieben.

3.8.5.4 Berechnung der thermodynamischen Parameter ΔC_p und $\Delta H(60^\circ\text{C})$

Die Methode nach Freire erlaubt es, die thermodynamischen Parameter ΔC_p und $\Delta H(60^\circ\text{C})$ zu berechnen, wenn die molekulare Struktur der interagierenden Proteine/Ligand-Komplexe bekannt ist [102, 103]. Die Parameter berechnen sich nach Gleichung 3 und Gleichung 4. Dabei stellen die Größen $\Delta\text{ASA}_{\text{polar}}$ und $\Delta\text{ASA}_{\text{unpolar}}$ die durch die Komplexbildung hervorgerufene Änderung der wasserzugänglichen polaren bzw. unpolaren Oberflächebereiche des Proteins und des Liganden dar. Als polare Bereiche wurden all jene wasserzugänglichen Oberflächenbereiche gewertet, die mit polaren Atomen wie Schwefel, Sauerstoff und Stickstoff assoziiert sind. Alle anderen Oberflächenbereiche wurden als unpolar klassifiziert. Die Größen der Parameter $a=0,45 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$, $b=-0,26 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$, $c=31,4 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ und

$d=8,44 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ wurden der Literatur entnommen [102, 103]. Zur Berechnung der Oberflächen wurde die Software „Grasp“ oder „Getarea 1.1“ genutzt [104, 105]. Die zur Generierung der wasserzugänglichen Oberfläche notwendige idealisierte, virtuelle Wasserkugel hatte einen Durchmesser von 1.4 \AA .

$$\text{Gleichung 3} \quad \Delta C_{P \text{ theor.}} = a \cdot \Delta ASA_{\text{unpolar}} + b \cdot \Delta ASA_{\text{polar}}$$

$$\text{Gleichung 4} \quad \Delta H(60^\circ\text{C}) = c \cdot \Delta ASA_{\text{polar}} + d \cdot \Delta ASA_{\text{unpolar}}$$

3.8.5.5 Kinetische Untersuchungen mittels Kalorimetrie

Allgemein: Die Konzentration der verwendeten GdmHCl-Lösungen wurde durch die Bestimmung des Brechungsindex kontrolliert [106]. Alle verwendeten Lösungen wurden kurz vor dem Experiment unter Vakuum entgast. Die Titrationsapparatur und die Messzelle wurden mit den im Ergebnisteil angegebenen Puffern befüllt. Anschließend wurde das gesamte System solange unter Rühren (510 U/min) äquilibriert, bis keine Basisliniendrift mehr zu erkennen war. Die Basislinie wurde für mindestens 20 min aufgezeichnet. Der Start des Experimentes erfolgte durch die manuelle Injektion der zu analysierenden Probe mittels einer gasdichten Glasspritze in die Messzelle. Dazu wurde die Titrationsapparatur entfernt, die Probe injiziert und das System unverzüglich wieder zusammengesetzt. Die Gerätesoftware zum Aufzeichnen des Messsignals wurde manuell gestartet. Das System benötigte üblicherweise zwischen 250 und 400 s, um die durch die Injektion der Probe und durch den Ein- und Ausbau der Titrationsapparatur hervorgerufenen thermischen Störungen auszugleichen. Während dieser Zeit lag das aufgezeichnete Messsignal außerhalb des Messbereiches des Kalorimeters. Die Auswertung der erhaltenen Thermogramme erfolgte mit SigmaPlot für Windows Version 8.

3.8.5.6 RNase A-Rückfaltungsexperimente

Die Renaturierung von verschiedenen Konzentrationen an vollständig entfalteter RNase A (5 M GdmHCl, 50 mM Glycin-Puffer, pH 2,0) wurde durch die Injektion von $100 \mu\text{l}$ des Entfaltungsansatzes in die den Renaturierungspuffer enthaltende Messzelle gestartet. Die Endkonzentrationen an RNase A im Rückfaltungsansatz lagen zwischen $43,5$ und $290 \mu\text{M}$. Die genaue Konzentration wurde nach Beendigung des Experiments spektroskopisch bestimmt. Für Experimente in denen L.p.Mip die Rückfaltung von RNase A beschleunigte, wurde die PPIase ($240 \mu\text{M}$) im Rückfaltungspuffer gelöst, in die Titrationsapparatur gefüllt und 250 s nach dem Start des Faltungsexperimentes zum Reaktionsansatz titriert.

Zur Berechnung der während der Rückfaltung ausgetauschten Wärme wurden die Parameter von Gleichung 5 oder Gleichung 6 an die erhaltenen Rückfaltungskinetiken angepasst. Wobei A die

Lage der Basislinie charakterisiert, B und C die Amplituden der beobachteten Reaktion sind und k, bzw. k_1 und k_2 die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten darstellen. Zur besseren Vergleichbarkeit der erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten mit den in der Literatur verwendeten Zeitkonstanten wurden die reziproken Werte der Geschwindigkeitskonstanten errechnet.

$$\text{Gleichung 5} \quad Q(t) = A + B \cdot (1 - e^{-kt})$$

$$\text{Gleichung 6} \quad Q(t) = A + B \cdot (1 - e^{-k_1 t}) + C \cdot (1 - e^{-k_2 t})$$

Mit Hilfe der bekannten Proteinkonzentration, dem gegebenen Volumen der Messzelle (1,45 ml) und des während der RNase A-Renaturierung auftretenden Gesamtwärmeumsatzes wurde die Enthalpie der Rückfaltung ($\Delta H_{\text{Faltung}}$) berechnet.

3.8.5.7 Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung von Ala-Pro (AP) und Ala-Ala-Pro (AAP)

Um pH-Wert-Sprungexperimente durchzuführen, wurden die Peptide (AP und AAP) mit einer ungefähren Endkonzentration von 50 mM in Wasser gelöst. Der benötigte pH-Wert von entweder pH 2,1 oder 7,5 wurde durch Zugabe von verdünnter HCl oder NaOH eingestellt. Die pH-Wert-Sprungexperimente wurden durch die Injektion von 100 μl der Peptidstammlösung in die Messzelle gestartet. Die Messzelle und die Titrationsapparatur enthielten in Abhängigkeit vom pH-Wert der Peptidlösung 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 oder pH 2,1.

Zur Durchführung von Lösungsmittelsprungexperimenten wurde von dem Peptid AAP eine rund 50 mM Stammlösung in wasserfreien 0,47 M LiCl/TFE angefertigt. Der Start der Lösungsmittelsprungexperimente erfolgte durch die manuelle Injektion von 50 μl der AAP 0,47 M LiCl/TFE Stammlösung in die Messzelle des Kalorimeters. Sowohl die Messzelle als auch die Titrationsapparatur waren mit 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,5) befüllt. Die Endkonzentration von allen Stammlösungen wurde mittels NMR-Spektroskopie bestimmt (siehe 3.8.6).

Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante (k_{obs}) wurde durch die Anpassung der Signal/Zeitkurve an ein Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung erhalten. Diese Geschwindigkeitskonstante setzt sich aus den mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten der *cis*- nach *trans*-Isomerisierung ($k_{c/t}$) und deren Rückreaktion ($k_{t/c}$) zusammen. Da die Gleichgewichtskonstante ($K_{c/t}$) der untersuchten Peptide unter den hier verwendeten Bedingungen mittels NMR-Spektroskopie ermittelt wurde, konnte aus Gleichung 7 und Gleichung 8 die Geschwindigkeitskonstante $k_{c/t}$ berechnet werden.

Gleichung 7
$$k_{obs} = k_{c/t} + k_{t/c}$$

Gleichung 8
$$K_{c/t} = \frac{k_{t/c}}{k_{c/t}}$$

Aus der Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstante konnte nach Gleichung 9 der enthalpische Unterschied (ΔH^0) zwischen den zwei Grundzuständen (*cis* und *trans*) der Peptide ermittelt werden.

Gleichung 9
$$\ln K_{c/t} = \left(\frac{-\Delta H^0_{c/t}}{R} \right) \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^0_{c/t}}{R}$$

Durch die Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstante k_{obs} für die *cis/trans*-Isomerisierung der untersuchten Peptide konnte unter Verwendung von Gleichung 10 die Änderung der Enthalpie und Entropie im Übergangszustand ermittelt werden.

Gleichung 10
$$\ln \left(\frac{k_{c/t}}{T} \right) = \left(\frac{-\Delta H^\ddagger_{c/t}}{R} \right) \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^\ddagger_{c/t}}{R} + \ln \left(\frac{k_b}{h} \right)$$

Die verwendeten Peptidstammlösungen wurden mittels NMR-Spektroskopie auf ihre Stabilität unter den hier verwendeten Bedingungen überprüft.

3.8.5.8 Konformationelle Umwandlung von Ac-(Pro)₁₃-NH₂

5 mg von Ac-(Pro)₁₃-NH₂ wurden durch Inkubation in 50 ml Isopropanol über Nacht in die all-*cis*-Konformation (Polyprolin-I) überführt. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Rotationsverdampfer verdampft. Das zurückbleibende Peptid wurde in 100 µl 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,5) aufgenommen und sofort in die Messzelle injiziert. Die Messzelle wurde zuvor mit dem gleichen Puffer gefüllt und äquilibriert. Unter diesen Pufferbedingungen wandelt sich das Peptid von der all-*cis*-Form in die all-*trans*-Form (Polyprolin-II) um.

3.8.6 NMR-spektroskopische Untersuchungen an AP und AAP

Die Bestimmung der Konzentration, sowie der Stabilität der verwendeten Peptid-Stammlösungen (AP und AAP) erfolgte durch Dr. Lücke mittel NMR-Spektroskopie. Des Weiteren wurde mittels NMR-spektroskopischen Methoden die Temperaturabhängigkeit des Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Gleichgewichtes dieser Peptide bestimmt.

3.8.7 PPIase-Aktivitätstests

Allgemein: Das hier verwendete Protokoll beruht auf der von Fischer *et al.* beschriebenen Vorschrift zur Untersuchung von PPIasen mittels isomerspezifischer Proteolyse [3]. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Experimente bei 10°C an einem Diodenarray-Spektrophotometer HP8453 durchgeführt. An Tagen mit hoher Luftfeuchtigkeit wurde die Küvette mit Stickstoff umspült, um ein Beschlagen der Glasoberflächen zu vermeiden. Typischerweise wurde der Reaktionsansatz während der Vorinkubationszeit (4 min) und der eigentlichen Messung (2 bis 6 min) ständig gerührt. Die Signalaufzeichnung erfolgte automatisch mit der vom Hersteller gelieferten Software. Die Absorption/Zeitkurven von allen proteasegekoppelten Tests wurden kontinuierlich aufgenommen. Im ungekoppelten Test (basierend auf dem Test beschrieben von Janowski *et al.* [107]) wurde die Änderung der Absorption aller 2 s aufgezeichnet, wobei zur Verbesserung des Signal/Rauschverhältnisses jeder Messpunkt den Mittelwert der Absorptionsänderung innerhalb von 0,5 s repräsentiert.

Die aufgezeichneten Kinetiken zeigten nach einer kurzen Mischphase (<15 s) in allen Fällen den typischen Zeitverlauf einer Reaktion erster Ordnung. Die Geschwindigkeitskonstante (k_{obs}) wurde durch nichtlineare Regression bestimmt.

3.8.7.1 Bestimmung der Viskositätsabhängigkeit der PPIase-Aktivität

Zur Bestimmung der Viskositätsabhängigkeit der PPIase-Aktivität wurden die $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Werte jedes der untersuchten Enzyme in 35 mM HEPES-Puffer (pH 7,8) mit steigenden Konzentrationen an verschiedenen viskosen Zusätzen mit Hilfe des proteasegekoppelten PPIase-Aktivitätstest ermittelt. Standardmäßig wurden die Enzyme in Lösungen von 0, 5, 10, 20 und 30% (w/w) Glycerol, 0, 5, 10, 20% (w/w) Rohrzucker und 0, 0,5, 1, 1,5% (w/w) PVP360 untersucht. Die absoluten Viskositäten der Puffer wurden bei 10°C mit einem Rotationsviskosimeter bestimmt, daraus wurden die Viskositäten (η_{rel}) relativ zum verwendeten Puffer ohne viskose Zusätze berechnet (Tabelle 7-10)

Das Gesamtvolumen des PPIase-Aktivitätstests betrug 1500 μl . Es wurde der proteasegekoppelte Aktivitätstest verwendet. Die Substratstammlösungen (60 mg/ml) wurden in DMSO oder 0,47 M LiCl/TFE hergestellt und mit einer 1/1500fachen Verdünnung eingesetzt. Als isomerspezifische Protease zur Untersuchung der Substrate Suc-AAPF-pNA, Suc-AFPF-pNA, Suc-ALPF-pNA und Suc-AAPF-DFA wurde α -Chymotrypsin (100 mg/ml Stammlösung) verwendet. Die Substrate Ac-AA(P)SPR-pNA und Ac-AASPR-pNA wurden mit Trypsin (50 mg/ml Stammlösung) isomerspezifisch gespalten. Die Endkonzentration beider Proteasen betrug in jedem Fall mindestens 0,3 mg/ml. Normalerweise wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates zum vortemperierten Messansatz gestartet.

Zur Bestimmung der k_{kat}/K_M -Werte wurden die Versuchsbedingungen so gewählt, dass die Substratkonzentration im Messansatz deutlich kleiner war als der K_M -Wert der untersuchten PPIase ($[S] \ll K_M$). Unter diesen Bedingungen ergibt sich die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung nach Gleichung 11.

$$\text{Gleichung 11} \quad \frac{k_{\text{kat}}}{K_M} = \frac{k_{\text{enz}}}{[E_0]}$$

Dabei stellt $[E_0]$ die PPIase-Konzentration im Messansatz dar und k_{enz} errechnet sich aus der Differenz der beobachtenden Geschwindigkeitskonstante (k_{obs}) der katalysierten Reaktion und der Geschwindigkeitskonstanten der unkatalysierten Reaktion (k_{unkat}) (Gleichung 12).

$$\text{Gleichung 12} \quad k_{\text{enz}} = k_{\text{obs}} - k_{\text{unkat}}$$

3.8.7.2 Bestimmung des KSIE

Zur Bestimmung des KSIE wurde 35 mM HEPES-Puffer in H_2O und D_2O hergestellt. Der pH/pD-Wert wurde mittels eines pH-Meters auf 7,8 eingestellt, wobei der pD-Wert nach der Formel $\text{pH} = \text{pD} + 0,4$ berechnet wurde. Die Messungen wurden ansonsten wie für den proteasegekoppelten Test (3.8.7.1) oder den proteasefreien Test (3.8.7.5) durchgeführt. Die notwendigen Protease-Stammlösungen wurden in H_2O und D_2O hergestellt. Für die Messungen in D_2O und H_2O wurde die gleiche PPIase-Stammlösung verwendet. Lösungen mit unterschiedlichen Verhältnissen von D_2O und H_2O wurden durch volumetrisches Mischen der beschriebenen Puffer erzeugt.

3.8.7.3 Bestimmung des K_i -Wertes für hCyp18 und dessen Varianten

Die Bestimmung der Inhibitorkonstante (K_i) erfolgte im proteasegekoppelten PPIase-Aktivitätstest mit Suc-AAPF-pNA als Substrat, wie unter 3.8.7.1 dargestellt. Dazu wurde hCyp18 bzw. die davon abgeleiteten Varianten mit verschiedenen CsA-Konzentrationen für 10 min im Messansatz (35 mM HEPES pH 7,8, 10°C) vorinkubiert und anschließend die verbleibende PPIase-Aktivität bestimmt. Die erhaltene Abhängigkeit zwischen CsA-Konzentration und den entsprechenden k_{kat}/K_M -Werten wurde an ein Modell für hochaffine kompetitive Inhibitoren angepasst [108].

3.8.7.4 Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter in viskosen Lösungen

Zur Bestimmung wurde der proteasegekoppelte Test verwendet. Die Stammlösung des Substrates Suc-AFPF-pNA (50-150 mg/ml) wurde in 0,47 M LiCl/TFE hergestellt. Progresskurven wurden für 9 Substratkonzentrationen im Bereich von 6 bis 535 μM (bezogen auf

das *cis*-Isomer des Peptides) aufgenommen. In Abhängigkeit von der eingesetzten Substratkonzentration wurde die Produktbildung bei zwei verschiedenen Wellenlängen beobachtet (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: verwendete Extinktionskoeffizienten zur Berechnung der Produktkonzentration im Messansatz bei verschiedenen Wellenlängen

Peptidkonzentration	Wellenlänge nm	Extinktionskoeffizient M ⁻¹ cm ⁻¹
<50 µM	390	13454
>50 µM	446	1262

Die Versuchsreihen wurden sowohl in Abwesenheit eines Viskosogens als auch in Anwesenheit von 30% (w/w) Rohrzucker oder 40% (w/w) Glycerol durchgeführt. Die Reaktion wurde nach der Temperierung des Messansatzes (bei 10°C für 4 min) durch die Zugabe der Chymotrypsinstammlösung (100 mg/ml) gestartet. Die Endkonzentration der Hilfsprotease im Ansatz betrug 0,6 mg/ml. Unter diesen Bedingungen war die Spaltung des Substrates in der *trans*-Konformation innerhalb von 5 bis maximal 20 s nach Zugabe der Protease beendet. Die hCyp18-Konzentrationen der verschiedenen Ansätze variierten zwischen 1,6 und 3,2 nM. Die Reaktion wurde gestoppt, wenn keine Signaländerung mehr sichtbar war. Alle erhaltenen Progresskurven wurden mittels des Programms Dynafit [109] ausgewertet. Dazu wurden die Parameter einer Michaelis-Menten-Kinetik (Gleichung 13) durch nichtlineare Regression simultan an alle Progresskurven angepasst.



3.8.7.5 Ungekoppelter/proteasefreier PPIase-Aktivitätstest

Die Versuche wurden in Anlehnung an das von Janowski *et al.* publizierte Protokoll durchgeführt [107]. Der Messpuffer (35 mM HEPES, pH/pD 7,8) wurde wie unter 3.8.7.2 beschrieben hergestellt. In allen Fällen wurde das Substrat Suc-AAPF-DFA verwendet. Die Stammlösung (60 mg/ml in 0,47 M LiCl/TFE) dieses Peptides wurde an jedem Messtag frisch hergestellt. Das Gesamtvolumen des Messansatzes betrug 1500 µl. Um etwaige Messungenauigkeiten durch mögliche unspezifische Wandabsorption von PPIasen an die Quarzglas-Küvettenwand oder den teflonbeschichteten Magnetrührer zu vermindern, wurden dem Reaktionsgemisch 0,5 µl einer 100 mg/ml Stammlösung BSA zugegeben. Die Äquilibration des Substrates im Messansatz wurde bei 246 nm beobachtet und numerisch durch die Absorption bei 300 nm korrigiert. Die erhaltene Signal/Zeit-Kurve konnte in allen Fällen an eine Kinetik erster Ordnung angepasst

werden. Die ermittelte Geschwindigkeitskonstante (k_{obs}) ist die Summe der Geschwindigkeitskonstanten für die *cis*- nach *trans*-Isomerisierung ($k_{c/d}$) und deren Rückreaktion ($k_{d/c}$). Zur Untersuchung des KSIE wurde die gleiche PPIase-Stammlösung für die jeweiligen Experimente in H₂O und D₂O verwendet, der D₂O-Gehalt reduzierte sich dadurch um weniger als 1%. Eine Vorinkubation der Enzymlösung in D₂O hatte keine Veränderung der enzymatischen Eigenschaften zur Folge.

3.8.7.6 RNase T1 (S54G/P55N)-Proteinrückfaltungstest

Bei diesem Test diente die entfaltetete Form von S-carboxymethylierter RNase T1 (S54G/P55N) (im Folgenden auch RNase T1-Variante genannt) als Substrat für die zu untersuchenden PPIasen [110]. Der langsamste Schritt bei der Rückfaltung dieses Proteins ist die Isomerisierung der Prolyl-Bindung Tyr-Pro39 von der nichtnativen *trans*-Form zu der nativen *cis*-Form. Das Substrat lag in 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) vollständig entfaltet vor, die Renaturierung wurde durch die 100fache Verdünnung des Proteins in 2 ml des Rückfaltungspuffers (2 M NaCl, 100 mM Tris/HCl, pH 8,0) gestartet. Die Endkonzentration der RNase T1-Variante lag bei ungefähr 0,7 μM . Die Faltung wurde fluoreszenzspektroskopisch verfolgt, wobei die Probe bei 268 nm (1,5 nm Spaltbreite) angeregt und das Messsignal bei 320 nm (10 nm Spaltbreite) aufgezeichnet wurde. Um den Einfluss von schwerem Wasser auf die Katalyseeffizienz der PPIasen gegen dieses Substrat zu bestimmen, wurden die Rückfaltungsversuche parallel sowohl in H₂O als auch in D₂O-haltigen Rückfaltungspuffern durchgeführt. Die Rückfaltungskinetiken wurden an eine monoexponentielle Funktion angepasst. Zur Bestimmung der $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Werte für die verschiedenen PPIasen wurde, wie bereits unter 3.8.7.1 beschrieben, die Geschwindigkeitskonstante der unkatalysierten Reaktion von der Geschwindigkeitskonstante der durch die PPIase beschleunigten Reaktion subtrahiert und anschließend durch die PPIase-Konzentration im Messansatz geteilt.

4 Ergebnisse

4.1 Kalorimetrische Untersuchungen

Das Studium von Enzyme/Inhibitor-Wechselwirkungen, besonders von Übergangszustandsanalogen Verbindungen, ist hilfreich für das Verständnis der molekularen Vorgänge im aktiven Zentrum von Enzymen während der Katalyse. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der kalorimetrischen Untersuchungen an Inhibitor-Komplexen von hCyp18 und hPin1 dargelegt.

4.1.1 humanes Cyclophilin 18

Bevor eine detaillierte thermodynamische Untersuchung der hCyp18/CsA durchgeführt werden konnte, mussten Bedingungen gefunden werden, die es erlaubten, die zu bestimmenden Parameter ΔH_{ITC} , K_A und N (Stöchiometrie), mit zufrieden stellender Genauigkeit zu messen. Die Konzentration von CsA in der Messzelle muss für ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis ausreichend hoch sein. Andererseits verhinderte der Einsatz von zu hohen CsA-Konzentrationen ($>20 \mu\text{M}$) eine präzise Bestimmung von K_A , da unter diesen Bedingungen der zu steile Anstieg der Titrationskurve im Wendepunkt eine sinnvolle Anpassung des verwendeten Bindungsmodells an die Messdaten unmöglich machte. Gute Ergebnisse wurden mit CsA-Konzentrationen zwischen 2 und 10 μM erzielt. Der Verlauf einer typischen Titration ist in Abbildung 2A dargestellt. Auffällig ist, dass, obwohl sich die Amplitude des beobachteten Signals bei jedem Titrationschritt verringerte, die umschlossene Fläche (Abbildung 2B) über die ersten 8 Titrationschritte annähernd konstant bleibt. Zur Bestimmung des Standardfehlers der ermittelten Parameter wurde das Experiment mehrfach wiederholt, wobei jedes Mal neue Protein- und CsA-Lösungen eingesetzt wurden. Dabei ergaben sich $\Delta H_{\text{ITC}}(25^\circ\text{C}) = -14,7 \pm 0,3 \text{ kcal mol}^{-1}$ und $K_A(25^\circ\text{C}) = 0,9 \pm 0,3 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$. Bei allen durchgeführten Experimenten lag der Stöchiometriefaktor zwischen 0,92 und 1,02, was darauf schließen ließ, dass das verwendete Enzym nahezu vollständig in seiner nativen, CsA-bindenden und deshalb vermutlich auch enzymatisch aktiven Form vorlag.

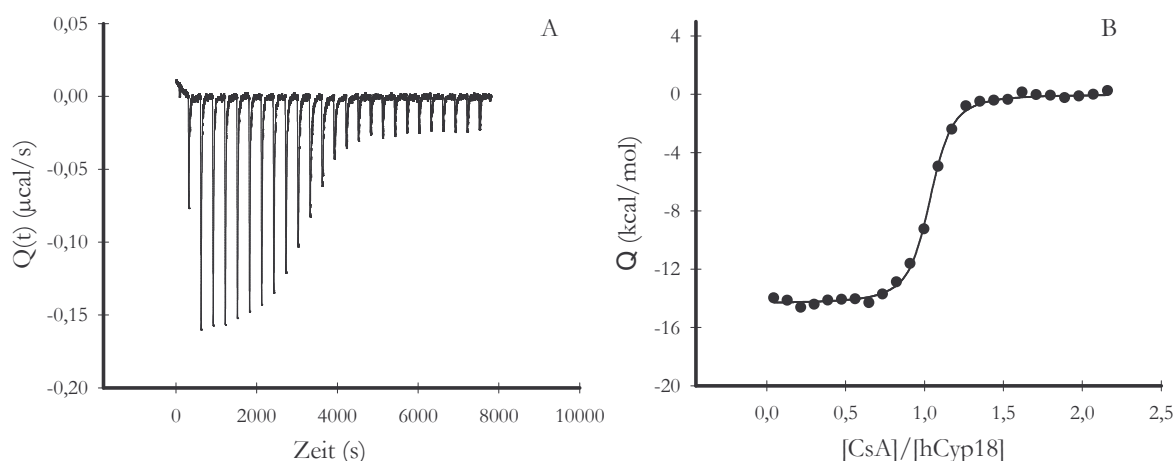


Abbildung 2: A) Interaktion von hCyp18 mit CsA. Die Titration wurde bei 25°C in 25 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,5) durchgeführt. In die Messzelle wurden 2,2 µM CsA vorgelegt. Die Titration erfolgte mit einer 66 µM hCyp18-Lösung in jeweils 4 µl Schritten. B) Die durch die Interaktion von hCyp18 mit CsA hervorgerufenen Signaländerungen wurden integriert, in molare Größen umgerechnet und gegen das molare Verhältnis von CsA zu hCyp18 aufgetragen. Die durchgezogene Linie entspricht der Anpassung der Parameter des Bindungsmodells an die Messwerte; folgende Parameter wurden ermittelt: $K_A=0,92 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, $\Delta H_{ITC}=14,3 \text{ kcal mol}^{-1}$ und $N=1,002$.

4.1.1.1 Temperaturabhängigkeit der thermodynamischen Parameter

Zur weiteren Charakterisierung der hCyp18/CsA-Interaktion wurde die Temperaturabhängigkeit der Bindung untersucht. Die Experimente wurden im Temperaturbereich von 5 bis 30°C durchgeführt. Die thermische Stabilität von hCyp18 wurde unter identischen Bedingungen mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie untersucht. Bis zu einer Temperatur von 40°C zeigten sich kaum Veränderungen der Sekundärstruktur, ab 48°C begann das Protein zu aggregieren. Die Anwesenheit von CsA stabilisierte hCyp18, sodass die Aggregation erst bei ungefähr 53°C einsetzte (Abbildung 3). Da der bei allen Experimenten verwendete Natriumphosphatpuffer nur eine geringe Änderung des pK_s -Werte mit der Temperatur zeigte ($\Delta pK_s/dT=-0,0028 \text{ K}^{-1}$), wurde der pH-Wert der Lösungen bei 25°C eingestellt und nicht temperaturkorrigiert. Die ermittelten Werte für ΔH_{ITC} , ΔG_{ITC} und $T\Delta S_{ITC}$ wurden in Abbildung 4 in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt.

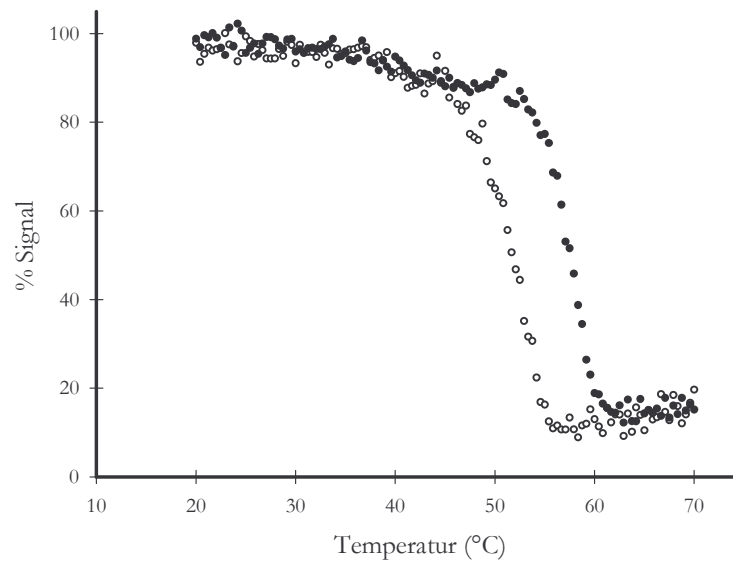


Abbildung 3: Temperaturabhängigkeit der CD-Signals bei 222 nm für 34 µM hCyp18 (○) und 34 µM hCyp18 im Komplex mit 34 µM CsA (●) in 25 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,5). Alle Messwerte wurden numerisch pufferkorrigiert. Der untersuchte Temperaturbereich von 20 bis 70°C wurde mit 0,25°C/min durchlaufen.

Sowohl ΔH_{ITC} als auch $T\Delta S_{ITC}$ zeigten eine starke Temperaturabhängigkeit, während ΔG_{ITC} kaum beeinflusst wurde. Bis zu einer Temperatur von 289 K wurde die Komplexierung vollständig durch den enthalpischen Beitrag der freien Enthalpie angetrieben, erst bei niedrigeren Temperaturen leistete auch der entropische Beitrag einen Anteil zur Bindung. Aus dem Anstieg der Regressionsgeraden der Messwerte für ΔH_{ITC} konnte die Änderung der spezifischen Wärmekapazität, hervorgerufen durch die Protein/Ligand-Wechselwirkung, mit rund $\Delta C_p = -435 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ berechnet werden (Gleichung 14). Dieser Parameter ist über eine empirische gefundene Beziehung mit der Änderung der wasserzugänglichen Oberfläche der Bindungstasche verknüpft und konnte auf diese Weise aus den vorhandenen strukturellen Daten berechnet werden (Gleichung 3). Damit ergab sich unter Benutzung der ermittelten, durch die Bindung hervorgerufenen Änderungen der wasserzugänglichen Oberflächen ($\Delta ASA_{\text{polar}} = -357,3 \text{ \AA}^2$ und $\Delta ASA_{\text{unpolar}} = -660,6 \text{ \AA}^2$) $\Delta C_{p \text{ theor.}} = -211 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

Gleichung 14

$$\Delta C_p = \left(\frac{\delta \Delta H}{\delta T} \right)_p$$

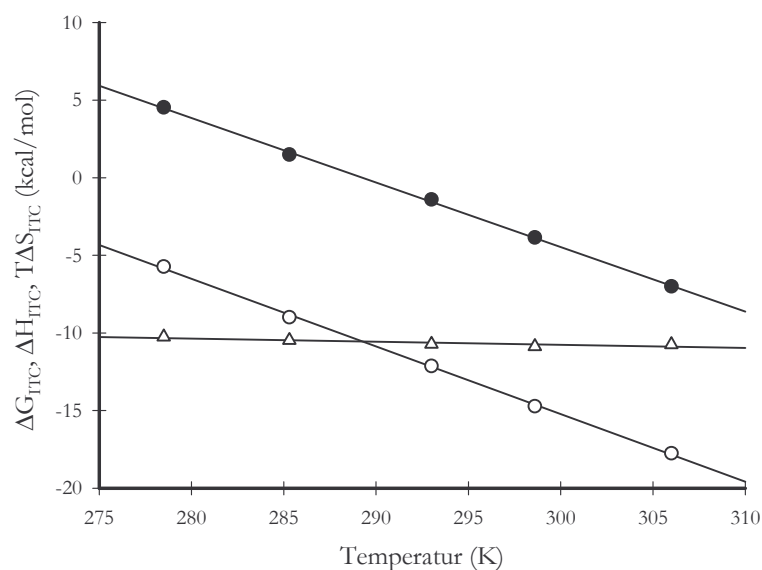


Abbildung 4: Temperaturabhängigkeit der thermodynamischen Parameter ΔH_{ITC} (○), ΔG_{ITC} (Δ) und $T\Delta S_{ITC}$ (●) der hCyp18/CsA Interaktion. Die linearen Regressionen (-) der aufgetragenen Werte wiesen ein Bestimmtheitsmaß (r^2) von 0,99 für ΔH_{ITC} und $T\Delta S_{ITC}$ und 0,79 für ΔG_{ITC} auf. Die Wertepaare der Abbildung sind in Tabelle 7-11, Tabelle 7-12 und Tabelle 7-13 des Anhangs zusammengefasst.

Die großen Unterschiede zwischen den gemessenen und berechneten ΔC_p -Werten führten zu der Vermutung, dass weitere Faktoren diesen Parameter beeinflussten. Es ist bekannt, dass in der Bindungstasche gebundene Wassermoleküle einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf ΔC_p haben können [111]. Um den Einfluss von in der Bindungstasche gebundenen Wassermolekülen auf die thermodynamischen Parameter der hCyp18/CsA-Interaktion näher zu beleuchten, wurden ITC-Experimente in D_2O - und Glycerollösungen durchgeführt. Die bei 25°C ermittelten Parameter und die Temperaturabhängigkeit von ΔH_{ITC} wurden in Tabelle 4-1 zusammengefasst.

Tabelle 4-1: Vergleich der ermittelten thermodynamischen Parameter der hCyp18/CsA-Interaktion bei 25°C in 25 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 bzw. pD 7,5 und bei Zusatz von 30% (v/v) Glycerol.

	H ₂ O pH 7,5	D ₂ O pD 7,5	30% (v/v) Glycerol
$K_A(298\text{ K})$	$0,9 \cdot 10^8\text{ M}^{-1}$	$1,5 \cdot 10^8\text{ M}^{-1}$	$0,6 \cdot 10^8\text{ M}^{-1}$
$\Delta G_{ITC}(298\text{ K})$	$-10,8\text{ kcal mol}^{-1}$	$-11,1\text{ kcal mol}^{-1}$	$-10,5\text{ kcal mol}^{-1}$
$\Delta H_{ITC}(298\text{ K})$	$-14,7\text{ kcal mol}^{-1}$	$-14,8\text{ kcal mol}^{-1}$	$-18,6\text{ kcal mol}^{-1}$
$T\Delta S_{ITC}(298\text{ K})$	$-3,9\text{ kcal mol}^{-1}\text{ K}^{-1}$	$-3,6\text{ kcal mol}^{-1}\text{ K}^{-1}$	$-7,8\text{ kcal mol}^{-1}\text{ K}^{-1}$
ΔC_p	$-435,8 \pm 7\text{ cal mol}^{-1}\text{ K}^{-1}$	$-488 \pm 18\text{ cal mol}^{-1}\text{ K}^{-1}$	$-426 \pm 27\text{ cal mol}^{-1}\text{ K}^{-1}$

Besonders auffällig war die deutlich negativere Bindungsenthalpie in Gegenwart von Glycerol ($\Delta\Delta H_{ITC\text{ H}_2\text{O-Glycerol}}(25^\circ\text{C})=3,9\text{ kcal mol}^{-1}$), welche jedoch nicht zu einer festeren Bindung führte,

sondern durch den ebenfalls negativeren entropischen Term ($T\Delta\Delta S_{\text{ITC H}_2\text{O-Glycerol}}(25^\circ\text{C})=4 \text{ kcal mol}^{-1}$) kompensiert wurde. Die hohe Glycerolkonzentration hatte nur einen geringen Einfluss auf ΔC_p ($\Delta\Delta C_{p \text{ H}_2\text{O-Glycerol}}(25^\circ\text{C})=-9 \text{ cal}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$).

Die Verwendung von D_2O führte über den gesamten untersuchten Temperaturbereich zu einer Verdopplung der Assoziationskonstanten ($K_{\text{A H}_2\text{O}}/K_{\text{A D}_2\text{O}}(25^\circ\text{C})=0,58$) (Tabelle 7-13) und zu einem stärker negativen ΔC_p ($\Delta\Delta C_{p \text{ H}_2\text{O-D}_2\text{O}}(25^\circ\text{C})=53 \text{ cal}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$).

4.1.1.2 pH-Wert-Abhängigkeit der thermodynamischen Parameter

Weiterhin wurde die Komplexbildung von hCyp18 mit CsA bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht. Dazu wurde zuerst die Stabilität von hCyp18 im Bereich von pH 5 bis 8 mittels Nah- und Fern-UV-CD-Spektroskopie ermittelt (Abbildung 5). Es konnte keine pH-Wert-abhängige Änderung der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur im untersuchten Bereich beobachtet werden. Unterhalb pH 5,0 tendierte das Protein zur Aggregation.

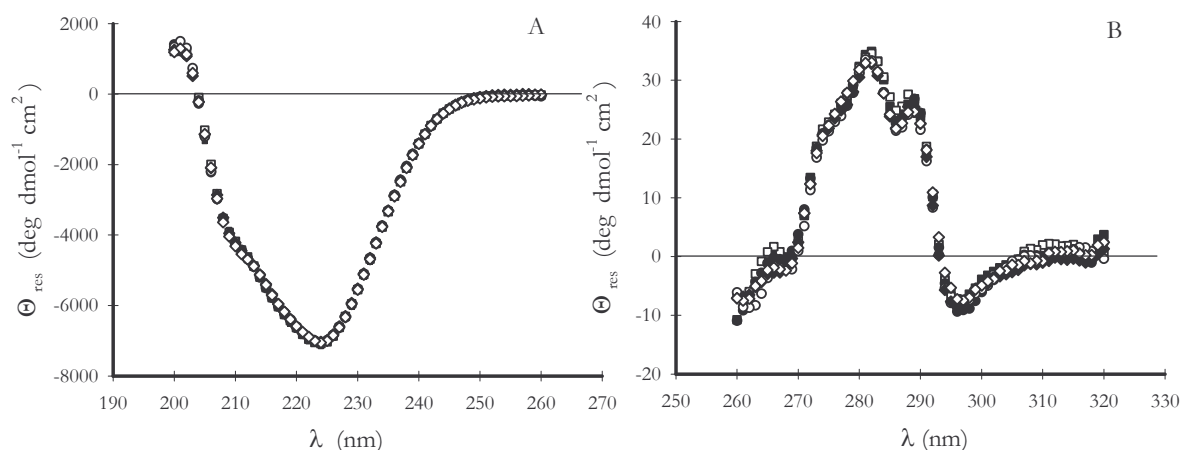


Abbildung 5: CD-Spektren von $37 \mu\text{M}$ hCyp18 im (A) Fern- und (B) Nah-UV-Bereich. Die Spektren wurden in Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 1 mm (Fern-UV) und 10 mm (Nah-UV) im Bereich von pH 5 bis pH 8 in wässriger Lösung aufgenommen, die Spektren wurden numerisch pufferkorrigiert.

Die kalorimetrischen Untersuchungen wurden in einem Puffergemisch (25 mM Natriumacetatpuffer, 25 mM MES-Puffer, 25 mM Tris-Puffer und 150 mM NaCl) durchgeführt, dadurch konnten konstante Pufferbedingungen über den gesamten pH-Wert-Bereich sichergestellt werden [112]. Die beobachtete Komplexbildung war bei sauren pH-Werten deutlich schwächer ausgeprägt, wobei die Assoziationskonstante bei pH 5 ungefähr 9mal kleiner war als im neutralen Bereich (Abbildung 6). Die erhaltenen Assoziationskonstanten wurden an ein Modell angepasst, welches die Änderung des pK_s -Wertes einer Aminosäureseitenkette durch den Bindungsprozess berücksichtigte (Gleichung 15). Die beiden in der Gleichung auftretenden pK_s -Werte beziehen sich auf dieselbe Aminosäureseitenkette, einmal im Enzyme/Inhibitor-

Komplex ($(pK_s)_b$) und einmal im ungebundenen Zustand ($(pK_s)_f$). K_A steht für Assoziationskonstante im deprotonierten Zustand des Proteins.

$$\text{Gleichung 15} \quad K_{obs} = K_A \frac{1 + 10^{(pK_s)_b - pH}}{1 + 10^{(pK_s)_f - pH}}$$

Die Anpassung dieses Modells an die erhaltenen Messwerte für K_{obs} ergaben: $K_A = 1,3 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, $(pK_s)_f = 5,7$ und $(pK_s)_b < 4,7$. Eine genaue Bestimmung von $(pK_s)_b$ war nicht möglich, da hCyp18 unterhalb pH 5,0 zur Aggregation neigt. Die pH-Wert-Abhängigkeit der ΔH_{ITC} -Werte wurde nicht aufgeführt, da die Verwendung des oben angegebenen Puffergemisches die Interpretation der Ergebnisse nicht erlaubte.

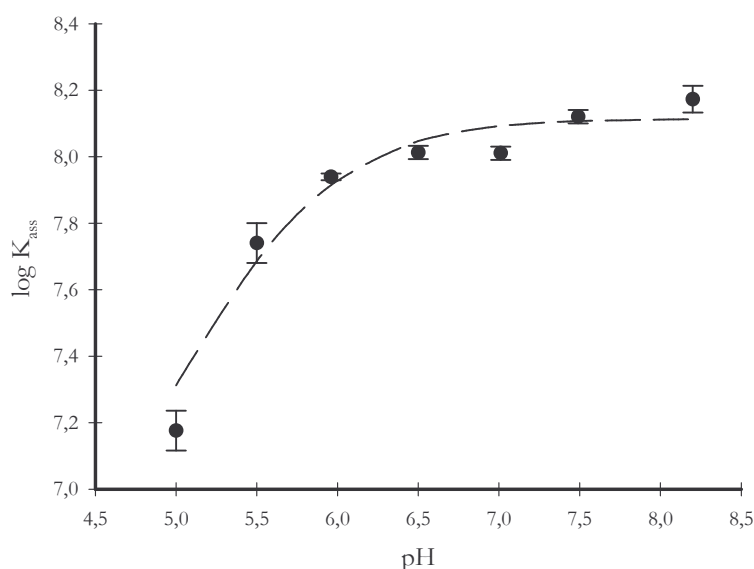


Abbildung 6: pH-Wert-Abhängigkeit der beobachteten Assoziationskonstante (K_{obs}), gemessen bei 20°C in einem Puffergemisch aus 25 mM Natriumacetatpuffer, 25 mM MES-Puffer, 25 mM Tris-Puffer und 150 mM NaCl im Bereich von pH 5 bis 8,2. Die Fehlerbalken entsprechen der durch die Auswertungssoftware errechneten Standardabweichung der Anpassung an die Messwerte.

Die pH-Wert-Abhängigkeit der Assoziationskonstante und die Änderung eines pK_s -Wertes einer Aminosäureseitenkette im aktiven Zentrum während des Bindungsprozesses ließen vermuten, dass ein Protonenaustausch zwischen hCyp18 und dem Lösungsmittel stattfand. ITC-Experimente in Puffern mit unterschiedlichen Ionisierungsenthalpien (ΔH_{Ion}) ermöglichen es, diesen Protonentransfer direkt zu beobachten (Gleichung 16) [113]. Um die Anzahl der zwischen Protein und Lösungsmittel ausgetauschten Protonen zu ermitteln, wurden die beobachteten Bindungsenthalpien (ΔH_{ITC}) gegen die Ionisierungsenthalpien der Puffer aufgetragen, der Anstieg der linearen Regressionsgeraden entspricht der gesuchten Größe. Da der Protonierungsgrad von Aminosäureseitenketten und damit auch die Anzahl der zwischen Protein und Lösungsmittel

übertragenen Protonen von der Protonenkonzentration in der Lösung abhängt, wurden die Experimente bei zwei verschiedenen pH-Werten durchgeführt (Abbildung 7A). Bei pH 7,5 konnte kein Protonentransfer beobachtet werden, wogegen bei pH 5,5 rund 0,5 Protonen pro hCyp18/CsA-Komplex ($n=-0,5$) freigesetzt wurden.

$$\text{Gleichung 16} \quad \Delta H_{ITC} = \Delta H_{\text{Bindung}} + n \cdot \Delta H_{\text{Ion.}}$$

Dieses Experiment wurde mit einer Variante des hCyp18, dem hCyp18 H126A, wiederholt. Die Anzahl der während der Protein/Ligand-Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel ausgetauschten Protonen sank dabei auf $n=-0,14$.

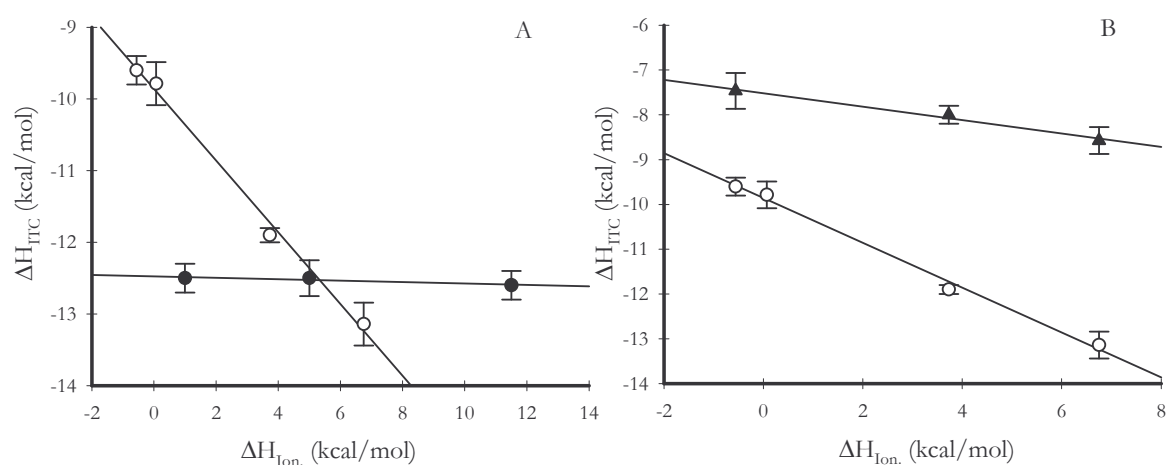


Abbildung 7: A) Darstellung der gemessenen Bindungsenthalpie (ΔH_{ITC}) der hCyp18/CsA-Interaktion in Abhängigkeit von der Puffer-Ionisierungsenthalpie ($\Delta H_{Ion.}$) der verwendeten Puffer. Die Experimente wurden bei pH 7,5 (●) in Natriumphosphatpuffer ($\Delta H_{Ion.}=0,8 \text{ kcal mol}^{-1}$), HEPES-Puffer ($\Delta H_{Ion.}=4,99 \text{ kcal mol}^{-1}$) und Tris-Puffer ($\Delta H_{Ion.}=11,5 \text{ kcal mol}^{-1}$) sowie bei pH 5,5 (○) in Cacodylatpuffer ($\Delta H_{Ion.}=-0,56 \text{ kcal mol}^{-1}$), Acetatpuffer ($\Delta H_{Ion.}=0,07 \text{ kcal mol}^{-1}$), MES-Puffer ($\Delta H_{Ion.}=3,73 \text{ kcal mol}^{-1}$) und Bistris-Puffer ($\Delta H_{Ion.}=6,75 \text{ kcal mol}^{-1}$) durchgeführt. B) Vergleich der gemessenen Bindungsenthalpie für hCyp18/CsA und hCyp18 H126A/CsA-Interaktion bei pH 5,5; es wurden die zuvor beschriebenen Puffer verwendet. Nach Gleichung 16 ergibt der Anstieg der linearen Regression die Anzahl der übertragenen Protonen bei pH 5,5 mit $n=-0,5$ für die hCyp18 und $n=-0,14$ für die hCyp18 H126A/CsA-Interaktion.

4.1.1.3 Untersuchung von Proteinvarianten des hCyp18

Die hier charakterisierten hCyp18-Varianten wiesen Aminosäureseitenkettenvariationen im aktiven Zentrum auf. Durch die Charakterisierung der in Tabelle 4-2 aufgeführten Varianten sollte unter anderem geklärt werden, ob die Proteine in einer nativen Form vorliegen. Nur so konnte gewährleistet werden, dass die in den folgenden Kapiteln aufgeführten enzymkinetischen Untersuchungen erhaltenen Daten sinnvoll interpretiert werden können. Desweiteren lassen die erhaltenen thermodynamischen Daten weitere Interpretationen der Wechselwirkung zwischen

CsA und hCyp18 zu. In Tabelle 4-2 sind alle thermodynamischen Parameter der Interaktion dieser Varianten mit CsA zusammengefasst. Alle Varianten hatten eine rund 10 bis 300fache Verringerung der CsA-Affinität zur Folge. In allen Fällen wurden die positiveren ΔG_{ITC} -Werte durch positivere ΔH_{ITC} -Werte vermittelt. Die Änderung des entropischen Terms kompensierte in allen Fällen den Verlust eines Teils der Bindungsenthalpie.

Tabelle 4-2 Thermodynamische Parameter der hCyp18/CsA-Interaktion, im Vergleich mit der Interaktion von hCyp18-Varianten mit CsA. Alle Experimente wurden in 25 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 bei 25°C durchgeführt.

Enzyme	ΔG_{ITC} (25°C) kcal mol ⁻¹	ΔH_{ITC} (25°C) kcal mol ⁻¹	$T\Delta S_{\text{ITC}}$ (25°C) kcal mol ⁻¹	K_A M ⁻¹
hCyp18	-10,8	-14,7	-3,9	0,9·10 ⁸
hCyp18 H126A	-8,3	-8,4	-0,1	1,3·10 ⁶
hCyp18 H126F	-9,7	-11,3	-1,7	1,3·10 ⁷
hCyp18 F113A	-9,9	-8,6	1,3	1,7·10 ⁷
hCyp18 R55A	-9,1	-10,1	-1	4,5·10 ⁶
hCyp18 Q63N	-9,4	-10,6	-1,2	7,3·10 ⁶
hCyp18 Q63E	-7,5	-3,0	4,5	3,1·10 ⁵

Die mittels nichtlinearer Regression erhaltenen Parameter zeigten in allen Fällen eine Standardabweichung von unter 15%. Die Stöchiometrie der Bindung (N) lag für alle Varianten im Bereich zwischen 0,92 und 1,05.

4.1.1.4 Thermodynamik der Interaktion von Suc-AFPF-pNA mit hCyp18

Die thermodynamischen Vorgänge, die die Substrat/hCyp18-Interaktion begleiten, sind bis heute unbekannt. Um diese Prozesse näher zu beleuchten, wurden Titrationsexperimente mit dem Oligopeptidsubstrat Suc-AFPF-pNA durchgeführt. Die geringe Affinität des Substrates zum Enzym verlangt hohe Konzentrationen an Protein und Peptid, um aussagekräftige Resultate zu erhalten. Bei 10°C liegt die ermittelte Assoziationskonstante bei $3,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Bei dieser Temperatur liefert nur die Änderung der Enthalpie ($\Delta H_{\text{ITC}} = -7,2 \text{ kcal mol}^{-1}$) einen negativen Beitrag zur freien Enthalpie der Bindung, die Änderung der Entropie wirkt der Assoziation von Enzym und Substrat entgegen ($T\Delta S_{\text{ITC}} = -2,7 \text{ kcal mol}^{-1}$). Die Temperaturabhängigkeit der thermodynamischen Parameter zeigt ein ähnliches Bild wie für die bereits beschriebene CsA/hCyp18-Interaktion. Die Temperaturerhöhung von 3 auf 25°C wirkt sich gleichermaßen auf die Enthalpie als auch auf die Entropie der Bindung aus (Abbildung 8), dadurch bleibt ΔG_{ITC} fast unverändert. Die Änderung der Wärmekapazität beträgt $\Delta C_p = -259,8 \pm 23 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

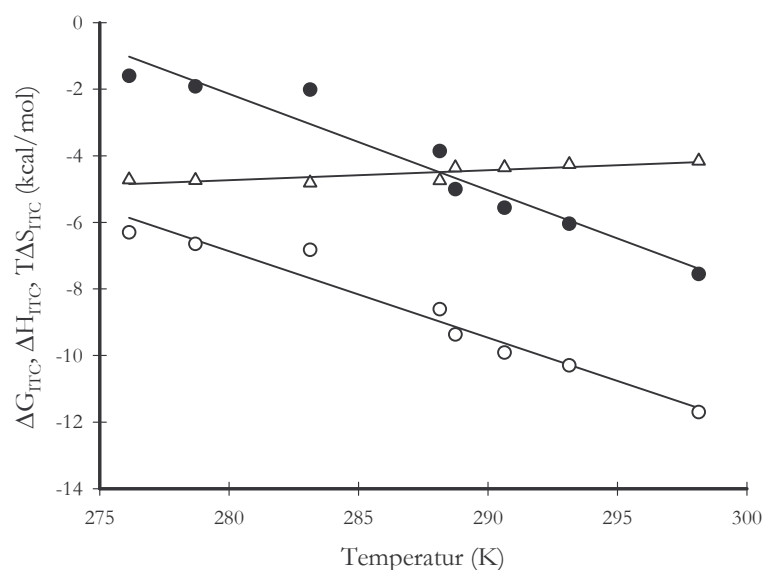


Abbildung 8: Temperaturabhängigkeit der thermodynamischen Parameter ΔG_{ITC} , ΔH_{ITC} , $T\Delta S_{ITC}$ der hCyp18/Suc-AFPF-pNA-Bindung. Die linearen Regressionen (-) der aufgetragenen Werte wiesen ein Bestimmtheitsmaß (r^2) von 0,95 für ΔH_{ITC} , 0,93 für $T\Delta S_{ITC}$ und 0,71 für ΔG_{ITC} auf. Die Wertepaare dieser Abbildung sind in Tabelle 7-14 zu finden.

4.1.2 Humanes Pin1

Ziel der Untersuchungen war es, durch die Charakterisierung der Komplexbildung von hPin1 mit einem hochaffinen peptidischen Ligand ein besseres Verständnis für die Thermodynamik der Wechselwirkung von PPIasen der Parvulin-Familie mit substratähnlichen Liganden zu erlangen. Der verwendete Ligand hatte die Sequenz Ac-Phe-DThr(PO_3H_2)-Pip-Nal-Gln-NH₂. Die Reste Pip (von Piperidin-2-Karbonsäure), Nal (von β -(2-Naphtyl)-alanin) und DThr (D-Threonin) stammten von nicht proteinogenen Aminosäuren ab. Der Ligand wurde im Rahmen einer Suche nach hPin1-Liganden unter Verwendung von zellulosegebundenen Peptidbibliotheken in der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung identifiziert und in dieser Arbeit unter thermodynamischen Gesichtspunkten charakterisiert.

4.1.2.1 Temperaturabhängigkeit der thermodynamischen Parameter

Zuerst wurden experimentelle Bedingungen gesucht, die es erlaubten, N , ΔH_{ITC} und K_A präzise zu bestimmen. Die besten Ergebnisse konnten erzielt werden, wenn das Protein mit einer Konzentration von 5 bis 10 μM in der Messzelle vorgelegt und mit einer 10fach höher konzentrierten Ligand-Lösung titriert wurde. Die Experimente wurden in 35 mM HEPES-Puffer pH 7,8 durchgeführt. In Abbildung 9 ist ein Experiment unter diesen Bedingungen beispielhaft dargestellt. Der zu beobachtende Übergang der Titrationskurve ist relativ steil, dadurch wird die Bestimmung der thermodynamischen Parameter erschwert. Die Durchführung des Experimentes

bei 25°C zeigte, dass die Assoziation sowohl enthalpisch ($\Delta H_{\text{ITC}}(25^\circ\text{C}) = -6,6 \text{ kcal mol}^{-1}$) als auch entropisch ($T\Delta S_{\text{ITC}}(25^\circ\text{C}) = 3,6 \text{ kcal mol}^{-1}$) begünstigt ist. Daraus ergab sich eine Dissoziationskonstante von $K_D = 1/K_A = 33 \text{ nM}$. Die Stöchiometrie der Interaktion war 1:1. hPin1 ist in der Lage, sowohl über die WW-Domäne als auch mit der PPIase-Domäne phosphorylierte Peptide zu binden [88-90]. Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass das hier untersuchte Peptid eine deutlich höhere Affinität zur PPIase-Domäne besaß (Wildemann *et al.*, zur Publikation eingereicht). Die Untersuchungen mit einer hPin1-Variante ohne WW-Domäne (hPin1 Δ WW) bestätigten diese Ergebnisse. Die Stöchiometrie der Reaktion war auch hier 1:1. Alle Parameter waren über den hier untersuchten Temperaturbereich (5-25°C) für hPin1 und hPin1 Δ WW nahezu identisch (Abbildung 10). Aus der Temperaturabhängigkeit von ΔH_{ITC} konnte mittels Gleichung 14 ein ΔC_p von $-148 \pm 13 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ für hPin1 und $-139 \pm 14 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ für hPin1 Δ WW berechnet werden.

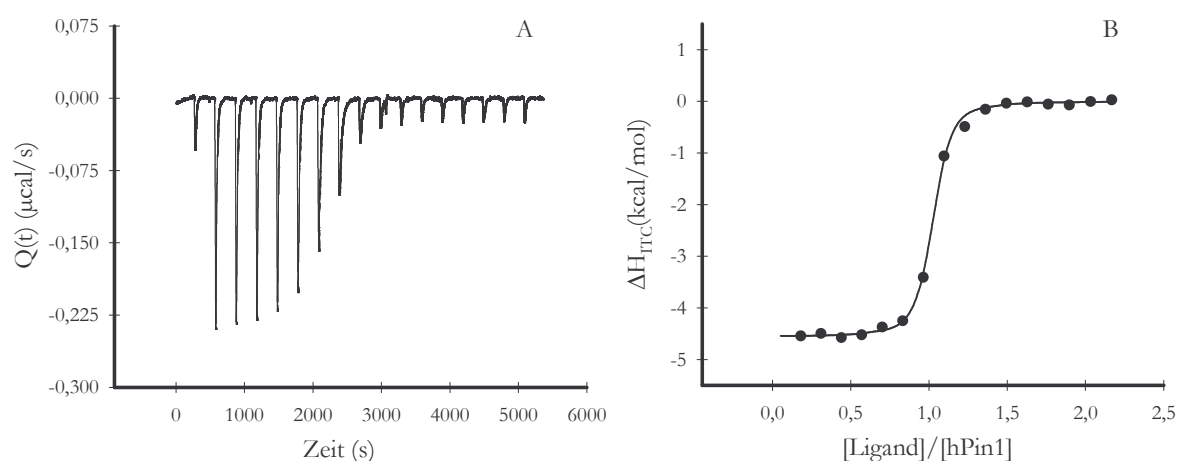


Abbildung 9: A) Interaktion von hPin1 mit Ac-Phe-D'Thr(PO_3H_2)-Pip-Nal-Gln- NH_2 . Die Titration wurde bei 10°C in 35 mM HEPES-Puffer (pH 7,8) durchgeführt. In die Messzelle wurden 7 μM hPin1 vorgelegt. B) Die durch die Interaktion von hPin1 mit Ac-Phe-D'Thr(PO_3H_2)-Pip-Nal-Gln- NH_2 hervorgerufenen Signaländerungen wurden integriert, in molare Größen umgerechnet und gegen das molare Verhältnis von Ligand zu hPin1 aufgetragen. Die durchgezogene Linie entspricht der Anpassung der Parameter des Bindungsmodells an die Messwerte. Folgende Parameter wurden ermittelt: $K_A = 5,1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, $\Delta H_{\text{ITC}} = -4,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ und $n = 0,98$.

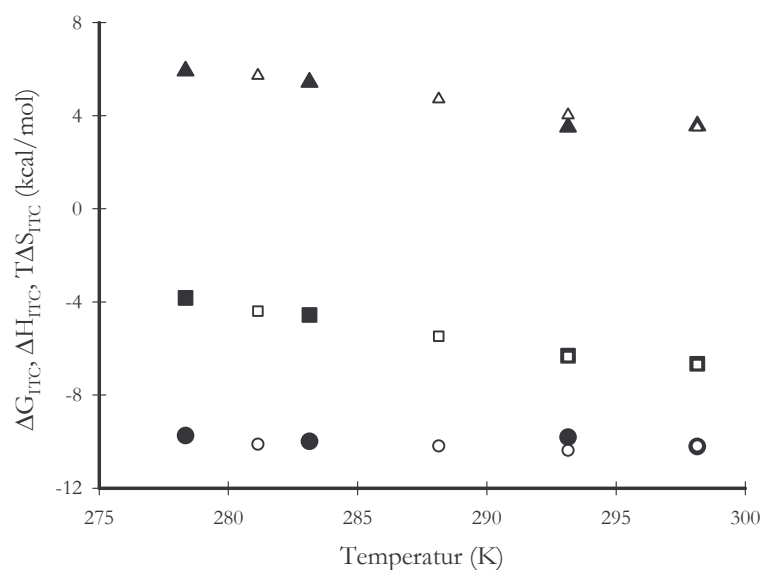


Abbildung 10: Vergleich der Temperaturabhängigkeit der Parameter ΔG_{ITC} (●, ○), ΔH_{ITC} (■, □) und $T\Delta S_{ITC}$ (▲, △) von hPin1 (geschlossene Symbole) und hPin1 ΔWW (offene Symbole). Die Regressionsgeraden wurden zur besseren Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet. Das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression für ΔH_{ITC} und $T\Delta S_{ITC}$ war größer 0,93. Die Messungen erfolgten in 35 mM HEPES-Puffer, pH 7,8.

Durch fünffache Wiederholung der Titrationsversuche bei 20°C konnte die Standardabweichung der thermodynamischen Parameter bestimmt werden (Tabelle 4-3). Es ist zu erkennen, dass sich die Werte für hPin1 und hPin1 ΔWW nur unwesentlich unterscheiden. Die WW-Domäne hatte somit keinen Einfluss auf die Bindung von Ac-Phe-DThr(PO_3H_2)-Pip-Nal-Gln-NH₂. Der Stöchiometriefaktor der Reaktion lag in jedem Fall zwischen 0,92 und 1,07.

Tabelle 4-3: Gegenüberstellung der thermodynamischen Parameter der Interaktion zwischen Ac-Phe-DThr(PO_3H_2)-Pip-Nal-Gln-NH₂ und hPin1 bzw. hPin1 ΔWW . Aus der Temperaturabhängigkeit der Enthalpie der Bindung wurde nach Gleichung 14 die Änderung der Wärmekapazität bestimmt.

	ΔH_{ITC} (20°C)	$T\Delta S_{ITC}$ (20°C)	ΔG_{ITC} (20°C)	K_A	ΔC_p
	kcal mol ⁻¹	kcal mol ⁻¹	kcal mol ⁻¹	10 ⁷ M ⁻¹	cal mol ⁻¹ K ⁻¹
hPin1	-6,3±0,1	3,7±0,2	-10,1±0,3	2,7±0,8	-148±13
hPin1 ΔWW	-6,3±0,1	4,1±0,1	-10,4±0,2	4,8±1,4	-139±15

Die dargestellten Werte für ΔH_{ITC} , $T\Delta S_{ITC}$, ΔG_{ITC} und K_A entsprechen den Mittelwerten von drei unabhängigen Messungen, gegebene Fehlergrenzen geben die Standardabweichungen vom Mittelwert wieder. Die Werte für ΔC_p wurden durch lineare Regression ermittelt, der angegebene Fehler entspricht der Standardabweichung der Regression.

Die Standardabweichung der Assoziationskonstante war relativ groß. Eine genauere Bestimmung war unmöglich, da die dafür notwendige Verringerung der Proteinkonzentration durch die relativ geringe Enthalpie der Bindung nicht möglich war, ohne das Signal/Rausch-Verhältnis deutlich zu

verschlechtern. Da hPin1 stärker zur Aggregation neigte als hPin1 Δ WW, wurden die weiteren Experimente mit der Variante durchgeführt.

4.1.2.2 Ionenstärke-Abhängigkeit der thermodynamischen Parameter

Die phosphorylierte Seitenkette des N-terminal zum Prolin gelegenen Aminosäurerestes ist sowohl für eine effiziente Katalyse von Substraten als auch für die hochaffine Bindung des hier untersuchten Liganden notwendig. Die dephosphorylierte Variante des Liganden zeigte unter den hier verwendeten Bedingungen kein kalorimetrisch messbares Signal. Zur näheren Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen der phosphorylierten Inhibitorseitenkette mit hPin1 wurden kalorimetrische Untersuchungen in gepufferten Lösungen variierender Ionenstärken durchgeführt. Erwartungsgemäß verringerte sich die beobachtete Assoziationskonstante mit steigenden Salzkonzentrationen (Abbildung 11A). Die schlechtere Bindung von Ac-Phe-DThr(PO_3H_2)-Pip-Nal-Gln- NH_2 konnte dabei vollständig von den positiveren Werten für ΔH_{TTC} abgeleitet werden ($\Delta H_{\text{TTC } 0 \text{ mM NaCl}} - \Delta H_{\text{TTC } 500 \text{ mM NaCl}} = -2,6 \text{ kcal mol}^{-1}$). Die Änderung des entropischen Anteils der freien Enthalpie war klein ($T\Delta S_{\text{TTC } 0 \text{ mM NaCl}} - T\Delta S_{\text{TTC } 500 \text{ mM NaCl}} = -0,2 \text{ kcal mol}^{-1}$) (Tabelle 4-4).

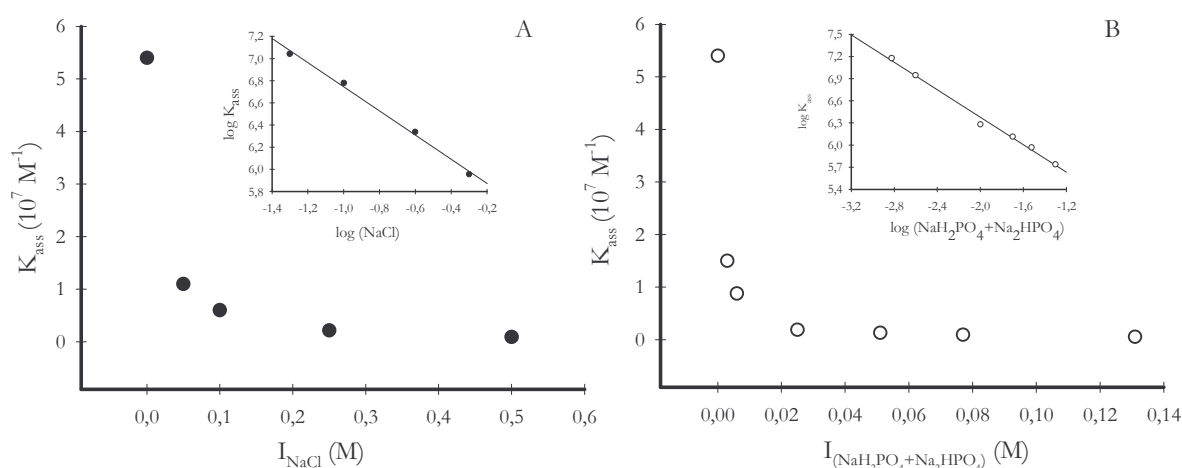


Abbildung 11: Salzabhängigkeit (●) und Phosphatabhängigkeit (○) der Assoziationskonstante (K_A) bei der Komplexbildung zwischen Ac-Phe-DThr(PO_3H_2)-Pip-Nal-Gln- NH_2 und Pin1 Δ WW. Die Parameter wurden bei 20°C in 35 mM HEPES-Puffer pH 7,8 ermittelt, die angegebenen Ionenstärken wurden durch Zugabe von NaCl oder NaH_2PO_4 variiert, der pH-Wert des Puffers wurde nach Zugabe der Salze auf pH 7,8 eingestellt. Die Assoziationskonstanten wurden gegen die Ionenstärke des zugesetzten Salzes aufgetragen. Die klein eingefügten Graphen zeigen die logarithmische Auftragung der Messwerte gegen den Logarithmus der Ionenstärke der zugesetzten Salze.

Die Affinität des Inhibitors wurde durch den Zusatz von Phosphat-Ionen deutlich stärker erniedrigt (Abbildung 11B). Durch die Anwesenheit von 50 mM Phosphat-Ionen wurde die Assoziationskonstante annähernd 100fach verringert. Dabei wurden die bei steigender Phosphat-

Ionenkonzentration positiveren Werte für ΔH_{ITC} teilweise durch ebenfalls positivere Werte für $T\Delta S_{ITC}$ kompensiert (Tabelle 4-5). Dieser Effekt war besonders bei der niedrigsten Phosphat-Ionenkonzentration zu beobachten. Mit steigenden Konzentrationen reduzierten sich die begünstigenden Beiträge zur freien Enthalpie. Die deutliche Abhängigkeit der Protein/Ac-Phe-DThr(PO_3H_2)-Pip-Nal-Gln- NH_2 -Affinität von der Ionenstärke wies auf ausgeprägte ionische Wechselwirkungen hin.

Tabelle 4-4: Abhängigkeit der thermodynamischen Parameter der Ac-Phe-DThr(PO_3H_2)-Pip-Nal-Gln- NH_2 /hPin1 ΔWW -Interaktion von der NaCl-vermittelten Ionenstärke des verwendeten Puffers. Die Messungen erfolgten bei 20°C, in 35 mM HEPES-Puffer, pH 7,8

[NaCl] mM	ΔH_{ITC} kcal mol ⁻¹	$T\Delta S_{ITC}$ kcal mol ⁻¹	ΔG_{ITC} kcal mol ⁻¹	K_A 10 ⁷ M ⁻¹
0	-6,3	4,1	10,6	5,4
50	-4,9	4,6	9,6	1,1
100	-4,5	4,6	9,2	0,6
250	-4,2	4,3	8,6	0,21
500	-3,7	4,3	8,1	0,09

Die aus der Anpassung der Parameter an das Bindungsmodell ermittelten Standardabweichungen lagen für alle Parameter unter 10%.

Tabelle 4-5: Abhängigkeit der thermodynamischen Parameter der Ac-Phe-DThr(PO_3H_2)-Pip-Nal-Gln- NH_2 /hPin1 ΔWW -Interaktion von der Phosphat-Ionenkonzentration des verwendeten Puffers. Die Messungen erfolgten bei 20°C, in 35 mM HEPES-Puffer, pH 7,8.

[NaH ₂ PO ₄ + Na ₂ HPO ₄] mM	ΔH_{ITC} kcal mol ⁻¹	$T\Delta S_{ITC}$ kcal mol ⁻¹	ΔG_{ITC} kcal mol ⁻¹	K_A 10 ⁷ M ⁻¹
0	-6,3	4,1	10,5	5,4
1,5	-2,8	6,9	9,8	1,5
2,5	-2,5	6,9	9,5	0,88
10	-2,1	6,4	8,6	0,19
20	-2,1	6,1	8,3	0,13
30	-2,0	6,0	8,1	0,09
50	-1,9	5,9	7,9	0,06

Die aus der Anpassung der Parameter an das Bindungsmodell ermittelten Standardabweichungen lagen für alle Parameter unter 10%.

Aus der deutlich stärkeren Beeinflussung der Ligand/hPin1 ΔWW -Interaktion durch Phosphat-Ionen kann geschlossen werden, dass diese Ionen spezifisch mit dem Protein interagieren. Röntgenkristallstrukturen von hPin1 in An- und Abwesenheit von Sulfat-Ionen gaben ebenfalls Anlass zu dieser Vermutung. Kontrovers diskutiert wird indes, ob diese Wechselwirkung zu einer

strukturellen Änderung im Protein führt. Da strukturelle Änderungen mit Veränderung der wasserzugänglichen Oberfläche des Proteins einhergehen, sollten eventuelle Konformationsänderungen auch zu einer Änderung von ΔC_p bei der Ligandbindung führen. Deshalb wurde ΔC_p in An- und Abwesenheit von Phosphat-Ionen gemessen. Falls die Interaktion von Phosphat- oder Sulfat-Ionen zu Strukturänderungen im Protein führt, sollten sich in beiden Versuchsreihen unterschiedliche Temperaturabhängigkeiten von ΔH_{ITC} bestimmen lassen. Dies ist nicht der Fall. Abbildung 12 zeigt die grafische Darstellung der ermittelten Werte. Es ist zu erkennen, dass sich zwar die absoluten Werte der Bindungsenthalpien deutlich unterscheiden, der Anstieg der linearen Regressionsgeraden jedoch annähernd unverändert bleibt ($\Delta C_p - \Delta C_{p \text{ Phosphat}} = -10 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$).

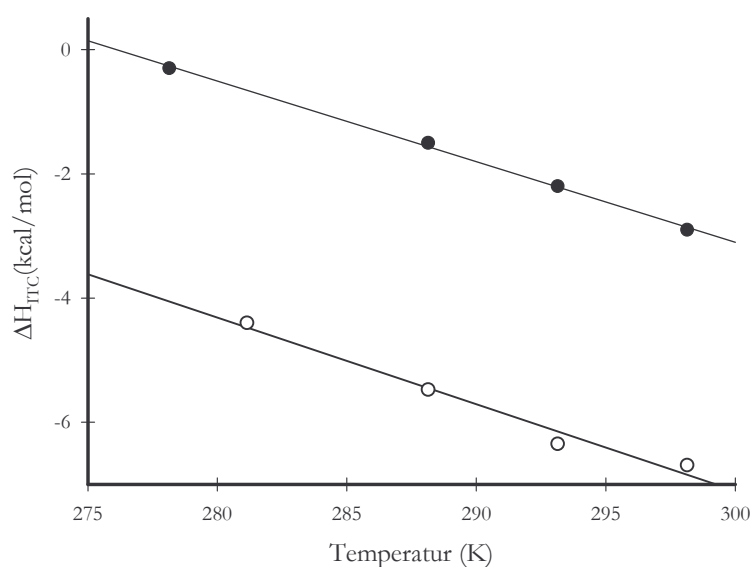


Abbildung 12: Temperaturabhängigkeit von ΔH_{ITC} in 35 mM HEPES-Puffer pH 7,8 (○) und mit Zusatz von 30 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$ bei 20°C. Die daraus bestimmten ΔC_p -Werte betragen $-139 \pm 15 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (○) und $-129 \pm 4 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Die durchgezogenen Linien wurden durch lineare Regressionen der Messwerte erhalten. Das Bestimmtheitsmaß war für beide Geraden größer als 0,97.

4.1.2.3 pH-Wert-Abhängigkeit der Komplexbildung

Offensichtlich trägt die phosphorylierte Seitenkette des Inhibitors entscheidend zur hohen Affinität zu hPin1 bei. Durch Variation des für die kalorimetrischen Experimente verwendeten pH-Wertes sollte untersucht werden, bei welchem Protonierungsgrad die Protein/ Ac-Phe-DThr(PO_3H_2)-Pip-Nal-Gln- NH_2 -Interaktion am effektivsten ist. Um die Ionenstärke und die Pufferzusammensetzung möglichst konstant zu halten, wurde ein Puffergemisch aus 25 mM Natriumacetat, 25 mM MES-Puffer, 25 mM Tris-Puffer und 150 mM NaCl verwendet. Die pH-Wert-Abhängigkeit der Assoziationskonstante ist in Abbildung 13A dargestellt. Die Bindung

wurde im sauren Bereich ($\text{pH} < 7$) deutlich schwächer. Ein Modell (Gleichung 17), welches die Änderung von zwei pK_s -Werten während des Bindungsprozesses berücksichtigte, wurde an die erhaltenen Daten angepasst. Dabei stellen die $(\text{pK}_s)_f$ -Werte die pK_s -Werte vor der Bindung bzw. im gebundenen ($(\text{pK}_s)_b$) Zustand dar. Die durch die nichtlineare Anpassung erhaltenen Parameter sind in Tabelle 4-6 dargestellt.

Gleichung 17

$$K_{obs} = K_A \frac{1 + 10^{(\text{pK}_s)_b - \text{pH}} + 10^{\text{pH} - (\text{pK}_s)_b}}{1 + 10^{(\text{pK}_s)_f - \text{pH}} + 10^{\text{pH} - (\text{pK}_s)_f}}$$

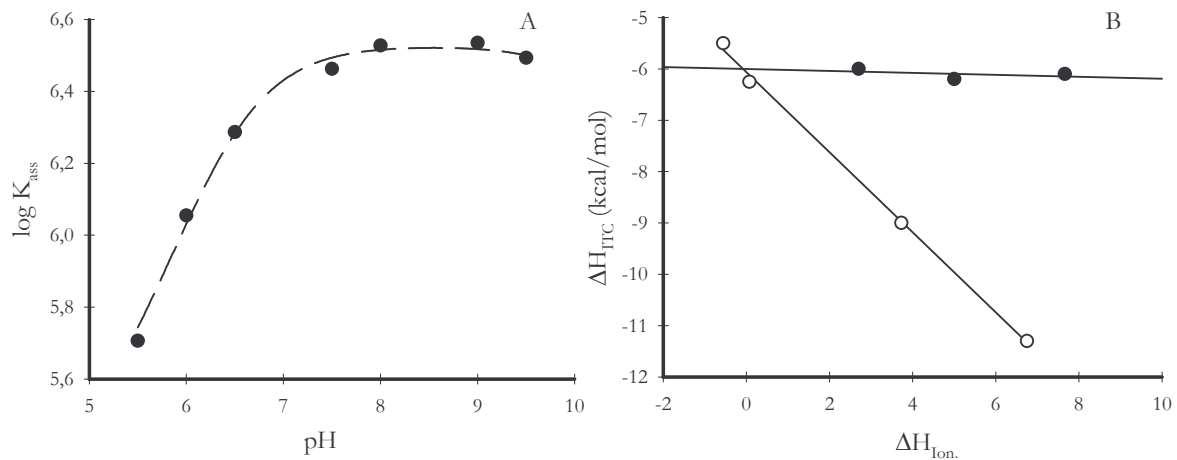


Abbildung 13: A) pH-Wert-Abhängigkeit der beobachteten Assoziationskonstante (K_{obs}), gemessen bei 20°C in einem Puffergemisch aus 25 mM Natriumacetat, 25 mM MES, 25 mM Tris und 150 mM NaCl im Bereich von pH 5,5 bis 9,5. Die unterbrochene Linie entspricht der nichtlinearen Regression anhand des in Gleichung 17 beschriebenen Modells. B) Darstellung der gemessenen Bindungsenthalpie (ΔH_{ITC}) der hPin1/ Ac-Phe-DThr(PO_3H_2)-Pip-Nal-Gln- NH_2 -Interaktion in Abhängigkeit von der Puffer-Ionisierungsenthalpie (ΔH_{Ion}) der verwendeten Puffer. Die Experimente wurden bei pH 5,5 in Cacodylatpuffer ($\Delta H_{\text{Ion}} = -0,56 \text{ kcal mol}^{-1}$), Acetatpuffer ($\Delta H_{\text{Ion}} = 0,07 \text{ kcal mol}^{-1}$), MES-Puffer ($\Delta H_{\text{Ion}} = 3,73 \text{ kcal mol}^{-1}$) und Bistris-Puffer ($\Delta H_{\text{Ion}} = 6,75 \text{ kcal mol}^{-1}$), sowie bei pH 7,5 in PIPES-Puffer ($\Delta H_{\text{Ion}} = 2,76 \text{ kcal mol}^{-1}$), HEPES-Puffer ($\Delta H_{\text{Ion}} = 5 \text{ kcal mol}^{-1}$) und Tricin-Puffer ($\Delta H_{\text{Ion}} = 7,66 \text{ kcal mol}^{-1}$) durchgeführt. Die Konzentration der Puffer betrug 25 mM. Durch lineare Regression wurden für n Werte von $-0,77 \pm 0,02$ (pH 5,5) und $-0,02 \pm 0,03$ (pH 7,5) ermittelt.

Tabelle 4-6: Zusammenfassung der Werte, welche nach nichtlinearer Anpassung der Parameter von Gleichung 17 an die in Abbildung 13 dargestellten Messwerte erhalten wurden.

Parameter	erhaltener Wert
$(pK_s)_{f1}$	10,6
$(pK_s)_{b1}$	>14
$(pK_s)_{f2}$	6,4
$(pK_s)_{b2}$	5,1
K_A	$3,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$

4.1.2.4 Untersuchung von hPin1-Varianten

Aus der Röntgenkristallstruktur des hPin1 im Komplex mit dem Dipeptid AP ist ersichtlich, dass die Seitenketten des R68 und R69 an der Komplexierung des schon erwähnten Sulfat-Ions beteiligt sind. Die Untersuchung der hPin1-Varianten hPin1 R68A und hPin1 R69A sollte die Frage beantworten, ob diese Seitenketten auch an der Komplexierung des Phosphatrestes des hier behandelten Liganden beteiligt sind. Die kalorimetrischen Experimente ergaben die in Tabelle 4-7 aufgeführten Ergebnisse. Die Affinität des Liganden zu hPin1 R68A war im Vergleich mit hPin1 fast unverändert. Dabei war die zu beobachtende leicht schwächere Bindung ausschließlich auf den reduzierten entropischen Beitrag zur freien Enthalpie zurückzuführen ($T\Delta S_{ITC, hPin1} - T\Delta S_{ITC, hPin1 R68A} = -0,9 \text{ kcal mol}^{-1}$). Die Seitenkette von R69 hatte einen weit größeren Einfluss auf die Assoziationskonstante, diese sank für die hPin1 R69A-Variante rund 30fach. Entgegen dem für die hPin1 R68A-Variante gefundenen entropischen Effekt wurde die positivere freie Enthalpie der Bindung zusätzlich durch ein positiveres ΔH_{ITC} vermittelt ($\Delta H_{ITC, hPin1} - \Delta H_{ITC, hPin1 R69A} = -1,3 \text{ kcal mol}^{-1}$).

Tabelle 4-7: Thermodynamische Parameter der Interaktion zweier hPin1 ΔWW -Varianten mit Ac-Phe-DThr(PO_3H_2)-Pip-Nal-Gln-NH₂. Die Messungen erfolgten bei 20°C, in 35 mM HEPES-Puffer, pH 7,8.

Variante	$\Delta H_{ITC} (20^\circ C)$ kcal mol ⁻¹	$T\Delta S_{ITC} (20^\circ C)$ kcal mol ⁻¹	$\Delta G_{ITC} (20^\circ C)$ kcal mol ⁻¹	K_A 10 ⁶ M ⁻¹
hPin1 R68A	-6,3	2,8	-9,2	7,7
hPin1 R69A	-4,9	3,1	-8,0	0,97

Die mittels nichtlinearer Regression ermittelten Parameter wiesen Standardabweichungen von weniger als 10% auf.

4.1.2.5 Thermodynamik der Interaktion von Ac-AA(p)SPR-pNA mit hPin1 Δ WW

Das in den vorangegangenen Abschnitten untersuchte Peptid weist strukturelle Ähnlichkeiten zu Oligopeptidsubstraten von hPin1 auf. Durch die Charakterisierung einer Interaktion zwischen hPin1 mit einem solchen Oligopeptidsubstrat kann geklärt werden, welchen Einfluss die nichtproteinogenen Aminosäurereste des oben erwähnten Liganden auf die thermodynamischen Eigenschaften der Ligand/Enzym-Interaktion haben. Das Experiment wurde bei 20°C in 35 mM HEPES-Puffer pH 7,8 durchgeführt. Es wurden folgende Parameter ermittelt: $\Delta H_{ITC} = -5,9 \text{ kcal mol}^{-1}$, $\Delta S_{ITC} = -1,1 \text{ kcal mol}^{-1}$, $K_A = 3,9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ und $\Delta G_{ITC} = -4,8 \text{ kcal mol}^{-1}$.

4.2 Kinetische Untersuchungen zu PPIasen

Ziel dieser Untersuchungen war es, weiterführende Einblicke in den enzymatischen Mechanismus der PPIasen zu erhalten. Zu diesem Zweck sollte mit Hilfe von KSIE der Übergangszustand des Substrat/PPIase-Komplexes während der Katalyse analysiert werden. Aussagekräftige Ergebnisse sind von diesen Experimenten nur zu erwarten, wenn der durch die veränderte Isotopenzusammensetzung beeinflusste Reaktionsschritt auch die Gesamtgeschwindigkeit des katalytischen Prozesses mitbestimmt. Viele Vertreter der PPIasen weisen k_{kat}/K_M -Werte in der Größenordnung von diffusionskontrollierten Enzymreaktionen auf. Deshalb sollte mit Hilfe von viskositätsabhängigen PPIase-Aktivitätsmessungen zuerst festgestellt werden, ob und wie stark PPIasen durch Diffusionsprozesse beeinflusst werden. Die hier untersuchten Reaktionen wurden in Messansätzen mit steigenden Konzentrationen Glycerol, Rohrzucker und PVP360 durchgeführt. In jedem Fall ist eine lineare Abhängigkeit der Aktivität von der ermittelten Viskosität zu beobachten. Die beobachteten Anstiege der linearen Regression geben Aufschluss darüber, zu welchem Anteil die gemessene enzymatische Reaktion von Diffusionsprozessen beeinflusst wird [114]. Ein Anstieg von 1 stellt die obere Grenze dar und bedeutet, dass die Reaktion zu 100% diffusionskontrolliert abläuft. Um spezifische Effekte auf die Enzyme, vermittelt durch den Zusatz von viskositätserhöhenden Substanzen (hier kurz Viskosogene genannt) ausschließen zu können, müssen Kontrollexperimente durchgeführt werden. Dazu wurden verschiedene Viskosogene verwendet und überprüft, ob der beobachtete Effekt auf die Enzymaktivität unabhängig von der verwendeten Substanz war und nur von der eingestellten Viskosität beeinflusst wurde. Als Negativkontrolle wurde ein hochmolekulares Viskosogen (PVP360) verwendet, welches zwar die Viskosität der Lösung erhöht, aber keinen Einfluss auf die Diffusionsgeschwindigkeit von kleinen Molekülen hat. Des Weiteren wurden Versuchsbedingungen gesucht, die es ermöglichten, den k_{kat}/K_M -Wert der untersuchten Enzyme soweit zu erniedrigen, dass keine Diffusionskontrolle der Reaktion mehr vorlag. Dies wurde zum Beispiel durch den Einsatz von enzymatisch inaktiveren Enzymvarianten oder durch die

Verwendung von Substraten erreicht, welche mit den jeweiligen Enzymen niedrige $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Werte aufwiesen. An dieser Stelle sei angemerkt, dass viskositätsabhängige Enzymaktivitäten auch bei Enzymen beobachtet wurden, deren $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Werte deutlich unter dem berechneten Diffusionslimit von 10^7 bis $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ lagen [115-120]. Dieses Verhalten wurde teilweise mit der verringerten Flexibilität der Enzyme in hochviskosen Lösungen begründet. Falls das Enzym während der Katalyse strukturelle Änderungen durchlaufen muss, kann die erhöhte Viskosität des Lösungsmittels ebenfalls die Enzymaktivität verringern.

4.2.1 Viskositätsabhängigkeit der PPIase-Aktivität

4.2.1.1 Validierung des proteasegekoppelten PPIase-Aktivitätstests

Zuerst wurde überprüft, ob der anzuwendende proteasegekoppelte Test auch unter Versuchsbedingungen mit erhöhter Viskosität reproduzierbare Ergebnisse liefert. Zu diesem Zweck wurden Vergleichsmessungen aller später verwendeten Peptidsubstrate mit den entsprechenden Hilfsproteasen in 35 mM HEPES pH 7,8 mit und ohne Zusatz von 30% (w/w) Glycerol bzw. Rohrzucker durchgeführt. Die unkatalysierte *cis/trans*-Isomerisierung wurde nicht durch den Zusatz der Viskosogene beeinflusst, es wurde ebenfalls keine Veränderung des *cis*-Gehalts der untersuchten Peptide beobachtet. Um auszuschließen, dass die zugesetzten Viskosogene die Stabilität der untersuchten PPIasen gegen die im Messansatz vorhandene Protease beeinflussten, wurden Vorinkubationsversuche durchgeführt. Dazu wurde der vortemperierte Standardmessansatz (35 mM HEPES pH 7,8, 0,3 mg/ml Hilfsprotease) in An- und Abwesenheit von 30% (w/w) Glycerol bzw. Rohrzucker für 0 bzw. 5 min bei 10°C vorinkubiert, und im Anschluss durch Zugabe von Substratpeptid die PPIase-Aktivität bestimmt. Für hCyp18, hFKBP12, *E. coli* Par10 wurde die Aktivität durch die Vorinkubation um nicht mehr als 5% reduziert. Die Aktivität von hPin1 hingegen wurde innerhalb von 5 min bereits auf 54% verringert, in Anwesenheit von Glycerol oder Rohrzucker verstärkte sich dieser Effekt nochmals leicht, sodass die beobachtete Restaktivität auf 50% sank. Um trotzdem diesen Test auf hPin1 anwenden zu können, wurden hPin1-Konzentrationen im Messansatz benutzt, die es erlaubten, die Gesamtmesszeit auf unter 150 s zu beschränken. Unter diesen Bedingungen folgten die aufgenommenen Kinetiken einer Reaktion erster Ordnung, was darauf schließen ließ, dass die PPIase während der Messung ausreichend stabil war.

4.2.1.2 hCyp18

Aus den Ergebnissen der im Kapitel 4.1.1 beschriebenen hCyp18/CsA-Interaktion konnte geschlussfolgert werden, dass die für die hier ausgeführten Untersuchungen verwendete Proteincharge annähernd vollständig in der nativen und enzymatisch aktiven Form vorlag. Die grafische Darstellung einer Auswahl der ermittelten viskositätsabhängigen hCyp18-Aktivitäten ist

in Abbildung 14 wiedergegeben. Die für das Substrat Suc-AAPF-pNA ermittelten relativen k_{kat}/K_M -Werte, aufgetragen gegen die relative Viskosität der Glycerol- bzw. Rohrzuckerlösung, zeigten, dass die Katalyse stark von der Viskosität beeinflusst wurde. Wie zu erwarten, beeinflusste das polymere Viskosogen PVP360 die Aktivität von hCyp18 nicht, da es die Diffusion von kleinen Molekülen nicht behindert. Die Aktivität der Varianten hCyp18 H126A ($k_{\text{kat}}/K_M=1,4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und hCyp18 H126F ($k_{\text{kat}}/K_M=1,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) zeigt keine Viskositätsabhängigkeit der Aktivität mehr. Aus diesen Beobachtungen wurde geschlussfolgert, dass die Viskositätsabhängigkeit der hCyp18-Aktivität tatsächlich auf der erhöhten Viskosität der Lösungen beruht und nicht aufgrund einer direkten Inhibition der Enzymaktivität durch die zugesetzten Viskosogene zustande kam.

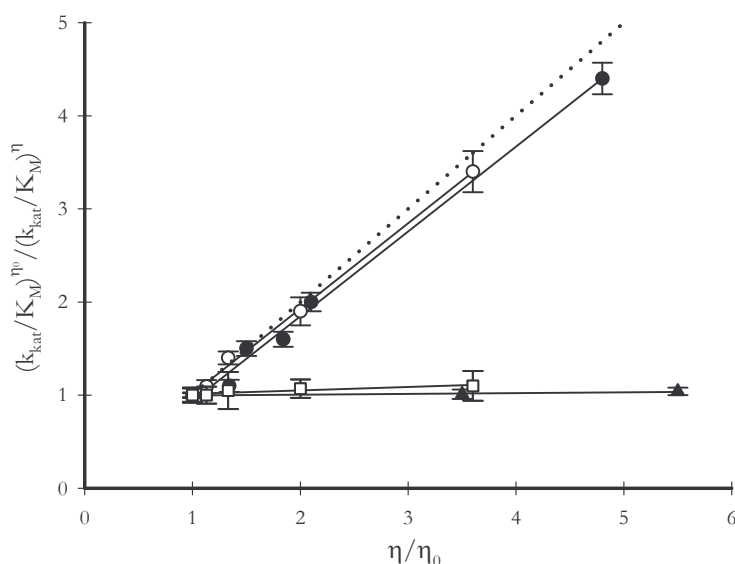


Abbildung 14: Viskositätsabhängigkeit der hCyp18-Aktivität, bestimmt mit dem Substrat Suc-AAPF-pNA in verschiedenen konzentrierten Lösungen von Glycerol (●), Rohrzucker (○) und PVP360 (▲) in 35 mM HEPES-Puffer, pH 7,8, 0,3 mg/ml Chymotrypsin bei 10°C. Zur Kontrolle wurde die Viskositätsabhängigkeit der Aktivität der hCyp18 H126A-Variante in Lösungen mit steigenden Rohrzuckerkonzentrationen untersucht (□). Die linearen Regressionsgeraden haben folgende Anstiege: $0,91 \pm 0,04$ (●), $0,92 \pm 0,3$ (○), $< 0,05$ (▲), $< 0,05$ (□). Die gepunktete Linie hat einen Anstieg von 1 und entspricht damit einer vollständig diffusionskontrollierten Reaktion.

Um eine detaillierte Aussage über die molekularen Grundlagen der Viskositätsabhängigkeit der gemessenen PPIase-Aktivität zu erlangen, wurden weitere Substrate und hCyp18-Varianten untersucht (Tabelle 4-8). Interessanterweise konnten auch für Substrate, welche mit niedrigeren k_{kat}/K_M -Werten katalysiert wurden, viskositätsabhängige Aktivitäten gemessen werden. Im Gegensatz dazu schien die Viskositätsabhängigkeit der Varianten hCyp18 R55A, hCyp18 Q63N und hCyp18 F113A auf einer enzymatisch hochaktiven Verunreinigung zu beruhen. Grund zu

dieser Annahme lieferten die in Tabelle 4-9 dargestellten Differenzen zwischen den gemessenen K_i - und K_D -Werten dieser Varianten gegenüber CsA.

Tabelle 4-8: Viskositätsabhängigkeit der PPIase-Aktivität von hCyp18 und dessen Varianten, ermittelt für verschiedene Viskosogene im proteasegekoppelten PPIase-Aktivitätstest bei 10°C. Die eingetragenen Anstiege wurden aus der Auftragung der relativen k_{kat}/K_M -Werte gegen die relative Viskosität des Messansatzes ermittelt. Die k_{kat}/K_M -Werte, ermittelt ohne Zusatz von Viskosogen, wurden zur leichteren Interpretation der Anstiege aufgeführt.

Enzym	Viskosogen	Substrat	Anstieg	k_{kat}/K_M^0 ($M^{-1} s^{-1}$)
hCyp18	Glycerol	Suc-AAPF-pNA	0,91	$1,5 \cdot 10^7$
	Rohrzucker	Suc-AAPF-pNA	0,92	$1,5 \cdot 10^7$
	PVP 360	Suc-AAPF-pNA	<0,05	$1,5 \cdot 10^7$
	Glycerol	Suc-AFPF-pNA	0,90	$6 \cdot 10^6$
	Rohrzucker	Suc-AFPF-pNA	0,91	$6 \cdot 10^6$
	PVP360	Suc-AFPF-pNA	<0,05	$6 \cdot 10^6$
	Rohrzucker	Suc-AAPF-DFA	0,90	$6,5 \cdot 10^6$
	Glycerol	Suc-AWPF-pNA	0,45	$2,2 \cdot 10^6$
	Rohrzucker	Suc-AWPF-pNA	0,50	$2,2 \cdot 10^6$
hCyp18 R55A	Rohrzucker	Suc-AAPF-pNA	0,5	$1,4 \cdot 10^4$
	Glycerol	Suc-AAPF-pNA	0,48	$1,4 \cdot 10^4$
hCyp18 Q63N	Rohrzucker	Suc-AAPF-pNA	0,2	$1,1 \cdot 10^4$
	Glycerol	Suc-AAPF-pNA	0,3	$1,1 \cdot 10^4$
hCyp18 F113A	Rohrzucker	Suc-AAPF-pNA	0,25	$3 \cdot 10^4$
	Glycerol	Suc-AAPF-pNA	0,22	$3 \cdot 10^4$
hCyp18 H126F	Rohrzucker	Suc-AAPF-pNA	< 0,05	$1,4 \cdot 10^6$
	Glycerol	Suc-AAPF-pNA	< 0,05	$1,4 \cdot 10^6$
hCyp18 H126A	Rohrzucker	Suc-AAPF-pNA	< 0,05	$1,4 \cdot 10^5$
	Glycerol	Suc-AAPF-pNA	< 0,05	$1,4 \cdot 10^5$

Die durch lineare Regression ermittelte Standardabweichung der Anstiege war in allen Fällen kleiner als $\pm 0,05$.

Je geringer die beobachtete Restaktivität der Varianten ist, desto größer ist die Gefahr, dass die PPIase-Aktivität durch mitgereinigte *E. coli*-Cyclophiline hervorgerufen wird. Das hier beobachtete Problem wurde bereits vermutet, konnte jedoch bis jetzt nicht direkt nachgewiesen werden [57].

Tabelle 4-9: Vergleich der im proteasegekoppelten PPIase-Aktivitätstest ermittelten K_i -Werte für die Inhibition von hCyp18 durch CsA bei 10°C unter Verwendung von Suc-AAPF-pNA als Substrat und den bei 25°C mittels ITC ermittelten K_D -Werten der hCyp18/CsA-Interaktion

Enzym	K_D nM	K_i nM	% aktive Zentren ^{a)}	Enzymkonzentration im PPIase-Test
hCyp18	8	2	>92%	1,5 nM
hCyp18 R55A	180	1100	94%	2,2 μ M
hCyp18 Q63N	104	1200	95%	2,5 μ M
hCyp18 Q63E	3225	>2500	88%	2,2 μ M
hCyp18 H126F	70	20	92%	24 nM
hCyp18 H126A	725	810	93%	0,3 μ M
hCyp18 F113A	58	250	93%	1,8 μ M

a) ermittelt mit Hilfe von ITC-Experimenten

Die geringere Temperaturstabilität von hCyp18 im Vergleich zu *E. coli*-Cyclophilinen liefert einen Ansatzpunkt dafür, beide PPIase-Aktivitäten voneinander zu trennen [45]. Dazu wurde die Enzymaktivität von hochkonzentrierten Proteinproben der Varianten (>150 μ M) jeweils vor und nach einer Inkubation für 5 min bei 53°C bestimmt. Während der Inkubationszeit zeigte sich ein deutlicher Niederschlag im Reaktionsgefäß, der durch Zentrifugation abgetrennt wurde. Obwohl im Reaktionsgefäß keine UV-Vis-spektroskopisch messbare Proteinkonzentration mehr bestimmt werden konnte, verringerte sich die PPIase-Aktivität nur gering. Dies ist ein Nachweis dafür, dass die bestimmten PPIase-Aktivitäten nur zu einem Teil durch die hCyp18-Varianten selbst hervorgerufen wurden. Da sich die verbleibende Aktivität der Verunreinigung auch bei längerer Inkubation bei 53°C nicht verringerte, konnte davon ausgegangen werden, dass die Verunreinigung unter diesen Bedingungen nicht inaktiviert wurde. Damit konnte aus der Differenz der ermittelten PPIase-Aktivitäten vor und nach der Inkubation auf die tatsächliche Restaktivität der untersuchten Varianten geschlossen werden (Tabelle 4-10). Die nach der Inkubation im Überstand zurückbleibende Aktivität zeigte eine viskositätsabhängige PPIase-Aktivität in glycerol- und rohrzuckerhaltigen Messansätzen. Eine anschließende Präparation der im Überstand verbliebenen PPIase (Daten nicht gezeigt) und deren proteinchemische Untersuchung mittels N-terminalen Aminosäureabbaus und massenspektrometrischen Methoden ergab, dass die beobachtete PPIase-Aktivität durch die PPIase *E. coli* CypA hervorgerufen wurde.

Tabelle 4-10: Vergleich der ermittelten Restaktivitäten der hCyp18-Varianten. Die korrigierten Restaktivitäten wurden erhalten, indem die nach der thermischen Inaktivierung und Präzipitation der Varianten zurückbleibende PPIase-Aktivität von der zuvor ermittelten Restaktivität der Varianten abgezogen wurde.

Variante	% Restaktivität zu hCyp18 (gemessen)	% Restaktivität zu hCyp18 (korrigiert)
hCyp18 R55A	0,09%	<0,02%
hCyp18 Q63N	0,07%	<0,03%
hCyp18 Q63E	0,1%	<0,03%
hCyp18 H126F	8,8%	8,8%
hCyp18 H126A	0,9%	0,8%
hCyp18 F113A	0,2%	<0,04%

Zur näheren Untersuchung der Enzymeigenschaften von hCyp18 in viskosen Lösungen sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Viskosität auf die Michaelis-Menten-Parameter auf dieses Enzym hatte. In Tabelle 4-11 wurden die Ergebnisse zusammengefasst. Wie zu erkennen ist, erhöht die gesteigerte Viskosität nur den K_M -Wert des Enzyms, lässt aber den k_{kat} -Wert unverändert.

Tabelle 4-11: Vergleich der k_{kat} - und K_M -Werte von hCyp18 gegenüber dem Substrat Suc-AFPF-pNA, bei 10°C in 35 mM HEPES-Puffer pH 7,8 mit Zusätzen der Viskosogene Rohrzucker und Glycerol.

Viskosogen	K_M $\mu\text{M s}^{-1}$	k_{kat} s^{-1}
	92	507
20% (w/w) Rohrzucker	160	485
40% (w/w) Glycerol	>500	511

4.2.1.3 hPin1

Substrate mit N-terminal zum Prolin gelegenen phosphorylierten Threonin- oder Serin-Seitenketten werden von hPin1 mit k_{kat}/K_M -Werten von bis zu $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ umgesetzt [89]. Diese ausgeprägte Substratspezifität unterscheidet hPin1 von anderen Vertretern der Parvulin-Familie. In diesem Abschnitt wurden die Ergebnisse der viskositätsabhängigen Messungen dieses Enzyms zusammengefasst. Abbildung 15 zeigt beispielhaft die Ergebnisse für hPin1, untersucht mit den Substraten Ac-AA(p)SPR-pNA und dem nicht phosphorylierten Substrat Ac-AASPR-pNA.

Ähnlich wie für hCyp18 beobachtet zeigte sich auch hier eine von dem eingesetzten Viskosogen unabhängige lineare Abhängigkeit der PPIase-Aktivität. Die Anstiege der linearen Regressionsgeraden für die unter Zusatz von Glycerol und Rohrzucker durchgeführten Reaktionen waren etwa 1. Überraschenderweise wurde die Katalyse von nichtphosphorylierten Substraten, welche von hPin1 mit deutlich geringerer Aktivität umgesetzt wurden, ebenfalls durch die Viskosität des Messansatzes beeinflusst. Dabei wurden für die linearen Regressionsgeraden der Messwerte aus glycerol- und rohrzuckerhaltigen Ansätzen annähernd gleiche Anstiege ermittelt (Tabelle 4-12).

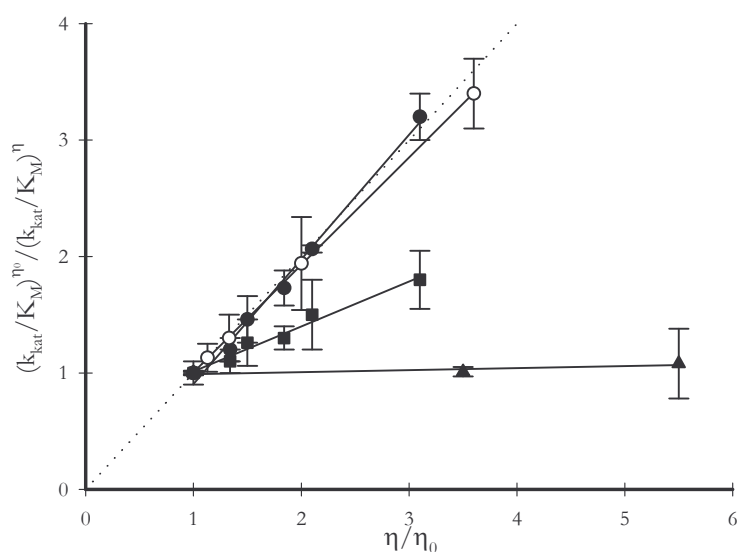


Abbildung 15: Viskositätsabhängigkeit der hPin1-Aktivität in verschiedenen konzentrierten Lösungen von Glycerol (●), Rohrzucker (○) und PVP360 (▲) in 35 mM HEPES-Puffer, pH 7,8, 0,3 mg/ml Trypsin bei 10°C mit dem Substrat Ac-AA(p)SR-pNA gemessen. Zur Kontrolle wurde die Viskositätsabhängigkeit der Aktivität mit einem unphosphorylierten Substrat (Ac-AASPR-pNA) bei steigenden Glycerolkonzentrationen untersucht (■). Die linearen Regressionsgeraden haben folgende Anstiege: $1,1 \pm 0,05$ (●), $0,93 \pm 0,01$ (○), $< 0,05$ (▲), $0,38 \pm 0,03$ (■). Die gepunktete Linie hat einen Anstieg von 1 und entspricht damit einer vollständig diffusionskontrollierten Reaktion.

Die zur Verfügung stehenden Varianten des hPin1 (hPin1 R68A, hPin1 R69A) konnten nicht untersucht werden, da diese Enzyme im verwendeten proteasegekoppelten PPIase-Aktivitätstest nicht ausreichend stabil waren. Die beobachtete Proteasesensibilität des Wildtypproteins kann dafür verantwortlich sein, dass bei den durchgeführten Messungen teilweise zu steile Anstiege für die Viskositätsabhängigkeit der hPin1-Aktivität ermittelt wurden. Durch die bereits im Abschnitt 4.2.1.1 beschriebenen Kontrollmessungen konnte jedoch ausgeschlossen werden, dass der dadurch verursachte Fehler größer als 10% war.

Tabelle 4-12: Viskositätsabhängigkeit der PPIase-Aktivität von hPin1, ermittelt für verschiedene Viskosogene im proteasegekoppelten PPIase-Aktivitätstest bei 10°C. Die eingetragenen Anstiege wurden aus der Auftragung der relativen k_{kat}/K_M -Werte gegen die relative Viskosität des Messansatzes ermittelt. Die ohne Zusatz von Viskosogen ermittelten k_{kat}/K_M -Werte wurden zur leichteren Interpretation der Anstiege aufgeführt.

Viskosogen	Substrat	Anstieg	k_{kat}/K_M^0 $M^{-1} s^{-1}$
Glycerol	Ac-AA(p)SPR-pNA	1,1	$2,5 \cdot 10^7$
Rohrzucker	Ac-AA(p)SPR-pNA	0,93	$2,5 \cdot 10^7$
PVP 360	Ac-AA(p)SPR-pNA	<0,05	$2,5 \cdot 10^7$
Rohrzucker	Ac-AASPR-pNA	0,25	$2,4 \cdot 10^4$
Glycerol	Ac-AASPR-pNA	0,38	$2,4 \cdot 10^4$
PVP 360	Ac-AASPR-pNA	<0,05	$2,4 \cdot 10^4$

Die durch lineare Regression erhaltenen Standardabweichungen der Anstiege waren in allen Fällen kleiner als $\pm 0,05$.

4.2.1.4 *E. coli* Par10

Die Ergebnisse der Viskositätsabhängigkeit der PPIase-Aktivität von *E. coli* Par10, dem prototypischen Vertreter der nicht phosphatspezifischen Parvuline, sollen in diesem Abschnitt dargelegt werden. Die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung des Substrats Suc-AFPF-pNA wird von *E. coli* Par10 mit einem k_{kat}/K_M -Wert von $8,5 \cdot 10^6 M^{-1} s^{-1}$ katalysiert. Obwohl dieser Wert niedriger ist als für hPin1 und hCyp18, wurde die Katalyse durch die Viskositätserhöhung mittels Glycerol oder Rohrzucker verlangsamt (Abbildung 16). Der ermittelte Anstieg der erhaltenen relativen k_{kat}/K_M -Werte, aufgetragen gegen die relative Viskosität, ergab Werte um 0,9. Eine enzymatisch inaktivere Variante (*E. coli* Par10 C40D) zeigte kein solches Verhalten mehr (Tabelle 4-13). Ebenso wenig wurde für die Katalyse des Substrates Suc-AAPF-DFA eine viskositätsabhängige Änderung der Enzymaktivität beobachtet. Im Gegensatz dazu erhöhte sich die PPIase-Aktivität der Variante *E. coli* Par10 C40A mit steigenden Konzentrationen an Glycerol oder Rohrzucker. Diese Variante schien durch den Zusatz der Viskosogene aktiviert zu werden. Die Aktivität dieser Variante verringerte sich deutlich, wenn das Enzym mit der verwendeten Protease im Messansatz vorinkubiert wurde. Die Variante *E. coli* Par10 C40D zeigte kein solches Verhalten. Daraus konnte abgeleitet werden, dass die Variante *E. coli* Par10 C40A eine unzureichende Stabilität gegenüber der im Ansatz vorliegenden Protease besaß und die beobachtete Erhöhung der PPIase-Aktivität, in Lösungen mit erhöhten Glycerolkonzentrationen, auf einer Stabilisierung dieser Variante beruhte.

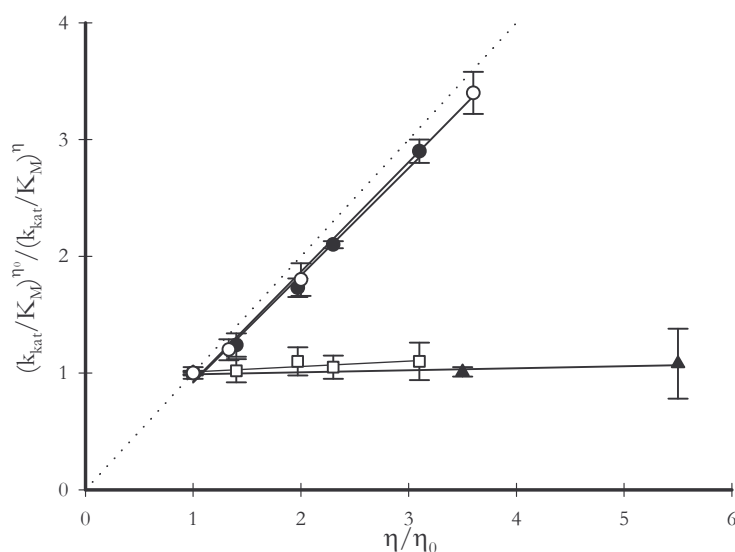


Abbildung 16: Viskositätsabhängigkeit der *E. coli* Par10-Aktivität in verschiedenen konzentrierten Lösungen von Glycerol (●), Rohrzucker (○) und PVP360 (▲) in 35 mM HEPES-Puffer, pH 7,8, 0,3 mg/ml Chymotrypsin bei 10°C. Als Substrat wurde Suc-AFPF-pNA verwendet. Zur Kontrolle wurde die Viskositätsabhängigkeit der Aktivität der *E. coli* Par10 C40D-Variante in Lösungen bei steigenden Rohrzuckerkonzentrationen untersucht (■). Die linearen Regressionsgeraden haben folgende Anstiege: $0,92 \pm 0,05$ (●) $0,94 \pm 0,04$ (○) $<0,05$ (▲) $<0,05$ (□). Die gepunktete Linie hat einen Anstieg von 1 und entspricht damit einer vollständig diffusionskontrollierten Reaktion.

Tabelle 4-13: Viskositätsabhängigkeit der PPIase-Aktivität von *E. coli* Par10 und der Variante *E. coli* Par10 C40D, ermittelt für verschiedene Viskosogene im proteasegekoppelten PPIase-Aktivitätstest bei 10°C. Die eingetragenen Anstiege wurden aus der Auftragung der relativen $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Werte gegen die relative Viskosität des Messansatzes ermittelt. Die ohne Zusatz von Viskosogen ermittelten $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Werte wurden zur leichteren Interpretation der Anstiege aufgeführt

Enzym	Viskosogen	Substrat	Anstieg	$k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}^0$ $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
<i>E. coli</i> Par10	Glycerol	Suc-AFPF-pNA	0,92	$8,5 \cdot 10^6$
	Rohrzucker	Suc-AFPF-pNA	0,94	$8,5 \cdot 10^6$
	PVP 360	Suc-AFPF-pNA	$<0,05$	$8,5 \cdot 10^6$
<i>E. coli</i> Par10 C40D	Glycerol	Suc-AAPF-DFA	$<0,05$	$7 \cdot 10^5$
	Rohrzucker	Suc-AAPF-DFA	$<0,05$	$7 \cdot 10^5$
	PVP 360	Suc-AAPF-DFA	$<0,05$	$7 \cdot 10^5$
<i>E. coli</i> Par10 C40A	Glycerol	Suc-AFPF-pNA	-0,7	$2,8 \cdot 10^4$
	Rohrzucker	Suc-AFPF-pNA	-0,2	$2,8 \cdot 10^4$

Die durch lineare Regression erhaltenen Standardabweichungen der Anstiege waren in allen Fällen kleiner als $\pm 0,05$.

4.2.1.5 hFKBP12

Obwohl die höchsten k_{kat}/K_M -Werte der von hFKBP12 katalysierten Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung von Oligopeptiden ungefähr 10fach kleiner sind als diejenigen von hCyp18 und hPin1 und damit nicht mehr im Bereich von diffusionskontrollierten Reaktionen liegen, sollte untersucht werden, inwiefern die Viskosität des Lösungsmittels die Aktivität dieses Enzyms beeinflusst. Anders als für die drei bereits beschriebenen Enzyme verhielt sich die Aktivität von hFKBP12 in Messansätzen mit Glycerol anders als in Ansätzen mit Rohrzucker (Abbildung 17). Glycerol verringert die hFKBP12-Aktivität weit stärker, als man es von der Verlangsamung von Diffusionsprozessen erwarten würde, wogegen die Anwesenheit von Rohrzucker und PVP360 keinen messbaren Einfluss auf die PPIase-Aktivität hatte.

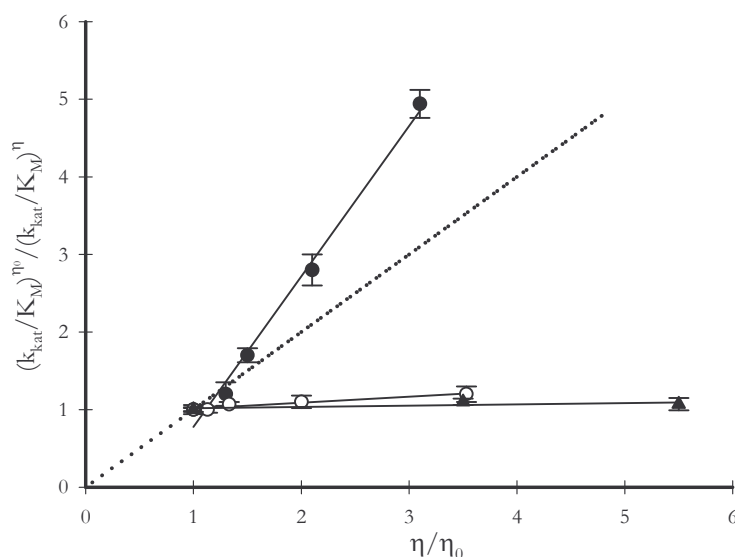


Abbildung 17: Viskositätsabhängigkeit der hFKBP12-Aktivität in verschiedenen konzentrierten Lösungen Glycerol (●), Rohrzucker (○) und PVP360 (▲) in 35 mM HEPES, pH 7,8, 0,3 mg/ml Chymotrypsin bei 10°C. Als Substrat wurde Suc-ALPF-pNA verwendet. Die linearen Regressionsgeraden haben folgende Anstiege: $1,9 \pm 0,1$ (●) $< 0,05$ (○) $< 0,05$ (▲). Die gepunktete Linie hat einen Anstieg von 1 und entspricht damit einer vollständig diffusionskontrollierten Reaktion.

Selbst die Umsetzung von Substraten, die hFKBP12 mit noch niedrigeren k_{kat}/K_M -Werten katalysierte, wurde durch die Anwesenheit von Glycerol stark inhibiert und von Rohrzucker nicht beeinflusst (Tabelle 4-14). Der beobachtete Effekt von Glycerol auf hFKBP12 scheint durch eine direkte Inhibierung der PPIase-Aktivität dieses Enzyms vermittelt zu werden und nicht auf die Änderung der Viskosität des Messansatzes zurückzuführen zu sein. Die unveränderte PPIase-Aktivität von hFKBP12 in Messansätzen mit 30% (w/w) Sorbitol als Viskosogen bestätigte diesen Befund (Daten nicht gezeigt). Die hier beobachteten Effekte unterstreichen die

Notwendigkeit, verschiedene Viskosogene zur Bestimmung der Viskositätsabhängigkeit von Enzymen zu verwenden.

Tabelle 4-14: Viskositätsabhängigkeit der PPIase-Aktivität von hFKBP12, ermittelt für verschiedene Viskosogene im proteasegekoppelten PPIase-Aktivitätstest bei 10°C. Die eingetragenen Anstiege wurden aus der Auftragung der relativen k_{kat}/K_M -Werte gegen die relative Viskosität des Messansatzes ermittelt. Die ohne Zusatz von Viskosogen ermittelten k_{kat}/K_M -Werte wurden zur leichteren Interpretation der Anstiege aufgeführt.

Viskosogen	Substrat	Anstieg	k_{kat}/K_M^0 $M^{-1} s^{-1}$
Glycerol	Suc-ALPF-pNA	1,9	$1,7 \cdot 10^6$
Rohrzucker	Suc-ALPF-pNA	<0,05	$1,7 \cdot 10^6$
PVP360	Suc-ALPF-pNA	<0,05	$1,7 \cdot 10^6$
Glycerol	Suc-AAPF-DFA	1,65	$8,5 \cdot 10^4$
Rohrzucker	Suc-AAPF-DFA	<0,05	$8,5 \cdot 10^4$
Glycerol	Suc-AAPF-pNA	0,8	$1,3 \cdot 10^5$
Rohrzucker	Suc-AAPF-pNA	<0,05	$1,3 \cdot 10^5$

Die durch lineare Regression erhaltenen Standardabweichungen der Anstiege waren in allen Fällen kleiner als $\pm 0,1$.

4.2.2 Kinetischer Lösungsmittelisotopeneffekt

4.2.2.1 hCyp18

Ziel der Untersuchungen war es, durch die Bestimmung des KSIE den Katalysemechanismus von hCyp18 näher zu beleuchten. Dazu wurden verschiedene Messmethoden angewendet. Zuerst wurde der KSIE für hCyp18 und zwei seiner Varianten mittels des proteasegekoppelten PPIase-Aktivitätstests bestimmt (Tabelle 4-15). Für hCyp18 und zwei seiner Varianten konnten dabei inverse KSIE ermittelt werden. Die im Messansatz vorliegende Protease konnte als Verursacher der inversen Effekte ausgeschlossen werden, da im proteasefreien PPIase-Aktivitätstest ähnliche Werte ermittelt wurden. Die Varianten hCyp18 R55A, hCyp18 Q63E, hCyp18 F113A und hCyp18 Q63N wurden aufgrund der bereits beschriebenen Verunreinigung (siehe Abschnitt 4.2.1.2) nicht untersucht. Bei der Auswertung der erhaltenen relativen k_{kat}/K_M -Werte musste beachtet werden, dass die Aktivität von hCyp18 stark durch die Viskosität des Lösungsmittels beeinflusst wurde. Unter den hier verwendeten Bedingungen ist D_2O um 28% viskoser als H_2O . Das bedeutet, dass eine in D_2O katalysierte Reaktion selbst in Abwesenheit jeglicher Isotopeneffekte per se langsamer ablaufen müsste als die Reaktion unter gleichen Bedingungen in H_2O .

Tabelle 4-15: Vergleich der durch die Verwendung von unterschiedlichen Substraten und unterschiedlichen Enzym-Varianten im proteasegekoppelten bzw. im proteasefreien PPIase-Aktivitätstest ermittelten KSIE der k_{kat}/K_M -Werte der untersuchten Enzyme.

Enzym	Substrat	KSIE (k_{kat}/K_M) ^{D b)}
hCyp18	Suc-AFPF-pNA	0,82±0,05
	Suc-AAPF-DFA ^{a)}	0,82±0,07
hCyp18 H126F	Suc-AFPF-pNA	0,69±0,06
hCyp18 H126A	Suc-AFPF-pNA	0,68±0,04

Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten mit den entsprechenden Standardabweichungen, ermittelt aus 3 unabhängigen Messungen.

a) im proteasefreien PPIase-Aktivitätstest bestimmt

b) errechnet sich aus dem Quotienten $(k_{\text{kat}}/K_M)^{\text{H}_2\text{O}} / (k_{\text{kat}}/K_M)^{\text{D}_2\text{O}}$

Um nähere Aussagen über den Ursprung des KSIE machen zu können, wurden die Messungen in Ansätzen mit verschiedenen Anteilen D_2O , sogenannte Protonen-Inventur-Experimente (engl. *proton-inventory*) durchgeführt. Die grafische Auswertung dieser Experimente ist in Abbildung 18A dargestellt.

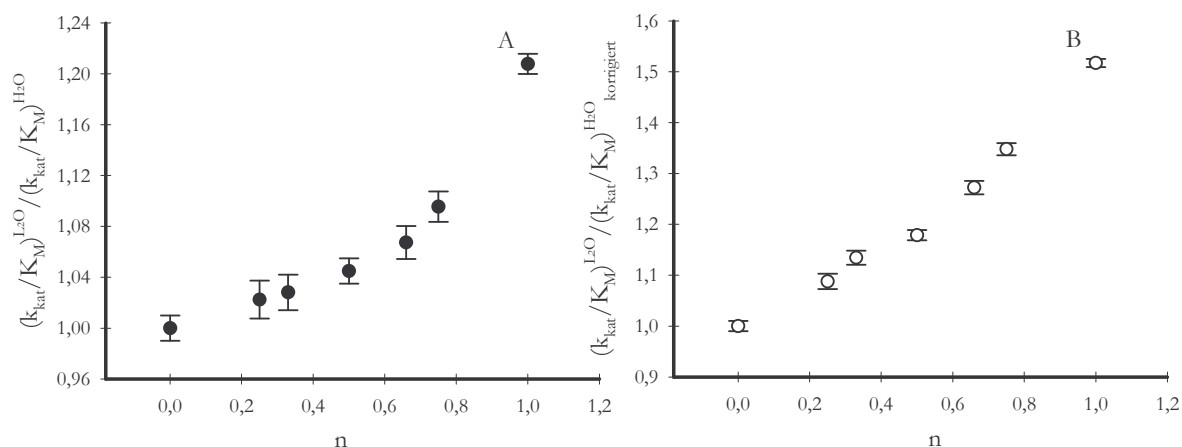


Abbildung 18: A) Beeinflussung der k_{kat}/K_M -Werte des hCyp18 gegenüber dem Substrat Suc-AAPF-DFA, ermittelt im proteasefreien PPIase-Aktivitätstest, durch steigende D_2O -Anteile im Messansatz. Die Reaktion wurde bei 10°C in 35 mM HEPES-Puffer, pH/pD 7,5 durchgeführt. B) Die in A) dargestellten relativen k_{kat}/K_M -Werte wurden so korrigiert, dass die durch den steigenden Anteil an D_2O erhöhte Viskosität des Messansatzes berücksichtigt wurde.

Die Protonen-Inventur-Experimente ergaben, dass die PPIase-Aktivität des hCyp18 nicht linear mit dem D_2O -Gehalt des Messansatzes in Beziehung steht. Die vorangegangenen Ergebnisse zeigten, dass die Aktivität von hCyp18 unter den hier verwendeten Bedingungen stark von der Viskosität des Lösungsmittels beeinflusst wird. Deshalb muss bei der Auftragung der Ergebnisse

der Protonen-Inventur-Experimente der Wert für $(k_{\text{kat}}/K_{\text{M}})^{\text{H}_2\text{O}}$ um den Viskositätseffekt des D_2O korrigiert werden, damit die reduzierte Aktivität des Enzyms in viskoserer Lösungen beachtet wird. Die Viskosität von Mischungen aus H_2O und D_2O errechnet sich aus der linearen Kombination der entsprechenden Verhältnisse der bekannten Viskositäten von H_2O (1,3 mPa s) und D_2O (1,66 mPa s) [121, 122]. Durch die Korrektur verringerte sich die Krümmung der Kurve des Protonen-Inventur-Experimentes (Abbildung 18B).

Des Weiteren wurde untersucht, ob der beobachtete inverse KSIE auch bei der Katalyse der Rückfaltung eines Proteinsubstrates (S-carboxymethylierte RNase T1 (S54G/P55N)) zu beobachten ist. Zuerst wurde die unbeschleunigte Faltung sowohl in H_2O als auch in D_2O untersucht. Unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel wurde für die Rückfaltung eine Geschwindigkeitskonstante von $8,3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Die Anwesenheit von $0,4 \mu\text{M}$ hCyp18 beschleunigte die Rückfaltung sowohl in D_2O als auch in H_2O -haltigen Puffern gleichermaßen. Um zu überprüfen, ob die im Rückfaltungsansatz benötigten hohen NaCl-Konzentrationen den KSIE beeinflussen, wurde der KSIE mittels des proteasefreien PPIase-Aktivitätstest in Anwesenheit von 2 M NaCl bestimmt. Es zeigte sich, dass sich die unkatalysierte *cis/trans*-Isomerisierung des Substrates Suc-AAPF-DFA um 17% verlangsamte und die Aktivität von hCyp18 in H_2O bei der bestehenden hohen Ionenstärke sich um 28% reduzierte. Diese Verringerung der Aktivität geht mit der Erhöhung der Viskosität des Lösungsmittels durch die Anwesenheit von 2 M NaCl einher. Der gemessene KSIE unter diesen Bedingungen betrug $(k_{\text{kat}}/K_{\text{M}})_{\text{H}_2\text{O}}/(k_{\text{kat}}/K_{\text{M}})_{\text{D}_2\text{O}}=0,99$. Daraus konnte geschlossen werden, dass der inverse KSIE nur bei niedrigen Ionenstärken zu beobachten ist.

4.2.2.2 hFKBP12, *E. coli* Par10 und hPin1

Die Ergebnisse der KSIE-Experimente für hFKBP12, *E. coli* Par10 und hPin1 sind in Tabelle 4-16 zusammengefasst. Alle untersuchten PPIasen zeigten einen inversen KSIE. Für hPin1 und *E. coli* Par10 müssen die beobachteten KSIE korrigiert werden, wenn die Katalyse unter Bedingungen gemessen wird, bei denen die Aktivität dieser Enzyme durch die Viskosität beeinflusst ist. Die Protonen-Inventur-Experimente für hFKBP12, gemessen im proteasefreien PPIase-Aktivitätstest, ergab eine Gerade (Abbildung 19A). Im Gegensatz dazu wies die Protonen-Inventur für *E. coli* Par10 eine deutliche Krümmung auf (Abbildung 19B). Da die Aktivität dieser Enzyme bei den verwendeten Bedingungen nicht von der Lösungsmittelviskosität beeinflusst wurde, war eine Korrektur der Messergebnisse nicht notwendig.

Tabelle 4-16: Vergleich der durch die Verwendung von unterschiedlichen Substraten und unterschiedlichen Enzymen bzw. Enzym-Varianten im proteasegekoppelten bzw. im proteasefreien PPIase-Aktivitätstest ermittelten KSIE der $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Werte der untersuchten Enzyme.

PPIase	Substrat	KSIE ($k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$) ^D
hPin1	Ac-AA(p)SPR-pNA	0,86±0,06
<i>E. coli</i> Par10	Suc-AAPF-DFA ^{a)}	0,54±0,07
	Suc-AFPF-pNA	0,81±0,04
<i>E. coli</i> Par10C40D	Suc-AAPF-DFA ^{a)}	0,58±0,04
hFKBP12	Suc-AAPF-DFA ^{a)}	0,63±0,04
	Suc-AFPF-pNA	0,80±0,05

Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten mit den entsprechenden Standardabweichungen, ermittelt aus 3 unabhängigen Messungen.

a) im proteasefreien PPIase-Aktivitätstest bestimmt

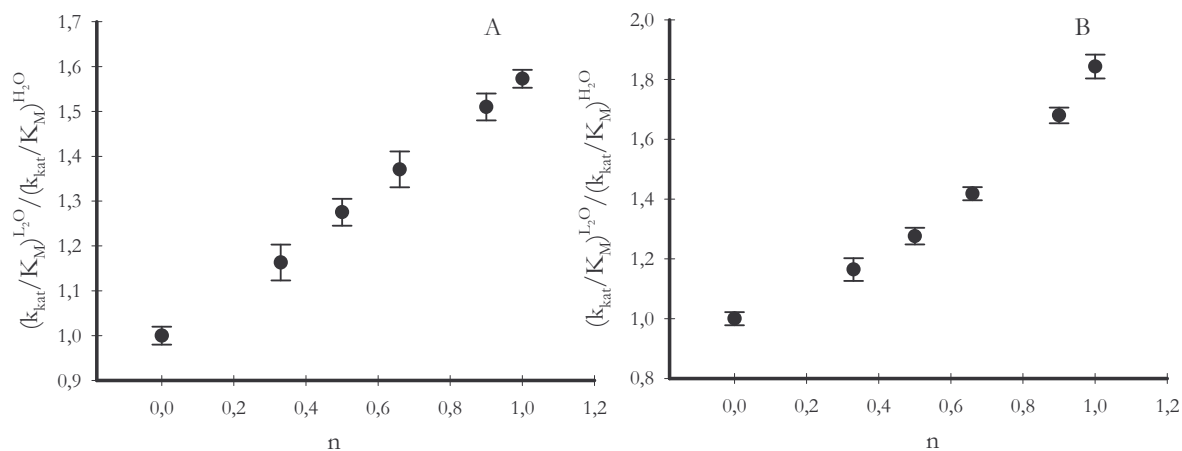


Abbildung 19: Beeinflussung der $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Werte des hFKBP12 (A) bzw. *E. coli* Par10 (B) gegenüber dem Substrat Suc-AAPF-DFA, ermittelt im proteasefreien PPIase-Aktivitätstest, durch steigende D_2O -Anteile im Messansatz. Die Reaktion wurde bei 10°C in 35 mM HEPES-Puffer, pH/pD 7,5 durchgeführt.

Der KSIE für beide Enzyme wurde ebenfalls im Rückfaltungstest und im proteasefreien Test in Anwesenheit von 2 M NaCl untersucht. Beide PPIasen zeigten auch hier einen inversen KSIE, wobei die hohe Ionenstärke den beobachteten KSIE noch verstärkte (Tabelle 4-17). Die hohe Salzkonzentration steigerte den im proteasefreien Aktivitätstest gemessenen $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Wert für hFKBP12 auf 280% und beeinflusste die Aktivität von *E. coli* Par10 nicht.

Tabelle 4-17: Vergleich des mittels RNase T1 (S54G/P55N)-Rückfaltungstest und mittels des proteasefreien PPIase-Aktivitätstest in Anwesenheit von 2 M NaCl ermittelten KSIE der Katalyse durch *E. coli* Par10 und hFKBP12.

PPIase	KSIE^{a)} (k_{kat}/K_M)^D	KSIE^{b)} (k_{kat}/K_M)^D 2 M NaCl
<i>E. coli</i> Par10	0,57±0,07	0,52±0,07
hFKBP12	0,64±0,04	0,73±0,06

Es wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aus 4 unabhängigen Messungen bestimmt.

a) ermittelt im RNase T1 (S54G/P55N)-Rückfaltung PPIase-Aktivitätstest

b) ermittelt im proteasefreien PPIase-Aktivitätstest. Als Substrat wurde Suc-AAPF-DFA verwendet; es wurden der Mittelwert und die Standardabweichung von 4 unabhängigen Messungen bestimmt.

4.3 Kalorimetrische Detektion von langsamen Konformationsänderungen in Proteinen und Peptiden

Ziel dieser Untersuchungen war es, eine neue Methode zu entwickeln, die es erlaubt, langsame strukturelle Änderungen in Proteinen und Peptiden kalorimetrisch zu messen. Ein großer zu erwartender Vorteil einer solchen Methode liegt in der Möglichkeit, gleichzeitig kinetische und thermodynamische Parameter einer derartigen strukturellen Änderung zu bestimmen. Des Weiteren würde eine solche Methode es erlauben, spektroskopisch „unsichtbare“ Prozesse, z.B. während der Proteinfaltung oder bei der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung von prolinhaltigen Peptiden, zu detektieren. Als Modell-Protein zur Untersuchung von Proteinfaltungsprozessen mittels Kalorimetrie wurde RNase A aus Rinderpankreas verwendet. Dieses Protein eignet sich für diese Untersuchungen besonders, da die Faltungsprozesse bereits im Detail untersucht sind, die Renaturierung des Proteins langsam verläuft, es auch bei hohen Proteinkonzentrationen nicht zur Aggregation neigt und es kommerziell in großen Mengen und in ausreichender Reinheit erhältlich ist. Leider erlaubt es die offen in die Messzelle ragende Titrationsapparatur nicht, hochkonzentrierte GdmHCl-Lösungen direkt in die mit dem Renaturierungspuffer gefüllte Messzelle zu titrieren. Der große Konzentrationsgradient zwischen Titrationsapparatur und Messzelle verhindert das Einstellen eines thermischen Gleichgewichts im Messgerät, und damit eine stabile Basislinie. Aus diesem Grund wurde die zu untersuchende Probe manuell in die Messzelle injiziert. Dadurch kommt es zwar ebenfalls zu einer Störung des thermischen Gleichgewichts, welches sich jedoch nach einer Äquilibrierungszeit von 250 bis 400 s wieder einstellt.

4.3.1 Renaturierung von RNase A unter schwach nativen Bedingungen

Lyophilisierte RNase A wurde in 5 M GdmHCl, 50 mM Glycin-Puffer (pH 2,0) für eine Stunde denaturiert und anschließend 100 µl dieser Lösung manuell in die voräquilibrierte ITC-Messzelle injiziert. Die Rückfaltung erfolgte unter schwach renaturierenden Bedingungen (2 M GdmHCl, pH 5,5, 10°C). Ein Kontrollexperiment unter identischen Bedingungen, jedoch ohne RNase A, wurde im Anschluss durchgeführt (Abbildung 20A; Diagramme, in denen die Änderung der Wärme gegen die Zeit aufgetragen wurde, werden im Folgenden als Thermogramme bezeichnet). In beiden Fällen konnten innerhalb der ersten 350 s keine aussagekräftigen Daten aus der resultierenden Wärmeänderung gewonnen werden. Nach dieser Reäquilibrierungsphase führte nur der RNase A-haltige Messansatz zu einer kalorimetrisch messbaren Signaländerung.

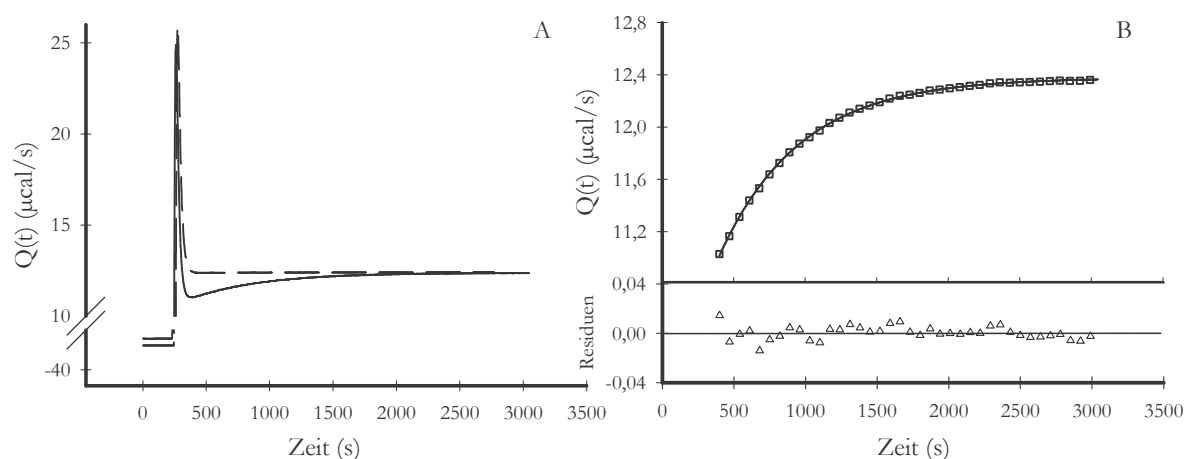


Abbildung 20: A) Thermogramme aufgezeichnet bei 10°C mittels ITC nach der manuellen Injektion von 100 µl 5 M GdmHCl, 50 mM Glycin-Puffer, pH 2,0 (--) und 100 µl 1,3 mM RNase A in 5 M GdmHCl, 50 mM Glycin-Puffer, pH 2,0 (-) in die Messzelle gefüllt mit 1,8 M GdmHCl, 100 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,5). B) Auswertung der Signal/Zeit-Kurve des RNase A-haltigen Messansatzes mittels nichtlinearer Regression. Die Messwerte (□) folgen einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung (-). Die Differenz zwischen den Messwerten und den durch die Anpassung erhaltenen Werten war klein und zeigte keine systematische Ungleichverteilung (Δ). Zur besseren Anschaulichkeit ist nur jeder 20. Messwert dargestellt.

Die aufgezeichnete Signal/Zeit-Kurve folgte einer Kinetik erster Ordnung (Abbildung 20B). Durch Anpassung der Parameter von Gleichung 5 an die Messdaten von fünf unabhängigen Experimenten mittels nichtlinearer Regression wurde eine beobachtbare Zeitkonstante von ($k_{\text{obs}}=541\pm 30$ s) erhalten. Die Renaturierung von RNase A wurde als eine exotherme Reaktion beobachtet. Zur Berechnung der durch den Faltungsprozess freigesetzten Wärme wurde die Fläche zwischen der Basislinie und dem Messsignal bestimmt, bis zum Zeitpunkt $t=0$ extrapoliert und durch die Gesamtstoffmenge RNase A in der Messzelle dividiert. Die so erhaltene beobachtete Faltungsenthalpie ($\Delta H_{\text{Faltung}}$) für die in Abbildung 20 gezeigten Reaktion betrug rund -12 kcal mol⁻¹. Zur genaueren Bestimmung von $\Delta H_{\text{Faltung}}$ wurde das Experiment mit unterschiedlichen Konzentrationen an RNase A im Rückfaltungsansatz durchgeführt. Alle anderen Parameter wurden konstant gehalten. In Abbildung 21A wurden die mit der Renaturierung von 290, 145, 87 und 43,5 µM RNase A verbundenen Reaktionswärmen dargestellt. Die durch die Faltungsreaktion freigesetzte Wärmemenge stand im direkten Verhältnis zur eingesetzten RNase A-Konzentration (Abbildung 21B). Dadurch ließ sich $\Delta H_{\text{Faltung}}=-10,9\pm 1,5$ kcal mol⁻¹ bestimmen. Außerdem ließ sich den gezeigten Daten entnehmen, dass für ein günstiges Signal-zu-Rauschverhältnis rund 40 µM RNase A im Messansatz vorliegen sollten (entspricht rund 0,8 mg Gesamtprotein im Ansatz).

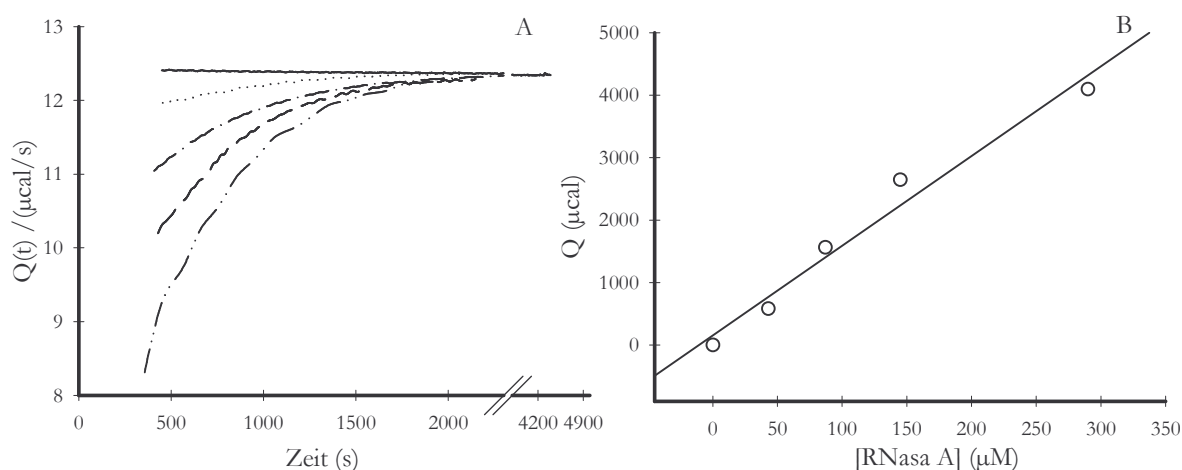


Abbildung 21: A) Thermogramme aufgezeichnet während der Rückfaltung von RNase A bei 10°C mit folgenden Endkonzentrationen: 290 (---), 145 (- -), 87 (-·-), 43,5 µM (···), die durchgezogene Linie stellt die Basislinie dar. Die Reaktion wurde durch manuelle Injektion von 100 µl der entsprechend konzentrierten RNase A-Stammlösung, hergestellt in 5 M GdmHCl, 50 mM Glycin-Puffer, pH 2,0, in die mit 1,8 M GdmHCl, 100 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,5) gefüllte Messzelle gestartet. B) Darstellung der linearen Abhängigkeit der durch die Renaturierung freigesetzten Wärmemenge von der in der Messzelle vorliegenden RNase A-Konzentration. Die lineare Regression hat ein Bestimmtheitsmaß von $r^2=0,97$.

4.3.2 Renaturierung von RNase A unter stark nativen Bedingungen

Um eine möglichst universelle Einsetzbarkeit dieser Methode zu gewährleisten, war zu untersuchen, ob es möglich ist, die Renaturierung von Proteinen unter stark nativen Bedingungen kalorimetrisch zu messen. Dazu wurden 100 µl der denaturierten RNase A manuell in die mit 100 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,5) befüllte Messzelle injiziert. Die Renaturierung von RNase A verläuft unter diesen Bedingungen schneller und die erhaltene Kinetik ist komplex [123-126]. Um die einzelnen Rückfaltungsphasen besser voneinander trennen zu können, wurden die Experimente bei 5°C durchgeführt. Der auswertbare Ausschnitt eines unter diesen Bedingungen erhaltenen Thermogramms ist in Abbildung 22 dargestellt. Das Experiment wurde dreimal unter identischen Bedingungen wiederholt, um die Standardabweichung der ermittelten Parameter zu ermitteln. Die erhaltene Signal/Zeit-Kurve folgte einer doppelt-exponentiellen Kinetik mit beobachteten Geschwindigkeitskonstanten von $k_1=102\pm 28$ s und $k_2=454\pm 22$ s. Durch die Auswertung der erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten und der dazugehörigen Amplituden konnte für die schnellere der beiden Phasen ein $\Delta H_{\text{Folding}}=-16,8\pm 1,3$ kcal mol⁻¹ und für die langsamere Phase ein $\Delta H_{\text{Folding}}=-3,0\pm 0,13$ kcal mol⁻¹ berechnet werden.

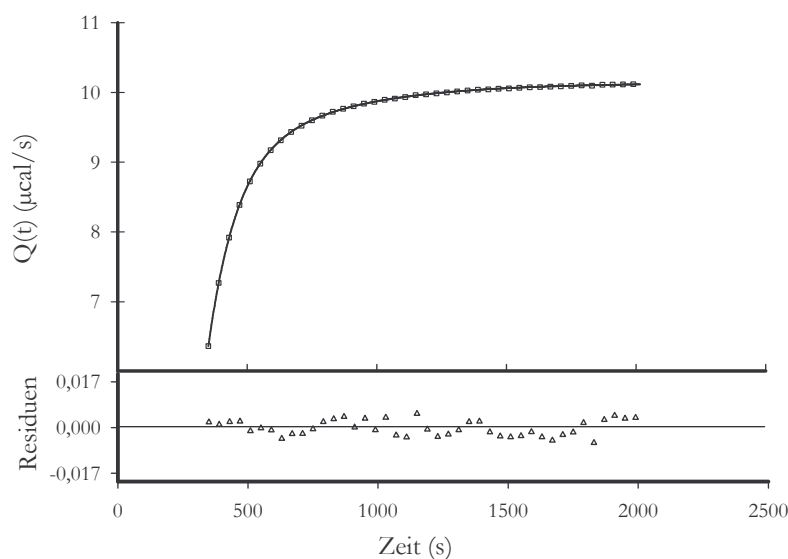


Abbildung 22: Ausschnitt eines Thermogramms, erhalten durch die Rückfaltung von RNase A bei 5°C mit einer Endkonzentration von 290 μM in der Messzelle. Die Reaktion wurde durch manuelle Injektion von 100 μl der RNase A-Stammlösung, hergestellt in 5 M GdmHCl, 50 mM Glycin-Puffer, pH 2,0, in die mit 100 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,5) gefüllte Messzelle gestartet. Die Messwerte (\square) folgen einer doppelt-exponentiellen Kinetik (-). Die Differenz zwischen den Messwerten und den durch die Anpassung erhaltenen Werten war klein und zeigte keine systematische Ungleichverteilung (Δ). Zur besseren Anschaulichkeit ist nur jeder 20. Messwert dargestellt.

Die Möglichkeit, langsame Faltungsreaktionen von Proteinen unter stark nativen Bedingungen zu beobachten, erlaubt den Einsatz von PPIasen als analytischen Sonden. Falls die beobachteten Faltungsschritte in Anwesenheit von PPIasen schneller verlaufen, müssen diese Faltungsprozesse mit der *cis/trans*-Isomerisierung von Prolyl-Bindungen assoziiert sein. Es ist bekannt, dass Cyp18 die Rückfaltung von RNase A beschleunigt [127, 128]. Eine weit effizientere Beschleunigung der Rückfaltung von RNase T1 (S54G/P55N) durch L.p.Mip wurde ebenfalls beschrieben [129]. Da eine möglichst niedrige Konzentration der PPIase im Messansatz wünschenswert war, um zusätzliche Wärmebeiträge durch die Interaktion von Enzym (L.p.Mip) und Substrat (Faltungsintermediate der RNase A) ausschließen zu können, wurde L.p.Mip für diese Versuche verwendet. Da PPIasen durch niedrige pH-Werte inhibiert werden, wurden die Experimente in 35 mM HEPES-Puffer pH 7,8 durchgeführt. Unter diesen Bedingungen zeigte die RNase A-Renaturierung eine doppelt exponentielle Kinetik mit Zeitkonstanten von 104 und 384 s. Die Zugabe von steigenden Konzentrationen L.p.Mip zum Renaturierungsansatz hatte den in Abbildung 23 dargestellten Effekt. Innerhalb der gleichen Zeitspanne wurden größere Mengen nativer RNase A gebildet, als ohne L.p.Mip. Der durch L.p.Mip erzielte Effekt konnte durch Zugabe von Rapamycin, einem spezifischen, hochaffinen Inhibitor dieser PPIase-Familie, aufgehoben werden (Abbildung 23). Da die Konzentration an L.p.Mip im Ansatz nie mehr als

13,1% der vorhandenen RNase A-Konzentration betrug, ist es unwahrscheinlich, dass die durch die Bindung von Enzym und Substrat freigesetzte Bindungswärme das erhaltene Ergebnis maßgeblich beeinflusste.

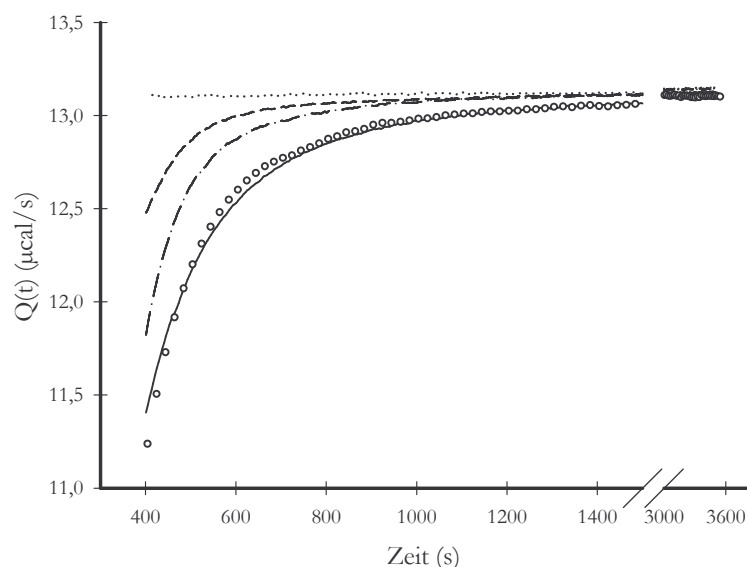


Abbildung 23: Ausschnitte verschiedener Thermogramme der Renaturierung von RNase A (290 μM) in Anwesenheit von 0 (-), 0,7 (- -) und 3,8 μM (- -) L.p.Mip im Messansatz. Die Reaktion wurde durch manuelle Injektion von 100 μl RNase A-Stammlösung, hergestellt in 5 M GdmHCl, 50 mM Glycin-Puffer, pH 2,0, in die Messzelle, befüllt mit 35 mM HEPES, pH 7,8 bei 5°C, gestartet. Die Basislinie (···) wurde durch die Injektion von 100 μl 5 M GdmHCl, 50 mM Glycin-Puffer pH 2,0 erhalten. Zur Kontrolle wurde ein Experiment bei gleichzeitiger Anwesenheit von 3,8 μM L.p.Mip und 32 μM Rapamycin durchgeführt (°°°).

4.3.3 Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung von prolinhaltigen Peptiden

Die Ergebnisse der bisher beschriebenen Experimente deuten darauf hin, dass es möglich ist, langsame Proteinfaltungsreaktionen mittels dieser kalorimetrischen Methode zu beobachten und zu quantifizieren. Fraglich ist, ob die Sensitivität der Methode ausreicht, um die während der *cis/trans*-Isomerisierung ausgetauschte Wärme einer isolierten Peptidbindung direkt zu beobachten. Zu diesem Zweck wurde die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung der Peptide AP, AAP und Ac-(Pro)₁₃-NH₂ mit dieser Methode näher untersucht. Die notwendige Störung des Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Gleichgewichtes der Peptide AP bzw. AAP wurde durch eine schnelle Veränderung des pH-Wertes der Peptidlösung oder deren Lösungsmittelzusammensetzung erreicht. Es ist bekannt, dass der *cis*-Gehalt von Peptiden mit C-terminalen Prolyl-Resten durch Erniedrigung des pH-Wertes sinkt (Tabelle 4-18). Hingegen ist der *cis*-Anteil der Prolyl-Bindung in Peptiden bei Gegenwart von 0,47 M LiCl/TFE deutlich erhöht (Tabelle 4-18). Eine Besonderheit stellen Polyprolin-Peptide dar. Diese können entweder in der all-*cis*- (Polyprolin-I-Form) oder in der all-*trans*-Konformation (Polyprolin-II-Form) vorliegen. Es ist bekannt, dass

durch Inkubation von Polyprolin-Peptiden in Isopropanol die all-*cis*-Konformation induziert wird. Die Umwandlung in die Polyprolin-II-Form erfolgt im wässrigen Medium. Die so erzeugten Unterschiede im *cis/trans*-Gleichgewicht wurden benutzt, um pH-Wert- bzw. Lösungsmittelsprungexperimente durchzuführen.

Tabelle 4-18: *cis*-Gehalte von AP und AAP bei verschiedenen pH-Werten und Lösungsmittelbedingungen. Die Werte wurden mittels NMR-Spektroskopie in 50 mM Natriumphosphatpuffer des angegebenen pH-Wertes bei 25°C ermittelt.

Peptid	% <i>cis</i> pH 2,1	% <i>cis</i> pH 7,5	% <i>cis</i> 0,47 M LiCl
AP	9,9	39	n. b.
AAP	7,4	18,9	37 ^{*)}

*) Wert aus Referenz [92] entnommen

Die Sprungexperimente resultierten in exothermen Reaktionen, wenn der *cis*-Gehalt der Peptide während der Messung sank (Abbildung 24A untere Kinetik), beziehungsweise in endothermen Reaktionen, wenn der *cis*-Gehalt der Peptide stieg (Abbildung 24A obere Kinetik).

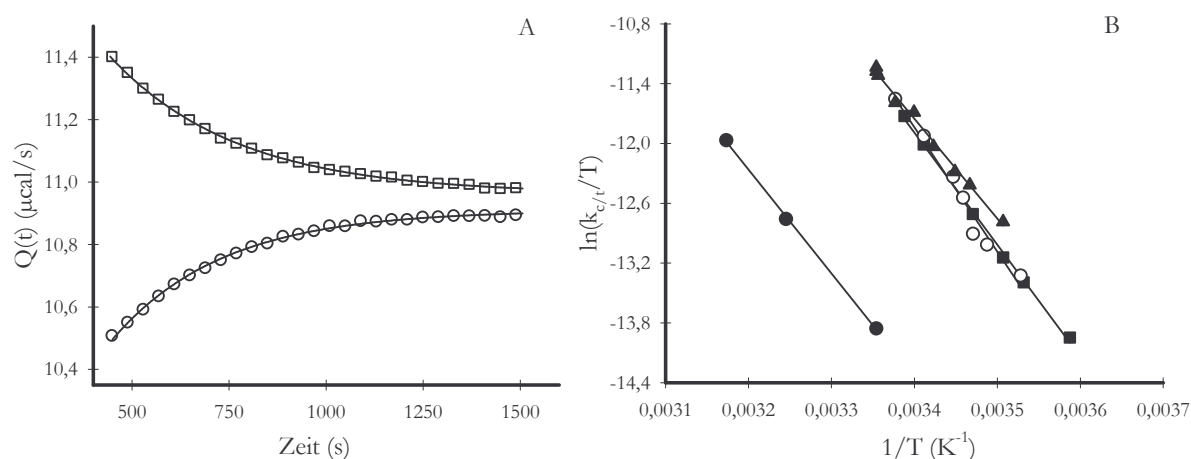


Abbildung 24: A) pH-Wert Sprungexperiment von pH 2,1 zu pH 7,5 (\square) bei 23°C und von pH 7,5 zu pH 2,1 bei 12°C (\circ). Jeweils 100 μ l einer 33 mM Stammlösung AAP des entsprechenden pH-Wertes wurden in die mit 50 mM Natriumphosphatpuffer äquilibrierte Messzelle manuell injiziert. B) Arrhenius-Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten der *cis*- nach *trans*-Isomerisierung von AP (pH-Wert-Sprung, \blacksquare) AAP (pH-Wert-Sprung, \circ , Lösungsmittelsprung \blacktriangle) und Ac-(Pro)₁₂-NH₂ (Lösungsmittelsprung, \bullet).

Die erhaltenen Thermogramme folgten ausnahmslos Kinetiken erster Ordnung. Aus den daraus abgeleiteten beobachteten Geschwindigkeitskonstanten wurden die Geschwindigkeitskonstanten für die *cis*- nach *trans*-Isomerisierung berechnet (Gleichung 7 und Gleichung 8). Durch die Ermittlung der Temperaturabhängigkeit dieser Geschwindigkeitskonstanten war es möglich, die Änderung der freien Enthalpie, der Entropie und der Enthalpie des Übergangszustandes zu errechnen (Tabelle 4-19).

Da während der Messungen nicht nur die Geschwindigkeit der *cis/trans*-Isomerisierung, sondern auch der damit verbundene Wärmeaustausch erfasst wurde, war es möglich, den enthalpischen Anteil der freien Enthalpie zwischen den Grundzuständen (*cis* und *trans*) der untersuchten Peptide zu ermitteln. Zur Berechnung der während der Isomerisierung umgesetzten Wärme wurde die Fläche zwischen der Basislinie und dem Messsignal bestimmt, bis zum Zeitpunkt $t=0$ extrapoliert und durch die in der Messzelle vorhandene Stoffmenge des untersuchten Peptides dividiert. Die Temperaturabhängigkeit des Anteils der *cis*-Prolyl-Bindungen bei verschiedenen pH-Werten wurde separat bestimmt und genutzt, um den gemessenen Wärmeumsatz auf 100% *cis*-Prolyl-Bindungen zu beziehen. Die durch die kalorimetrische Methode erhaltenen Beträge der ΔH^0 -Werte sind in jedem Fall größer als die durch die indirekte NMR-basierte Methode berechneten Werte. Besonders auffällig scheint dies bei dem durch LiCl/TFE-Sprung ermittelten ΔH^0 -Wert der Fall zu sein. Für diese Reaktion wurde ein rund 3fach höherer Wert ermittelt.

Tabelle 4-19: Thermodynamische Parameter zur Isomerisierung von AP, AAP und Polyprolin unter verschiedenen Bedingungen

Peptide	$\Delta H^{\ddagger}_{c/t}$ kcal mol ^{-1 a)}	$T\Delta S^{\ddagger}_{c/t}$ kcal mol ^{-1 a)}	$\Delta G^{\ddagger}_{c/t}$ kcal mol ^{-1 a)}	$\Delta H^0_{c/t}$ Kalorimetrie kcal mol ^{-1 a)}	$\Delta H^0_{c/t}$ NMR kcal mol ^{-1 b)}
AP _{pH 2,1 zu pH 7,5}	22,4±0,5	1,3	21,1±0,5	-2,1±0,4	-1,67±0,05
AP _{pH 7,5 zu pH 2,1}	17,2±1,1	-3,0	20,2±1,1	-1,3±0,2	-1,29±0,05
AAP _{pH 2,1 zu pH 7,5}	24,8±0,2	4,1	20,7±0,2	-2,1±0,4	-1,36±0,05
AAP _{pH 7,5 zu pH 2,1}	17,5±1,3	-2,8	20,3±1,3	-1,2±0,3	-0,78±0,06
AAP _{0,47 M LiCl/TFE^{c)}}	19,9±0,6	-1,0	20,9±0,6	-4,5±0,8	-1,36±0,05
Polyprolin _{Isopropanol^{c)}}	20,6±0,5	-1,6	22,2±0,5	n. b.	n. b.

a) Parameter wurden aus den in Tabelle 7-17 bis Tabelle 7-21 gezeigten Daten, teilweise unter Verwendung von Gleichung 10, berechnet. Die angegebenen Fehler wurden aus der Standardabweichung der linearen Anpassung der Parameter erhalten. Für $T\Delta S^{\ddagger}_{c/t}$ lag die errechnete Standardabweichung unterhalb 1%.

b) Der Parameter wurden aus den in Tabelle 7-15 und Tabelle 7-16 gezeigten Daten nach Gleichung 9 berechnet.

c) Experiment wurde bei pH 7,5 durchgeführt.

5 Auswertung und Diskussion

5.1 Thermodynamische Charakterisierung der hCyp18/CsA-Interaktion

Die direkte thermodynamische Charakterisierung von hCyp18/Substrat-Komplexen ist durch die relativ geringe Affinität des Enzyms zum Grundzustand der Substrate schwierig. Ein detailliertes Verständnis von Enzym/Inhibitor-Wechselwirkungen erlaubt es aber, Rückschlüsse auf die Enzym/Substrat-Wechselwirkung zu ziehen. Aus diesen Grund wurde die Wechselwirkung von hCyp18 mit CsA mittels ITC näher beleuchtet. Unter Verwendung verschiedener biochemischer Methoden wurde die Interaktion von hCyp18 und CsA bereits charakterisiert und dabei K_D -Werte im Bereich von 2 bis 5000 nM ermittelt [49, 57, 130-138]. Die großen Unterschiede wurden hauptsächlich mit den leicht verschiedenen experimentellen Bedingungen sowie einer eventuell großen Temperatur- bzw. Lösungsmittelabhängigkeit der Interaktion erklärt. Die sinnvolle Interpretation der von CsA oder dessen Derivaten vermittelten biologischen Effekte setzt jedoch voraus, dass die Thermodynamik und speziell die Affinität dieser Substanzen zu hCyp18 bekannt ist.

ITC eignet sich dafür, diese Wechselwirkung über einen großen Bereich von experimentellen Bedingungen zu untersuchen. Es konnte festgestellt werden, dass weder Temperatur noch Pufferzusammensetzung einen wesentlichen Einfluss auf die Assoziationskonstante hatten. Im Temperaturbereich von 5 bis 33°C verringerte sich diese Größe nur von 1,1 auf $0,46 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ (Tabelle 7-11), auch im pH-Wert-Bereich von 6,5 bis 8,2 sind die Änderungen gering. Die in der Literatur beschriebenen Methoden zur Bestimmung der hCyp18/CsA-Affinität können im Wesentlichen in vier Gruppen unterteilt werden: 1) enzymkinetisch ermittelte Inhibitionskonstanten (K_i -Werte) [49, 57, 130-132, 139], 2) indirekte Messungen der Assoziationskonstanten durch fluoreszenzbasierte Verdrängungstitration [137], 3) direkte Methoden zur Messung der Assoziationskonstanten durch SPR-basierte Methoden und Fluoreszenztitration [132, 133, 136, 138] sowie 4) durch die Änderung der Ligandenmobilität ermittelte Assoziationskonstanten [135]. Die durch enzymkinetische Experimente erhaltenen Werte (K_i im Bereich von 1,6 bis 17 nM) sind deutlich kleiner als die Werte, welche durch Fluoreszenztitration und SPR-basierte Methoden ermittelt wurden (K_D im Bereich von 30 bis 205 nM). Ein solcher Unterschied wurde bereits für Rinder-Cyp18 beobachtet und es wurde vermutet, dass die CsA-Bindungsstelle nicht mit dem aktiven Zentrum identisch ist [132]. Die hier mittels ITC bestimmte Dissoziationskonstante ($K_D=10 \text{ nM}$ bei 10°C) stimmt hingegen gut mit der durch enzymkinetische Untersuchungen bestimmten Inhibitionskonstante überein ($K_i=2 \text{ nM}$ bei 10°C) und erfordert diese Interpretation nicht. Die verbleibende Differenz kann

unter anderem den unterschiedlichen experimentellen Bedingungen, besonders den unterschiedlichen Proteinkonzentrationen, welche sich bei beiden Tests um bis zu Faktor 100.000 unterscheiden, zugeschrieben werden. Es scheint also, dass die Gründe für die große Varianz der in der Literatur beschriebenen Werte der hCyp18/CsA-Affinität in der experimentellen Durchführung sowie in den verwendeten biochemischen Methoden selbst liegen. Der hohen Affinität der Interaktion zwischen hCyp18 und CsA liegt ausschließlich der enthalpische Anteil der freien Enthalpie von $\Delta H_{\text{ITC}}(298 \text{ K}) = -14,7 \text{ kcal mol}^{-1}$ zugrunde, der entropische Anteil von $T\Delta S_{\text{ITC}}(298 \text{ K}) = -3,8 \text{ kcal mol}^{-1}$ wirkt der Bindung entgegen.

Die thermodynamischen Parameter ΔG_{ITC} , ΔH_{ITC} und $T\Delta S_{\text{ITC}}$ zeigen eine lineare Temperaturabhängigkeit, wobei sich die Temperatureffekte auf ΔH_{ITC} und $T\Delta S_{\text{ITC}}$ derart kompensieren, dass ΔG_{ITC} im beobachteten Temperaturbereich fast unverändert bleibt. Der als Enthalpie-Entropie-Kompensation bekannte Effekt ist eine direkte Folge eines großen negativen ΔC_p [140]. Da sich der ΔC_p -Wert aus $(\partial\Delta H/\partial T)_p = \Delta C_p$ errechnet und $T\Delta S$ mit ΔC_p über die Beziehung $(\partial(T\Delta S)/\partial T)_p = \Delta C_p + \Delta S$ verknüpft ist, folgt unter der Annahme, dass $|\Delta C_p| \gg |\Delta S|$ erfüllt ist, dass die Änderungen von ΔH_{ITC} und $T\Delta S$ mit der Temperatur ungefähr gleich ΔC_p sind und sich im Bezug auf ΔG_{ITC} gegenseitig aufheben. Der Betrag für $|\Delta C_p| = 435,8 \pm 7 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ist bei 25°C rund 35mal größer als $|\Delta S|$ und erfüllt damit die beschriebene Bedingung ausreichend. Ein solcher Effekt wurde bereits für andere Protein/Protein- und Protein/Ligand-Interaktionen beschrieben [141-146]. Wie bereits im Abschnitt Material und Methoden erläutert, kann die durch die Komplexbildung hervorgerufene Änderung der Wärmekapazität mit der Änderung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche (ΔASA) von Protein und Ligand in Beziehung gesetzt werden (Gleichung 3). Ein negativer Wert für ΔC_p ergibt sich, wenn die Ligand-Bindung den als nichtpolar charakterisierten Anteil der ASA verkleinert. Da ΔC_p für die Interaktion von hCyp18 und CsA mit $-435,8 \pm 7 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ bestimmt wurde, kann geschlussfolgert werden, dass die Bindung zwischen hCyp18 und CsA zu einem Teil durch hydrophobe Wechselwirkungen vermittelt wird.

Durch die Verwendung der Gleichung 3 wurde aus den Strukturdaten des hCyp18/CsA-Komplexes ein Wert für $\Delta C_{p \text{ theor}}$ mit $-211 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ berechnet, welcher mehr als doppelt so groß ist wie der experimentell ermittelte Wert. Eine weniger gute Übereinstimmung zwischen berechnetem und experimentell ermitteltem ΔC_p ist nicht ungewöhnlich, und Beispiele dafür sind bekannt [111, 147-150]. Einer der Hauptgründe ist in den konformationellen Unterschieden zwischen den wechselwirkenden Partnern in ihrer „freien“ und der im Komplex vorliegende Form zu suchen. Solche Änderungen der Struktur führen ebenfalls zu einer Änderung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche, die nicht beachtet werden, wenn nur der hCyp18/CsA-Komplex zur Berechnung von ΔC_p herangezogen wird. Im Fall der hCyp18/CsA-Interaktion ist

die dreidimensionale Struktur des hCyp18 sowohl in der CsA-gebundenen Form als auch in der freien Form bekannt [151, 152]. Eine wesentliche, durch die CsA-Bindung vermittelte strukturelle Änderung ist nicht zu erkennen. Der hydrophobe Charakter des CsA erlaubte eine Strukturbestimmung in wässrigen Lösungen bis jetzt nicht. Es ist aus NMR-spektroskopischen [153] und kinetischen Untersuchungen bekannt [51], dass CsA unterschiedliche Konformationen in Lösung aufweist. Eine hochaffine Bindung zu hCyp18 erfolgt jedoch nur dann, wenn alle Peptidbindungen in der *trans*-Konformation vorliegen. Diese strukturellen Änderungen sind in der hier verwendeten Berechnung nicht berücksichtigt und können somit den Wert für ΔC_p verfälschen. Zusätzlich zu diesen Effekten können nach Ladbury *et al.* auch Änderungen der Flexibilität von Aminosäureseitenketten oder des lösungsmittelzugänglichen Peptidbindungsrückgrates, hervorgerufen durch den Bindungsprozess, zu einem negativeren ΔC_p führen [147]. Obwohl wie bereits beschrieben die Bindung von CsA an hCyp18 nicht zu strukturellen Änderungen im Protein führt, konnte doch mittels NMR-spektroskopischer Methoden nachgewiesen werden, dass die Flexibilität des hCyp18 im Bereich der Aminosäuren 68 bis 72 und 101 bis 104 durch die CsA-Interaktion verringert wird [154].

Neben diesen qualitativen Erklärungen zeigten Holdgate *et al.* eine Möglichkeit, die Differenz zwischen berechneten und gemessenen ΔC_p -Werten quantitativ zu erklären [111]. Die Autoren postulierten, dass pro Wassermolekül, welches an der Vermittlung der Komplexbildung beteiligt ist, $\Delta C_{p, \text{theor}}$ um $48 \pm 31 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ erniedrigt wird. Da die CsA/hCyp18-Interaktion durch fünf Wassermoleküle vermittelt wird [152], muss der berechnete $\Delta C_{p, \text{theor}}$ -Wert um $-240 \pm 155 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ zu $\Delta C_{p, \text{theor}} = -451 \pm 155 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ korrigiert werden. Damit würden berechneter und experimentell ermittelter Wert innerhalb der jeweiligen Fehlergrenzen gut übereinstimmen.

Die Beobachtung eines stark negativen ΔC_p lässt, wie schon angedeutet, vermuten, dass hydrophobe Wechselwirkungen zwischen CsA und hCyp18 einen bedeutenden Anteil an der gesamten Stabilisierung des Komplexes ausmachen. Als hydrophobe Wechselwirkung bezeichnet man üblicherweise jene energetischen Effekte, welche auftreten, wenn nichtpolare Substanzen von einer organischen Lösungsmittelphase in eine wässrige Phase transferiert werden [155]. Bei Raumtemperatur ist dieser Prozess durch ein positives ΔG charakterisiert, welches sich aus einem negativen ΔS und einem kleinen ΔH zusammensetzt [155]. Überträgt man diesen Prozess auf die Interaktion von Proteinen und Liganden, kann angenommen werden, dass die Wechselwirkung von nichtpolaren Resten des aktiven Zentrums des Proteins mit nichtpolaren Gruppen des Liganden die gleiche Situation beschreibt wie die von nichtpolaren Substanzen in einer organischen Phase. Daraus ergeben sich zwei wesentliche Schlussfolgerungen: 1. Die Verringerung der nichtpolaren Oberfläche durch die Protein/Ligand-Interaktion ist mit einem

negativen ΔG assoziiert. 2. Der Hauptanteil an ΔG wird durch $T\Delta S$ bestimmt, während keine großen Beiträge durch ΔH zu erwarten sind [156]. Bei der hCyp18/CsA-Interaktion wird zwar ein großer Anteil der nichtpolaren Oberfläche in der Bindungsschnittstelle zwischen Ligand und Protein verringert, und es kann eine stark negative Änderung der Wärmekapazität während der Komplexbildung beobachtet werden. Andererseits konnte weder ein begünstigender entropischer Anteil an der freien Enthalpie der Bindung noch eine vernachlässigbar kleine Änderung der Enthalpie für die CsA/hCyp18-Interaktion experimentell bestimmt werden. Ähnlich widersprüchliche Beobachtungen wurden für andere Protein/Ligand-Wechselwirkungen gemacht und sind kontrovers diskutiert [141, 142, 150, 156]. Um die Bedeutung von Solvatationseffekten bzw. wasservermittelten Wechselwirkungen in der Bindungsschnittstelle des hCyp18/CsA-Komplexes näher zu beleuchten, wurden Experimente in D_2O und in glycerolhaltigen Lösungen durchgeführt.

Hohe Glycerolkonzentrationen führen zu einer Destabilisierung von Protein/Ligand-Komplexen, wenn Wassermoleküle an der Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand in der Bindungsschnittstelle beteiligt sind oder aber zu einer Stabilisierung des Komplexes, wenn während der Komplexbildung Oberflächenbereiche der Wechselwirkungspartner desolvatisiert werden (hydrophobe Wechselwirkung). Glycerol wurde verwendet, weil es die Ionenstärke und die makroskopische Dielektrizitätskonstante des Puffers nur gering beeinflusst [157]. Die Komplexbildung bei $25^\circ C$ zwischen hCyp18 und CsA wird durch die Anwesenheit von 30% Glycerol nur sehr geringfügig destabilisiert. Dies widerspricht der aus der negativen Änderung der Wärmekapazität gezogenen Vermutung, dass die Wechselwirkung zwischen hCyp18 und CsA zu einem großen Anteil durch hydrophobe Wechselwirkungen vermittelt wird. Die erhöhte Glycerolkonzentration hatte zwar nur geringe Effekte auf ΔG_{ITC} , jedoch führte sie zu einer deutlich negativeren Bindungsenthalpie ($\Delta\Delta H_{ITC(H_2O-Glycerol)}(25^\circ C) = 3,9 \text{ kcal mol}^{-1}$), welche durch eine ebenso verringerte Bindungsentropie ($(T\Delta\Delta S_{ITC(H_2O-Glycerol)}(25^\circ C) = 4 \text{ kcal mol}^{-1}$) ausgeglichen wurde. Neben der Eigenschaft, die Wasseraktivität in der Lösung zu vermindern, beeinflussen hohe Glycerolkonzentrationen auch die Viskosität der Lösung, welche wiederum den entropische Anteil der Protein/Ligand-Bindung beeinflusst. Der Gesamtänderung der Entropie des Systems durch den Bindungsvorgang liegen drei wesentliche Prozesse zugrunde: Die Lösungsmittelreorganisation (ΔS_{solv}), die Änderung der konformationellen Freiheitsgrade von Protein und Ligand (ΔS_{conf}) sowie die Änderung der Rotations- und Translationsfreiheitsgrade (ΔS_{rt}). Somit ergibt sich $\Delta S_{ITC} = \Delta S_{conf} + \Delta S_{solv} + \Delta S_{rt}$ [158-160]. Der durch die Lösungsmittelreorganisation vermittelte Beitrag kann durch die Beziehung $\Delta S_{conf} = \Delta C_p \ln(T/385)$ abgeschätzt werden. Da sich durch den Zusatz von Glycerol ΔC_p nur wenig ändert ($\Delta\Delta C_p(H_2O-Glycerol) = -9,4 \text{ cal mol}^{-1} K^{-1}$), beeinflusst dieser Term die Gesamtänderung der Entropie

nur gering ($\Delta\Delta S_{\text{solv (H}_2\text{O-Glyzein)}}(25^\circ\text{C})=2,4 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). Die Erhöhung der Viskosität sollte die Änderung der Entropie, vermittelt durch Änderungen der Rotations- und Translationsfreiheitsgrade, nicht beeinflussen und kann mit $\Delta S_{\text{rt}}=-8 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ für eine 1:1 Interaktion abgeschätzt werden [159]. Damit errechnet sich die Änderung der Entropie, vermittelt durch die reduzierten konformationellen Freiheitsgrade nach Zusatz von Glycerol, mit $\Delta\Delta S_{\text{conf (H}_2\text{O-Glycerol)}}(25^\circ\text{C})=11 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Übereinstimmend wurde für eine Reihe von Proteinen nachgewiesen, dass der Zusatz von Glycerol die Flexibilität von Proteinen erniedrigt, indem die beobachtete konformationelle Heterogenität sowie die thermische Fluktuation des Proteinrückgrates verringert werden [161-163]. Wie oben bereits erwähnt, schlägt sich die negativere Bindungsentropie der Reaktion in Glycerol nicht in einer verringerten Bindungsaffinität nieder, da dieser Effekt durch die ebenfalls negativere Bindungsenthalpie ausgeglichen wird. Diese Änderung kann zum Teil mit den durch Dürr *et al.* ermittelten Transferenthalpien für Modellsubstanzen für nichtpolare Aminosäureseitenketten aus wässrigen Lösungen zu glycerolhaltigen Lösungen erklärt werden [164]. Mit der ermittelten Beziehung $\Delta\Delta H_{\text{H}_2\text{O-Glycerol}}=0,96\pm 0,47 \text{ cal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2} \Delta\text{ASA}_{\text{unpolar}}$ [165] ergeben sich für die untere und obere Fehlergrenze Werte von 0,3 bis 0,9 kcal mol⁻¹.

Eine weitere Möglichkeit, die Art der molekularen Wechselwirkung von Protein/Ligand-Komplexen zu charakterisieren, ist der Einsatz von D₂O als Lösungsmittel. Es ist bekannt, dass hydrophobe Wechselwirkungen in D₂O stabilisiert werden [166]. Die Stärke von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen neutralen Gruppen ist in D₂O ebenfalls größer als in H₂O [167]. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen geladenen Gruppen sind in D₂O hingegen schwächer als in H₂O [167]. Da sowohl Wasserstoffbrückenbindungen als auch hydrophobe Bereiche des Enzyms an der Interaktion zwischen CsA und hCyp18 beteiligt sind, sollte die beobachtete Assoziationskonstante in D₂O größer als in H₂O sein. Dabei sollte die höhere Affinität durch einen stärker negativen Beitrag zur Enthalpie der Bindung vermittelt werden [168]. Ein solcher Effekt wurde beobachtet, wobei die freie Enthalpie der Bindung über den gesamten Temperaturbereich in schwerem Wasser negativer ist als in H₂O, was zu einer Verdopplung der Assoziationskonstante führt. Dabei wird die festere Interaktion bei höheren Temperaturen ($T>24^\circ\text{C}$) durch eine negativere Enthalpie der Bindung hervorgerufen, während ein größerer Beitrag der Bindungsentropie bei niedrigeren Temperaturen die Interaktion begünstigt. Dieses Verhalten kann durch ein verändertes ΔC_p der Komplexbildung in H₂O und D₂O erklärt werden ($\Delta\Delta C_p(\text{H}_2\text{O-D}_2\text{O})=52,3 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). Eine vergleichbare kalorimetrische Untersuchung der hFKBP12/FK506 bzw. Rapamycin-Interaktion zeigte, dass in diesen Fällen ΔC_p in D₂O entweder nicht verändert (hFKBP12/FK506) oder aber weniger negativ als in H₂O war (hFKBP12/Rapamycin) [169]. Die Autoren erklärten die durch zwei verschiedene

Lösungsmittel hervorgerufenen Änderungen in ΔH_{ITC} mit bekannten negativen Transferenthalpien von nichtpolaren Substanzen von H_2O zu D_2O . Diese müssen natürlich auch für das hier beschriebene hCyp18/CsA-System zutreffen, jedoch scheinen diese Effekte bei höheren Temperaturen schwächer ausgeprägt zu sein, als die durch die an der Bindung beteiligten D_2O -Moleküle vermittelte Verstärkung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Ligand und Protein.

Mittels ITC werden alle während der Bindung auftretenden Wärmeaustausche beobachtet. Dazu zählen neben den direkt durch den Bindungsprozess ausgetauschten Wärmemengen auch sekundäre Effekte wie die durch Protonierungs- und Deprotonierungsprozesse auftretenden Ionisierungsenthalpien von Aminosäureseitenketten in der Bindungsschnittstelle zwischen Ligand und Protein oder von Puffer-Ionen. Die pH-Wert-Abhängigkeit der Assoziationskonstante lässt sich durch die durch die Bindung hervorgerufene Änderung eines pK_s -Wertes einer Aminosäureseitenkette nach Gleichung 15 erklären. Der pK_s -Wert im ungebundenen Zustand wurde mit $(\text{pK}_\text{s})_\text{f}=5,7$ bzw. im gebundenen Zustand mit $(\text{pK}_\text{s})_\text{b}<4,5$ bestimmt. Ein genauerer Wert konnte nicht ermittelt werden, da bei niedrigeren pH-Werten das Protein zur Aggregation neigte. Die Veränderung des pK_s -Wertes wird vermutlich durch die Verstärkung des hydrophoben Charakters der Bindetasche im CsA-gebundenen Zustand hervorgerufen. CsA selbst besitzt keine protonierbaren Gruppen und kommt somit als Ursprung der pH-Wert-Abhängigkeit der Assoziationskonstante nicht in Frage. Mittels Fluoreszenz- und NMR-Spektroskopie durchgeführte Titrationsexperimente unterstützen diese Vermutung [170, 171]. Durch die Bestimmung der Enthalpie der CsA/hCyp18-Interaktion in Puffern mit unterschiedlichen Ionisierungsenthalpien konnte nachgewiesen werden, dass bei pH 5,5 rund 0,5 Protonen pro CsA/hCyp18-Komplex freigesetzt werden. Bei pH 7,5 hingegen konnte keine solche Protonenübertragung nachgewiesen werden. Diese Beobachtung stimmt gut mit der Veränderung eines pK_s -Wertes im aktiven Zentrum des hCyp18 während der Bindung überein, denn der Protonierungsgrad dieser Seitenkette ändert sich nicht, wenn das Experiment bei pH 7,5 durchgeführt wird. Bei pH 5,5, also im Bereich des bestimmten pK_s -Wertes im ungebundenen Zustand, ist ein Teil dieser Seitenkette protoniert. Wenn sich der pK_s -Wert jedoch durch die Interaktion bis auf unter 4,5 verschiebt, sollte sie wieder vollständig deprotoniert vorliegen. Damit ist eine Protonenübertragung vom Komplex zum Lösungsmittel möglich. Da bei pH 7,5 kein Protonenübergang nachgewiesen werden konnte, gilt nach Gleichung 16, dass $\Delta H_{\text{ITC}}=\Delta H_{\text{Bindung}}$. Dabei setzt sich die Änderung der durch den Bindungsprozess freigesetzten Enthalpie ($\Delta H_{\text{Bindung}}$) aus der von Protonierungsvorgängen unbeeinflussten Enthalpieänderung ($\Delta H'$) und der durch die Protonierung von Aminosäureresten hervorgerufenen Änderung der Enthalpie (ΔH_{Proton}) zusammen (Gleichung 18) [172].

Gleichung 18

$$\Delta H_{\text{Bindung}} = \Delta H' + n \cdot \Delta H_{\text{Proton}}$$

Aus Gleichung 16 und Gleichung 18 ergibt sich Gleichung 19:

Gleichung 19

$$\Delta H_{\text{ITC}} = \Delta H' + n \cdot (\Delta H_{\text{Proton}} + \Delta H_{\text{Ion.}})$$

Da bei pH 7,5 kein Protontransfer messbar war und damit $n=0$ ist, ergibt sich $\Delta H_{\text{ITC}}(\text{pH } 7,5) = \Delta H'$. Unter der Annahme, dass $\Delta H'$ pH-Wert-unabhängig ist, kann man die durch den Protonierungsvorgang bei pH 5,5 auftretende Enthalpie nach Gleichung 20 berechnen:

$$\text{Gleichung 20} \quad \Delta H_{\text{Proton}}(\text{pH } 5,5) = \frac{\Delta H_{\text{ITC}}(\text{pH } 5,5) - \Delta H_{\text{ITC}}(\text{pH } 7,5)}{n} - \Delta H_{\text{Ion.}}$$

Die Deprotonierung einer Seitenkette an der Bindungsschnittstelle zwischen hCyp18 und CsA setzt bei pH 5,5 rund $4,3 \text{ kcal mol}^{-1}$ frei, dies stimmt relativ gut mit der für Imidazolgruppen bekannte Protonierungsenthalpie von $6,6 \text{ kcal mol}^{-1}$ überein [173]. In unmittelbarer Umgebung ($3,3 \text{ \AA}$) des für die hochaffine Bindung des CsA notwendigen MeVal11-Restes befindet sich die Seitenkette von H126 des hCyp18. Durch NMR-spektroskopische pH-Titrationen wurde bereits nachgewiesen, dass diese Seitenkette eine pK_s -Wertänderung von 6,5 auf $< 4,5$ während der CsA-Bindung erfährt [171]. Die hier vorgestellten Untersuchungen lassen vermuten, dass die Protonierung dieser Seitenkette zu der verminderten Affinität des hCyp18 bei niedrigen pH-Werten beiträgt. In Übereinstimmung damit steht die Beobachtung, dass der Austausch H126A zu einem stark reduzierten Protonentransfer zum Lösungsmittel bei pH 5,5 führt. Damit konnte nachgewiesen werden, dass H126 zu einem Großteil für die pH-Wert-Abhängigkeit der hCyp18/CsA-Interaktion verantwortlich ist ($\Delta\Delta G_{\text{ITC WT-hCyp18 H126A}} = -2,5 \text{ kcal mol}^{-1}$). Die höhere CsA-Affinität der Variante H126F zeigte ($\Delta\Delta G_{\text{ITC WT-hCyp18 H126F}} = -1,1 \text{ kcal mol}^{-1}$), dass der aromatische Charakter dieser Seitenkette für die Bindungsaffinität von größerer Bedeutung ist als deren Protonierbarkeit.

Die Untersuchung der Varianten R55A, Q63N, Q63E und F113A erfolgte in erster Linie, um die strukturelle Integrität der Proteine zu überprüfen. Die für alle Proteine erhaltenen Stöchiometriefaktoren von ca. 1 erlauben die Aussage, dass alle Varianten in einer nativen Form vorliegen. Für diese Varianten konnte festgestellt werden, dass die jeweiligen Aminosäureaustausche die Affinität zu CsA verringern ($\Delta\Delta G_{\text{ITC WT-hCyp18 R55A}} = -1,7 \text{ kcal mol}^{-1}$, $\Delta\Delta G_{\text{ITC WT-hCyp18 Q63N}} = -1,4 \text{ kcal mol}^{-1}$, $\Delta\Delta G_{\text{ITC WT-hCyp18 Q63E}} = -3,3 \text{ kcal mol}^{-1}$, $\Delta\Delta G_{\text{ITC WT-hCyp18 F113A}} = -0,9 \text{ kcal mol}^{-1}$). Die enzymologische Charakterisierung der Varianten R55A und F113A durch Zydowsky *et al.* lieferte zu den hier beschriebenen Ergebnissen widersprüchliche Resultate. So wurde der K_D -Wert für die Variante F113A mit $< 10 \mu\text{M}$ und für

die R55A-Variante mit <10 nM mittels spektroskopischer Methoden ermittelt [57]. Der hier mittels ITC bestimmte K_D -Wert für die F113A-Variante lag bei 58 nM und für die R55A-Variante bei $0,2 \mu\text{M}$. Obwohl der Rest F113 den Boden der CsA-Bindetasche des hCyp18 bildet, sind die direkten Wechselwirkungen zum Ligand gering, nur ein Atom dieses Restes ist weniger als $3,5 \text{ \AA}$ vom CsA entfernt [152]. Weshalb die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung dieser Variante einen fast 200fach größeren Wert ergab, ist nicht nachzuvollziehen. Ebenso überraschend ist die mittels Fluoreszenzspektroskopie ermittelte hohe Affinität der R55A-Variante zu CsA. Die Guanidiniumgruppe dieses Restes befindet sich in unmittelbarer Nähe zum CsA und bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit diesem Liganden aus [152]. Die mittels ITC beobachtete verminderte CsA-Affinität spiegelt den Verlust einer solchen Wechselwirkung wider. Die Seitenkette des Restes Q63 bildet ebenfalls eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Liganden aus, durch den Austausch Q63N wird diese Wechselwirkung gestört. Die ähnlichen thermodynamischen Parameter der Komplexbildung für beide Varianten deuten darauf hin, dass die Interaktion zwischen beiden Resten fein abgestimmt ist. Bereits sehr geringfügige Veränderungen (der Variante Q63N fehlt nur eine Methylengruppe gegenüber dem WT) führen zu deutlichen Effekten bei der Interaktion zwischen Ligand und Enzym. Die hier untersuchten Varianten wurden in Kapitel 4.2.1.2 und 4.2.2.1 näher enzymkinetisch charakterisiert, der Vergleich dieser Ergebnisse und deren Interpretation wird im Abschnitt 5.3.1 vorgenommen.

Durch die thermodynamische Untersuchung von Substrat/hCyp18-Interaktion und den Vergleich dieser Daten mit denen der hCyp18/CsA-Interaktion ist es möglich, Rückschlüsse auf die allgemeinen Grundlagen der hCyp18/Ligand-Interaktion zu ziehen. Dabei muss zuerst untersucht werden, ob die Auswertung von beiden Interaktionen nach dem gleichen Bindungsmodell zulässig ist. Zwei wesentliche Eigenschaften unterscheiden die Interaktion von hCyp18 mit CsA von der mit einem Substratpeptid. Im Gegensatz zu CsA, welches zwar in Lösung in verschiedenen Konformationen vorliegt, jedoch nur in der *all-trans*-Konformation in hoher Affinität von hCyp18 gebunden wird, ist von Substraten bekannt, dass beide Isomere (*cis* und *trans*) mit ähnlichen Affinitäten von hCyp18 gebunden werden [66]. Die Affinität des *cis*-Isomers ist nur rund 4mal größer als die des *trans*-Isomers. Diese geringen Unterschiede liegen bei den hier verwendeten Bedingungen (die eingesetzte Enzymkonzentration ist nur rund 10fach höher als der ermittelte K_D -Wert) unterhalb der Messgenauigkeit dieser Methode und können nicht nachgewiesen werden. Ein weiterer Unterschied ist die Umwandlung der *cis/trans*-Isomere ineinander, während das Substrat am Enzym gebunden ist. Eine katalysierte Isomerisierung der MeLeu9-MeLeu10 Bindung wurde für CsA nicht beobachtet. hCyp18 hat in katalytischen Mengen keinen Einfluss auf das *cis/trans*-Gleichgewicht des Substrates. Damit sollten die kalorimetrisch messbaren Enzym/Substrat-Interaktionen auch nur durch die Bildung der beiden

Michaelis-Menten-Komplexe zustande kommen. Durch NMR-spektroskopische Untersuchungen konnten die Gleichgewichtskonstanten sowohl der *cis*- als auch der *trans*-Konformation des Substrates Suc-AFPF-pNA zu hCyp18 mit $K_{s\ cis}=1,5\cdot 10^{-4}$ M und $K_{s\ trans}=3,5\cdot 10^{-3}$ M bestimmt werden [66]. Damit errechnet sich für beide Isomere ein $\Delta G_{cis}(283,2\text{ K})=-5,4\text{ kcal mol}^{-1}$ bzw. $\Delta G_{trans}(283\text{ K})=-4,6\text{ kcal mol}^{-1}$. Diese Werte stimmen mit dem hier bestimmten Parameter $\Delta G_{ITC\ cis/trans}(283\text{ K})=-4,6\text{ kcal mol}^{-1}$ sehr gut überein. Die angeführten Gründe sprechen dafür, dass die Auswertung der Substrat/hCyp18-Titrationsdaten nach einem einfachen Bindungsmodell möglich ist und die resultierenden Parameter den Bindungsprozess des Substrates sowohl in der *cis*- als auch in der *trans*-Konformation, zum Enzym charakterisieren. Die ermittelten thermodynamischen Parameter können daher mit den für die hCyp18/CsA-Interaktion bestimmten Parametern verglichen werden.

Naturgemäß unterscheidet sich die freie Enthalpie der Bindung zwischen Substraten und Inhibitoren. Während Substrate in ihrem Grundzustand nur mit geringer Affinität gebunden werden, zeichnen sich effektive Inhibitoren durch ihre hohe Bindungsaffinität aus. Dies spiegelt sich in einem $\Delta\Delta G_{ITC\ CsA-Suc-AFPF-pNA}(283\text{ K})$ von rund 6 kcal mol^{-1} wieder. Im Gegensatz zur geringen Affinität von Enzymen zum Grundzustand der Substrate evolvierte die Struktur des aktiven Zentrums dergestalt, dass der Übergangszustand der Reaktion mit maximaler Affinität gebunden wird. Die Dissoziationskonstante dieses Enzyms/Übergangszustand-Komplexes (K_{TX}) kann nach Gleichung 21 abgeschätzt werden, wobei k_{unkat} die Geschwindigkeitskonstante der unkatalysierten Reaktion ist und k_{kat}/K_M die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung der enzymkatalysierten Reaktion [174]. Die unkatalysierte Prolyl-Isomerisierung von Oligopeptiden verläuft bei 10°C mit Geschwindigkeitskonstanten im Bereich von $10^{-3}\text{ s}^{-1}\text{ M}^{-1}$, die k_{kat}/K_M -Werte der hCyp18-katalysierten Reaktion liegen im Bereich von 10^6 bis $10^7\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$.

Gleichung 21

$$K_{TX} = \frac{k_{unkat}}{k_{kat} / K_M}$$

Damit ergibt sich für K_{TX} ein Wert zwischen 10^{-9} und 10^{-10} M. Daraus lässt sich die freie Enthalpie der Bindung $\Delta G_{TX}(283\text{ K})$ mit rund -11 kcal mol^{-1} berechnen. Es bleibt anzumerken, dass dieser Wert nicht die gesamte Bindungsaffinität widerspiegelt, wenn die enzymatische Reaktion durch Diffusionsprozesse limitiert ist [174]. Da dies für hCyp18 der Fall ist (siehe 4.2.1.2), kann angenommen werden, dass $\Delta G_{TX}<-11\text{ kcal mol}^{-1}$ zutrifft. Interessanterweise zeigt CsA eine ähnlich hohe Affinität zu hCyp18: $\Delta G_{ITC}(283\text{ K})$ beträgt rund $-10,4\text{ kcal mol}^{-1}$, wie der Übergangszustand. Nach anfänglichen Spekulationen darüber, ob CsA eine Übergangszustandanalogue Verbindung darstellt [175, 176], herrscht nach der Analyse der strukturellen Daten für Enzym/Substrat- und Enzym/CsA-Komplexe nun die Meinung vor, dass das nicht

der Fall sein kann. Dies wurde hauptsächlich aus der entgegengesetzten Orientierung von CsA und Substraten (im Sinne der Orientierung der Peptidbindung) im aktiven Zentrum geschlossen [177].

Die im Abschnitt 4.1.1.4 beschriebene Beobachtung, dass sich die Bindungsenthalpien von CsA und Suc-AFPF-pNA trotz der großen Differenzen in ΔG_{TTC} nur unwesentlich unterscheiden ($\Delta\Delta H_{CsA-Suc-AFPF-pNA}(283\text{ K}) = -0,5\text{ kcal mol}^{-1}$), rechtfertigt die Vermutung, dass die Interaktion von hCyp18 mit beiden Molekülen trotz ihrer entgegengesetzten Orientierung im aktiven Zentrum auf den gleichen intermolekularen Wechselwirkungen beruht. Die Analyse der vorhandenen Kristallstrukturen von hCyp18 im Komplex mit CsA und einer Variante des HIV-Hüllproteins (HIV-1 CA, wovon eine Form in der *cis*- und die andere in der *trans*-Konformation gebunden ist) unterstützen diese Interpretation. Auch die Enthalpie der Bindung des Hüllproteins zu hCyp18 stimmt mit derjenigen der hCyp18/CsA-Interaktion gut überein, wie die kalorimetrische Untersuchung dieser Wechselwirkung ergab [178].

Abbildung 25 zeigt einen Ausschnitt der Überlagerung von fünf Strukturen: CsA, *cis*- bzw. *trans*-Isomer des HIV-1 Hüllproteins, sowie die Überlagerung von CsA mit Ala-Dala-Pro-pNA und Ala-Pro (RCSB-Datenbankeintrag: 1CWA, 1M9E, 1M9F, 1VBS und 2CYH). Es ist deutlich zu erkennen, dass die *cis*- und *trans*-Prolyl-Bindung der zwei HIV-Hüllprotein-Varianten in einer Ebene liegen und die Carbonylsauerstoffatome beider Bindungen sich genau gegenüberstehen ($\omega = 180^\circ$ und $\omega = 0^\circ$). Der Carbonylsauerstoff des Restes MeVal11 des CsA-Moleküls steht hingegen fast senkrecht zu dieser Ebene. Diese orthogonale Orientierung kann als eine im Übergangszustand fixierte Carbonylgruppe einer Peptidbindung des Substrats angesehen werden. Eine solche Stellung des Carbonylsauerstoffs der ansonsten planaren Bindung ist nur deshalb möglich, weil CsA in der entgegengesetzten Orientierung im Vergleich zu Substratmolekülen gebunden wird. Diese Betrachtung steht in Übereinstimmung mit Computersimulationen, durch welche berechnet wurde, dass der Carbonylsauerstoff der Prolyl-Bindung im Übergangszustand durch eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem NH-Proton des Peptidrückgrates des Aminosäurerestes 102 stabilisiert wird [58]. Diese spezielle Lage des Carbonylsauerstoffs ist nur für diese Bindung zu beobachten. Alle weiteren Carbonylsauerstoffatome N- und C-terminal von dieser Bindung weisen in allen drei Liganden eine sehr ähnliche räumliche Orientierung auf und sind deshalb auch in ähnliche Ligand/Enzym-Interaktionen einbezogen. Dies spiegelt sich auch in den thermodynamischen Parametern wider. Der Unterschied in der freien Enthalpie der Bindung zwischen CsA und Substrat rührt fast ausschließlich von den jeweiligen entropischen Beiträgen der Bindungsreaktion her. Während die Assoziation von CsA und hCyp18 bei 10°C entropisch begünstigt ist, ist die Substratassoziation entropisch ungünstig ($T\Delta\Delta S_{CsA-Suc-AFPF-pNA} = 5,3\text{ kcal mol}^{-1}$).

Interessanterweise zeigen die als Inhibitoren beschriebenen Liganden Ala-DAla-Pro-Phe-pNA und Ala-Pro eine zum CsA ähnliche orthogonale Orientierung der Carbonylgruppe der Prolyl-Bindung auf, wie sie für CsA beobachtet wurde (Abbildung 25). Diese Orientierung der Carbonylgruppe bei ansonsten planarer Peptidbindung wird erreicht, weil sich der Pyrolidin-Ring des Prolyl-Restes ebenfalls aus der für Substrate typischen Ebene herausdreht. Eine solche Verdrehung ist nur möglich, da beide Liganden keine nativen Wechselwirkungen zwischen dem Aminosäurerest in P1-Position und dem Enzym eingehen können. In Übereinstimmung damit zeigt die Struktur des hCyp18 im Komplex mit dem Tetrapeptid Ala-Ala- Ψ [CS-N]-Pro-Phe-pNA, in welchem nur der Sauerstoff der Peptidyl-Prolyl-Bindung durch Schwefel ersetzt wurde, eine substratähnliche Stellung dieser Thioxo-Gruppe auf, obwohl dieses Peptid kein Substrat darstellt.

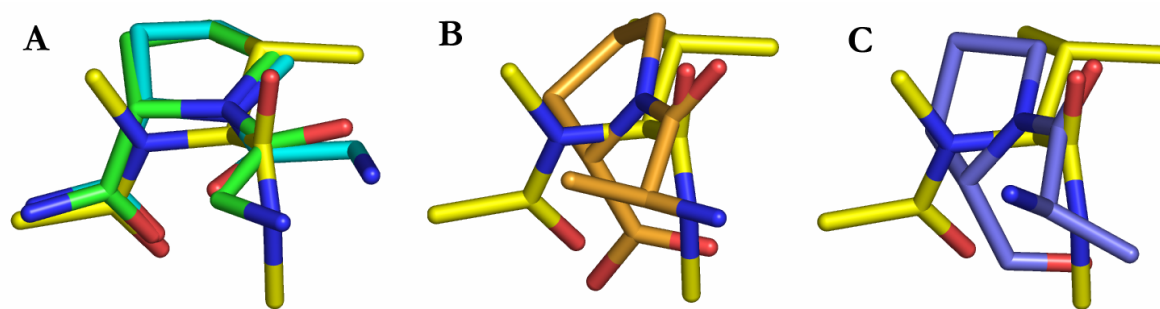


Abbildung 25: Ausschnitte der Überlagerungen von Strukturen des hCyp18 im Komplex mit (A) CsA (gelb), *cis*-HIV 1-Hüllprotein (hellblau) und *trans*-HIV 1-Hüllprotein (grün), (B) Ala-DAla-Pro-Phe-pNA (gold) und (C) Ala-Pro (blau). Zur Überlagerung wurden die Kristallstrukturen der RCSB-Datenbank entnommen (1cwa, 1m9f, 1m9e, 1vbs und 2cyh) und die $C\alpha$ -Atome der fünf Proteine zur Deckung gebracht. Es sind nur die Teile der Liganden dargestellt, welche sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu der zu isomerisierenden Peptidbindung befinden.

Beide Reaktionen weisen unterschiedliche Änderungen der Wärmekapazität auf, wobei die der CsA-Komplexierung mit $\Delta C_p = -435,8 \pm 7 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ deutlich niedriger ist als die der Substratbindung ($\Delta C_p = -259,8 \pm 23 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). Dies kann unter anderem auf die N- und C-terminalen polaren Reste des verwendeten Substratmoleküls zurückgeführt werden. Diese Beobachtungen begründen die Vermutung, dass CsA im hCyp18-gebundenen Zustand sowohl Eigenschaften eines Substrates im Grundzustand als auch einer Übergangszustandanalogen Verbindung aufweist.

5.2 Thermodynamische Charakterisierung der hPin1/Ac-Phe-DThr(PO_3H_2)-Pip-Nal-Gln-NH₂-Interaktion

Die molekularen Grundlagen der Interaktion zwischen PPIasen der Parvulin-Familie und Liganden, die im aktiven Zentrum dieser PPIasen binden, sind bis heute nicht im Detail bekannt.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wurden die ersten Informationen über das aktive Zentrum aus der Kristallstruktur des hPin1 im Komplex mit dem Dipeptid AP erhalten. Später konnten durch NMR-spektroskopische Experimente an Pin1At und einem Substratmolekül weitere Daten über das aktive Zentrum dieser Enzyme gewonnen werden [87, 94]. Mit Hilfe der hier durchgeführten Untersuchungen sollen diese Erkenntnisse anhand der direkten thermodynamischen Charakterisierung der hPin1/Ligand-Interaktion erweitert werden. Zu diesem Zweck wurde ein Ligand benutzt, der im Gegensatz zu Substraten eine hohe Affinität zum Enzym aufweist, jedoch durch seine substratähnliche Struktur Rückschlüsse auf die Substrat/hPin1-Interaktion erlaubt. Diesen Zweck erfüllt der hochaffine Ligand Ac-Phe-DThr(PO₃H₂)-Pip-Nal-Gln-NH₂.

Im Gegensatz zur hCyp18/CsA-Interaktion, die bei 25°C ausschließlich aus der Änderung der Enthalpie der Bindung resultiert, tragen zur hohen Affinität zwischen hPin1 und dem hier untersuchten Liganden sowohl die Änderung der Enthalpie ($\Delta H_{ITC} = -6,6 \text{ kcal mol}^{-1}$) als auch die Änderung der Entropie ($T\Delta S_{ITC}(298 \text{ K}) = 3,6 \text{ kcal mol}^{-1}$) bei. Daraus ergibt sich eine Änderung der freien Enthalpie der Bindung von $\Delta G_{ITC}(298 \text{ K}) = -10,2 \text{ kcal mol}^{-1}$, und entsprechend eine Assoziationskonstante von $K_A = 3,0 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. Die Assoziationskonstante steigt mit sinkender Temperatur auf $K_A = 5,1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} = 1/K_D = 20 \text{ nM}$ (10°C) und stimmt damit relativ gut mit dem bei dieser Temperatur durch kinetische Untersuchungen erhaltenen K_i -Wert von 40 nM überein (Daten nicht gezeigt). Es kann deshalb geschlussfolgert werden, dass der untersuchte Ligand im aktiven Zentrum des hPin1 gebunden wird. Die Untersuchungen zeigten ebenfalls, dass der Ligand ausschließlich an die PPIase-Domäne des hPin1 bindet, da die Stöchiometrie der Bindung unabhängig von der An- oder Abwesenheit der WW-Domäne bei allen Experimenten nahe 1 lag. Die einfachere Präparation von hPin1 Δ WW, seine geringere Tendenz zu Aggregation und die Möglichkeit, selbst eine schwache Interaktion des untersuchten Liganden mit der WW-Domäne ausschließen zu können, begründeten die Entscheidung, die weiteren Experimente mit dieser Variante durchzuführen. Zuvor wurde jedoch untersucht, ob die WW-Domäne einen Einfluss auf die Bindung des Liganden hat. Zu diesem Zweck wurden die thermodynamischen Parameter über einen Temperaturbereich von 5 bis 25°C ermittelt. Alle Parameter sind für hPin1 und hPin1 Δ WW nahezu identisch. Daraus folgt, dass auch die resultierenden Änderungen der Wärmekapazitäten für beide untersuchten Proteine sehr ähnlich sind ($\Delta C_{P \text{ hPin1}} - \Delta C_{P \text{ hPin1 } \Delta \text{WW}} = -9 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). Diese geringe Änderung ist ein Nachweis dafür, dass die Ligand/Enzym-Interaktion nicht wesentlich durch die WW-Domäne vermittelt wird und es auch nicht zu einer detektierbaren Strukturänderung zwischen der PPIase-Domäne und der WW-Domäne kommt. Wäre dies der Fall, würde man erwarten, dass sich die lösungsmittelzugänglichen Oberflächenbereiche von hPin1 und hPin1 Δ WW unterschiedlich

ändern, was nach Gleichung 3, zu einem veränderten ΔC_p führen müsste. Der im Falle der hPin1/Ac-Phe-DThr(PO_3H_2)-Pip-Nal-Gln- NH_2 -Interaktion beobachtete leicht negativere Wert für ΔC_p im Vergleich zur hPin1 ΔWW -Variante könnte als Indiz dafür gewertet werden, dass es zu einer geringen Verringerung von nichtpolaren Oberflächenbereichen im hPin1 während der Ligandbindung kommt, welche während der Ligandkomplexierung durch die hPin1 ΔWW -Variante nicht möglich ist. Die beobachtete Änderung von ΔC_p liegt jedoch im Fehlerbereich der hier dargelegten Daten und muss somit kritisch bewertet werden. Durch NMR-spektroskopische Untersuchungen konnte bereits nachgewiesen werden, dass der Kontakt zwischen beiden Domänen nur äußerst schwach ist und sich deshalb beide Domänen fast unabhängig voneinander in Lösung bewegen können. Durch die Interaktion mit Substraten verstärkt sich die durch hydrophobe Bereiche vermittelte schwache Wechselwirkung so weit, dass sich beide Domänen wie ein Eindomänenprotein in Lösung verhalten [179].

Mit Hilfe von Gleichung 3 und Gleichung 4 kann unter Verwendung der Parameter ΔC_p und $\Delta H_{\text{ITC}}(25^\circ\text{C})$ die durch die Interaktion von hPin1 und Ac-Phe-DThr(PO_3H_2)-Pip-Nal-Gln- NH_2 hervorgerufene Veränderung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche mit $\Delta\text{ASA}_{\text{polar}} = -550 \text{ \AA}^2$ und $\Delta\text{ASA}_{\text{unpolar}} = -646 \text{ \AA}^2$ errechnet werden. Wie schon die relativ geringe Änderung der Wärmekapazität von rund $\Delta C_p = -148 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ erwarten ließ, wird die Bindung zu fast gleichen Teilen von polaren und nicht polaren Interaktionen hervorgerufen. Nimmt man an, dass sich die berechneten Änderungen der wasserzugänglichen Oberflächen zu gleichen Teilen auf das Protein und den Liganden aufteilen, kann errechnet werden, dass an der Interaktion rund 7% der Gesamtoberfläche (8600 \AA^2 , ermittelt aus der Röntgenkristallstruktur mit dem RCSB-Datenbankeintrag 1PIN) oder 8,5% der Oberfläche der PPIase-Domäne beteiligt sind (6900 \AA^2 , ermittelt aus der Röntgenkristallstruktur mit dem RCSB-Datenbankeintrag 1PIN, in welcher die ersten 39 Aminosäurereste verworfen wurden). Inwiefern diese Werte die tatsächlichen strukturellen Prozesse im hPin1/Ac-Phe-DThr(PO_3H_2)-Pip-Nal-Gln- NH_2 -Komplex beschreiben, kann nur mittels Strukturanalyse überprüft werden.

Weiterführende kalorimetrische Messungen bestätigten jedoch die Vermutung, dass polare Bereiche des Enzyms entscheidend an dem Bindungsprozess beteiligt sind. So konnte durch die Variation der Ionenstärke des Messansatzes nachgewiesen werden, dass ionische Wechselwirkungen wesentlich zur Affinität des Liganden beitragen. Der Zusatz von 250 mM NaCl verringerte K_A 26fach, wobei der beobachtete Effekt ausschließlich durch den weniger negativen enthalpischen Beitrag zur Bindung hervorgerufen wurde.

Die durch die erhöhte Ionenstärke verminderte Bindungsaffinität ist dabei stark abhängig von der Art des eingesetzten Anions. So wurde durch den Zusatz eines Gemisches aus NaH_2PO_4 und Na_2HPO_4 (10 mM Gesamtkonzentration) eine 28fache Erniedrigung von K_A beobachtet. Dabei

ist die mit der geringeren Affinität verbundene positivere Änderung der Bindungsenthalpie noch stärker als bei den Messungen mit NaCl ausgeprägt, diese werden jedoch zum Teil von einer ebenfalls positiveren Änderung der Bindungsentropie kompensiert. Die verringerte Änderung der Bindungsenthalpie kann unter den hier beschriebenen Bedingungen durch eine direkte Interaktion der zugesetzten Phosphat-Ionen mit den basischen Aminosäureresten, welche an den ionischen Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein beteiligt sind, erklärt werden. Im Unterschied zu Lösungen mit niedriger Ionenstärke bilden diese Aminosäurereste schon vor der Interaktion mit dem Liganden ionische Wechselwirkungen mit den zugesetzten Phosphat-Ionen aus. Die Interaktion mit dem Liganden ersetzt diese später nur, wodurch ein Teil der Enthalpie der Bindung und damit der freien Enthalpie für die Bindung „verloren“ geht.

Es ist bekannt, dass hPin1 in der Lage ist, mit Phosphat- und Sulfat-Ionen direkt zu interagieren [87, 93]; wobei Dissoziationskonstanten von 2 mM bzw. 0,4 mM gemessen wurden. Behandelt man die während der hier beschriebenen Titrationsexperimente anwesenden Phosphat-Ionen als kompetierende Liganden, erhält man für diese eine Dissoziationskonstante von rund 0,5 mM. Im Gegensatz zu der unspezifischen Interaktion der Chlorid-Ionen wechselwirken Phosphat-Ionen spezifisch mit dem aktiven Zentrum des Enzyms. Die Kristallstruktur von hPin1 (Index der RCSB-Datenbankeintrag: 1PIN) weist ein Sulfat-Ion auf, welches sich in direkter Nähe zum aktiven Zentrum des Enzyms befindet [87]. In Nachbarschaft zu diesem Sulfat-Ion befinden sich drei positiv geladene Reste (K63, R68 und R69), die an dessen Bindung beteiligt sind. Durch NMR-spektroskopische Untersuchungen konnten weitere Seitenketten identifiziert werden, welche durch die Bindung des Sulfat-Ions beeinflusst werden. So zeigten die Reste W73 und S114 eine reduzierte Flexibilität im sulfatgebundenen Zustand [93].

Die Bindung eines Phosphat-Ions an dieser Position würde somit die mit einer solchen Interaktion verbundenen entropischen Effekte, wie z.B. den Verlust der Rotationfreiheitsgrade dieser Seitenketten und ihre eingeschränkte Flexibilität, bereits vor der mittels ITC messbaren Ligandenbindung realisieren. Dies könnte die kompensierenden entropischen Effekte erklären, die bei der Anwesenheit von Phosphat-Ionen während der Ac-Phe-DThr(PO₃H₂)-Pip-Nal-Gln-NH₂/hPin1-Interaktion beobachtet wurden. Dass ionische Wechselwirkungen auch an der Substratbindung des hPin1 beteiligt sind, stimmt mit den Beobachtungen überein, dass die PPIase-Aktivität von hPin1 gegenüber negativ geladenen Substraten stark von der Ionenstärke der Lösung abhängt. Hohe Konzentrationen an Na₂HPO₄, NaCl und KCl inhibieren dessen Aktivität deutlich [29, 87].

Des Weiteren wurden Unterschiede in der Lage einer Schleifenregion in Röntgenkristallstrukturen von hPin1 in An- und Abwesenheit von Sulfat-Ionen beobachtet. Diese Unterschiede gaben Anlass zu der Vermutung, dass die Substratbindung von hPin1 zu

einer strukturellen Änderung im Protein führt [90]. Dabei sollte sich bei einer Substratinteraktion, oder auch schon durch die Bindung von Phosphat- oder Sulfationen, die „ β 1/ α 1-Schleife“ über der Substratbindetasche schließen. Da eine strukturelle Änderung auch eine Veränderung der wasserzugänglichen Oberfläche zur Folge hätte ($\Delta ASA_{\text{unpolar}} = -535 \text{ \AA}^2$, $\Delta ASA_{\text{polar}} = -446 \text{ \AA}^2$, berechnet aus den PPIase-Domänen der Strukturen mit bzw. ohne gebundenem Sulfation), sollte auch ΔC_p bei der Ligandbindung beeinflusst werden. Berechnet man ΔC_p für die beschriebene Konformationsänderung und lässt die Bindung eines Liganden dabei unbeachtet, erhält man einen Wert von $-125 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Dieser Wert würde bereits knapp 90% der durch die Ligand/hPin1 ΔWW -Interaktion erhaltenen Änderung der Wärmekapazität ($\Delta C_p = -139 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) entsprechen. Da die Bindung des Liganden selbst jedoch ebenfalls eine Änderung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche zu Folge hat, scheint eine solche Konformationsänderung unwahrscheinlich.

Zur näheren Beleuchtung dieses Problems wurde ΔC_p in An- und Abwesenheit von Phosphat-Ionen bestimmt. Falls die Interaktion von Phosphat- oder Sulfat-Ionen eine Strukturänderung im Protein induziert, müssen sich in beiden Versuchsreihen unterschiedliche Temperaturabhängigkeiten von ΔH_{ITC} bestimmen lassen. Dies ist nicht der Fall, ΔC_p bleibt in An- und Abwesenheit von Phosphat-Ionen annähernd unverändert ($\Delta C_p - \Delta C_{p \text{ Phosphat}} = -10 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). Diese Ergebnisse stimmen mit NMR-spektroskopischen Untersuchungen überein, durch welche ebenfalls keine substratinduzierten Konformationsänderungen in der PPIase-Domäne des hPin1 nachwiesen werden konnten [93]. Die durch die Anwesenheit von Phosphat-Ionen beobachtete starke Erniedrigung der Ligandaffinität lässt weiterhin vermuten, dass die phosphorylierte Seitenkette des Liganden entscheidend zur hochaffinen Bindung beiträgt. Ähnlich wie es für die PPIase-Aktivität des hPin1 beschrieben wurde, zeigt auch die Bindungsaffinität des hier untersuchten Liganden eine starke pH-Wert-Abhängigkeit. So erniedrigt sich ΔG_{ITC} von pH 8,0 zu pH 5,5 um rund 1 kcal mol^{-1} was zu einer rund 6fach niedrigeren Bindungsaffinität führt. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung durch die dianionische Form des Phosphat-Restes der DThr-Seitenkette am besten vermittelt wird. Eine sehr ähnliche pH-Wert-Abhängigkeit wurde für die PPIase-Aktivität des hPin1 gegenüber phosphorylierten Substraten beobachtet [29]. Dabei verringerte sich die Aktivität des Enzyms von pH 7,5 auf pH 5,5 um rund Faktor 4. Bei der hier beobachteten pH-Wert-Abhängigkeit reduzierte sich die Assoziationskonstante im gleichen pH-Wert-Bereich um Faktor 5. Anscheinend kommt die reduzierte Aktivität bei sauren pH-Werten zum Teil durch die schwächere Bindung des untersuchten Substrates zustande. Es ist jedoch schwierig, die Ergebnisse aus kinetischen und Titrationsexperimenten direkt zu vergleichen, da bei der Aktivitätsbestimmung nur die pH-Wert-Abhängigkeit der k_{kat}/K_M -Werte bestimmt wurde [29].

Um das erhaltene pH-Profil der Ac-Phe-DThr(PO₃H₂)-Pip-Nal-Gln-NH₂/hPin1-Interaktion quantitativ beschreiben zu können, wurde ein Modell verwendet, welches die Protonierung sowohl einer Aminosäureseitenkette des Proteins als auch des Liganden berücksichtigte. Ein einfacheres Modell, welches z.B. für die hCyp18/CsA-Interaktion verwendet wurde, war nicht in der Lage, die gemessenen Daten, insbesondere im basischen Bereich, zu beschreiben. Dabei wurde angenommen, dass sich die pK_s-Werte der entsprechenden Seitenketten im freien Zustand und im Komplex unterscheiden können. Der resultierende pK_s-Wert im sauren Bereich stimmt gut mit den aus der Literatur bekannten pK_s-Werten von phosphorylierten Threonin- und Serinseitenketten überein [29, 176, 180, 181]. Die Verschiebung dieses pK_s-Wertes von 6,4 im freiem nach 5,1 im gebundenen Zustand kann dabei durch die Wechselwirkung mit positiv geladenen Aminosäureseitenketten des aktiven Zentrums von hPin1, wie z.B. K63, R68 und R69, erklärt werden. Ein solcher Effekt wurde für andere Peptid/Protein-Interaktionen bereits beschrieben. So wurde für den pK_s-Wert eines Phosphatrestes von Phosphotyrosin (in der Peptidsequenz Ac-PQ(pY)EEIPI-NH₂) eine Änderung von 1,8 pK_s-Einheiten bei der Bindung an die SH2-Domäne beobachtet [182].

Die Untersuchung der zwei hPin1-Varianten hPin1 R68A und hPin1 R69A bestätigte die Vermutung, dass diese Aminosäurereste an der ionischen Wechselwirkung mit dem Phosphatrest des Liganden beteiligt sind. Der Austausch R68A verringert den Betrag von ΔG_{ITC} um rund 1 kcal mol⁻¹. Dies entspricht etwa der Verringerung der Bindungsaffinität des Liganden im sauren pH-Wert-Bereich. Dieser Effekt wird ausschließlich durch Verringerung des Betrages von $T\Delta S_{ITC}$ vermittelt. Für eine direkte ionische Wechselwirkung mit dem Liganden spricht die geringe Entfernung (2-3 Å) der Guanidiniumgruppe dieses Restes zu dem bereits beschriebenen Sulfat-Ion in der Röntgenkristallstruktur des Komplexes hPin1/AP. Eine doppelt so große Verringerung des Betrages von ΔG_{ITC} (2 kcal mol⁻¹) hat der Austausch R69A zur Folge. Die schwächere Bindung wird in diesem Fall sowohl durch eine Verringerung des Betrages von ΔH_{ITC} (um 1,4 kcal mol⁻¹) als auch von $T\Delta S_{ITC}$ (um 0,6 kcal mol⁻¹) vermittelt. Dies ist überraschend, da im Gegensatz zu R68 die Guanidiniumgruppe dieses Restes weiter vom Sulfat-Ion der Röntgenkristallstruktur entfernt ist (4-5 Å) und keine direkten polaren Kontakte mit diesem Ion besitzt. Die Guanidiniumgruppe bildet aber eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Wassermolekül aus, welches seinerseits wiederum mit anderen Aminosäureresten des Proteins interagiert. Eventuell ist dieser Rest notwendig, um die „β1/α1-Schleife“ für die Ausbildung der maximalen Ligand/Protein-Affinität zu positionieren.

Das hier beschriebene Verhalten der zwei hPin1-Varianten korreliert ebenfalls mit den in der Literatur dargelegten Daten zur PPIase-Aktivität der Varianten hPin1 R68L und hPin1 R69L [91]. So reduzierte der Austausch R68L die PPIase-Aktivität um Faktor 2,2. Dies steht in guter

Übereinstimmung mit der hier beschriebenen Verminderung der Affinität des Liganden um Faktor 3,5 zur Variante hPin1 R68A. Die wesentlich stärkere Reduzierung der PPIase-Aktivität der Variante R69L (1,2% Restaktivität) korreliert ebenfalls mit einer deutlich schwächeren Affinität des Liganden zu hPin1 R69A (3,5% der Affinität bleiben erhalten). Dieses Verhalten zeigt deutlich, dass die hier untersuchte Ligand/Enzym-Interaktion wesentliche Aspekte der Enzym/Substrat-Wechselwirkung widerspiegelt.

Durch die nähere Untersuchung der Ac-Phe-DThr(PO₃H₂)-Pip-Nal-Gln-NH₂/hPin1-Interaktion bei pH 5,5 und 7,8 in Puffern mit unterschiedlicher Ionisierungsenthalpie konnte nachgewiesen werden, dass die Wechselwirkung zwischen Ligand und Protein bei pH 5,5 zu einer Freisetzung von 0,77 Protonen pro Komplex führt ($n=-0,77$), wogegen kein Protonentransfer zum Lösungsmittel bei pH 7,8 erfolgte ($n\approx 0$). Mit Hilfe der bereits im vorigen Abschnitt (Seite 77) angestellten Überlegungen ergibt sich unter der Voraussetzung, dass bei pH 7,8 kein Protonentransfer stattfindet, aus Gleichung 19:

$$\text{Gleichung 22} \quad \Delta H_{\text{Proton}}(\text{pH}5,5) = \frac{\Delta H_{\text{ITC}}(\text{pH}5,5) - \Delta H_{\text{ITC}}(\text{pH}7,8)}{n} - \Delta H_{\text{Ion.}}$$

Durch Einsetzen von $n=-0,77$, den Bindungsenthalpien für $\Delta H_{\text{ITC}}(\text{pH}5,5)$, $\Delta H_{\text{ITC}}(\text{pH}7,8)$ und den entsprechenden Ionisierungsenthalpien $\Delta H_{\text{Ion.}}$ kann eine durch die Deprotonierung einer Aminosäureseitenkette ausgetauschte durchschnittliche Wärmemenge von rund $-0,04 \text{ kcal mol}^{-1}$ errechnet werden. Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass die Phosphatgruppe des DThr-Restes des Liganden der Ursprung des sauren pK_s -Wertes ist, da Phosphat-Ionen nur eine sehr geringe Ionisierungsenthalpie ($\Delta H_{\text{Ion.}}=0,8 \text{ kcal mol}^{-1}$) aufweisen [183].

Der zweite durch die Anpassung des Modells an die experimentellen Daten erhaltene pK_s -Wert liegt im basischen Bereich und zeigt eine deutliche Veränderung von $(\text{pK}_s)_2$ 10,6 zu >14 . Die Bestimmtheit dieser Parameter ist durch die fehlenden Messwerte oberhalb pH 9,5 gering und eine Interpretation deshalb schwierig. Die hier vorliegenden Ergebnisse erlauben es nicht, diesen pK_s -Wert einer spezifischen Aminosäureseitenkette zuzuordnen. Der relative hohe pK_s -Wert im ungebundenen Zustand lässt jedoch vermuten, dass es sich hierbei um einen Cysteinyl-Rest (die Thiolgruppe besitzt pK_s -Werte im Bereich von 8 bis 11), einen Lysyl-Rest (die ϵ -Aminogruppe zeigt pK_s -Werte um 10) oder einen Tyrosyl-Rest (die OH-Gruppe zeigt pK_s -Werte zwischen 9 und 12) handelt [184]. Die Röntgenkristallstruktur von hPin1 im Komplex mit dem Dipeptid AP erlaubt es, solche Aminosäurereste zu identifizieren. Die einzigen Aminosäurereste mit pK_s -Werten dieser Größenordnung, der korrekten räumlichen Orientierung der Seitenketten und räumlicher Nähe zu aktiven Zentrum sind die Reste K63 und C113. Von diesen beiden Resten wechselwirkt die ϵ -Aminogruppe des Restes K63 direkt mit dem in der Röntgenkristallstruktur beschriebenen Sulfat-Ion. Andererseits wurde für die Seitenkette des C113 berichtet, dass sie

durch die Wechselwirkung von hPin1 mit Sulfat-Ionen eine Verschiebung des pK_s -Wertes in den basischen Bereich erfährt [93]. Eine abschließende Interpretation ist nach dem Stand der Untersuchungen nicht möglich.

Die Anzahl der kalorimetrischen Untersuchungen zur Interaktion von Oligopeptiden mit phosphorylierten Seitenketten mit Proteinen bzw. Proteindomänen hat in den letzten Jahren stetig zugenommen. Das vermehrte wissenschaftliche Interesse ist dabei auf der herausragenden Bedeutung solcher Interaktionen für das Verständnis von Signaltransduktionsprozessen begründet. Besonderes detailliert sind die Wechselwirkungen zwischen phosphorylierten Peptiden und verschiedenen SH2-Domänen untersucht [185-193]. Ein Vergleich der beschriebenen thermodynamischen Parameter mit den in dieser Arbeit erhaltenen Daten zeigt, dass die Assoziation in den meisten Fällen durch ähnliche Parameter charakterisiert ist. So lag die durch die Bindung von phosphorylierten Oligopeptiden an verschiedene SH2-Domänen hervorgerufene Änderung der Wärmekapazität zwischen -120 und $-217 \text{ cal mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ [185, 191, 192]. Die freie Enthalpie der Bindung war in allen Fällen fast vollständig durch die Änderung der Enthalpie der Bindung bestimmt, in vielen Fällen lag sie zwischen rund 7 kcal mol^{-1} und 5 kcal mol^{-1} [185, 187, 191, 192]. Die höhere Affinität des hier untersuchten Phosphopeptides zur PPIase-Domäne von hPin1, im Vergleich zu den bereits in der Literatur beschriebenen Wechselwirkungen zwischen Phosphopeptiden mit verschiedenen SH2-Domänen, liegt in der stabilisierenden Wirkung der Änderung der Entropie begründet. Dieser stabilisierende Effekt wird vermutlich durch die nichtpolaren Seitenketten der nichtproteinogenen Aminosäurereste des hier charakterisierten Liganden vermittelt.

Die thermodynamischen Resultate der Titration des Substrates Ac-AA(p)SPR-pNA mit hPin1 verdeutlichen, dass die Interaktion zwischen einem Substrat und hPin1 sowie dem oben beschriebenen Liganden und hPin1 auf ähnlichen Prinzipien beruht. Unter den im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Annahmen können die aus den ITC-Experimenten erhaltenen Daten für die Interaktion von Substraten mit denen von Liganden verglichen werden. Obwohl sich der Betrag der freien Enthalpie der Bindung ΔG_{ITC} von Substrat und Ligand um mehr als 5 kcal mol^{-1} unterscheidet, ist der enthalpische Beitrag für beide Interaktionen fast gleich groß ($\Delta H_{\text{ITC Ligand}} - \Delta H_{\text{ITC Substrat}} = -0,4 \text{ kcal mol}^{-1}$). Besonders bemerkenswert ist dies, wenn man bedenkt, dass der untersuchte Ligand im Gegensatz zum Substrat in Position P1 einen Aminosäurerest der D-Konfiguration aufweist und der fünfgliedrige Ring des Prolyl-Restes gegen einen sechsgliedrigen Ring ausgetauscht wurde. Der große Unterschied in der Bindungsaffinität erwächst aus dem entropischen Beitrag zur Bindung. Die Interaktion des Liganden mit hPin1 ist bei 20°C entropisch begünstigt ($T\Delta S_{\text{ITC}} = 3,7 \text{ kcal mol}^{-1}$), während die Substratinteraktion nicht begünstigt ist ($T\Delta S_{\text{ITC}} = -1,1 \text{ kcal mol}^{-1}$). Die Substrat- bzw. CsA/hCyp18-Interaktion weist ein

ähnliches thermodynamisches Verhalten auf und lässt somit auf grundlegende Gemeinsamkeiten bei der Substratbindung von beiden Enzymen schließen. Leider konnten aufgrund der nur in geringen Mengen zu Verfügung stehenden Substratmengen keine weiteren Untersuchungen zur Substratbindung durchgeführt werden. Besonders die Temperaturabhängigkeit von ΔH_{ITC} scheint in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse zu sein.

5.3 Kinetische Untersuchungen zu PPIasen

5.3.1 Die thermodynamischen und kinetischen Parameter der hCyp18-Varianten

Bevor die Ergebnisse der viskositätsabhängigen Messungen näher betrachtet werden, soll an dieser Stelle auf die erhaltenen PPIase-Aktivitäten der untersuchten hCyp18-Varianten eingegangen werden. Wie bereits in der Einleitung (Tabelle 7-4) beschrieben, wurden einige Enzymvarianten mit Aminosäureaustauschen im aktiven Zentrums auf ihre Enzymaktivität untersucht, um Rückschlüsse auf den Katalysemechanismus zu erlangen. In Abschnitt 4.2.1.2 wurden die Auswirkungen des Austausches von vier Aminosäureseitenketten des aktiven Zentrums von hCyp18 (R55, Q63, F113 und H126) auf die Enzymaktivität bestimmt. Enzymkinetische Untersuchungen an hCyp18-Varianten der Reste R55, F113 und H126 wurden in der Literatur beschrieben [57].

Obwohl die in dieser Arbeit ermittelte Aktivität des hCyp18 nur geringfügig von den in der Literatur beschriebenen Werten abweicht, unterschieden sich die Restaktivitäten der Varianten hCyp18 R55A (<0,04%) und hCyp18 F113A (<0,02%) zum Teil deutlich von den bereits publizierten Ergebnissen (hCyp18 R55A, 0,1% und hCyp18 F113A, 3% Restaktivität). Es zeigte sich, dass die Enzymlösungen eine Verunreinigung mit dem hochaktiven *E. coli* CypA enthielten, welche in den hier verwendeten Lösungen bis zu 88% der Gesamtaktivität ausmachte. Die ähnlichen proteinchemischen Eigenschaften von hCyp18 und *E. coli* CypA machten eine vollständige Trennung der Proteine unmöglich. Die Verunreinigung ist nur bei Untersuchungen von inaktiveren Varianten von Bedeutung, da zur Bestimmung der kinetischen Konstanten hohe Proteinkonzentrationen eingesetzt werden müssen. Varianten mit Restaktivitäten über 1% (hCyp18 H126A und hCyp18 H126F) werden nicht beeinflusst. Die Möglichkeit, dass die in dieser Arbeit beschriebenen niedrigeren Aktivitäten der hCyp18-Varianten durch die Verwendung von teilweise denaturierten Proteinen zustande kam, kann anhand der mittels ITC gemessenen Stöchiometrie der CsA-Bindung von nahe 1 ausgeschlossen werden.

Die Beobachtung, dass die Interaktion von CsA mit hCyp18 sowohl Aspekte der Substratbindung im Grundzustand als auch einige Eigenschaften einer Übergangszustandanalogen Verbindung widerspiegelt, gab Anlass dazu, die Effekte der Varianten auf die CsA-Affinität und die enzymatische Aktivität zu vergleichen. Alle untersuchten Varianten zeigten einen stärkeren Einfluss auf die Aktivität von hCyp18 als auf die Affinität zu CsA. Dabei reduzierten die

Austausche R55A, Q63N und F113A die PPIase-Aktivität um fast vier Größenordnungen, während die Affinität zu CsA nur um eine Größenordnung verringert wurde. Die Reste R55 und Q63 bilden vergleichbare Wasserstoffbrückenbindungen sowohl zu CsA als auch zum Substrat aus. Beide Reste bilden zusätzlich eine Wasserstoffbrückenbindung untereinander aus, sodass der Austausch eines Restes sehr wahrscheinlich die Interaktionen des anderen beeinflusst. Die beobachteten Unterschiede in Inhibitoraffinität und Enzymaktivität lassen sich somit nicht durch diese Interaktionen allein erklären. Sie zeigen, dass diese Seitenketten auf eine spezifische Weise in den Katalysemechanismus des hCyp18 eingreifen müssen, die sich nicht in der hCyp18/CsA-Interaktion widerspiegelt. Dabei scheinen Katalysemechanismen unrealistisch die ausschließlich die Guanidiniumgruppe des Restes R55 in den Mittelpunkt stellen, da der Austausch des Restes Q63 die Enzymaktivität gleichermaßen reduziert.

Die unterschiedlichen Effekte des Austausches F113A auf Affinität und Aktivität lassen sich durch die Störung der unpolaren Prolyl-Bindetasche erklären. Die Wechselwirkungen zwischen der aromatischen Seitenkette und dem Prolyl-Rest des Substrates bzw. der Isopropyl-Seitenkette des MeVal11-Restes des CsA werden durch den Austausch F113A unterschiedlich beeinflusst. Ausgehend von der hCyp18-Struktur kann man abschätzen, dass der Prolyl-Ring des Substrates für direkte Wechselwirkungen zu weit von der Methylgruppe des Alanyl-Restes der Variante entfernt ist (4,7 Å). Das Kohlenstoffatom einer der γ -Methylgruppen des Methylvalins 11 des CsA befindet sich im Gegensatz dazu in direkter Nachbarschaft zum Alanyl-Rest dieser Variante (3,88 Å). Des Weiteren scheint die voluminöse Seitenkette des F113 notwendig zu sein, um den benachbarten Rest L122 in der korrekten Orientierung zum Prolyl-Rest des Substrates zu positionieren.

Die Austausche H126F, H126A und Q63E resultierten in vergleichbaren relativen Änderungen der PPIase-Aktivität und der CsA-Affinität. Die hydrophoben Eigenschaften der aromatischen Seitenkette des H126 sind sowohl für die CsA-Interaktion als auch für die Wechselwirkung mit dem Substrat von Bedeutung. Die 10fach stärkere Abschwächung der Affinität zu CsA und der PPIase-Aktivität, welche für die H126A gegenüber der H126F-Variante beobachtet wurde, bestätigt diese Interpretation. Wie im Abschnitt 5.1 diskutiert wurde, ist diese Seitenkette für die pH-Wert-Abhängigkeit der CsA-Bindung verantwortlich. Damit wird klar, dass die hydrophoben Eigenschaften dieser Seitenkette nicht ausreichen, um das gesamte Spektrum an Wechselwirkungen zwischen H126 und einem Liganden zu erklären, wie es von Ke *et al.* vorgeschlagen wurde [40]. Im Gegensatz dazu konnte durch die Untersuchung der pH-Wert-Abhängigkeit der PPIase-Aktivität keine Veränderung des pH-Profiles durch diesen Austausch festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Das lässt darauf schließen, dass die Funktion der H126-

Imidazolgruppe als Wasserstoffbrückendonator und -akzeptor für den Katalysemechanismus von hCyp18 keine wesentliche Bedeutung hat.

Die drastischen Effekte, die durch die Variante Q63E sowohl auf die CsA-Affinität als auch auf die PPIase-Aktivität vermittelt werden, sind auf die zusätzliche negative Ladung im aktiven Zentrum des hCyp18 zurückzuführen. Die im Vergleich zu den anderen Varianten ungewöhnlich große Änderung der Bindungsenthalpie und -entropie ($\Delta\Delta H_{\text{ITC WT-hCyp18Q63E}} = -11 \text{ kcal mol}^{-1}$, $\Delta(T\Delta S)_{\text{ITC WT-hCyp18 Q63E}} = -8,4 \text{ kcal mol}^{-1}$) lässt auf schwerwiegende Änderungen der Interaktionen zwischen Ligand und Protein schließen. Diese können z.B. durch konformationelle Änderungen der an der Bindung beteiligten Seitenketten und/oder der Lösungsmittelstruktur im aktiven Zentrum von hCyp18 hervorgerufen werden. Eine Interpretation dieser Effekte aufgrund der bekannten hCyp18-Strukturen ist deshalb nicht möglich.

5.3.2 Viskositätseffekte auf die PPIase-Aktivität

Viskositätsabhängige Enzymaktivitäten werden immer dann beobachtet, wenn die Reaktion diffusionskontrolliert abläuft oder Konformationsänderungen im Enzym während der Katalyse stattfinden [184]. Eine enzymatische Reaktion wird als diffusionskontrolliert bezeichnet, wenn entweder die Enzym/Substratassoziation oder die Enzym/Produktfreisetzung langsamer ablaufen als alle vom Enzym katalysierten Schritte der Substrat/Produktumwandlung. Die Geschwindigkeit, mit welcher Substrat und Enzym assoziieren können, wurde durch Alberty und Hammes mit Werten zwischen 10^8 und $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ berechnet [194]. Die meisten experimentell ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für solche Reaktionen sind zwei Größenordnungen kleiner und liegen im Bereich von 10^6 bis $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [184]. Sie können jedoch, falls die sterischen und geometrischen Anforderungen der Wechselwirkung hoch sind, wie es z.B. für Protein/Protein-Interaktionen beschrieben wurde, auch nur $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ betragen [184]. Die $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Werte von Enzymen gelten als unteres Limit für die Geschwindigkeit der Substrat/Enzymassoziation. Effiziente Enzyme mit $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Werten größer $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, oder für Enzyme, welche Proteinsubstrate umsetzen, mit größer $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, können somit durch Diffusionsprozesse in ihrer Aktivität limitiert sein. Die im Abschnitt 4.2.1 untersuchten Enzyme hCyp18, hPin1, hFKBP12 und *E. coli* Par10 weisen Enzymaktivitäten dieser Größenordnung auf, wenn als Substrate Oligopeptide verwendet werden.

Die Geschwindigkeit der Dissoziation des Enzym/Produktkomplexes ist üblicherweise deutlich kleiner als das Diffusionslimit. Diese Beobachtung resultiert aus dem Fakt, dass für die Dissoziation im Prinzip die Kräfte überwunden werden müssen, welche zur Bildung des Komplexes führten. Der Fall, dass die Produktfreisetzung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Katalyse ist, tritt daher meist dann auf, wenn dieser Schritt mit konformationellen Änderungen im Enzym einhergeht. Dass eine strukturelle Änderung im Enzym der

geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion ist, wurde z.B. für Triosephosphatisomerase nachgewiesen [195]. Diese Effekte wirken sich nur bei Substratsättigung (k_{kat}) auf des Enzym aus [184].

Da die Geschwindigkeit, mit der Moleküle in Lösung diffundieren, invers proportional zur Viskosität der Lösung ist, kann mit Hilfe von viskositätsabhängigen Aktivitätsmessungen auf eine eventuelle Diffusionskontrolle der Katalyse der untersuchten Enzyme geschlossen werden.

5.3.2.1 Viskositätseffekte auf die Aktivität von hCyp18

Die enzymatische Aktivität von hCyp18 sinkt linear mit zunehmender Viskosität des Messansatzes, wenn Rohrzucker oder Glycerol als Viskosogene verwendet wurden. PVP360 beeinflusst die Enzymaktivität hingegen nicht. Dabei spielte es keine Rolle, ob zur Untersuchung der PPIase-Aktivität das Substrat Suc-AAPF-pNA ($k_{\text{kat}}/K_M=1,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), Suc-AFPF-pNA ($k_{\text{kat}}/K_M=6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) oder Suc-AAPF-DFA ($k_{\text{kat}}/K_M=6,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) verwendet wurden. Trotz der unterschiedlichen k_{kat}/K_M -Werte des hCyp18 für diese Substrate wurde die gleiche Viskositätsabhängigkeit bestimmt. Aus den Ergebnissen konnte geschlussfolgert werden, dass die Katalyse dieser Reaktionen zu rund 90% von der Viskosität des Lösungsmittels abhing. Die Katalyse der Umsetzung des Substrats Suc-AWPF-pNA ($k_{\text{kat}}/K_M=2,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) hing noch zu 50% von der Viskosität ab. Wie ist es möglich, dass die hCyp18-Katalyse in vergleichbarem Maße für Reaktionen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten diffusionskontrolliert abläuft? Die Häufigkeit, mit der Substrat und Enzym in der Lösung aufeinander treffen, um einen Enzym/Substratkomplex zu bilden, hängt neben der Viskosität der Lösung, sterischen Faktoren wie Substrat- und Enzymform und Größe auch von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat ab [184]. Die hier untersuchten Substrate unterscheiden sich sowohl in ihrem Molekulargewicht als auch in ihren hydrophoben/polaren Eigenschaften voneinander. So ist das Substrat Suc-AFPF-pNA ($\log R'=1$)^a deutlich hydrophober als Suc-AAPF-pNA ($\log R'=0,4$)^a. Ein direkter Vergleich der viskositätsbedingten Aktivitätsveränderungen beider Substrate ist nicht möglich, weil die Häufigkeit der Bildung der jeweiligen Enzym/Substratkomplexe nicht identisch ist. Die Hydrophobizität von Suc-AFPF-pNA ($\log R'=1$)^a und Suc-AWPF-pNA ($\log R'=1,1$)^a unterscheidet sich dagegen kaum. Da das Substrat Suc-AFPF-pNA von hCyp18 rund dreimal schneller umgesetzt wird als Suc-AWPF-pNA, resultiert daraus eine geringere Viskositätsabhängigkeit der Katalyse von Suc-AWPF-pNA.

^a Als Maß für die Hydrophobizität wurde R' , der HPLC-Kapazitätsfaktor benutzt, welcher für die untersuchten Peptide aus Referenz 33. Kramer, M.L.G. Fischer (1997). "Fcbp-Like Catalysis of Peptidyl-Prohyl Bond Isomerization by Micelles and Membranes." *Biopolymers* 42(1): 49-60 entnommen wurde.

Eine andere Erklärung für die beobachteten Viskositätseffekte wäre, dass hCyp18 während der Katalyse konformationelle Änderungen durchläuft, die durch die erhöhte Viskosität der Lösung behindert werden. Grund zu dieser Annahme gaben die Untersuchungen von Harrison und Stein, die zeigten, dass hCyp18 wahrscheinlich in zwei reversibel ineinander umwandelbaren Konformationen vorliegt [50]. Da sich solche strukturellen Änderungen nur bei Substratsättigung bemerkbar machen, wurde der Einfluss der Viskosität auf die Michaelis-Menten-Parameter des hCyp18 untersucht. Das Substrat Suc-AFPF-pNA (*cis*-Isomer) weist mit rund 80 μM einen um fast eine Größenordnung kleineren K_M -Wert für hCyp18 auf als andere Oligopeptide und eignet sich deshalb am besten zur Ermittlung der Michaelis-Menten-Parameter dieses Enzyms [107]. Die Bestimmung dieser Parameter zeigte, dass mit zunehmender Viskosität der Lösung der K_M -Wert des hCyp18 steigt, k_{kat} jedoch unverändert bleibt. Unter Substratsättigung, wenn die Produktfreisetzung die Katalyse limitiert, können keine Viskositätseffekte nachgewiesen werden. Aus diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass der Katalysemechanismus des hCyp18 nicht wie von Harrison und Stein vermutet wurde, von Konformationsänderungen begleitet wird. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Struktur des hCyp18 im nicht komplexierten Zustand, im Komplex mit Inhibitoren und im Komplex mit Substraten nur geringe Unterschiede aufweist [37, 38, 40, 41, 52, 154]. Im Einklang mit dieser Interpretation ist das Verhalten der Variante hCyp18 H126F und hCyp18 H126A, deren Aktivität keine Viskositätsabhängigkeit und damit auch keine Diffusionskontrolle der Katalyse mehr zeigte. Wenn die viskositätsbedingte Verringerung der PPIase-Aktivität durch strukturelle Änderungen im Enzym hervorgerufen wird, sollten diese Effekte auch bei der hCyp18 H126F-Variante zu beobachten sein.

Einige der Varianten des hCyp18 mit stark reduzierten enzymatischen Aktivitäten (hCyp18 R55A, hCyp18 Q63N, hCyp18 Q63E und hCyp18 F113A) zeigten noch immer eine deutliche Viskositätsabhängigkeit. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel nachgewiesen wurde, waren die verwendeten Enzympräparationen in diesen Fällen mit *E. coli* CypA verunreinigt. *E. coli* CypA besitzt gegenüber Oligopeptiden eine mit hCyp18 vergleichbare PPIase-Aktivität ($5,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [45], welche ebenfalls durch die erhöhte Viskosität des Messansatzes verringert wurde. Die beobachteten Effekte sind also nicht auf eine Diffusionskontrolle der untersuchten Varianten zurückzuführen.

Die hier beobachtete Diffusionskontrolle von hCyp18 wirkt sich auf alle bis jetzt gewonnenen kinetischen Daten für dieses Enzym und deren Interpretation aus. So wurde z.B. schon in den ersten Jahren der Untersuchung von PPIasen festgestellt, dass hCyp18 im Gegensatz zu hFKBP12 Oligopeptid-Substrate mit unterschiedlichen Aminosäureresten in Position P1 annähernd gleich gut katalysierte. Nach den hier dargelegten Ergebnissen dürfen daraus jedoch

keine weiteren Schlüsse auf den Katalysemechanismus gezogen werden, weil dies auch nur ein Ausdruck für die hier beschriebene Diffusionskontrolle der Reaktion sein könnte. Gegen eine solche Interpretation spricht die Beobachtung, dass, obwohl verschiedene Substrate mit ähnlichen $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Werten umgesetzt werden, sich die Werte für k_{kat} bei Substratsättigung deutlich unterscheiden können, wohingegen die Änderung der Viskosität keinen Einfluss auf k_{kat} hat. Die relativ schwierige und mit großen Fehlern behaftete Ermittlung der isolierten Michaelis-Menten-Parameter für peptidische Substrate macht eine abschließende Interpretation dieser Beobachtungen hier unmöglich.

Im gleichen Maße müssen die thermodynamischen Parameter des Übergangszustandes der hCyp18-katalysierten Reaktion, welche durch die Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Aktivität gewonnen wurden, neu interpretiert werden, da sich im untersuchten Temperaturbereich von 0 bis 30°C die Viskosität von Wasser halbiert. Nimmt man an, dass die Aktivität des hCyp18 bei 10°C zu 90% diffusionskontrolliert abläuft, resultiert aus der Zunahme der Viskosität bei niedrigeren Temperaturen und deren Abnahme bei höheren Temperaturen, dass sich die zur Berechnung der Werte ΔH^\ddagger verwendeten Anstiege der Eyring-Auftragungen verringern. Es bleibt auch zu hinterfragen, welche Aussagekraft die gemessenen kinetischen Isotopeneffekte haben, wenn der geschwindigkeitslimitierende Schritt der Katalyse die Enzym/Substratassoziation ist. Ebenso kann die pH-Wert-Abhängigkeit des hCyp18 durch Diffusionsprozesse beeinflusst werden. Ein solcher Effekt wurde für die pH-Wert-Abhängigkeit des $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Wertes für Chymotrypsin beschrieben [196].

Die hier für hCyp18 angestellten Überlegungen haben vermutlich für viele Vertreter der PPIase-Familie der Cyclophiline Bedeutung, da, wie bereits in der Einleitung beschrieben, fast alle bis jetzt untersuchten Cyclophiline mit hCyp18 vergleichbare $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Werte aufweisen.

5.3.2.2 Viskositätseffekte auf die Aktivität von hPin1 und *E. coli* Par10

Beide Enzyme gehören der gleichen PPIase-Familie an. Dabei setzt hPin1 bevorzugt Substrate mit einer phosphorylierten Seitenkette in Position P1 um, andererseits weist *E. coli* Par10 keine solche Substratspezifität auf [29, 96]. hPin1 katalysiert die *cis/trans*-Isomerisierung von Oligopeptiden mit $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Werten von bis zu $2,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, hingegen erreicht *E. coli* Par10 $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Werte von $8,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Trotz dieser Unterschiede werden die Enzymaktivitäten beider Enzyme durch viskose Zusätze verringert. Die unterschiedliche Proteasesensitivität von hPin1 in Lösungen mit Glycerol und Rohrzucker resultiert in unterschiedlichen Viskositätsabhängigkeiten der Aktivität für beide Viskosogene. hPin1 eignet sich deshalb nur bedingt, um quantitative Aussagen über eine Diffusionskontrolle der Katalyse durch viskositätsabhängige Messungen zu erlangen. Dies wird deutlich, wenn man die hPin1-katalysierte Umsetzung des Substrates

Ac-AASPR-pNA betrachtet. Aus der Viskositätsabhängigkeit der Enzymaktivität folgt, dass die Katalyse noch zu rund 30% diffusionskontrolliert verläuft. Ausgehend von dem niedrigen gemessenen $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Wert für dieses Substrat ($2,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) scheint eine so starke Diffusionskontrolle nicht wahrscheinlich. Unter der Annahme, dass die mit diesem Substrat beobachteten Viskositätsabhängigkeiten der PPIase-Aktivität zumindest zum Teil der Sensibilität von hPin1 gegenüber der im Messansatz vorhandenen Protease geschuldet ist, kann die Diffusionskontrolle der Katalyse bei der Umsetzung von Ac-AA(p)SR-pNA durch hPin1 mit Werten von größer 70% angegeben werden. Im Gegensatz dazu zeigt *E. coli* Par10 keine solche Proteaseempfindlichkeit. Die Katalyse des Substrates Suc-AFPF-pNA verläuft zu 90% diffusionskontrolliert, hingegen wurde keine Viskositätsabhängigkeit der Enzymaktivität mit dem Substrat Suc-AAPF-DFA gemessen.

Als Beispiel dafür, dass die verwendeten Zusätze unerwartete Effekte auf die Aktivitäten von Enzymen haben können, sei die Variante *E. coli* Par10 C40A ($k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}=2,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) aufgeführt. Dieser Austausch führt zu einer proteaselabilen Variante, welche durch den Zusatz von Glycerol stabilisiert wird. Dadurch ergibt sich eine Zunahme der Aktivität mit steigenden Glycerolkonzentrationen. Rohrzucker kann die Variante nicht im gleichen Maße stabilisieren, was zu einer Verringerung der Aktivitätszunahme führt. Die Variante *E. coli* Par10 C40D ($k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}=9,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ist hingegen nicht destabilisiert und weist keine Viskositätsabhängigkeit mehr auf, unabhängig davon, ob Glycerol oder Rohrzucker zum Messansatz zugesetzt werden. Vergleicht man die Strukturen von *E. coli* Par10 und hPin1, so zeigt sich, dass der Rest C40 des *E. coli* Par10 mit dem Cysteinyln-Rest 113 des hPin1 korrespondiert [197]. Im einleitenden Kapitel wurden bereits die Arbeiten vorgestellt, in denen vermutet wurde, dass der Rest C113 die zentrale Rolle in einem kovalenten PPIase-Mechanismus der hPin1-Katalyse spielt. Die hier beobachtete Restaktivität der Variante *E. coli* Par10 C40D von 2% stimmt jedoch mit jenen Publikationen überein, die einen solchen Mechanismus in Frage stellen [94, 95].

Strukturelle Änderungen können als Ursache für die erhaltene Viskositätsabhängigkeit des *E. coli* Par10 ausgeschlossen werden, da für ein Enzym mit einer Größe von nur 10 kDa angenommen werden kann, dass Bewegungen von Domänen- oder Schleifenregionen im Enzym nicht stattfinden. Für hPin1 wurde zwar die Bewegung einer Schleifenregion bei Substratfreisetzung beschrieben, jedoch konnte dieser Befund weder durch die hier dargelegten Untersuchungen noch durch NMR-spektroskopische Analysen bestätigt werden (siehe Abschnitt 4.1.2 und 5.2).

Die Diffusionskontrolle der hPin1- und *E. coli* Par10-katalysierten *cis/trans*-Isomerisierung von Oligopeptiden zeigt, dass der enzymatische Mechanismus dieser Vertreter der PPIase-Familie der Parvuline ähnlich effizient ablaufen muss wie der des hCyp18. Interessanterweise zeigt

E. coli Par10 ähnlich wie hCyp18 nur eine geringe Spezifität gegenüber Oligopeptid-Substraten mit unterschiedlichen Aminosäureresten in der P1-Position [96]. Dies kann ähnlich wie im Falle des hCyp18 ein Ausdruck für die Diffusionskontrolle der von diesen Enzymen katalysierten Reaktion sein. Der Umkehrschluss ist jedoch nicht zulässig, was bedeutet, dass die Aktivität von Enzyme, welche eine hohe Substratspezifität aufweisen, wie z.B. hPin1, trotzdem durch Diffusionsprozesse limitiert sein kann.

5.3.2.3 Viskositätseffekte auf die Aktivität von hFKBP12

hFKBP12 weist unter den hier untersuchten PPIasen die niedrigste katalytische Effizienz auf. Für das Substrat Suc-ALPF-pNA wurde ein $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von $1,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Die Umsetzung dieses Substrates wird nicht durch steigende Konzentrationen Rohrzucker verlangsamt. Der gleiche Effekt ist für die wesentlich schlechteren Substrate Suc-AAPF-pNA und Suc-AAPF-DFA ($k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}=1,5 \cdot 10^5$ und $8,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) zu beobachten. Ebenfalls keine Viskositätsabhängigkeit der Aktivität wurde gegenüber steigenden Konzentrationen Sorbitol beobachtet (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu inhibierten steigende Glycerolkonzentrationen die PPIase-Aktivität gegenüber diesen Substraten. Die daraus resultierenden Anstiege der linearen Regressionsgeraden der Auftragung der relativen $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Werte gegen die relative Viskosität waren in beiden Fällen deutlich größer als 1, überstiegen also die theoretisch mögliche vollständige Diffusionskontrolle der Katalyse. Der unterschiedliche Einfluss der viskosen Zusätze kann nur mit einer spezifischen Wechselwirkung von hFKBP12 mit Glycerol erklärt werden. Für das aktive Zentrum von hFKBP12 ist bekannt, dass es in der Lage ist, mit verschiedenen niedermolekularen Substanzen schwache nichtkovalente Komplexe zu bilden [198]. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass Glycerol als kompetitiver Inhibitor der hFKBP12-Aktivität wirkt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Katalyse der PPIasen hCyp18, hPin1 und *E. coli* Par10 gegenüber Oligopeptiden als Substraten diffusionskontrolliert verläuft, während die Aktivität von FKBP12 nicht durch diesen physikalischen Prozess limitiert ist.

5.3.3 kinetische Lösungsmittelisotopeneffekte auf PPIasen

Die Bestimmung und Interpretation der Geschwindigkeitsunterschiede von chemischen Reaktionen in H_2O und D_2O ist eine etablierte Methode, um Informationen über den Reaktionsmechanismus und die Struktur des bei der Umwandlung der Substrate durchlaufenen Übergangszustandes zu erhalten. Ein Isotopeneffekt ist immer dann zu erwarten, wenn sich die freie Enthalpie der Bildung des Übergangszustandes der Reaktion in H_2O von der in D_2O unterscheidet.

Der beobachtete kinetische Isotopeneffekt ist das Produkt aus drei Faktoren, des primären und sekundären Isotopeneffektes und des so genannten Medium-Effektes. Verläuft die Reaktion in schwerem Wasser langsamer als in H_2O , spricht man von einem normalen kinetischen Isotopeneffekt, ist das Gegenteil der Fall, von einem inversen. Der Anteil des Medium-Effektes am gesamten Isotopeneffekt ist klein und resultiert z.B. aus unterschiedlichen Interaktionen zwischen dem Lösungsmittel (H_2O oder D_2O) mit dem Substrat, oder von strukturellen Einflüssen des D_2O auf das untersuchte Enzym. Die Solvatationseffekte resultieren in KSIE von der Größenordnung von 1,2 bis 1,3 [166]. Es wurden jedoch auch inverse KSIE mit Medium-Effekten erklärt [199]. Diese Medium-Effekte sind eine Folge der unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften von H_2O und D_2O . So wird vermutet, dass in schwerem Wasser mehr intermolekulare Wasserstoffbrücken ausgebildet werden können, was zu einer stärker geordneten Wasserstruktur führt. Diese Unterschiede führen z.B. dazu, dass hydrophobe Interaktionen in D_2O bevorzugt werden, Reaktionen, in denen Ionen „erzeugt“ werden (im Übergangszustand oder in den Produkten) jedoch langsamer ablaufen. Primäre kinetische Wasserstoffisotopeneffekte werden beobachtet, wenn eine Bindung zu einem Protium/Deuterium-Atom während der Reaktion - genauer: während der Bildung des Übergangszustandes - gebrochen wird oder entsteht, das entsprechende Protium/Deuterium-Atom also während der Bildung des Übergangszustandes in Bewegung ist. Sekundäre Effekte werden beobachtet, wenn Protium/Deuterium-Atome zwar Veränderungen in ihrer Bindung erfahren, sich jedoch während der Bildung des Übergangszustandes nicht bewegen.

5.3.3.1 kinetische Lösungsmittelisotopeneffekte auf die Aktivität von hCyp18

Für die hCyp18-katalysierte Isomerisierung des Substrates Suc-AAPF-pNA wurden zwei KSIE für $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ berichtet, beide sind nahe 1 [50, 51]. Diese Beobachtung ist verwunderlich, wenn man beachtet, das D_2O unter den verwendeten Bedingungen rund 28% viskoser ist als H_2O [121, 122]. Die erhöhte Viskosität sollte für diese diffusionskontrollierten Reaktionen zu einem normalen KSIE von rund 1,28 führen. Um diese Diskrepanz zu erklären, wurde der KSIE von hCyp18 erneut untersucht. Um eventuelle artifizielle Einflüsse auf die Ergebnisse ausschließen zu können, wurden verschiedene Substrate, Enzym-Varianten und PPIase-Aktivitätstests verwendet. Der Einfluss von D_2O auf die pK_{s} -Werte von protonierbaren Aminosäureseitenketten hat für die beobachteten Isotopeneffekte des hCyp18 keine Bedeutung, da die Aktivität des Enzym im untersuchten Bereich pH-Wert-unabhängig ist [16, 26].

Die Bestimmung des KSIE für die Substrate Suc-AFPF-pNA und Suc-AAPF-DFA im proteasegekoppelten PPIase-Aktivitätstest ergab annähernd gleiche Werte von rund 0,83. Wie im vorigen Kapitel beschrieben wurde, verläuft die hCyp18-katalysierte Umsetzung dieser Substrate

zu 90% diffusionskontrolliert. Berücksichtigt man die Zunahme der Viskosität in D₂O bei der Berechnung des Isotopeneffektes, erhält man einen Wert von 0,65. Der Berechnung liegt zugrunde, dass die Reaktion in H₂O langsamer abläuft, wenn die Viskosität des Messansatzes auf die von D₂O bei 10°C eingestellt wird. Die Untersuchung der Varianten hCyp18 H126F und hCyp18 H126A bestätigten diesen Wert. Aufgrund der reduzierten Aktivität beider Varianten konnte keine Diffusionskontrolle der Katalyse mehr beobachtet werden, folgerichtig liegt der KSIE beider Enzyme bei rund 0,68. Der bestimmte inverse KSIE ist dabei nicht auf die unterschiedliche Stabilität der untersuchten Enzyme in H₂O und D₂O gegenüber der in Messansatz vorhandenen Hilfsprotease zurückzuführen. Dies konnte durch den Einsatz des proteasefreien PPIase-Aktivitätstest ausgeschlossen werden.

Zur weiteren Bestätigung des inversen KSIE wurde die Aktivität des hCyp18 im RNase T1 (S54G/P55N)-Rückfaltungstest bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Faltung der RNase T1-Variante sowohl in H₂O als auch in D₂O von hCyp18 gleichermaßen beschleunigt wurde, was in einem KSIE von rund 1 resultierte. Dieser Effekt ist auf die für diesen Test notwendige hohe Ionenstärke des Messansatzes zurückzuführen. Führt man den proteasefreien PPIase-Aktivitätstest in Anwesenheit von mehr als 100 mM NaCl durch, kann ebenfalls ein KSIE von rund 1 gemessen werden. Eine durch die Erhöhung der Ionenstärke des Messansatzes vermittelte Verschiebung des KSIE zu stärker „normalen“ Werten, wurde bereits für andere Enzyme beobachtet [200-202]. Dieser Effekt kann für die Unterschiede zwischen den hier beobachteten KSIE und den von Kofron *et al.* bestimmten Werten verantwortlich sein, da in diesem Fall die Ionenstärke des Messansatzes deutlich höher war als bei den hier beschriebenen Untersuchungen [51]. Hier sei angemerkt, dass die Erhöhung der Ionenstärke (2 M NaCl) zu einem geringen Aktivitätsverlust von 28% bei hCyp18 führt, welcher auf die erhöhte Viskosität der Lösung zurückzuführen ist.

Wodurch wird ein inverser KSIE in der Größenordnung von 0,6 bis 0,8 hervorgerufen? Inverse KSIE für enzymatisch katalysierte Reaktionen werden im Allgemeinen beobachtet, wenn durch Metall-Ionen ionisierte Wassermoleküle sowie Sulfhydrylgruppen an der Bildung des Übergangszustandes der Reaktion beteiligt sind [166]. Zusätzlich können inverse KSIE auftreten, wenn sich die freie Enthalpie der Reaktanten in H₂O und D₂O unterscheidet. Eine weitere Möglichkeit ist die Beteiligung von stark verkürzten Wasserstoffbrückenbindungen am Katalysemechanismus. Wenn solche sogenannten LBHB (engl. „low barrier hydrogen bond“) an der Bildung des Übergangszustands beteiligt sind, können ebenfalls inverse KSIE auftreten [203]. Für die hCyp18-katalysierte Reaktion kann die Beteiligung von Sulfhydrylgruppen am Katalysemechanismus ausgeschlossen werden [49]. Auch ist eine Beteiligung von Metallionen unwahrscheinlich, da in keiner der publizierten Röntgenkristallstrukturen ein Metall-Ion

beobachtet wurde. Um zu untersuchen, ob der beobachtete inverse KSIE durch Medium-Effekte hervorgerufen wird, wurde die PPIase-Aktivität von hCyp18 in unterschiedlichen Verhältnissen von H₂O zu D₂O bestimmt. Die Auftragung der relativen Aktivitäten gegen den Anteil D₂O im Messansatz ergibt stark gekrümmte Kurven, wenn Medium-Effekte zum Gesamt-KSIE beitragen [166]. Dies konnte für hCyp18 beobachtet werden. Die nichtlineare Abhängigkeit der Aktivität vom D₂O-Gehalt des Messansatzes kann jedoch zum Teil auf die Viskositätsabhängigkeit der PPIase-Aktivität des hCyp18 zurückgeführt werden. Zur quantitativen Beschreibung des KSIE wurde ein einfaches System von sogenannten Fraktionierungsfaktoren (engl. *fractionation factors*) entwickelt [166]. Diese Faktoren entsprechen den Gleichgewichtskonstanten für Protium bzw. Deuterium zwischen einem gelösten Stoff (z.B. den Reaktanten oder dem Übergangszustand) und dem Lösungsmittel. Reichert sich z.B. in einem Gemisch aus H₂O und D₂O Deuterium an einer Position im gelösten Stoff gegenüber Protium an, besitzt diese Position einen Fraktionierungsfaktor von >1. Der beobachtete KSIE errechnet sich aus dem Quotienten der Produkte der Fraktionierungsfaktoren im Grund- und Übergangszustand.

Um einen inversen KSIE zu erklären, muss das Produkt der Fraktionierungsfaktoren des Grundzustandes kleiner sein als das des Übergangszustandes [166]. Eine genauere Interpretation des KSIE ermöglichen die Protonen-Inventur-Experimente. Unter Zuhilfenahme der Gross-Butler-Gleichung, kann die Abhängigkeit einer Geschwindigkeitskonstante (k_n) vom D₂O-Gehalt (n) des Lösungsmittels mit den Fraktionierungsfaktoren des Grund- (ϕ^R) und des Übergangszustandes (ϕ^T) der Reaktion in Beziehung gesetzt werden (Gleichung 23). Die Geschwindigkeitskonstante k_0 wird in H₂O ermittelt.

$$\text{Gleichung 23} \quad k_n = k_0 \frac{\prod_i^v (1 - n + n\phi_i^T)}{\prod_i^v (1 - n + n\phi_i^R)}$$

Unterscheiden sich die Fraktionierungsfaktoren in Grund- und Übergangszustand nicht voneinander, kürzen sich die entsprechenden Glieder aus Gleichung 23. Dies kann für die meisten Wasserstoffatome von Enzym und Substrat angenommen werden. Die Anpassung der Parameter ϕ^R , ϕ^T der Gleichung 23 an die korrigierten Messdaten des Protonen-Inventur-Experimentes unter der Annahme, dass sich ein Fraktionierungsfaktor in Grund- und Übergangszustand unterscheidet, ergab für $\phi^T = 0,92$ und für $\phi^R = 0,61$ (Abbildung 28).

Wie bereits dargestellt, können Sulfhydrylgruppen, sowie durch Metall-Ionen ionisierte Wassermoleküle nicht der Grund für den niedrigen Fraktionierungsfaktor im Grundzustand sein. Ob dies die einzigen Möglichkeiten für Fraktionierungsfaktoren <1 in Enzymen sind, ist jedoch

anzuzweifeln. Bei der Untersuchung von Fraktionierungsfaktoren der Peptidrückgrat-Amidprotonen eines Proteins konnte festgestellt werden, dass diese Werte im Bereich von 0,3 bis 1,5 erreichen können [204]. Da im Allgemeinen angenommen wird, dass starke Wasserstoffbrückenbindungen mit niedrigen, und schwache Wasserstoffbrückenbindungen mit hohen Fraktionierungsfaktoren assoziiert sind [204], kommt die Erhöhung des Fraktionierungsfaktors im Übergangszustand einer Abschwächung einer starken Wasserstoffbrückenbindung gleich. Damit würden alle vorgeschlagenen Enzymmechanismen, die nach einer stärkeren Wasserstoffbrückenbindung im Übergangszustand verlangen, ausscheiden. Diese Argumentation schließt die eventuelle Beteiligung von LBHB am Mechanismus ein. Eine direkte Beteiligung einer solchen LBHB scheint jedoch unwahrscheinlich, da solche stark verkürzten Wasserstoffbrückenbindungen ansonsten in den vorhandenen Kristallstrukturen zu finden sein sollten.

Medium-Effekte können aufgrund der Krümmung der Protonen-Inventur-Experimente nicht ausgeschlossen werden. In Übereinstimmung damit ist die Beobachtung, dass die CsA-Affinität zu hCyp18 in D₂O erhöht ist. D₂O könnte auf die Substratassoziation den gleichen Effekt haben. Da bei diffusionskontrollierten Enzymen die unproduktive Substratfreisetzung praktisch nicht stattfindet, hätte eine Beschleunigung der Assoziationsreaktion in D₂O einen beschleunigenden Einfluss auf die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung ($k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$). Solch eine Beschleunigung wäre vorstellbar, wenn die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften von H₂O und D₂O, wie z.B. die geringere Dielektrizitätskonstante von schwerem Wasser, die Bildung des Enzym/Substrat-Komplexes in D₂O begünstigen.

Ist es möglich, dass ein Wassermolekül im aktiven Zentrum des hCyp18 für einen solchen inversen KSIE verantwortlich ist? Können die Aminosäureseitenketten des aktiven Zentrums von hCyp18 ein Wassermolekül im Grundzustand soweit polarisieren, dass der beobachtete Fraktionierungsfaktor zu erklären wäre? Ein struktureller Vergleich des aktiven Zentrums von hCyp18 mit dem aktiven Zentrum des Komplexes aus r21ras (eine GTPase), dem GTP-analogen GDP-AlF₃ und p120GAP (ein GTPase-aktivierendes Protein) hilft diese Frage zu beantworten. Obwohl beide Enzymekomplexe völlig unterschiedliche Reaktionen katalysieren, können erstaunliche strukturelle Gemeinsamkeiten beobachtet werden. Genauso wie es in dieser Arbeit für hCyp18 nachgewiesen wurde, ist für die Aktivität des r21ras ein Glutaminyl-Rest (Q61) essentiell [205, 206]. Das zur Hydrolyse des γ -Phosphatrestes von GTP essentielle Wassermolekül (W230) bildet mit der Seitenkette des Restes Q63 eine Wasserstoffbrückenbindung aus [207]. Für eine hohe Aktivität der GTPase wird zusätzlich ein Arginyl-Rest (R789) des GTPase-aktivierenden Proteins benötigt. Dieser Arginyl-Rest befindet sich ebenfalls in Wasserstoffbrückenentfernung zu Q61 [207]. Computersimulationen ergaben,

dass das Zusammenspiel der Interaktion von R789, Q61 und dem γ -Phosphatrest des gebundenen GTP ausreicht, um das erwähnte Wassermolekül W230 soweit zu polarisieren, dass es als nukleophil die Hydrolyse des γ -Phosphatrest bewerkstelligt [207].

In Abbildung 26 ist ein Vergleich eines Teils des aktiven Zentrums des r21ras/GDP-AlF₃/p120GAP-Komplexes (Q61 und R789) mit einem Ausschnitt des aktiven Zentrums (Q63 und R55) des hCyp18 dargestellt. Überlagert man die entsprechenden Peptidrückgratome der Arginyl- und Glutaminyl-Reste sowie die Prolyl-Bindung des hCyp18-Substrates (hier ein Teil des HIV-1 Hüllproteins) mit dem GTP-analogen GDP-AlF₃ zeigt sich, dass in unmittelbarer Nähe des oben genannten „nukleophilen“ Wassermoleküls ein Wassermolekül des hCyp18 lokalisiert ist. Eine detaillierte Untersuchung der vorhandenen hCyp18-Röntgenkristallstrukturen zeigte, dass dieses Wassermolekül in hCyp18-Komplexen mit verschiedenen Substraten sowie CsA konserviert ist, nicht jedoch in den Strukturen, in denen das Dipeptid Ala-Pro, das Tetrapeptid Ala-DAla-Pro-Phe-pNA oder das Thioxopeptid Ala-Ala- Ψ [CS-N]-Pro-Phe-pNA im Enzym gebunden sind. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, stellen die letzten drei genannten Peptide keine Substrate dar.

Diese Beobachtungen stimmen mit der Vermutung überein, dass ein Wassermolekül tatsächlich an der Stabilisierung des Übergangszustandes beteiligt ist. Durch die partiell negative Ladung dieses Wassermoleküls könnte die positive Partialladung des Carbonylkohlenstoff der Prolyl-Bindung geschwächt werden und dadurch deren Resonanzstabilisierung teilweise aufgehoben werden. Es muss beachtet werden, dass in den Reaktionsmechanismus der GTP-Hydrolyse auch der γ -Phosphatrest des GTP eingreift; eine solche funktionelle Gruppe ist im hCyp18 nicht zu finden. Im Falle der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung müssen während der Katalyse jedoch auch keine Bindungen gespalten oder geknüpft werden. Eine geringe Polarisierung des Wassers würde deshalb ausreichen, um die Ausbildung eines carbokationischen Zentrums, wie es z.B. im Wiberg-Modell der Amidgruppe beschrieben ist, elektrostatisch zu stabilisieren und damit den partiellen Doppelbindungscharakters der Peptidbindung zum Teil aufzuheben.

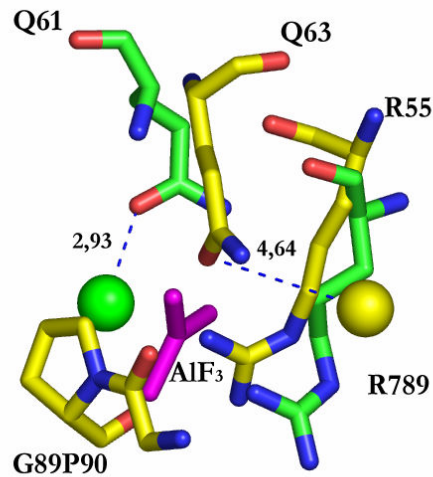


Abbildung 26: Vergleich der aktiven Zentren des Komplexes hCyp18HIV-1 Hüllprotein (gelb; RCSB-Datenbankeintrag: 1M9F) mit dem des Komplexes r21ras/GDP-AlF₃/p120GAP (grün; AlF₃, violett RCSB-Datenbankeintrag: 1WQ1). Die gestrichelten Linien kennzeichnen die Abstände zwischen dem Sauerstoffatom der Wassermoleküle und dem Amidsauerstoff der Glutaminseitenketten (Angaben in Å).

5.3.3.2 kinetische Lösungsmittelisotopeneffekte auf die Aktivität von hPin1 und *E. coli* Par10 und hFKBP12

Um die enzymatischen Mechanismen der drei PPIase-Familien miteinander vergleichen zu können, wurden die Vertreter hPin1, *E. coli* Par10 und hFKBP12 in Anlehnung an die für hCyp18 beschriebenen Lösungsmittelisotopen-Experimente untersucht. Dabei zeigte sich, dass alle drei Enzyme einen inversen KSIE aufwiesen, wenn zur Aktivitätsbestimmung Oligopeptid-Substrate verwendet wurden. Der Einfluss von D₂O auf die pK_s-Werte von protonierbaren Aminosäureseitenketten hat für die beobachteten Isotopeneffekte des *E. coli* Par10 keine Bedeutung, da die Aktivität des Enzyms im Bereich von pH 7 bis 8,5 unverändert ist. Eine vollständige pH-Wert-Abhängigkeit wurde nicht aufgenommen, da das Protein bei pH-Werten unterhalb von pH 6,5 keine ausreichende Stabilität im proteasegekoppelten Test aufwies (Daten nicht gezeigt). Für hFKBP12 und hPin1 wurde ebenfalls beschrieben, dass die PPIase-Aktivität im neutralen Bereich nicht vom pH-Wert abhing [29, 50]. Der Vergleich des mit Suc-AAPF-DFA ermittelten KSIE für *E. coli* Par10 (KSIE=0,54) mit dem durch die Verwendung des Substrats Suc-AFPF-pNA bestimmten Wert (KSIE=0,81) zeigt, dass ähnlich wie bei hCyp18 der inverse KSIE verstärkt wird, wenn das Enzym nicht mehr durch Diffusionsprozesse limitiert ist. Diese Ergebnisse wurden im RNase T1 (S54G/P55N)-Rückfaltungstest bestätigt. Die deutlich geringere enzymatische Aktivität gegenüber diesem Proteinsubstrat verhindert, dass Diffusionsprozesse die Enzymaktivität beeinflussen.

Im Gegensatz zu hCyp18 wies *E. coli* Par10 keine Salzabhängigkeit des KSIE in diesem PPIase-Aktivitätstest auf. Ebenso wenig wurde die Enzymaktivität dieses Enzyms durch die hohe Ionenstärke reduziert. hPin1 konnte in diesem Aktivitätstest nicht untersucht werden, da die PPIase-Aktivität gegenüber der entfalteten RNase T1-Variante zu gering war. Die Aktivität von hPin1 gegenüber Oligopeptid-Substraten zeigte ebenfalls einen inversen KSIE. Für das Substrat Ac-AA(p)SPR-pNA wurde ein Wert von 0,86 ermittelt. Der viskositätskorrigierte Wert wird unter Berücksichtigung der für dieses Enzym beobachteten Diffusionskontrolle von über 70% ebenfalls niedriger liegen.

Ausgehend von der Erkenntnis, dass beide Enzyme einen Cysteinyl-Rest im aktiven Zentrum aufweisen (C113 in hPin1 und C40 für *E. coli* Par10), wäre eine mögliche Erklärung für den inversen KSIE, dass die Sulfhydrylgruppen dieser Cysteinyl-Reste in einem kovalenten Katalyse-Mechanismus involviert sind. Als Zwischenprodukt würde ein tetraedrisches Intermediat entstehen, in dem die Resonanzstabilisierung der Peptidbindung aufgehoben wäre. Dieser Mechanismus kann für *E. coli* Par10 ausgeschlossen werden, da die Variante *E. coli* Par10 C40D ebenfalls einen inversen KSIE aufweist. Diese Ergebnisse stimmen mit der Beobachtung überein, dass die Modifizierung dieses Cysteinyl-Restes nicht unmittelbar zur Inaktivierung des Enzyms führt, sondern erst durch eine von der Modifizierung ausgelöste strukturelle Änderung des Enzyms hervorgerufen wird [95]. Die für dieses Enzym gewonnenen Ergebnisse lassen sich aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit auf hPin1 übertragen und untermauern die in der Einleitung aufgeführten Arbeiten, welche eine Beteiligung des C113 an der Katalyse in Frage stellen [94, 95]. Der inverse KSIE muss deshalb einen anderen Ursprung haben.

Durch die beobachtete Proteasesensibilität erwies sich hPin1 als ungeeignet, um Protonen-Inventur-Experimente durchzuführen. Die Experimente mit *E. coli* Par10 zeigten, dass die PPIase-Aktivität, sehr ähnlich wie es für hCyp18 beobachtet wurde, nicht-linear vom D₂O-Gehalt des Messansatzes abhing. Die Auswertung dieser experimentellen Daten mit Hilfe von Gleichung 23 ergab für die Fraktionierungsfaktoren $\phi^T=0,91$ und $\phi^R=0,49$ (Abbildung 28). Die Fraktionierungsfaktoren unterscheiden sich nur geringfügig von denen für die hCyp18-katalysierte Reaktion ($\phi^T=0,92$ und für $\phi^R=0,61$). Daraus kann geschlossen werden, dass sich sowohl der Grundzustand der Reaktanten als auch der Übergangszustand, welcher während der Katalyse durchlaufen wird, in beiden Enzymen gleichen. Die strukturellen Übereinstimmungen der aktiven Zentren von hPin1 und *E. coli* Par10 lassen vermuten, dass der gemessene inverse KSIE für hPin1 durch ähnliche Fraktionierungsfaktoren beschrieben werden kann.

Das Parvuline und Cyclophiline einen ähnlichen Katalysemechanismus aufweisen sollen, scheint auf den ersten Blick verwunderlich, denn zwischen den Vertretern beider Familien sind keine strukturellen Ähnlichkeiten bekannt. Auch wenn keine Übereinstimmungen im allgemeinen

Aufbau der Enzyme zu finden sind, so zeigten sich doch deutliche Ähnlichkeiten in der Lage der Aminosäureseitenketten des aktiven Zentrums. Die manuelle Überlagerung des aktiven Zentrums von *E. coli* Par10 mit dem des hCyp18 ist in Abbildung 27A dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die für die katalytische Aktivität des hCyp18 wichtigen Aminosäurereste mit Resten des aktiven Zentrums des *E. coli* Par10 in Lage und Eigenschaften gut übereinstimmen. Dass die dargestellten Reste des *E. coli* Par10 tatsächlich zum aktiven Zentrum des Enzyms gehören, wird deutlich, wenn man die Struktur dieses Enzyms mit der des hPin1 überlagert (Abbildung 27B). Das von hPin1 gebundene Dipeptid AP liegt genau in der von den in der Abbildung 27A angegebenen Resten des *E. coli* Par10 gebildeten Bindetasche. Inwiefern im Katalysemechanismus von *E. coli* Par10 und hPin1 ebenfalls ein Wassermolekül den Übergangszustand stabilisiert kann aus den vorhandenen Strukturellen Daten von beiden Enzymen nicht abgeleitet werden, da für diese Enzyme keine Substrat/Enzym-Komplexe mittels Röntgenkristallstrukturanalyse publiziert wurden. Die Seitenkette des S42 im aktiven Zentrum des *E. coli* Par10 kann auf zwei Wegen die Aufgabe des Q63 des hCyp18 übernehmen. Zum einen kann diese Seitenkette in Analogie zum Q63 ein Wassermolekül polarisieren, zum anderen könnte die OH-Gruppe dieses Restes jedoch auch selbst polarisiert werden und den kationischen Übergangszustand stabilisieren.

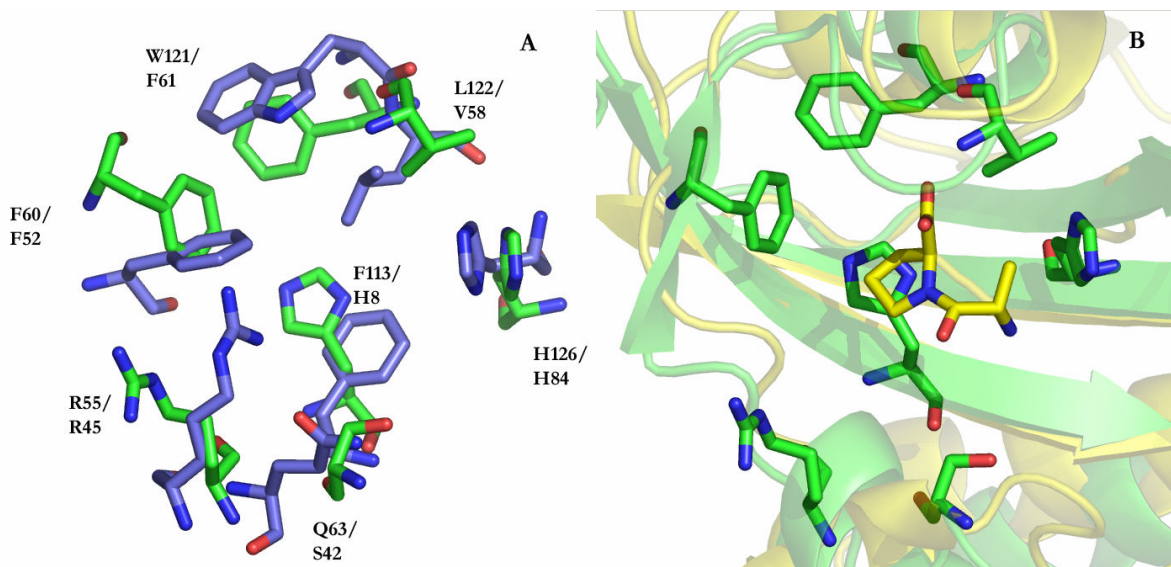


Abbildung 27: A) Überlagerung von hCyp18 (blau) mit *E. coli* Par10 (grün), dargestellt ist eine Auswahl von Seitenketten der aktiven Zentren. B) Überlagerung von *E. coli* Par10 (grün) und hPin1 (gelb), das von hPin1 gebundene Dipeptid und die Reste des aktiven Zentrums des *E. coli* Par10 sind hervorgehoben.

Für FKBP12 wurde bereits ein inverser KSIE von 0,92 beschrieben [50, 80]. Die hier ermittelten Werte weisen einen deutlich stärkeren inversen Charakter auf (KSIE liegt zwischen 0,63 und 0,8 in Abhängigkeit vom verwendeten PPIase-Aktivitätstest). Der im proteasegekoppelten Test ermittelte Wert des KSIE zeigt mit 0,8 eine mit den Literaturwerten vergleichbare

Größenordnung. Verwendet man jedoch Aktivitätstests, die ohne Verwendung von Proteasen ablaufen (der RNase T1 (S54G/P55N)-Rückfaltungstest sowie der proteasefreie PPIase-Aktivitätstest), erhält man Werte, welche deutlich niedriger liegen (KSIE um 0,63). Im Falle des hFKBP12 kann ein direkter Einfluss der verwendeten Hilfsprotease auf die Enzymaktivität deshalb nicht ausgeschlossen werden. Die Verwendung von ungekoppelten PPIase-Aktivitätstests verhindert eine solche Beeinflussung der PPIase-Aktivität. Im Gegensatz zu den Protonen-Inventur-Experimenten für hCyp18 und *E. coli* Par10 erhöhte sich die PPIase-Aktivität des hFKBP12 linear mit dem D₂O-Gehalt des Messansatzes. Lineare Abhängigkeiten schließen den Einfluss von Medium-Effekten aus [208] und werden im Allgemeinen so interpretiert, dass alle Fraktionierungsfaktoren im Grundzustand gleich 1 sind und sich nur ein Fraktionierungsfaktor im Übergangszustand verändert. Modifiziert man Gleichung 23 derart und bestimmt den Fraktionierungsfaktor im Übergangszustand mit Hilfe der experimentellen Daten der Protonen-Inventur-Experimente, so erhält man für $\phi^T=1,5$.

Unabhängig von der Interpretation des Ursprungs des Fraktionierungsfaktors kann festgestellt werden, dass sich die Grund- und Übergangszustände der Katalyse der PPIasen hCyp18 bzw. *E. coli* Par10 von dem des hFKBP12 unterscheiden. Dieses Ergebnis ist überraschend, da zwischen Vertretern der FKBP und der Parvuline eine deutliche strukturelle Ähnlichkeit besteht [97, 197]. Die Unterschiede im Katalysemechanismus werden ebenfalls bei der Ionenstärkeabhängigkeit der PPIase-Aktivität deutlich: Während hCyp18 und *E. coli* Par10 durch 2 M NaCl nur leicht inhibiert werden bzw. unverändert aktiv bleiben, wird hFKBP12 um 280% aktiviert. Da diese Salzkonzentrationen nur einen geringen Einfluss auf die unkatalysierte Reaktion haben, ist es wahrscheinlich, dass die hohe Ionenstärke im Falle des hFKBP12 den Substrat/Enzym-Übergangszustand stabilisiert, oder den Grundzustand destabilisiert. Da die Bildung von hydrophoben Wechselwirkungen durch hohe Ionenstärken unterstützt wird, kann daraus geschlossen werden, dass ein Teil der Erniedrigung der Aktivierungsenergie der *cis/trans*-Isomerisierung von Prolyl-Bindungen durch hydrophobe Wechselwirkungen im aktiven Zentrum von hFKBP12 vermittelt wird. Diese Beobachtung stimmt mit der Feststellung überein, dass hFKBP12 bevorzugt Oligopeptid-Substrate mit großen hydrophoben Seitenketten in Position P1 umsetzt [78, 80].

5.4 Kalorimetrische Untersuchung von langsamen Konformationsänderungen in Proteinen und Peptiden

Ziel der Untersuchungen war es, eine neue Methode zu entwickeln, die es erlaubt, langsame konformationelle Änderungen in Proteinen und Peptiden auf nichtspektroskopische Weise nachzuweisen. Die Vorteile einer kalorimetrischen gegenüber UV-Vis- oder fluoreszenzspektroskopischen Methoden sind offensichtlich: es bedarf keiner speziellen Chromophore oder

Fluorophore, um dem Verlauf der Reaktion zu folgen. Besonders im Falle von langsamen konformationellen Änderungen, wie z.B. der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung in Proteinen oder Peptiden, sind die spektralen Änderungen meist sehr klein oder nicht nachweisbar. Ausnahmen bilden Vorgänge, welche direkt mit der Änderung der elektronischen Umgebung von spektroskopisch gut beobachtbaren Aminosäureseitenketten einhergehen. Damit sind spektroskopische Untersuchungen an unmodifizierten Proteinen und Peptiden zwangsläufig auf Bereiche begrenzt, welche sich in der Nähe von solchen Aminosäureseitenketten befinden.

Die Verwendung von isothermer Titrationskalorimetrie zur kinetischen Untersuchung enzymatisch katalysierten Reaktionen wurde bereits beschrieben und bildete die Grundlage der hier vorgestellten Experimente [209-211]. Normalerweise wird die Reaktion durch die Zugabe von Substrat oder Enzym mittels der Titrationsapparatur zum Reaktionsansatz gestartet. Zur Untersuchung von Proteinfaltungsreaktionen bzw. Peptidkonformationsänderungen werden Sprungexperimente verwendet. Dabei wird die Reaktion durch die schnelle Änderung der Lösungsmittelzusammensetzung, der Temperatur oder des pH-Wertes gestartet. Bei einem klassischen Proteinrückfaltungsexperiment werden die für die Entfaltung des Proteins verwendeten chemischen Denaturantien soweit mit Puffer verdünnt, dass die Renaturierung des Proteins einsetzen kann. Der Aufbau des verwendeten Titrationskalorimeters erlaubte es nicht, solche Sprungexperimente durch die automatische Injektion der entfalteten Proteinlösung in die Messzelle des Kalorimeters zu starten. Die Anwesenheit von hohen Konzentrationen an chemischen Denaturantien wie GdmHCl oder Harnstoff in der Titrationsapparatur verhinderte die Ausbildung einer für die Messung notwendigen stabilen Basislinie. Der Grund dafür liegt in der offenen Konstruktionsweise des Kalorimeters. Das bedeutet, dass die zur Injektion des Titranten verwendete Kanüle offen in die Messzelle ragt. Ist der Konzentrationsgradient zwischen den Lösungen in der Titrationsapparatur und Messzelle zu groß, verursacht die durch Diffusionsprozesse ausgelöste Verdünnungswärme eine zu starke Basisliniendrift. Aus diesem Grund wurden die Sprungexperimente durch manuelle Injektion in die Messzelle gestartet, dabei diente die Titrationsapparatur des Kalorimeters nur zum Rühren der Lösung in der Messzelle.

Die Rückfaltung von vollständig entfalteter RNase A unter Bedingungen, welche den nativen Zustand des Proteins stark stabilisieren (niedrige Konzentrationen an chemischen Denaturantien im pH-Wert Bereich von 5 bis 8 und bei niedriger Temperatur) ist komplex [212]. Im vollständig entfalteten Zustand liegen mindestens fünf RNase A-Spezies im Gleichgewicht vor (U_{vD} , U_D , U_m , U_s^I und U_s^{II}), welche unabhängig voneinander zum nativen Protein renaturieren. Unter stark nativen Bedingungen falten die U_{vF} und die U_F -Spezies innerhalb kurzer Zeit (im Millisekundenbereich) zum nativen Protein [213].

Die Konformation der vier Prolyl-Bindungen der U_{vf} -Spezies entspricht der des nativen Proteins. Das heißt, die Prolyl-Bindungen Y92P93 und N113P114 liegen in der *cis*-Konformation vor, und die Prolyl-Bindungen K41P42 und V116P117 liegen in der *trans*-Konformation vor [214]. U_f besteht aus zwei Spezies, welche je eine nicht native Prolyl-Bindung (N113P114 oder V116P117) aufweisen. Beide schnell faltenden Spezies können mit der hier beschriebenen Methode nicht beobachtet werden. Die U_m -Spezies faltet im Bereich von wenigen Sekunden zurück und kann ebenfalls nicht beobachtet werden [126].

Die zwei langsam faltenden Spezies U_s^I und U_s^{II} enthalten mehrere der Prolyl-Bindungen in einer nicht nativen Konformation [215]. U_s^{II} besteht aus zwei ungefalteten Spezies, wovon eine die nichtnativen Prolyl-Bindungen *trans*-Y92P93 und *trans*-N113P114 aufweist, und die zweite die nichtnativen Prolyl-Bindungen *trans*-Y92P93 und *cis*-V116P117 zeigt [215]. Der Faltungsweg der U_s^{II} -Spezies verläuft über mindestens zwei Faltungsintermediate I_1 und I_N [125, 212, 216]. Das zeitig gebildete Faltungsintermediat I_1 entsteht unter stark nativen Bedingungen nach weniger als 100 ms, es ist durch ein bereits gut ausgebildetes Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen gekennzeichnet. Außerdem sind Teile der Sekundärstrukturelemente des nativen Proteins bereits ausgeprägt, z.B. zwei von drei Helices (Reste 24-34 und Reste 50-60) sowie eine β -Faltblattregion (Reste 79 bis 118) [217, 218]. Das nachfolgende I_N -Intermediat ist kompakt gefaltet und bereits enzymatisch aktiv, jedoch weist es noch immer mindestens eine inkorrekte Prolyl-Bindung auf [212]. Dieses Intermediat unterscheidet sich in seinen UV-Vis-spektroskopischen Eigenschaften kaum vom nativen Protein, kann jedoch durch fluoreszenzspektroskopische Methoden detektiert werden [124]. Das Verhältnis zwischen den Summen aller schnell und langsam faltenden Spezies beträgt 20 zu 80 [212, 219-223]. Dabei machen U_s^{II} 70-60% und U_s^I 10-20% der gesamten entfalteten Spezies aus. Die Faltung der U_s^I -Spezies verläuft wahrscheinlich ebenfalls über Faltungsintermediate, welche jedoch noch nicht im Detail charakterisiert sind [224]. Während der Faltung zum nativen Protein müssen die nichtnativen Prolyl-Bindungen in Position Y92P93, N113P114 und V116P117 dieser Spezies ihre native Konformation ausprägen [215]. Im Gegensatz zur hier beschriebenen Methode nutzen optische Methoden die Absorption- bzw. Fluoreszenzänderungen von drei der im Protein vorhandenen Tyrosyl-Resten des Proteins (Y25, Y92, und Y97), um den Grad der Faltung des Proteins zu bestimmen [220, 225]. Es ist bekannt, dass mittels UV-Vis-spektroskopischer Methoden im Falle der U_s^{II} -Spezies nicht die Bildung des nativen Proteins, sondern eines unter stark nativen Bedingungen stabilen Faltungsintermediats (I_N) beobachtet wird [226]. Durch die Verwendung von fluoreszenzspektroskopischen Methoden ist es jedoch möglich, die Umwandlung von I_N zu N zu beobachten [225].

Die normalerweise komplexe Rückfaltungskinetik von RNase A ist unter den hier verwendeten und in Abschnitt 4.3.1 beschriebenen Bedingungen stark vereinfacht. Hohe Konzentrationen an

GdmHCl im Rückfaltungsansatz vermindern oder verhindern die Akkumulation von Faltungsintermediaten [125, 216]. Deshalb gehorcht die gesamte Rückfaltungskinetik der zwei U_s -Spezies einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung (Abbildung 20B). Durch die im Abschnitt 4.3.1 dargelegten Versuche konnte nachgewiesen werden, dass das nach der Injektion von entfalteter RNase A gemessene Signal durch die Renaturierung des Proteins zustande kommt. Die kalorimetrisch bestimmte Zeitkonstante von $k_{\text{obs}}=541\pm 30$ s stimmt sehr gut mit der durch optische Methoden bestimmten Konstante von rund 500 s überein [125]. Unter diesen Bedingungen konnte festgestellt werden, dass die mit der Rückfaltung assoziierte Wärmefreisetzung linear von der eingesetzten RNase A-Stoffmenge abhängt (Abbildung 21B). Die Empfindlichkeit dieser Methode ist ausreichend, um der Renaturierung von rund 0,8 mg RNase A mit gutem Signal-zu-Rauschverhältnis folgen zu können. Die Totzeit der Methode erlaubt es aber nicht, die Rückfaltung der schnell faltenden Spezies (U_{vf} und U_{f}) zu beobachten. Daraus folgt, dass die mit der Rückfaltung assoziierte Wärmefreisetzung nur aus dem Faltungsprozess der zwei U_s -Spezies resultiert. Entsprechend ergibt sich die im Abschnitt 4.3.1 ermittelte Faltungsenthalpie von $\Delta H_{\text{Faltung}}=-10,9\pm 1,5$ kcal mol⁻¹ ebenfalls nur aus der Faltung der U_s -Spezies. Um diesen Wert mit einer durch DSC-Messungen unter sehr ähnlichen Bedingungen ermittelten Entfaltungsenthalpie vergleichen zu können, muss dieser um den fehlenden Betrag der U_{f} und U_{vf} -Spezies korrigiert werden. Unter der begründeten Annahme, dass sich die Faltungsenthalpien der verschiedenen Spezies nicht unterscheiden [222], ergibt sich für $\Delta H_{\text{Faltung}}=-13,6\pm 1,9$ kcal mol⁻¹. Mittels DSC-Messungen wurde für RNase A bei 25°C eine Entfaltungsenthalpie von 36,6 kcal mol⁻¹ ermittelt. Mit Hilfe der für diesen Prozess gemessenen Änderung der Wärmekapazität von $\Delta C_p=1,57$ kcal mol⁻¹ K⁻¹ errechnet sich dementsprechend für 10°C eine Entfaltungsenthalpie von $\Delta H_{\text{Entfaltung}}(10^\circ\text{C})=13$ kcal mol⁻¹ [227]. Da die Faltung und Entfaltung von RNase A vollständig reversibel verläuft, gilt $\Delta H_{\text{Faltung}}=-\Delta H_{\text{Entfaltung}}$. Damit stimmt der mittels DSC gemessene Wert innerhalb der Fehlergrenzen gut mit dem hier ermittelten Wert überein. Diese Ergebnisse zeigen am Beispiel der RNase A, dass die beschriebene Methode es ermöglicht, langsame Faltungsvorgänge mittels Kalorimetrie zu beobachten und damit simultan sowohl die Faltungskinetik als auch den mit der Faltung assoziierten Wärmeaustausch bestimmen zu können.

Um eine universelle Einsetzbarkeit dieser Methode zu gewährleisten, wurde untersucht, ob die komplexe Faltungskinetik von RNase A, welche mittels optischer Methoden unter stark nativen Bedingungen beobachtet wurde, auch mittels Kalorimetrie messbar ist. Im Gegensatz zu den im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Experimenten ist die GdmHCl-Konzentration im Rückfaltungsansatz zu gering um Faltungsintermediate zu destabilisieren. Unter stark nativen Bedingungen wurde für die Renaturierung von RNase A eine biphasische exotherme Reaktion

mit Zeitkonstanten von 102 ± 28 und 454 ± 22 s beobachtet (Abbildung 22). Ein direkter Vergleich mit den durch UV-Vis-Spektroskopie erhaltenen Zeitkonstanten ist schwierig, da die langsamen Faltungsreaktionen unter stark nativen Faltungsbedingungen zum Teil an Funktionen angepasst wurden, welche entweder zwei oder drei exponentielle Glieder aufwiesen [123-125]. Daraus ergaben sich für die gleiche Kinetik bei 10°C z.B. Zeitkonstanten von entweder $24,6 \pm 1,5$ s und 155 ± 35 s oder $20,0 \pm 2$ s, $59,4 \pm 10$ s und 618 ± 200 s [123]. Für 5°C wurden von Houry und Scheraga Zeitkonstanten für die Faltung der U_s^{II} -Spezies von $29,5 \pm 1,2$ s und für die U_s^{I} -Spezies von 311 ± 29 s gemessen [126]. Die mittels Kalorimetrie beobachtete biphasische Kinetik legt nahe, dass mit dieser Methode ebenfalls die Renaturierung der U_s^{II} (schnelle Phase) als auch der U_s^{I} -Spezies (langsame Phase) beobachtet werden kann. Ein weiteres Indiz dafür, dass die mittels Kalorimetrie bestimmten Kinetiken aus der Faltung der U_s^{I} bzw. U_s^{II} -Spezies resultieren, ergibt sich aus dem Verhältnis der mit den Faltungsphasen assoziierten Enthalpien. Mit der schnelleren Phase ist eine Wärmefreisetzung von $-16,8 \pm 1,3$ kcal mol⁻¹ und mit der langsameren Phase von $-3 \pm 0,13$ kcal mol⁻¹ verbunden. Damit verhalten sich beide Phasen im Verhältnis von rund 5,5 zu 1. Das molare Verhältnis von U_s^{II} zu U_s^{I} wurde mit Werten von 7 zu 1 bis 4 zu 1 bestimmt [126, 212, 226].

Die Unterschiede zwischen den hier kalorimetrisch und den in der Literatur optisch bestimmten Zeitkonstanten könnten darauf zurückzuführen sein, dass verschiedene Abschnitte der jeweiligen Faltungsprozesse beobachtet werden. So ist es im Falle der Renaturierung der U_s^{II} -Spezies aufgrund der Totzeit der kalorimetrischen Methode nicht möglich, die relativ schnelle Bildung von zeitigen Faltungsintermediaten zu erfassen. Damit beschränkt sich die erfassbare Reaktion auf die Bildung des Faltungsintermediates (I_N) bzw. des nativen Proteins (N). Da sich I_N und N nur durch die Konformation von Prolyl-Bindungen unterscheiden, sollte dieser Prozess nur eine geringe oder gar keine Änderung der Enthalpie zu Folge haben. Dies ist, wie bereits oben beschrieben, für die schnellere der beiden kalorimetrisch messbaren Faltungsphasen nicht gegeben. Da bei dieser Reaktion rund 40% der gesamten Faltungsenthalpie von -42 kcal mol⁻¹ [227] freigesetzt werden, muss angenommen werden, dass sich im Verlauf des beobachteten Faltungsschrittes wesentliche strukturelle Änderungen im Protein zutragen. Dieser Wert ist zu groß, als dass er durch eventuelle exotherme intramolekulare Interaktionen, die nach der Isomerisierung der prolyl-Bindung stattfinden, hervorgerufen werden könnte. Diese Beobachtung spricht eher dafür, dass während der schnelleren Faltungsphase die Umwandlung eines frühen Faltungsintermediates mit noch wenigen intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen (I_1) zum nativ-ähnlichen Intermediat (I_N) beobachtet wird. Dies widerspricht jedoch der Beobachtung, dass das frühe Faltungsintermediat mit einer Zeitkonstante von nur 25 s bei 10°C gebildet wird [216]. Unter der Annahme, dass die langsame

Faltungsphase mit der Faltung der U_s^1 -Spezies assoziiert ist, ergibt sich ebenfalls eine beträchtliche Enthalpieänderung, wenn man beachtet, dass diese Spezies nur zu 10% zu Beginn der Reaktion vorliegt. Durch die hier aufgeführten Untersuchungen unter stark nativen Bedingungen kann noch nicht endgültig festgestellt werden, ob die beobachteten Kinetiken die gleichen Faltungsprozesse beschreiben wie die mittels optischen Methoden bestimmten Kinetiken.

Der beschleunigende Einfluss einer PPIase auf die Faltungskinetik bestätigt die oben genannte Vermutung, dass das beobachtete kalorimetrische Signal aus den langsamen Faltungsprozessen der RNase A resultiert. Da PPIasen ausschließlich die *cis/trans*-Isomerisierung von Prolyl-Bindungen katalysieren, müssen die beobachteten Faltungsphasen mit solchen Prozessen assoziiert sein. Die Totzeit der Methode sowie die kleine Amplitude der langsamen Phase erlauben es nicht, den Einfluss von L.p.Mip auf die Kinetiken quantitativ zu analysieren. Durch den beschleunigenden Effekt der PPIase ist ein exakter Fit der beiden Phasen nicht mehr möglich. Es kann jedoch festgestellt werden, dass eine steigende PPIase-Konzentration hauptsächlich die schnellere Faltungsphase beeinflusst.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass langsame Faltungsprozesse durch die hier vorgestellte kalorimetrische Methode beobachtet werden können, die quantitative Interpretation einer Faltungskinetik und des gemessenen Wärmeaustauschs jedoch nur dann möglich ist, wenn die beobachtete Reaktion ausreichend langsam (im Verhältnis zur Totzeit der Methode) und möglichst nach einer einfachen Kinetik verläuft.

Diese Bedingungen sind z.B. bei der *cis/trans*-Isomerisierung von Prolyl-Bindungen in Peptiden erfüllt. Die mittels pH-Wert-Sprung gemessenen Geschwindigkeitskonstanten der *cis*- nach *trans*-Isomerisierung von AP und AAP bei 10°C und pH 7,5 von $0,43 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ bzw. $0,46 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ stimmen sehr gut mit dem durch spektroskopische Methoden bestimmten Wert von $0,42 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ überein [92]. Der aus der Temperaturabhängigkeit dieser Geschwindigkeitskonstante berechnete ΔG^\ddagger -Wert der *cis*- nach *trans*-Isomerisierung von rund 21 kcal mol^{-1} entspricht ebenfalls den mittels kapillarelektrophoretischer und spektroskopischer Methoden bestimmten Werten, welche im Bereich von 18,1 bis 21,9 liegen [92, 228, 229]. Auffällig ist hingegen, dass die Beträge der mittels pH-Wert-Sprung kalorimetrisch ermittelten Werte für ΔH^0 im Vergleich mit den durch die mittels Gleichung 9 aus der Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten berechneten Konstanten unter allen Bedingungen um bis zu $0,7 \text{ kcal mol}^{-1}$ größer waren. Wenn die Sprungexperimente mit der LiCl/TFE-Methode durchgeführt wurden, zeigte sich eine noch größere Diskrepanz von rund 3 kcal mol^{-1} . Qualitativ kann festgestellt werden, dass das *trans*-Isomer der untersuchten Peptide enthalpisch begünstigt war. Diese qualitative Beobachtung wurde für eine Reihe von prolinhaltigen Oligopeptiden gemacht (GP, $\Delta H_{c/t}^0 = -1 \text{ kcal mol}^{-1}$; Ac-

GP-OMe, $\Delta H_{c/t}^0 = -1,3 \text{ kcal mol}^{-1}$; DWPG, $\Delta H_{c/t}^0 = -0,75 \text{ kcal mol}^{-1}$) [27, 230, 231]. In allen in Abschnitt 4.3.3 beschriebenen Experimenten, in welchen eine Netto-Umwandlung von *cis*- zu *trans*-Isomeren auftrat (pH-Wert-Sprung von pH 7,5 zu pH 2,1 oder LiCl/TFE-Sprung), wurde eine exotherme Reaktion beobachtet, während endotherme Reaktionen für die Umwandlung von *trans*- zu *cis*-Isomeren beobachtet wurde.

Die Genauigkeit der hier beschriebenen Ergebnisse hängt stark davon ab, wie präzise die Konzentrationen der Peptide im Messansatz sowie deren *cis*-Gehalt vor und nach dem Sprungexperiment bestimmt werden können. Da eine einfache, direkte Bestimmung der Peptidkonzentration im Messansatz z.B. mittels UV-Vis-Spektroskopie nicht möglich war, wurden nur die Peptidkonzentrationen der verwendeten Stammlösungen mittels NMR-Spektroskopie ermittelt und die jeweiligen Konzentrationen in der Messzelle errechnet. Ungenauigkeiten in der Peptidkonzentration bzw. im *cis*-Gehalt könnten für einen Teil der hier beobachtenden Diskrepanzen verantwortlich sein. Des Weiteren können die deutlichen Unterschiede zwischen den mittels pH-Wert-Sprung und LiCl/TFE-Sprung ermittelten Parametern zu einem Teil auf unterschiedliche Reaktionsbedingungen zurückgeführt werden. Der Messansatz enthielt unter den hier beschriebenen Bedingungen immerhin 6% TFE.

Diese Ergebnisse untermauern die durch die Rückfaltungsexperimente von RNase A gewonnenen Erkenntnisse, wonach mit dieser Methode eine kinetische sowie eine thermodynamische Charakterisierung von langsamen konformationellen Prozessen sowohl in Proteinen als auch in Peptiden möglich ist.

6 Zusammenfassung

6.1 Kalorimetrische Untersuchungen zu PPIase/Ligand-Wechselwirkungen

Die kalorimetrische Untersuchung der hCyp18/CsA-Interaktion erbrachte die folgenden Ergebnisse:

1. Anders als aus den bereits publizierten Daten über diese Wechselwirkung geschlossen werden kann, ist der K_D -Wert des CsA/hCyp18-Komplexes sehr ähnlich zur kinetisch ermittelten Inhibitionskonstante K_i . Die Dissoziationskonstante ändert sich nur wenig in Abhängigkeit von Pufferzusammensetzung, Temperatur und pH-Wert.
2. Die Wechselwirkung zwischen Ligand und Protein wird bei 25°C ausschließlich durch die Enthalpie der Bindung ($\Delta H_{ITC}(25^\circ\text{C}) = -14,7 \pm 0,3 \text{ kcal mol}^{-1}$) vermittelt, die Entropie der Bindung ($T\Delta S_{ITC}(25^\circ\text{C}) = -3,9 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) wirkt der Interaktion entgegen.
3. Aus dem gemessenen stark negativen Wert für ΔC_p von ($\Delta C_p = -435 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) kann geschlossen werden, dass die Wechselwirkung zwischen CsA und hCyp18 zum großen Teil durch nichtpolare Interaktionen vermittelt wird. Dies steht jedoch im Widerspruch zum in Punkt 2 aufgeführten Ergebnis.
4. Kalorimetrische Untersuchungen in Lösungen mit 30% Glycerol sowie in schwerem Wasser zeigten, dass hydrophobe Interaktionen für die CsA/hCyp18-Bindung nicht wie bisher angenommen von herausragender Bedeutung sind.
5. Die beobachtete pH-Wert-Abhängigkeit der Wechselwirkung kommt zu einem großen Teil durch die Protonierung des Restes H126 im aktiven Zentrum von hCyp18 zustande.
6. Aus dem Vergleich der thermodynamischen Konstanten der hCyp18/CsA bzw. der hCyp18/Substrat-Interaktion konnte geschlussfolgert werden, dass CsA Eigenschaften einer Übergangszustandanalogen Verbindung aufweist. Diese Vermutung konnte mittels struktureller Vergleiche von verschiedenen hCyp18/Ligand-Komplexen untermauert werden.

Die kalorimetrische Untersuchung der hPin1/Ac-Phe-DThr(PO₃H₂)-Pip-Nal-Gln-NH₂-Interaktion führte zu folgenden Ergebnissen:

1. Der Ligand Ac-Phe-DThr(PO₃H₂)-Pip-Nal-Gln-NH₂ wird bei 10°C von hPin1 mit einem K_D -Wert von 20 nM gebunden. Dieser Wert stimmt gut mit dem aus kinetischen Messungen bestimmten K_i -Wert von 40 nM bei 10°C überein.
2. Der Inhibitor wird ausschließlich von der PPIase-Domäne des hPin1 komplexiert.
3. Die Wechselwirkung zwischen Ligand und Protein wird bei 25°C sowohl durch die Enthalpie der Bindung ($\Delta H_{ITC}(25^\circ\text{C}) = -6,6 \text{ kcal mol}^{-1}$) als auch durch die Entropie der Bindung ($T\Delta S_{ITC}(25^\circ\text{C}) = 3,6 \text{ kcal mol}^{-1}$) vermittelt.

5. Die Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein sind zu fast gleichen Teilen auf polare und nichtpolare Wechselwirkungen zurückzuführen.
6. Die Erhöhung der Ionenstärke des Messansatzes verringert die Ligand/hPin1 Δ WW-Affinität stark, dies ist auf die herausragende Bedeutung der phosphorylierten Seitenkette des Liganden zurückzuführen.
7. Die Interaktion der Phosphat-Gruppe des Inhibitors mit den Resten R69 und L63 des hPin1 konnte nachgewiesen werden.
8. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Interaktion von Ligand und hPin1 *nicht*, wie zuvor vermutet wurde, zu einer induzierten Änderung der Konformation der β 1/ α 1-Schleife oder einer Änderung der Interaktion zwischen PPIase-Domäne und WW-Domäne führt.
9. Die pH-Wert-Abhängigkeit der Bindungsaffinität lässt darauf schließen, dass der Ligand in seiner dianionischen Form am besten von hPin1 erkannt und gebunden wird. Dabei konnte festgestellt werden, dass bei pH 5,5 während der Wechselwirkung zwischen Ligand und hPin1 Δ WW rund 0,8 Protonen je Komplex freigesetzt werden, wogegen kein Protonentransfer bei pH 7,8 erfolgte.
10. Die Interaktion eines Substrates (Ac-AA(p)SPR-pNA) mit hPin1 zeigte bei 20°C eine vergleichbare Enthalpie der Bindung wie der zuvor charakterisierte Inhibitor, was auf ähnliche molekulare Grundlagen der Interaktion schließen lässt.

6.2 Enzymkinetische Untersuchungen zu vier Vertretern der drei bekannten PPIase-Familien

Die enzymkinetischen Untersuchungen von hCyp18, hPin1, E. coli Par10 und hPin1 ergaben folgende Resultate:

1. Unter Verwendung von *in vitro*-PPIase-Aktivitätstests konnte festgestellt werden, dass die Katalyse der Enzyme hCyp18, hPin1 und *E. coli* Par10 diffusionskontrolliert verläuft.
2. Die Aktivität von hFKBP12 ist unabhängig von der Diffusionsgeschwindigkeit der Substrate.
3. Alle untersuchten PPIase-Vertreter zeigten einen inversen kinetischen Lösungsmittelisotopeneffekt im Bereich von 0,52 bis 0,86.
4. Die Stärke des Isotopeneffekts muss für die diffusionskontrollierten Vertreter um die Viskositätsänderung, die durch die Verwendung von schwerem Wasser hervorgerufen wird, korrigiert werden, um interpretierbare Ergebnisse zu erhalten.
5. Die Enzymaktivität und der beobachtete inverse KSIE für hCyp18 verringern sich mit steigender Ionenstärke des Messansatzes.
6. Die Enzymaktivität und der KSIE von *E. coli* Par10 sind nicht wesentlich ionenstärkeabhängig.
7. Hohe Ionenstärken im Messansatz aktivieren hFKBP12, haben jedoch nur einen geringen Einfluss auf den bestimmten KSIE.

8. Aus den Ergebnissen der Protonen-Inventur-Experimente konnte geschlussfolgert werden, dass sich die Übergangszustände der hCyp18- und *E. coli* Par10-katalysierten Reaktion gleichen und sich von dem des hFKBP12 unterscheiden.
9. Aus dem Vergleich der kinetischen und strukturellen Eigenschaften von hCyp18 und *E. coli* Par10 konnte geschlussfolgert werden, dass beide Enzyme einen verwandten Katalysemechanismus aufweisen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die positive Partialladung des Carbonykohlenstoffs der Prolyl-Bindung im Übergangszustand durch ein polarisiertes Wassermolekül stabilisiert wird.
10. Heterolog in *E. coli* exprimierte Enzymvarianten des hCyp18 mit Restaktivitäten unterhalb 0,1% sind oftmals mit *E. coli* CypA verunreinigt, und enzymkinetische Untersuchungen führen daher zu falschen Ergebnissen. In der Literatur beschriebene Aktivitäten solcher Varianten wurden überprüft und korrigiert. Es konnte ein Schnelltest entwickelt werden, um den Grad der *E. coli* CypA-Kontaminierung zu quantifizieren.

6.3 Beschreibung einer neuen kalorimetrischen Methode zu Analyse von langsamen Konformationsänderungen in Peptiden und Proteinen

1. Für RNase A und eine Reihe von prolinhaltigen Di- bzw. Oligopeptiden konnte nachgewiesen werden, dass es möglich ist, mittels einer neuen kalorimetrischen Methode sowohl die Kinetik als auch die Thermodynamik von langsamen konformationellen Änderungen, am Beispiel der *cis/trans*-Isomerisierung der Prolyl-Bindung, direkt zu messen.
2. Die Methode erlaubt es, eine Vielzahl von verschiedenen etablierten Sprungmethoden zu verwenden, um das *cis/trans*-Gleichgewicht der Prolyl-Bindung von Peptiden bzw. die native Struktur von Proteinen zu stören.
3. Die erhaltenen Ergebnisse stimmen gut mit den in der Literatur beschriebenen Werten überein. Die Anwendung dieser Methode auf weitere Proteine und/oder Oligopeptide in Kombination mit der PPIase-katalysierten Beschleunigung dieser Reaktionen kann das Verständnis der Proteinfaltung und des Katalysemechanismus der PPIasen erweitern.

7 Literatur

1. Pauling, L., R.B. Corey, and H.R. Branson (1951). "The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **37**: 205-211
2. Brandts, J.F., H.R. Halvorson, and M. Brennan (1975). "Consideration of the Possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues." *Biochemistry* **14**: 4953-63
3. Fischer, G., H. Bang, and C. Mech (1984). "Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides." *Biomed Biochim Acta* **43**(10): 1101-11
4. Lu, K.P. (2003). "Prolyl isomerase Pin1 as a molecular target for cancer diagnostics and therapeutics." *Cancer Cell* **4**(3): 175-80
5. Shaw, P.E. (2002). "Peptidyl-prolyl isomerases: a new twist to transcription." *EMBO Rep* **3**(6): 521-6
6. Harrar, Y., C. Bellini, and J.D. Faure (2001). "FKBPs: at the crossroads of folding and transduction." *Trends Plant Sci* **6**(9): 426-31
7. Lehnart, S.E., F. Huang, S.O. Marx, and A.R. Marks (2003). "Immunophilins and coupled gating of ryanodine receptors." *Curr Top Med Chem* **3**(12): 1383-91
8. Schmid, F.X. (2001). "Prolyl isomerases." *Adv Protein Chem* **59**: 243-82
9. Dugave, C.L. Demange (2003). "Cis-trans isomerization of organic molecules and biomolecules: implications and applications." *Chem Rev* **103**(7): 2475-532
10. Wiberg, K.B. (1999). "The Interaction of Carbonyl Groups with Substituents." *Acc Chem Res* **32**(1): 922-929
11. Drakenberg, T. (1972). "The barrier to internal rotation in amides VI acetamide solvent dependent entropy of activation." *Tetrahedron Lett*: 1743-1746
12. Keller, M., C. Sager, et al. (1998). "Enhancing the Proline Effect - Pseudo-Prolines for Tailoring Cis/Trans Isomerization." *J Am Chem Soc* **120**(12): 2714-2720
13. Eberhardt, E.S., et al. (1992). "Solvent Effects on the Energetics of Prolyl Peptide Bond Isomerization." *J Am Chem Soc* **114**: 5437-5439
14. Gerig, J.T. (1971). "The effect of adjacent charges on the kinetics of rotation of the peptide bond." *Biopolymers* **10**(12): 2435-43
15. Lindskog, S. (1997). "Structure and mechanism of carbonic anhydrase." *Pharmacol Ther* **74**(1): 1-20
16. Stein, R.L. (1993). "Mechanism of enzymatic and nonenzymatic prolyl cis-trans isomerization." *Adv Protein Chem* **44**: 1-24
17. Harrison, R.K.R.L. Stein (1990). "Mechanistic studies of peptidyl prolyl cis-trans isomerase: evidence for catalysis by distortion." *Biochemistry* **29**(7): 1684-9
18. Texter, F.L., D.B. Spencer, R. Rosenstein, and C.R. Matthews (1992). "Intramolecular catalysis of a proline isomerization reaction in the folding of dihydrofolate reductase." *Biochemistry* **31**(25): 5687-91
19. Cox, C.T. Lectka (1998). "Intramolecular Catalysis of Amide Isomerization - Kinetic Consequences of the 5-Nb- -N-a Hydrogen Bond in Prolyl Peptides." *J Am Chem Soc* **120**(41): 10660-10668
20. Rabenstein, D.L., T.S. Shi, and S. Spain (2000). "Intramolecular catalysis of the cis-trans isomerization of proline peptide bonds in cyclic disulfide-containing peptides." *J Am Chem Soc* **122**(10): 2401-2402
21. Shi, T., S.M. Spain, and D.L. Rabenstein (2004). "Unexpectedly fast cis/trans isomerization of Xaa-Pro peptide bonds in disulfide-constrained cyclic peptides." *J Am Chem Soc* **126**(3): 790-6
22. Reimer, U., N. el Mokdad, M. Schutkowski, and G. Fischer (1997). "Intramolecular assistance of cis/trans isomerization of the histidine-proline moiety." *Biochemistry* **36**(45): 13802-8
23. Kern, D., M. Schutkowski, and T. Drakenberg (1997). "Rotational Barriers of Cis/Trans Isomerization of Proline Analogues and Their Catalysis by Cyclophilin." *J Am Chem Soc* **119**(36): 8403-8408
24. Renner, C., S. Alefelder, et al. (2001). "Fluoroprolines as tools for protein design and engineering." *Angew Chem Int Ed Engl* **40**(5): 923-925
25. Beausoleil, E., R. Sharma, S.W. Michnick, and W.D. Lubell (1998). "Alkyl 3-Position Substituents Retard the Isomerization of Prolyl and Hydroxyprolyl Amides in Water." *J Org Chem* **63**(19): 6572-6578
26. Schutkowski, M., S. Wollner, and G. Fischer (1995). "Inhibition of peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity by substrate analog structures: thioxo tetrapeptide-4-nitroanilides." *Biochemistry* **34**(40): 13016-26
27. Eberhardt, E.S., N. Panasik, and R.T. Raines (1996). "Inductive Effects on the Energetics of Prolyl Peptide Bond Isomerization - Implications for Collagen Folding and Stability." *J Am Chem Soc* **118**(49): 12261-12266

28. Pao, Y.L., M.R. Wormarld, R.A. Dwek, and A.C. Lellouch (1996). "Effect of serine O-glycosylation on cis-trans proline isomerization." *Biochem Biophys Res Commun* **219**(1): 157-62
29. Schutkowski, M., A. Bernhardt, et al. (1998). "Role of phosphorylation in determining the backbone dynamics of the serine/threonine-proline motif and Pin1 substrate recognition." *Biochemistry* **37**(16): 5566-75
30. Taylor, C.M., R. Hardre, and P.J. Edwards (2005). "The impact of pyrrolidine hydroxylation on the conformation of proline-containing peptides." *J Org Chem* **70**(4): 1306-15
31. Ylikauhaluoma, J.T., J.A. Ashley, et al. (1996). "Catalytic Antibodies with Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase Activity." *J Am Chem Soc* **118**(23): 5496-5497
32. Ma, L., L.C. Hsieh-Wilson, and P.G. Schultz (1998). "Antibody catalysis of peptidyl-prolyl cis-trans isomerization in the folding of RNase T1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(13): 7251-6
33. Kramer, M.L.G. Fischer (1997). "Fkbp-Like Catalysis of Peptidyl-Prolyl Bond Isomerization by Micelles and Membranes." *Biopolymers* **42**(1): 49-60
34. Fischer, G.T. Aumuller (2003). "Regulation of peptide bond cis/trans isomerization by enzyme catalysis and its implication in physiological processes." *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **148**: 105-50
35. Wolfenden, R.M.J. Snider (2001). "The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts." *Acc Chem Res* **34**(12): 938-45
36. Zhao, Y., Y. Chen, et al. (1997). "Cyclophilin A complexed with a fragment of HIV-1 gag protein: insights into HIV-1 infectious activity." *Structure* **5**(1): 139-46
37. Zhao, Y.H. Ke (1996). "Crystal structure implies that cyclophilin predominantly catalyzes the trans to cis isomerization." *Biochemistry* **35**(23): 7356-61
38. Zhao, Y.H. Ke (1996). "Mechanistic implication of crystal structures of the cyclophilin-dipeptide complexes." *Biochemistry* **35**(23): 7362-8
39. Kallen, J.M.D. Walkinshaw (1992). "The X-ray structure of a tetrapeptide bound to the active site of human cyclophilin A." *FEBS Lett* **300**(3): 286-90
40. Ke, H., D. Mayrose, and W. Cao (1993). "Crystal structure of cyclophilin A complexed with substrate Ala-Pro suggests a solvent-assisted mechanism of cis-trans isomerization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(8): 3324-8
41. Konno, M., M. Ito, T. Hayano, and N. Takahashi (1996). "The substrate-binding site in *Escherichia coli* cyclophilin A preferably recognizes a cis-proline isomer or a highly distorted form of the trans isomer." *J Mol Biol* **256**(5): 897-908
42. Howard, B.R., F.F. Vajdos, et al. (2003). "Structural insights into the catalytic mechanism of cyclophilin A." *Nat Struct Biol* **10**(6): 475-81
43. Wu Sy, S., J. Dornan, et al. (2001). "The First Direct Determination of a Ligand Binding Constant in Protein Crystals." *Angew Chem Int Ed Engl* **40**(3): 582-586
44. Scholz, C., G. Scherer, et al. (1998). "Prolyl isomerases do not catalyze isomerization of non-prolyl peptide bonds." *Biol Chem* **379**(3): 361-5
45. Compton, L.A., J.M. Davis, J.R. Macdonald, and H.P. Bachinger (1992). "Structural and functional characterization of *Escherichia coli* peptidyl-prolyl cis-trans isomerases." *Eur J Biochem* **206**(3): 927-34
46. Kallen, J., C. Spitzfaden, et al. (1991). "Structure of human cyclophilin and its binding site for cyclosporin A determined by X-ray crystallography and NMR spectroscopy." *Nature* **353**(6341): 276-9
47. Fischer, G., B. Wittmann-Liebold, et al. (1989). "Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins." *Nature* **337**(6206): 476-8
48. Fischer, G., E. Berger, and H. Bang (1989). "Kinetic beta-deuterium isotope effects suggest a covalent mechanism for the protein folding enzyme peptidylprolyl cis/trans-isomerase." *FEBS Lett* **250**(2): 267-70
49. Liu, J., M.W. Albers, et al. (1990). "Cloning, expression, and purification of human cyclophilin in *Escherichia coli* and assessment of the catalytic role of cysteines by site-directed mutagenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(6): 2304-8
50. Harrison, R.K.R.L. Stein (1992). "Mechanistic Studies of Enzymic and Nonenzymic Prolyl Cis-Trans Isomerization." *J Am Chem Soc* **114**: 3464-3471
51. Kofron, J.L., P. Kuzmic, et al. (1991). "Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl cis-trans isomerases by an improved spectrophotometric assay." *Biochemistry* **30**(25): 6127-34
52. Kakalis, L.T.I.M. Armitage (1994). "Solution conformation of a cyclophilin-bound proline isomerase substrate." *Biochemistry* **33**(6): 1495-501
53. Demange, L.C. Dugave (2001). "Synthesis of phosphinic alanyl-proline surrogates Ala psi(PO₂R-CH)Pro as potential inhibitors of the human cyclophilin hCyp-18." *Tetrahedron Lett* **42**: 6295-6297
54. Wang, H.C., K. Kim, R. Bakhtiar, and J.P. Germanas (2001). "Structure-activity studies of ground- and transition-state analogue inhibitors of cyclophilin." *J Med Chem* **44**(16): 2593-600

55. Schechter, I.A. Berger (1967). "On the size of the active site in proteases. I. Papain." Biochem Biophys Res Commun **27**(2): 157-62
56. Schiene, C., U. Reimer, M. Schutkowski, and G. Fischer (1998). "Mapping the stereospecificity of peptidyl prolyl cis/trans isomerases." FEBS Lett **432**(3): 202-6
57. Zydowsky, L.D., F.A. Etzkorn, et al. (1992). "Active site mutants of human cyclophilin A separate peptidyl-prolyl isomerase activity from cyclosporin A binding and calcineurin inhibition." Protein Sci **1**(9): 1092-9
58. Hur, S.T.C. Bruice (2002). "The mechanism of cis-trans isomerization of prolyl peptides by cyclophilin." J Am Chem Soc **124**(25): 7303-13
59. Li, G.Q. Cui (2003). "What is so special about Arg 55 in the catalysis of cyclophilin A? insights from hybrid QM/MM simulations." J Am Chem Soc **125**(49): 15028-38
60. Eisenmesser, E.Z., D.A. Bosco, M. Akke, and D. Kern (2002). "Enzyme dynamics during catalysis." Science **295**(5559): 1520-3
61. Hsu, V.L, et al. (1990). "Peptidyl prolyl cis/trans isomerase activity of cyclophilin studied by one-dimensional ^1H nmr." J Am Chem Soc **112**: 6745-6747
62. Luban, J., K.L. Bossolt, et al. (1993). "Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B." Cell **73**(6): 1067-78
63. Gamble, T.R., F.F. Vajdos, et al. (1996). "Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid." Cell **87**(7): 1285-94
64. Schutkowski, M., M. Drewello, et al. (1996). "Extended binding sites of cyclophilin as revealed by the interaction with HIV-1 Gag polyprotein derived oligopeptides." FEBS Lett **394**(3): 289-94
65. Bosco, D.A., E.Z. Eisenmesser, et al. (2002). "Catalysis of cis/trans isomerization in native HIV-1 capsid by human cyclophilin A." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): 5247-52
66. Kern, D., G. Kern, et al. (1995). "Kinetic analysis of cyclophilin-catalyzed prolyl cis/trans isomerization by dynamic NMR spectroscopy." Biochemistry **34**(41): 13594-602
67. Tradler, T., G. Stoller, et al. (1997). "Comparative mutational analysis of peptidyl prolyl cis/trans isomerases: active sites of *Escherichia coli* trigger factor and human FKBP12." FEBS Lett **407**(2): 184-90
68. Hottenrott, S., T. Schumann, et al. (1997). "The *Escherichia coli* SlyD is a metal ion-regulated peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase." J Biol Chem **272**(25): 15697-701
69. Chambraud, B., N. Rouviere-Fourmy, et al. (1993). "Overexpression of p59-HBI (FKBP59), full length and domains, and characterization of PPlase activity." Biochem Biophys Res Commun **196**(1): 160-6
70. Barent, R.L., S.C. Nair, et al. (1998). "Analysis of FKBP51/FKBP52 chimeras and mutants for Hsp90 binding and association with progesterone receptor complexes." Mol Endocrinol **12**(3): 342-54
71. Callebaut, I., J.M. Renoir, et al. (1992). "An immunophilin that binds M(r) 90,000 heat shock protein: main structural features of a mammalian p59 protein." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(14): 6270-4
72. Kamphausen, T., J. Fanghanel, et al. (2002). "Characterization of *Arabidopsis thaliana* AtFKBP42 that is membrane-bound and interacts with Hsp90." Plant J **32**(3): 263-76
73. Iida, T., M. Furutani, F. Nishida, and T. Maruyama (1998). "FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase from a sulfur-dependent hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus* sp. KS-1." Gene **222**(2): 249-55
74. Ideno, A.T. Maruyama (2002). "Expression of long- and short-type FK506 binding proteins in hyperthermophilic archaea." Gene **292**(1-2): 57-63
75. Ideno, A., T. Yoshida, M. Furutani, and T. Maruyama (2000). "The 28.3 kDa FK506 binding protein from a thermophilic archaeum, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, protects the denaturation of proteins in vitro." Eur J Biochem **267**(11): 3139-49
76. Van Duyne, G.D., R.F. Standaert, et al. (1993). "Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin." J Mol Biol **229**(1): 105-24
77. Sich, C., S. Improta, et al. (2000). "Solution structure of a neurotrophic ligand bound to FKBP12 and its effects on protein dynamics." Eur J Biochem **267**(17): 5342-55
78. Albers, M.W., C.T. Walsh, and S.L. Schreiber (1990). "Substrate specificity for human rotamase FKBP: a view of FK506 and rapamycin as leucine-(twisted amide)-proline mimic." J Org Chem **55**: 4984-4986-4986
79. Van Duyne, G.D., R.F. Standaert, et al. (1991). "Atomic structure of FKBP-FK506, an immunophilin-immunosuppressant complex." Science **252**(5007): 839-42
80. Park, S.T., R.A. Aldape, et al. (1992). "PPIase catalysis by human FK506-binding protein proceeds through a conformational twist mechanism." J Biol Chem **267**(5): 3316-24
81. Bossard, M.J., D.J. Bergsma, et al. (1994). "Catalytic and ligand binding properties of the FK506 binding protein FKBP12: effects of the single amino acid substitution of Tyr82 to Leu." Biochem J **297** (Pt 2): 365-72

82. Tocci, M.J., D.A. Matkovich, et al. (1989). "*The immunosuppressant FK506 selectively inhibits expression of early T cell activation genes.*" J Immunol **143**(2): 718-26
83. Orozco, M., J. Tirado-Rives, and W.L. Jorgensen (1993). "*Mechanism for the rotamase activity of FK506 binding protein from molecular dynamics simulations.*" Biochemistry **32**(47): 12864-74
84. Fischer, S., S. Michnick, and M. Karplus (1993). "*A mechanism for rotamase catalysis by the FK506 binding protein (FKBP).*" Biochemistry **32**(50): 13830-7
85. Fischer, G. (2000). "*Chemical aspects of peptide bond isomerisation [Review].*" ChemSoc Rev **29**(2): 119-127
86. Rahfeld, J.U., K.P. Rucknagel, et al. (1994). "*Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl cis/trans isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin.*" FEBS Lett **352**(2): 180-4
87. Ranganathan, R., K.P. Lu, T. Hunter, and J.P. Noel (1997). "*Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent.*" Cell **89**(6): 875-86
88. Kato, Y., M. Ito, et al. (2002). "*Determinants of ligand specificity in groups I and IV WW domains as studied by surface plasmon resonance and model building.*" J Biol Chem **277**(12): 10173-7
89. Yaffe, M.B., M. Schutkowski, et al. (1997). "*Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism.*" Science **278**(5345): 1957-60
90. Verdecia, M.A., M.E. Bowman, et al. (2000). "*Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains.*" Nat Struct Biol **7**(8): 639-43
91. Rippmann, J.F., S. Hobbie, et al. (2000). "*Phosphorylation-dependent proline isomerization catalyzed by Pin1 is essential for tumor cell survival and entry into mitosis.*" Cell Growth Differ **11**(7): 409-16
92. Zhang, Y., S. Fussel, et al. (2002). "*Substrate-based design of reversible Pin1 inhibitors.*" Biochemistry **41**(39): 11868-77
93. Bayer, E., S. Goettsch, et al. (2003). "*Structural analysis of the mitotic regulator hPin1 in solution: insights into domain architecture and substrate binding.*" J Biol Chem **278**(28): 26183-93
94. Landrieu, I., J.M. Wieruszkeski, et al. (2002). "*Solution structure of the single-domain prolyl cis/trans isomerase PIN1At from Arabidopsis thaliana.*" J Mol Biol **320**(2): 321-32
95. Hennig, L., C. Christner, et al. (1998). "*Selective inactivation of parvulin-like peptidyl-prolyl cis/trans isomerases by juglone.*" Biochemistry **37**(17): 5953-60
96. Uchida, T., F. Fujimori, et al. (1999). "*Identification and characterization of a 14 kDa human protein as a novel parvulin-like peptidyl prolyl cis/trans isomerase.*" FEBS Lett **446**(2-3): 278-82
97. Sekerina, E., J.U. Rahfeld, et al. (2000). "*NMR solution structure of hPar14 reveals similarity to the peptidyl prolyl cis/trans isomerase domain of the mitotic regulator hPin1 but indicates a different functionality of the protein.*" J Mol Biol **301**(4): 1003-17
98. Laemmli, U.K. (1970). "*Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.*" Nature **227**(5259): 680-5
99. Fairbanks, G., T.L. Steck, and D.F. Wallach (1971). "*Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane.*" Biochemistry **10**(13): 2606-17
100. Bradford, M.M. (1976). "*A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.*" Anal Biochem **72**: 248-54
101. Gill, S.C.P.H. von Hippel (1989). "*Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data.*" Anal Biochem **182**(2): 319-26
102. Murphy, K.P.E. Freire (1992). "*Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins.*" Adv Protein Chem **43**: 313-61
103. Xie, D.E. Freire (1994). "*Structure based prediction of protein folding intermediates.*" J Mol Biol **242**(1): 62-80
104. Nicholls, A., K.A. Sharp, and B. Honig (1991). "*Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons.*" Proteins **11**(4): 281-96
105. Fraczkwicz, R.W. Braun (1998). "*Exact and efficient analytical calculation of the accessible surface areas and their gradients for macromolecules.*" J Comp Chem **19**(3): 319-333
106. Nozaki, Y. (1972). "*The preparation of guanidine hydrochloride.*" Methods Enzymol **26 PtC**: 43-50
107. Janowski, B., S. Wollner, M. Schutkowski, and G. Fischer (1997). "*A protease-free assay for peptidyl prolyl cis/trans isomerases using standard peptide substrates.*" Anal Biochem **252**(2): 299-307
108. Morrison, J.F. (1969). "*Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors.*" Biochim Biophys Acta **185**(2): 269-86
109. Kuzmic, P. (1996). "*Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase.*" Anal Biochem **237**(2): 260-73

110. Stoller, G., K.P. Rucknagel, et al. (1995). "*A ribosome-associated peptidyl-prolyl cis/trans isomerase identified as the trigger factor.*" *Embo J* **14**(20): 4939-48
111. Holdgate, G.A., A. Tunnicliffe, et al. (1997). "*The entropic penalty of ordered water accounts for weaker binding of the antibiotic novobiocin to a resistant mutant of DNA gyrase: a thermodynamic and crystallographic study.*" *Biochemistry* **36**(32): 9663-73
112. Ellis, K.J.J.F. Morrison (1982). "*Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes.*" *Methods Enzymol* **87**: 405-26
113. Baker, B.M.K.P. Murphy (1996). "*Evaluation of linked protonation effects in protein binding reactions using isothermal titration calorimetry.*" *Biophysical Journal* **71**(4): 2049-55
114. Brouwer, A.C.J.F. Kirsch (1982). "*Investigation of diffusion-limited rates of chymotrypsin reactions by viscosity variation.*" *Biochemistry* **21**(6): 1302-7
115. Dale, M.P., W.P. Kopfler, I. Chait, and L.D. Byers (1986). "*Beta-glucosidase: substrate, solvent, and viscosity variation as probes of the rate-limiting steps.*" *Biochemistry* **25**(9): 2522-9
116. Li, Y., L. Feng, and J.F. Kirsch (1997). "*Kinetic and spectroscopic investigations of wild-type and mutant forms of apple 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase.*" *Biochemistry* **36**(49): 15477-88
117. Mattei, P., P. Kast, and D. Hilvert (1999). "*Bacillus subtilis chorismate mutase is partially diffusion-controlled.*" *Eur J Biochem* **261**(1): 25-32
118. Simopoulos, T.T.W.P. Jencks (1994). "*Alkaline phosphatase is an almost perfect enzyme.*" *Biochemistry* **33**(34): 10375-80
119. Steyaert, J., L. Wyns, and P. Stanssens (1991). "*Subsite interactions of ribonuclease T1: viscosity effects indicate that the rate-limiting step of GpN transesterification depends on the nature of N.*" *Biochemistry* **30**(35): 8661-5
120. Stratton, J.R., J.G. Pelton, and J.F. Kirsch (2001). "*A novel engineered subtilisin BPN' lacking a low-barrier hydrogen bond in the catalytic triad.*" *Biochemistry* **40**(35): 10411-6
121. Cho, C.H., J. Urquidi, S. Singh, and G.W. Robinson (1999). "*Thermal offset viscosities of liquid H₂O, D₂O, and T₂O.*" *J. Phys. Chem. B* **103**: 1991-94
122. Kerstin, J. (1985). "*Viscosity of light and heavy Water and thier mixtures.*" *Physica A* **134**: 38-58
123. Lin, L.N.J.F. Brandts (1987). "*Evidence for the existence of three or more slow phases in the refolding of ribonuclease A and some characteristics of the phases.*" *Biochemistry* **26**(12): 3537-43
124. Schmid, F.X. (1981). "*A native-like intermediate on the ribonuclease A folding pathway. 1. Detection by tyrosine fluorescence changes.*" *Eur J Biochem* **114**(1): 105-9
125. Schmid, F.X. (1986). "*Proline isomerization during refolding of ribonuclease A is accelerated by the presence of folding intermediates.*" *FEBS Lett* **198**(2): 217-20
126. Houry, W.A.H.A. Scheraga (1996). "*Nature of the unfolded state of ribonuclease A: effect of cis-trans X-Pro peptide bond isomerization.*" *Biochemistry* **35**(36): 11719-33
127. Fischer, G.H. Bang (1985). "*The refolding of urea-denatured ribonuclease A is catalyzed by peptidyl-prolyl cis-trans isomerase.*" *Biochim Biophys Acta* **828**(1): 39-42
128. Lang, K., F.X. Schmid, and G. Fischer (1987). "*Catalysis of protein folding by prolyl isomerase.*" *Nature* **329**(6136): 268-70
129. Kohler, R., J. Fanghanel, et al. (2003). "*Biochemical and functional analyses of the Mip protein: influence of the N-terminal half and of peptidylprolyl isomerase activity on the virulence of Legionella pneumophila.*" *Infect Immun* **71**(8): 4389-97
130. Bossard, M.J., P.L. Koser, et al. (1991). "*A single Trp121 to Ala121 mutation in human cyclophilin alters cyclosporin A affinity and peptidyl-prolyl isomerase activity.*" *Biochem Biophys Res Commun* **176**: 1142-8
131. Kofron, J.L, et al. (1992). "*Lithium Chloride Perturbation of Cis-Trans Peptide Bond Equilibria - Effect on Conformational Equilibria in Cyclosporin-A and on Time-Dependent Inhibition of Cyclophilin.*" *J. Am. Chem. Soc.* **114**: 2670-2675
132. Gallo, P., F. Rossi, et al. (1998). "*Specific Interaction between Bovine Cyclophilin a and Synthetic Analogues of Cyclolinopeptide A.*" *Journal of Biochemistry* **124**: 880-885
133. Seebach, D, et al. (1994). "*Calorimetric Measurements of the Complexation of Cyclosporin A, Ascomycin, Fujimycin, and Rapamycin with Lithium Chloride and with an Immunophilin.*" *Helvetica Chimica Acta* **77**: 291-305
134. Braun, W., J. Kallen, et al. (1995). "*Three-dimensional structure and actions of immunosuppressants and their immunophilins.*" *FASEB Journal* **9**(1): 63-72
135. Handschumacher, R.E., M.W. Harding, et al. (1984). "*Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A.*" *Science* **226**: 544-7

136. Harding, M.W.R.E. Handschumacher (1988). "*Cyclophilin, a primary molecular target for cyclosporine. Structural and functional implications.*" Transplantation **46(2S)**: 29S-35S
137. Kuzmic, P., M.L. Moss, J.L. Kofron, and D.H. Rich (1992). "*Fluorescence displacement method for the determination of receptor-ligand binding constants.*" Analytical Biochemistry **205(1)**: 65-9
138. Zeder-Lutz, G., M.H. Van Regenmortel, R. Wenger, and D. Altschuh (1994). "*Interaction of cyclosporin A and two cyclosporin analogs with cyclophilin: relationship between structure and binding.*" Journal of Chromatography B: Biomedical Applications **662(2)**: 301-6
139. Janowski, B.G. Fischer (1997). "*Modulation of cyclosporin A/cyclophilin interactions by drug vehicles.*" Bioorg Med Chem **5**: 179-186
140. Ha, J.H., R.S. Spolar, and M.T. Record, Jr. (1989). "*Role of the hydrophobic effect in stability of site-specific protein-DNA complexes.*" J Mol Biol **209(4)**: 801-16
141. Hibbits, K.A., D.S. Gill, and R.C. Willson (1994). "*Isothermal titration calorimetric study of the association of hen egg lysozyme and the anti-lysozyme antibody HyHEL-5.*" Biochemistry **33(12)**: 3584-90
142. Swaminathan, C.P., A. Nandi, S.S. Visweswariah, and A. Surolia (1999). "*Thermodynamic analyses reveal role of water release in epitope recognition by a monoclonal antibody against the human guanylyl cyclase C receptor.*" Journal of Biological Chemistry **274(44)**: 31272-8
143. Dam, T.K., S. Oscarson, and C.F. Brewer (1998). "*Thermodynamics of binding of the core trimannoside of asparagine-linked carbohydrates and deoxy analogs to Dioclea grandiflora lectin.*" Journal of Biological Chemistry **273(49)**: 32812-7
144. Cervoni, L., I. Lascu, et al. (2001). "*Binding of nucleotides to nucleoside diphosphate kinase: a calorimetric study.*" Biochemistry **40(15)**: 4583-9
145. Bachhawat-Sikder, K., C.J. Thomas, and A. Surolia (2001). "*Thermodynamic analysis of the binding of galactose and poly-N-acetyllactosamine derivatives to human galectin-3.*" FEBS Lett **500(1-2)**: 75-9
146. Chervenak, M.C.E.J. Toone (1995). "*Calorimetric analysis of the binding of lectins with overlapping carbohydrate-binding ligand specificities.*" Biochemistry **34(16)**: 5685-95
147. Ladbury, J.E., J.G. Wright, J.M. Sturtevant, and P.B. Sigler (1994). "*A thermodynamic study of the trp repressor-operator interaction.*" J Mol Biol **238(5)**: 669-81
148. Faergeman, N.J., B.W. Sigurskjold, et al. (1996). "*Thermodynamics of ligand binding to acyl-coenzyme A binding protein studied by titration calorimetry.*" Biochemistry **35(45)**: 14118-26
149. Samland, A.K., I. Jelesarov, et al. (2001). "*Thermodynamic characterization of ligand-induced conformational changes in UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase.*" Biochemistry **40(33)**: 9950-6
150. Schwarz, F.P., D. Tello, et al. (1995). "*Thermodynamics of antigen-antibody binding using specific anti-lysozyme antibodies.*" European Journal of Biochemistry **228(2)**: 388-94
151. Ke, H., L.D. Zydowsky, J. Liu, and C.T. Walsh (1991). "*Crystal structure of recombinant human T-cell cyclophilin A at 2.5 Å resolution.*" Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 9483-9487
152. Mikol, V., J. Kallen, G. Pflugl, and M.D. Walkinshaw (1993). "*X-ray structure of a monomeric cyclophilin A-cyclosporin A crystal complex at 2.1 Å resolution.*" Journal of Molecular Biology **234(4)**: 1119-30
153. Augustijns, P.F., S.C. Brown, et al. (2000). "*Hydration changes implicated in the remarkable temperature-dependent membrane permeation of cyclosporin A.*" Biochemistry **39**: 7621-7630
154. Ottiger, M., O. Zerbe, P. Guntert, and K. Wuthrich (1997). "*The NMR solution conformation of unligated human cyclophilin A.*" Journal of Molecular Biology **272(1)**: 64-81
155. Kauzmann, W. (1959). "*Some factors in the interpretation of protein denaturation.*" Adv Protein Chem **14**: 1-63
156. Wintrode, P.L.P.L. Privalov (1997). "*Energetics of target peptide recognition by calmodulin: a calorimetric study.*" Journal of Molecular Biology **266(5)**: 1050-62
157. Kornblatt, M.J., J.A. Kornblatt, and G. Hui Bon Hoa (1993). "*The role of water in the dissociation of enolase, a dimeric enzyme.*" Arch Biochem Biophys **306(2)**: 495-500
158. Murphy, K.P.S.J. Gill (1991). "*Solid model compounds and the thermodynamics of protein unfolding.*" J Mol Biol **222(3)**: 699-709
159. Murphy, K.P., D. Xie, et al. (1993). "*Structural energetics of peptide recognition: angiotensin II/antibody binding.*" Proteins **15(2)**: 113-20
160. Murphy, K.P., D. Xie, et al. (1994). "*Entropy in biological binding processes: estimation of translational entropy loss.*" Proteins **18(1)**: 63-7
161. Bizzarri, A.R.S. Cannistraro (1993). "*Solvent modulation of the structural heterogeneity in FeIII myoglobin samples: a low temperature EPR investigation.*" Eur Biophys J **22(4)**: 259-67

162. Schlyer, B.D., D.G. Steel, and A. Gafni (1996). "Long time-scale probing of the protein globular core using hydrogen-exchange and room temperature phosphorescence." *Biochem Biophys Res Commun* **223**(3): 670-84
163. Butler, S.L.J.J. Falke (1996). "Effects of protein stabilizing agents on thermal backbone motions: a disulfide trapping study." *Biochemistry* **35**(33): 10595-600
164. Gekko, K. (1981). "Enthalpy and entropy of transfer of amino acids and diglycine from water to aqueous polyol solutions." *J Biochem (Tokyo)* **90**(6): 1643-52
165. Durr, E.I. Jelesarov (2000). "Thermodynamic analysis of cavity creating mutations in an engineered leucine zipper and energetics of glycerol-induced coiled coil stabilization." *Biochemistry* **39**(15): 4472-82
166. Gandour, R.D.R.L. Schowen, *Transition states of biochemical Processes*. 1978, New York and London: Plenum Press.
167. Scheiner, S.M. Cuma (1996). "Relative stability of hydrogen and Deuterium bonds." *Biochemistry* **118**(1): 1511-21
168. Schowen, K.B.R.L. Schowen (1982). "Solvent isotope effects of enzyme systems." *Methods Enzymol* **87**: 551-606
169. Connelly, P.R, et al. (1993). "Probing Hydration Contributions to the Thermodynamics of Ligand Binding by Proteins - Enthalpy and Heat Capacity Changes of Tacrolimus and Rapamycin Binding to FK506 Binding Protein in D2O and H2O." *Biochemistry* **32**: 5583-5590
170. Gastmans, M., G. Volckaert, and Y. Engelborghs (1999). "Tryptophan microstate reshuffling upon the binding of cyclosporin A to human cyclophilin A." *Proteins* **35**(4): 464-74
171. Yu, L.S.W. Fesik (1994). "pH titration of the histidine residues of cyclophilin and FK506 binding protein in the absence and presence of immunosuppressant ligands." *Biochimica et Biophysica Acta* **1209**(1): 24-32
172. Jelesarov, I.H.R. Bosshard (1994). "Thermodynamics of ferredoxin binding to ferredoxin:NADP+ reductase and the role of water at the complex interface." *Biochemistry* **33**(45): 13321-8
173. Shiao, D.D.J.M. Sturtevant (1976). "Heats of binding protons to globular proteins." *Biopolymers* **15**(6): 1201-11
174. Wolfenden, R. (2003). "Thermodynamic and extrathermodynamic requirements of enzyme catalysis." *Biophys Chem* **105**(2-3): 559-72
175. Theriault, Y., T.M. Logan, et al. (1993). "Solution structure of the cyclosporin A/cyclophilin complex by NMR." *Nature* **361**(6407): 88-91
176. Vogel, H.J.W.A. Bridger (1982). "A phosphorus 31 nuclear magnetic resonance study of the intermediates of the *Escherichia coli* succinyl coenzyme A synthetase reaction. Evidence for substrate synergism and catalytic cooperativity." *J Biol Chem* **257**(9): 4834-42
177. Ke, H., D. Mayrose, et al. (1994). "Crystal structures of cyclophilin A complexed with cyclosporin A and N-methyl-4-[(E)-2-butenyl]-4,4-dimethylthreonine cyclosporin A." *Structure* **2**(1): 33-44
178. Yoo, S., D.G. Myszka, et al. (1997). "Molecular recognition in the HIV-1 capsid/cyclophilin A complex." *J Mol Biol* **269**(5): 780-95
179. Jacobs, D.M., K. Saxena, et al. (2003). "Peptide binding induces large scale changes in inter-domain mobility in human Pin1." *J Biol Chem* **278**(28): 26174-82
180. Shen, T., C.F. Wong, and J.A. McCammon (2001). "Atomistic Brownian dynamics simulation of peptide phosphorylation." *J Am Chem Soc* **123**(37): 9107-11
181. Hoffmann, R., I. Reichert, et al. (1994). "1H and 31P NMR spectroscopy of phosphorylated model peptides." *Int J Pept Protein Res* **44**(3): 193-8
182. Bradshaw, J.M.G. Waksman (1998). "Calorimetric investigation of proton linkage by monitoring both the enthalpy and association constant of binding: application to the interaction of the Src SH2 domain with a high-affinity tyrosyl phosphopeptide." *Biochemistry* **37**(44): 15400-7
183. Christensen, J.J., L.D. Hansen, and R.M. Izatt, *Handbook of Proton Ionization*. 1976, New York: Wiley.
184. Fersht, A., *Structure and mechanism in protein science*. Vol. 25. 1999, New York: W. H. Freeman and Company. 485-6.
185. Henriques, D.A., J.E. Ladbury, and R.M. Jackson (2000). "Comparison of binding energies of SrcSH2-phosphotyrosyl peptides with structure-based prediction using surface area based empirical parameterization." *Protein Sci* **9**(10): 1975-85
186. Bradshaw, J.M., V. Mitaxov, and G. Waksman (1999). "Investigation of phosphotyrosine recognition by the SH2 domain of the Src kinase." *J Mol Biol* **293**(4): 971-85
187. Lemmon, M.A.J.E. Ladbury (1994). "Thermodynamic studies of tyrosyl-phosphopeptide binding to the SH2 domain of p56lck." *Biochemistry* **33**(17): 5070-6

188. Lubman, O.Y.G. Waksman (2002). "Dissection of the energetic coupling across the Src SH2 domain-tyrosyl phosphopeptide interface." *J Mol Biol* **316**(2): 291-304
189. Lubman, O.Y.G. Waksman (2003). "Structural and thermodynamic basis for the interaction of the Src SH2 domain with the activated form of the PDGF beta-receptor." *J Mol Biol* **328**(3): 655-68
190. Mandiyan, V., R. O'Brien, et al. (1996). "Thermodynamic studies of SHC phosphotyrosine interaction domain recognition of the NPXpY motif." *J Biol Chem* **271**(9): 4770-5
191. McNemar, C., M.E. Snow, et al. (1997). "Thermodynamic and structural analysis of phosphotyrosine polypeptide binding to Grb2-SH2." *Biochemistry* **36**(33): 10006-14
192. Bradshaw, J.M.G. Waksman (1999). "Calorimetric examination of high-affinity Src SH2 domain-tyrosyl phosphopeptide binding: dissection of the phosphopeptide sequence specificity and coupling energetics." *Biochemistry* **38**(16): 5147-54
193. Domchek, S.M., K.R. Auger, et al. (1992). "Inhibition of SH2 domain/phosphoprotein association by a nonhydrolyzable phosphonopeptide." *Biochemistry* **31**(41): 9865-70
194. Alberty, R.A.H. G.G. (1958). "Application of the Theory of Diffusion-controlled Reactions to Enzyme Kinetics." *J. Phys. Chem* **62**(2): 154-159
195. Williams, J.C.A.E. McDermott (1995). "Dynamics of the flexible loop of triosephosphate isomerase: the loop motion is not ligand gated." *Biochemistry* **34**(26): 8309-19
196. Renard, M.A.R. Fersht (1973). "Anomalous pH dependence of k_{cat} - K_M in enzyme reactions. Rate constants for the association of chymotrypsin with substrates." *Biochemistry* **12**(23): 4713-8
197. Kuhlewein, A., G. Voll, et al. (2004). "Solution structure of *Escherichia coli* Par10: The prototypic member of the Parvulin family of peptidyl-prolyl cis/trans isomerases." *Protein Sci* **13**(9): 2378-87
198. Dalvit, C., P. Floersheim, M. Zurini, and A. Widmer (1999). "Use of organic solvents and small molecules for locating binding sites on proteins in solutions." *J Biomol NMR* **14**(1): 23-32
199. Karsten, W.E., C.J. Lai, and P.F. Cook (1995). "Inverse solvent isotope effects in the NAD-malic enzyme reaction are the result of the viscosity difference between D₂O und H₂O: Implications for solvent isotope effect studies." *J. Am. Chem. Soc.* **117**: 5914-5918
200. Polgar, L. (1999). "Oligopeptidase B: a new type of serine peptidase with a unique substrate-dependent temperature sensitivity." *Biochemistry* **38**(47): 15548-55
201. Szeltner, Z.L. Polgar (1996). "Rate-determining steps in HIV-1 protease catalysis. The hydrolysis of the most specific substrate." *J Biol Chem* **271**(50): 32180-4
202. Park, C.R.T. Raines (2003). "Catalysis by ribonuclease A is limited by the rate of substrate association." *Biochemistry* **42**(12): 3509-18
203. Cleland, W.W. (1992). "Low-barrier hydrogen bonds and low fractionation factor bases in enzymatic reactions." *Biochemistry* **31**(2): 317-9
204. Loh, S.N.J.L. Markley (1994). "Hydrogen bonding in proteins as studied by amide hydrogen D/H fractionation factors: application to staphylococcal nuclease." *Biochemistry* **33**(4): 1029-36
205. Chung, H.H., D.R. Benson, and P.G. Schultz (1993). "Probing the structure and mechanism of Ras protein with an expanded genetic code." *Science* **259**(5096): 806-9
206. Langen, R., T. Schweins, and A. Warshel (1992). "On the mechanism of guanosine triphosphate hydrolysis in ras p21 proteins." *Biochemistry* **31**(37): 8691-6
207. Scheffzek, K., M.R. Ahmadian, et al. (1997). "The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants." *Science* **277**(5324): 333-8
208. Schowen, K.B., H.H. Limbach, G.S. Denisov, and R.L. Schowen (2000). "Hydrogen bonds and proton transfer in general-catalytic transition-state stabilization in enzyme catalysis." *Biochim Biophys Acta* **1458**(1): 43-62
209. Cai, L., A. Cao, and L. Lai (2001). "An isothermal titration calorimetric method to determine the kinetic parameters of enzyme catalytic reaction by employing the product inhibition as probe." *Anal Biochem* **299**(1): 19-23
210. Lonhienne, T., E. Baise, et al. (2001). "Enzyme activity determination on macromolecular substrates by isothermal titration calorimetry: application to mesophilic and psychrophilic chitinases." *Biochim Biophys Acta* **1545**(1-2): 349-56
211. Todd, M.J.J. Gomez (2001). "Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity?" *Anal Biochem* **296**(2): 179-87
212. Schmid, F.X.H. Blaschek (1981). "A native-like intermediate on the ribonuclease A folding pathway. 2. Comparison of its properties to native ribonuclease A." *Eur J Biochem* **114**(1): 111-7
213. Udgaonkar, J.B.R.L. Baldwin (1995). "Nature of the early folding intermediate of ribonuclease A." *Biochemistry* **34**(12): 4088-96

214. Wyckoff, H.W., D. Tsernoglou, et al. (1970). "The three-dimensional structure of ribonuclease-S. Interpretation of an electron density map at a nominal resolution of 2 Å." *J Biol Chem* **245**(2): 305-28
215. Dodge, R.W.H.A. Scheraga (1996). "Folding and unfolding kinetics of the proline-to-alanine mutants of bovine pancreatic ribonuclease A." *Biochemistry* **35**(5): 1548-59
216. Schmid, F.X. (1983). "Mechanism of folding of ribonuclease A. Slow refolding is a sequential reaction via structural intermediates." *Biochemistry* **22**(20): 4690-6
217. Udgaonkar, J.B.R.L. Baldwin (1988). "NMR evidence for an early framework intermediate on the folding pathway of ribonuclease A." *Nature* **335**(6192): 694-9
218. Udgaonkar, J.B.R.L. Baldwin (1990). "Early folding intermediate of ribonuclease A." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(21): 8197-201
219. Hagerman, P.J.R.L. Baldwin (1976). "A quantitative treatment of the kinetics of the folding transition of ribonuclease A." *Biochemistry* **15**(7): 1462-73
220. Garel, J.R.R.L. Baldwin (1973). "Both the fast and slow refolding reactions of ribonuclease A yield native enzyme." *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**(12): 3347-51
221. Garel, J.R.R.L. Baldwin (1975). "A physical difference between the fast- and slow-refolding forms of nitrotyrosyl ribonuclease A: the pK values of the nitrotyrosyl groups." *J Mol Biol* **94**(4): 621-32
222. Garel, J.R.R.L. Baldwin (1975). "The heat-unfolded state of ribonuclease A is an equilibrium mixture of fast and slow refolding species." *J Mol Biol* **94**(4): 611-20
223. Garel, J.R., B.T. Nall, and R.L. Baldwin (1976). "Guanidine-unfolded state of ribonuclease A contains both fast- and slow-refolding species." *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(6): 1853-7
224. Mui, P.W., Y. Konishi, and H.A. Scheraga (1985). "Kinetics and mechanism of the refolding of denatured ribonuclease A." *Biochemistry* **24**(16): 4481-9
225. Rehage, A.F.X. Schmid (1982). "Fast- and slow-refolding forms of unfolded ribonuclease A differ in tyrosine fluorescence." *Biochemistry* **21**(7): 1499-505
226. Cook, K.H., F.X. Schmid, and R.L. Baldwin (1979). "Role of proline isomerization in folding of ribonuclease A at low temperatures." *PNAS* **76**(12): 6157-61
227. Makhatadze, G.I.P.L. Privalov (1992). "Protein interactions with urea and guanidinium chloride. A calorimetric study." *J Mol Biol* **226**(2): 491-505
228. Schoetz, G., O. Trapp, and V. Schurig (2001). "Determination of the cis-trans isomerization barrier of several L-peptidyl-L-proline dipeptides by dynamic capillary electrophoresis and computer simulation." *Electrophoresis* **22**(12): 2409-15
229. Grathwohl, C.K. Wüthrich (1981). "NMR Studies of the Rates of Proline Cis-Trans Isomerization in Oligopeptides." *Biopolymers* **20**: 2623-33
230. Troganis, A., I.P. Gerotheranassis, et al. (2000). "Thermodynamic origin of cis/trans isomers of a proline-containing beta-turn model dipeptide in aqueous solution: a combined variable temperature 1H-NMR, two-dimensional 1H,1H gradient enhanced nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY), one-dimensional steady-state intermolecular 13C,1H NOE, and molecular dynamics study." *Biopolymers* **53**(1): 72-83
231. Wu, W.J.D.P. Raleigh (1998). "Local control of peptide conformation: stabilization of cis proline peptide bonds by aromatic proline interactions." *Biopolymers* **45**(5): 381-94
232. Joseph, J.D., J. Heitman, and A.R. Means (1999). "Molecular cloning and characterization of *Aspergillus nidulans* cyclophilin B." *Fungal Genet Biol* **27**(1): 55-66
233. Derkx, P.M.S.M. Madrid (2001). "The *Aspergillus niger* cypA gene encodes a cyclophilin that mediates sensitivity to the immunosuppressant cyclosporin A." *Mol Genet Genomics* **266**(4): 527-36
234. Derkx, P.M.S.M. Madrid (2001). "The foldase CYPB is a component of the secretory pathway of *Aspergillus niger* and contains the endoplasmic reticulum retention signal HEEL." *Mol Genet Genomics* **266**(4): 537-45
235. Grebe, M., J. Gadea, et al. (2000). "A conserved domain of the arabidopsis GNOM protein mediates subunit interaction and cyclophilin 5 binding." *Plant Cell* **12**(3): 343-56
236. Lippuner, V., I.T. Chou, et al. (1994). "Cloning and characterization of chloroplast and cytosolic forms of cyclophilin from *Arabidopsis thaliana*." *J Biol Chem* **269**(11): 7863-8
237. Page, A.P., D. Landry, G.G. Wilson, and C.K. Carlow (1995). "Molecular characterization of a cyclosporin A-insensitive cyclophilin from the parasitic nematode *Brugia malayi*." *Biochemistry* **34**(36): 11545-50
238. Ma, D., X. Hong, et al. (1996). "A Cyclosporin A-sensitive small molecular weight cyclophilin of filarial parasites." *Mol Biochem Parasitol* **79**(2): 235-41

239. Achenbach, T.V., S.F. Gothel, and M.A. Marahiel (1997). "Histidine 109 in peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of *Bacillus subtilis* plays an important role in catalysis and in cyclosporin A binding." FEMS Microbiol Lett **154**(1): 139-44
240. Bose, S., M. Mucke, and R.B. Freedman (1994). "The characterization of a cyclophilin-type peptidyl prolyl cis-trans-isomerase from the endoplasmic-reticulum lumen." Biochem J **300 (Pt 3)**: 871-5
241. Koser, P.L., G.P. Livi, et al. (1990). "A *Candida albicans* homolog of a human cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase." Gene **96**(2): 189-95
242. Page, A.P., K. MacNiven, and M.O. Hengartner (1996). "Cloning and biochemical characterization of the cyclophilin homologues from the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*." Biochem J **317 (Pt 1)**: 179-85
243. Ma, D., L.S. Nelson, et al. (2002). "A novel cyclophilin from parasitic and free-living nematodes with a unique substrate- and drug-binding domain." J Biol Chem **277**(17): 14925-32
244. Skruzny, M., M. Ambrozokova, et al. (2001). "Cyclophilins of a novel subfamily interact with SNW/SKIP coregulator in *Dictyostelium discoideum* and *Schizosaccharomyces pombe*." Biochim Biophys Acta **1521**(1-3): 146-51
245. Cavarec, L., T. Kamphausen, et al. (2002). "Identification and characterization of Moca-cyp. A *Drosophila melanogaster* nuclear cyclophilin." J Biol Chem **277**(43): 41171-82
246. Hong, X., D. Ma, and C.K. Carlow (1998). "Cloning, expression and characterization of a new filarial cyclophilin." Mol Biochem Parasitol **91**(2): 353-8
247. Ostoa-Saloma, P., J. Cesar Carrero, et al. (2000). "Cloning, characterization and functional expression of a cyclophilin of *Entamoeba histolytica*." Mol Biochem Parasitol **107**(2): 219-25
248. Nagashima, K., S. Mitsuhashi, K. Kamino, and T. Maruyama (1994). "Cyclosporin A sensitive peptidyl-prolyl cis-trans isomerase in a halophilic archaeum, *Halobacterium cutirubrum*." Biochem Biophys Res Commun **198**(2): 466-72
249. Rinfret, A., C. Collins, R. Menard, and S.K. Anderson (1994). "The N-terminal cyclophilin-homologous domain of a 150-kilodalton tumor recognition molecule exhibits both peptidylprolyl cis-trans-isomerase and chaperone activities." Biochemistry **33**(7): 1668-73
250. Kieffer, L.J., T. Thalhammer, and R.E. Handschumacher (1992). "Isolation and characterization of a 40-kDa cyclophilin-related protein." J Biol Chem **267**(8): 5503-7
251. Teigelkamp, S., T. Achsel, et al. (1998). "The 20kD protein of human [U4/U6.U5] tri-snRNPs is a novel cyclophilin that forms a complex with the U4/U6-specific 60kD and 90kD proteins." Rna **4**(2): 127-41
252. Bergsma, D.J., C. Eder, et al. (1991). "The cyclophilin multigene family of peptidyl-prolyl isomerases. Characterization of three separate human isoforms." J Biol Chem **266**(34): 23204-14
253. Gasser, C.S., D.A. Gunning, K.A. Budelier, and S.M. Brown (1990). "Structure and expression of cytosolic cyclophilin/peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of higher plants and production of active tomato cyclophilin in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(24): 9519-23
254. Rascher, C., A. Pahl, et al. (1998). "*Leishmania major* parasites express cyclophilin isoforms with an unusual interaction with calcineurin." Biochem J **334 (Pt 3)**: 659-67
255. Schmidt, B., T. Tradler, et al. (1996). "A cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Legionella pneumophila*-characterization, molecular cloning and overexpression." Mol Microbiol **21**(6): 1147-60
256. Schonbrunner, E.R., S. Mayer, et al. (1991). "Catalysis of protein folding by cyclophilins from different species." J Biol Chem **266**(6): 3630-5
257. Faou, P.M. Tropschug (2003). "A novel binding protein for a member of CyP40-type Cyclophilins: *N.crassa* CyPBP37, a growth and thiamine regulated protein homolog to yeast *Thi4p*." J Mol Biol **333**(4): 831-44
258. Chen, H., X.L. Li, and L.G. Ljungdahl (1995). "A cyclophilin from the polycentric anaerobic rumen fungus *Orpinomyces sp. strain PC-2* is highly homologous to vertebrate cyclophilin B." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(7): 2587-91
259. Reddy, G.R. (1995). "Cloning and characterization of a *Plasmodium falciparum* cyclophilin gene that is stage-specifically expressed." Mol Biochem Parasitol **73**(1-2): 111-21
260. Hirtzlin, J., P.M. Farber, R.M. Franklin, and A. Bell (1995). "Molecular and biochemical characterization of a *Plasmodium falciparum* cyclophilin containing a cleavable signal sequence." Eur J Biochem **232**(3): 765-72
261. Mortillaro, M.J.R. Berezney (1998). "Matrin CYP, an SR-rich cyclophilin that associates with the nuclear matrix and splicing factors." J Biol Chem **273**(14): 8183-92
262. Connern, C.P.A.P. Halestrap (1992). "Purification and N-terminal sequencing of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin." Biochem J **284 (Pt 2)**: 381-5
263. Cardenas, M.E., E. Lim, and J. Heitman (1995). "Mutations that perturb cyclophilin A ligand binding pocket confer cyclosporin A resistance in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **270**(36): 20997-1002

264. Scholz, C., P. Maier, et al. (1999). "R73A and H144Q mutants of the yeast mitochondrial cyclophilin Cpr3 exhibit a low prolyl isomerase activity in both peptide and protein-folding assays." *FEBS Lett* **443**(3): 367-9
265. Warth, R., P.A. Briand, and D. Picard (1997). "Functional analysis of the yeast 40 kDa cyclophilin Cyp40 and its role for viability and steroid receptor regulation." *Biol Chem* **378**(5): 381-91
266. Mayr, C., K. Richter, H. Lilie, and J. Buchner (2000). "Cpr6 and Cpr7, two closely related Hsp90-associated immunophilins from *Saccharomyces cerevisiae*, differ in their functional properties." *J Biol Chem* **275**(44): 34140-6
267. Bugli, F., A. Khattab, et al. (1998). "Expression cloning and biochemical characterizations of recombinant cyclophilin proteins from *Schistosoma mansoni*." *Protein Expr Purif* **12**(3): 340-6
268. Kiang, D., N.E. El Ghazalie, et al. (1996). "Identification and characterization of *Schistosoma mansoni* p17.7, a cyclophilin." *Mol Biochem Parasitol* **76**(1-2): 73-82
269. Pemberton, T.J., S.L. Rulten, and J.E. Kay (2003). "Identification and characterisation of *Schizosaccharomyces pombe* cyclophilin 3, a cyclosporin A insensitive orthologue of human USA-CyP." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **786**(1-2): 81-91
270. Pahl, A., M. Uhlein, et al. (1992). "Streptomyces possess peptidyl-prolyl cis-trans isomerases that strongly resemble cyclophilins from eukaryotic organisms." *Mol Microbiol* **6**(23): 3551-8
271. Pahl, A., A. Gewies, and U. Keller (1997). "ScCypB is a novel second cytosolic cyclophilin from *Streptomyces chrysomallus* which is phylogenetically distant from ScCypA." *Microbiology* **143** (Pt 1): 117-26
272. Bua, J., L. Aslund, et al. (2001). "Characterisation of a cyclophilin isoform in *Trypanosoma cruzi*." *FEMS Microbiol Lett* **200**(1): 43-7
273. High, K.P., K.A. Joiner, and R.E. Handschumacher (1994). "Isolation, cDNA sequences, and biochemical characterization of the major cyclosporin-binding proteins of *Toxoplasma gondii*." *J Biol Chem* **269**(12): 9105-12
274. Kano, R., Y. Nakamura, et al. (2000). "Characterization of the cyclophilin of *Trichophyton mentagrophytes*." *Microbiol Immunol* **44**(1): 51-6
275. Takaki, Y., T. Muta, and S. Iwanaga (1997). "A peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase (cyclophilin G) in regulated secretory granules." *J Biol Chem* **272**(45): 28615-21
276. Zocher, R., U. Keller, C. Lee, and K. Hoffmann (1992). "A seventeen kilodaltons peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of the cyclosporin-producer *Tolypocladium inflatum* is sensitive to cyclosporin A." *J Antibiot (Tokyo)* **45**(2): 265-8
277. Luan, S., W.S. Lane, and S.L. Schreiber (1994). "pCyp B: a chloroplast-localized, heat shock-responsive cyclophilin from fava bean." *Plant Cell* **6**(6): 885-92
278. Miele, R., M. Borro, et al. (2003). "A peptidylprolyl cis/trans isomerase from *Xenopus laevis* skin: cloning, biochemical characterization and putative role in the secretion." *Peptides* **24**(11): 1713-21
279. Sheldon, P.S.M.A. Venis (1996). "Purification and characterization of cytosolic and microsomal cyclophilins from maize (*Zea mays*)." *Biochem J* **315** (Pt 3): 965-70
280. Fanghanel, J.G. Fischer (2003). "Thermodynamic characterization of the interaction of human cyclophilin 18 with cyclosporin A." *Biophys Chem* **100**(1-3): 351-66
281. Zarnt, T., K. Lang, H. Burtscher, and G. Fischer (1995). "Time-dependent inhibition of peptidylprolyl cis-trans-isomerases by FK506 is probably due to cis-trans isomerization of the inhibitor's imide bond." *Biochem J* **305** (Pt 1): 159-64
282. Lam, E., M.M. Martin, et al. (1995). "A novel FK506 binding protein can mediate the immunosuppressive effects of FK506 and is associated with the cardiac ryanodine receptor." *J Biol Chem* **270**(44): 26511-22
283. Futer, O., M.T. DeCenzo, R.A. Aldape, and D.J. Livingston (1995). "FK506 binding protein mutational analysis. Defining the surface residue contributions to stability of the calcineurin co-complex." *J Biol Chem* **270**(32): 18935-40
284. Jin, Y.J., S.J. Burakoff, and B.E. Bierer (1992). "Molecular cloning of a 25-kDa high affinity rapamycin binding protein, FKBP25." *J Biol Chem* **267**(16): 10942-5
285. Ma, D.C.K. Carlow (1999). "Molecular characterization of FKBP13 from filarial parasites." *Mol Biochem Parasitol* **99**(2): 263-7
286. Galat, A., W.S. Lane, R.F. Standaert, and S.L. Schreiber (1992). "A rapamycin-selective 25-kDa immunophilin." *Biochemistry* **31**(8): 2427-34
287. Mo, Y.Y., N.P. Cianciotto, and L.P. Mallavia (1995). "Molecular cloning of a *Coxiella burnetii* gene encoding a macrophage infectivity potentiator (Mip) analogue." *Microbiology* **141** (Pt 11): 2861-71
288. Lundemose, A.G., J.E. Kay, and J.H. Pearce (1993). "Chlamydia trachomatis Mip-like protein has peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity that is inhibited by FK506 and rapamycin and is implicated in initiation of chlamydial infection." *Mol Microbiol* **7**(5): 777-83

289. Rahfeld, J.U., K.P. Rucknagel, et al. (1996). "Isolation and amino acid sequence of a new 22-kDa FKBP-like peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase of *Escherichia coli*. Similarity to Mip-like proteins of pathogenic bacteria." *J Biol Chem* **271**(36): 22130-8
290. Bang, H., A. Pecht, et al. (2000). "Prolyl isomerases in a minimal cell. Catalysis of protein folding by trigger factor from *Mycoplasma genitalium*." *Eur J Biochem* **267**(11): 3270-80
291. Furutani, M., T. Iida, et al. (1998). "Biochemical and genetic characterization of an FK506-sensitive peptidyl prolyl cis-trans isomerase from a thermophilic archaeon, *Methanococcus thermolithotrophicus*." *J Bacteriol* **180**(2): 388-94
292. Solscheid, B.M. Tropschug (2000). "A novel type of FKBP in the secretory pathway of *Neurospora crassa*." *FEBS Lett* **480**(2-3): 118-22
293. Tropschug, M., E. Wachter, et al. (1990). "Isolation and sequence of an FK506-binding protein from *N. crassa* which catalyzes protein folding." *Nature* **346**(6285): 674-7
294. Sampson, B.A.E.C. Gotschlich (1992). "*Neisseria meningitidis* encodes an FK506-inhibitable rotamase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(4): 1164-8
295. Ideno, A., M. Furutani, et al. (2002). "FK506 binding protein from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* suppresses the aggregation of proteins in *Escherichia coli*." *Appl Environ Microbiol* **68**(2): 464-9
296. Nielsen, J.B., F. Foor, et al. (1992). "Yeast FKBP-13 is a membrane-associated FK506-binding protein encoded by the nonessential gene *FKB2*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(16): 7471-5
297. Manning-Krieg, U.C., R. Henriquez, et al. (1994). "Purification of FKBP-70, a novel immunophilin from *Saccharomyces cerevisiae*, and cloning of its structural gene, *FPR3*." *FEBS Lett* **352**(1): 98-103
298. Alnemri, E.S., T. Fernandes-Alnemri, et al. (1994). "FKBP46, a novel *Sf9* insect cell nuclear immunophilin that forms a protein-kinase complex." *J Biol Chem* **269**(49): 30828-34
299. Luan, S., J. Kudla, W. Gruissem, and S.L. Schreiber (1996). "Molecular characterization of a FKBP-type immunophilin from higher plants." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(14): 6964-9
300. Pirkl, F.J. Buchner (2001). "Functional analysis of the Hsp90-associated human peptidyl prolyl cis/trans isomerases FKBP51, FKBP52 and *Cyp40*." *J Mol Biol* **308**(4): 795-806
301. Peattie, D.A., M.W. Harding, et al. (1992). "Expression and characterization of human FKBP52, an immunophilin that associates with the 90-kDa heat shock protein and is a component of steroid receptor complexes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(22): 10974-8
302. Sinars, C.R., J. Cheung-Flynn, et al. (2003). "Structure of the large FK506-binding protein FKBP51, an Hsp90-binding protein and a component of steroid receptor complexes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(3): 868-73
303. Sewell, T.J., E. Lam, et al. (1994). "Inhibition of calcineurin by a novel FK-506-binding protein." *J Biol Chem* **269**(33): 21094-102
304. Carol, R.L., A. Breimann, et al. (2001). "*PASTICCINO1* (*AtFKBP70*) is a nuclear-localised immunophilin required during *Arabidopsis thaliana* embryogenesis." *Plant Science* **161**(3): 527-535
305. Shadidy, M., X. Caubit, et al. (1999). "Biochemical analysis of mouse FKBP60, a novel member of the FKBP family." *Biochim Biophys Acta* **1446**(3): 295-307
306. Coss, M.C., D. Winterstein, R.C. Sowder, 2nd, and S.L. Simek (1995). "Molecular cloning, DNA sequence analysis, and biochemical characterization of a novel 65-kDa FK506-binding protein (FKBP65)." *J Biol Chem* **270**(49): 29336-41
307. Marquis-Omer, D., G. Sanyal, et al. (1991). "Stabilization of the FK506 binding protein by ligand binding." *Biochem Biophys Res Commun* **179**(2): 741-8
308. DeCenzo, M.T., S.T. Park, et al. (1996). "FK506-binding protein mutational analysis: defining the active-site residue contributions to catalysis and the stability of ligand complexes." *Protein Eng* **9**(2): 173-80
309. Yang, W., L.W. Rozamus, et al. (2000). "Investigating protein-ligand interactions with a mutant FKBP possessing a designed specificity pocket." *J Med Chem* **43**(6): 1135-42
310. Vitikainen, M., I. Lappalainen, et al. (2004). "Structure-function analysis of *PrsA* reveals roles for the parvulin-like and flanking N- and C-terminal domains in protein folding and secretion in *Bacillus subtilis*." *J Biol Chem*
311. Dartigalongue, C.S. Raina (1998). "A new heat-shock gene, *ppiD*, encodes a peptidyl-prolyl isomerase required for folding of outer membrane proteins in *Escherichia coli*." *Embo J* **17**(14): 3968-80
312. Yao, J.L., O. Kops, P.J. Lu, and K.P. Lu (2001). "Functional conservation of phosphorylation-specific prolyl isomerases in plants." *J Biol Chem* **276**(17): 13517-23
313. Metzner, M., G. Stoller, et al. (2001). "Functional replacement of the essential *ESS1* in yeast by the plant parvulin *DIPar13*." *J Biol Chem* **276**(17): 13524-9

314. Kops, O., C. Eckerskorn, et al. (1998). "*Ssp1*, a site-specific parvulin homolog from *Neurospora crassa* active in protein folding." J Biol Chem **273**(48): 31971-6
315. Winkler, K.E., K.I. Swenson, S. Kornbluth, and A.R. Means (2000). "Requirement of the prolyl isomerase *Pin1* for the replication checkpoint." Science **287**(5458): 1644-7

Anhänge

Tabelle 7-1: Übersicht über Cyclophiline, deren PPIase-Aktivität mittels eines *in vitro*-PPIase-Aktivitätstest experimentell untersucht wurde. Wenn nicht anders vermerkt, wurde der proteasegekoppelte PPIase-Aktivitätstest mit dem Substrat Suc-AAPF-pNA verwendet.

Organismus	Name des Enzyms/ generischer Name	Swissprot- Datenbank-Eintrag	k_{kat}/K_M (M ⁻¹ s ⁻¹)	Ref.
<i>A. nidulans</i>	CypB / Cyp23	O94190	aktiv	[232]
<i>A. niger</i>	CypA / Cyp19	O94184	aktiv	[233]
<i>A. niger</i>	CypB / Cyp23	Q8X166	aktiv	[234]
<i>A. thaliana</i>	AtCyp22	P34790	$5,7 \cdot 10^6$	[235]
<i>A. thaliana</i>	AtCyp28	P34791	aktiv	[236]
<i>B. malayi</i>	Cyp-1 / Cyp98	Q27450	$7,5 \cdot 10^6$	[237]
<i>B. malayi</i>	Cyp-2 / Cyp19	Q17246	$1,23 \cdot 10^7$	[238]
<i>B. subtilis</i>	PPiB / Cyp15	P35137	$1,1 \cdot 10^6$	[239]
<i>B. taurus</i>	CypA / Cyp18	P04374	$1,3 \cdot 10^7$	[51]
<i>B. taurus</i>	CypB / Cyp23	P80311	$3,0 \cdot 10^6$	[240]
<i>C. albicans</i>	Cyp1 / Cyp18	P22011	aktiv	[241]
<i>C. elegans</i>	cyp-1 / Cyp21	P52009	$7,0 \cdot 10^4$	[242]
<i>C. elegans</i>	cyp-2 / Cyp18,5	P52010	$6,1 \cdot 10^5$	[242]
<i>C. elegans</i>	cyp-3 / Cyp18,6	P52011	$3,6 \cdot 10^5$	[242]
<i>C. elegans</i>	cyp-4 / Cyp59	P52012	$1,8 \cdot 10^4$	[242]
<i>C. elegans</i>	cyp-5 / Cyp22	P52013	$7,4 \cdot 10^4$	[242]
<i>C. elegans</i>	cyp-6 / Cyp21,9	P52014	$8,4 \cdot 10^6$	[242]
<i>C. elegans</i>	cyp-8 / Cyp54	P52016	$1,95 \cdot 10^4$	[242]
<i>C. elegans</i>	cyp-9 / Cyp36	Q09637	$1,5 \cdot 10^4$	[242]
<i>C. elegans</i>	Cyp-10 / Cyp18	P52017	$1,9 \cdot 10^4$	[242]
<i>C. elegans</i>	Cyp-11 / Cyp20	P52018	$1,5 \cdot 10^4$	[242]
<i>C. elegans</i>	CeCyp-16 / Cyp25	Q9XXI7	$2 \cdot 10^3$ a)	[243]
<i>D. discoideum</i>	CypE / Cyp17	Q9NI62	aktiv	[244]
<i>D. melanogaster</i>	Moca-CypA / Cyp113	Q8ISE5	$5,6 \cdot 10^4$	[245]
<i>D. immitis</i>	Dicyp-3 / Cyp60	O61300	$3,95 \cdot 10^5$	[246]
<i>E. coli</i>	CypA / Cyp20	P20752	$5,71 \cdot 10^7$	[45]

<i>E. coli</i>	CypB / Cyp18	P23869	$6,74 \cdot 10^7$	[45]
<i>E. histolytica</i>	EhCyp / Cyp18	O15729	aktiv	[247]
<i>H. cutirubrum</i>	Cyp19	O50586	aktiv	[248]
<i>H. sapiens</i>	NKCR_HUMAN / Cyp166	P30414	$7,5 \cdot 10^5$	[249]
<i>H. sapiens</i>	Cyp 40	Q08752	$1,9 \cdot 10^6$	[250]
<i>H. sapiens</i>	SnuCyp-20	O43447	aktiv	[251]
<i>H. sapiens</i>	Cyp18	P05092	$1,3 \cdot 10^7$ ^{b)}	[107]
<i>H. sapiens</i>	CypB / Cyp23	P23284	$1,1 \cdot 10^7$	[252]
<i>H. sapiens</i>	CypF / Cyp22	P30405	$2,3 \cdot 10^7$	[252]
<i>L. esculentum</i>	CypA / Cyp18	P21568	aktiv	[253]
<i>L. major</i>	LmCyp19	O02614	$1,6 \cdot 10^6$	[254]
<i>L. pneumophila</i>	lpCyp18	Q48822	$4,6 \cdot 10^6$	[255]
<i>N. crassa</i>	CPH / Cyp24	P10255	$2,8 \cdot 10^6$	[256]
<i>N. crassa</i>	NcCyP41	Q9P3X9	$6,5 \cdot 10^5$	[257]
<i>O. volvulus</i>	OvCyp16	Q8IA80	$5,2 \cdot 10^2$ ^{c)}	[243]
<i>Orpinomyces</i> sp.	CypB / Cyp22	Q01490	$9,3 \cdot 10^6$	[258]
<i>P. falciparum</i>	PFCyP / Cyp25	Q8I6S4	aktiv	[259]
<i>P. falciparum</i>	PFCyP / Cyp22	Q8IHK8	$2,3 \cdot 10^6$	[260]
<i>R. norvegicus</i>	Matrin CYP / Cyp88	O55035	$1,0 \cdot 10^6$	[261]
<i>R. norvegicus</i>	CypF / Cyp22	P29117	$0,9 \cdot 10^6$	[262]
<i>S. cerevisiae</i>	Cpr1 / Cyp17	P14832	aktiv	[263]
<i>S. cerevisiae</i>	Cpr3 / Cyp20	P25719	$5,8 \cdot 10^6$	[264]
<i>S. cerevisiae</i>	Cpr6 / Cyp42	P53691	$5 \cdot 10^5$	[265]
<i>S. cerevisiae</i>	Cpr7 / Cyp45	P47103	$7 \cdot 10^4$	[266]
<i>S. mansoni</i>	SmCypB / Cyp23	Q26551	$8,2 \cdot 10^5$	[267]
<i>S. mansoni</i>	SmCypA / Cyp31	Q26548	$3,65 \cdot 10^5$	[267]
<i>S. mansoni</i>	Smp17,7	Q26565	aktiv ^{d)}	[268]
<i>S. pombe</i>	SpCyp3 / Cyp19	O74729	$1,5 \cdot 10^6$	[269]
<i>S. chrysomallus</i>	ScCYPA / Cyp18	Q06118	$3,73 \cdot 10^6$	[270]
<i>S. chrysomallus</i>	ScCYPB / Cyp19	P77949	$7,5 \cdot 10^6$	[271]
<i>T. cruzi</i>	TcCyP19	AI021872 ^{e)}	aktiv	[272]
<i>T. gondii</i>	cyp18,5	Q26994	aktiv	[273]
<i>T. gondii</i>	cyp20	Q26995	aktiv	[273]
<i>T. mentagrophytes</i>	Cyp13	B019518	aktiv	[274]
<i>T. tridentatus</i>	CypG / Cyp24	O44073	$1,8 \cdot 10^5$ ^{f)}	[275]
<i>T. inflatum</i>	/ Cyp25	Q99009	aktiv	[276]
<i>V. faba</i>	CypB / Cyp27	Q41651	aktiv	[277]

<i>X. laevis</i>	XlCyp / Cyp17	AJ49679 ^{a)}	1,1·10 ⁷	[278]
<i>Z. mays</i>	zmCyp18	P21569	1,1·10 ⁷	[279]
<i>Z. mays</i>	CypB	Q10724 ^{h)}	2,5·10 ⁷	[279]

Die aufgeführten enzymatischen Konstanten wurden wie in den jeweiligen Publikationen beschrieben erhalten. Der generische Name wurde angegeben, wenn der in der Publikation verwendete Name nicht der allgemeinen Konvention entsprach. Für PPIasen besteht der generische Name aus der Abkürzung der der PPIase-Familie, gefolgt vom gerundeten Molekulargewicht.

a) Suc-AVPF-pNA wurde als Substrat verwendet.

b) Die Anzahl der aktiven Zentren für diese Enzyme wurden bestimmt [280].

c) Suc-ALPF-pNA wurde als Substrat verwendet.

d) Das verwendete Substrat wurde nicht beschrieben.

e) Kein Swissprot-Datenbank-Eintrag vorhanden, deshalb wurde die SRS EMBL „nucleotide accession number“ aufgeführt.

f) Suc-AAPF-mca wurde als Substrat verwendet.

g) Kein Swissprot-Datenbank-Eintrag vorhanden, deshalb wurde die SRS EMBL „protein accession number“ aufgeführt.

h) Keine Sequenzdaten verfügbar.

Tabelle 7-2: Einträge von Cyclophilinen in der Proteinstrukturdatenbank

Organismus	Name des Enzyms	Anzahl der Strukturen	RCSB-Datenbank-Eintrag
<i>H. sapiens</i>	Cyp18	45	1ak4, 1awq, 1awr, 1aws, 1awt, 1awu, 1bck, 1cwa, 1cwb, 1cwc, 1cwf, 1cwh, 1cwi, 1cwj, 1cwk, 1cwm, 1cwl, 1cwo, 1cya, 1cyb, 1fgl, 1m63, 1m9c, 1m9d, 1m9e, 1m9f, 1m9x, 1m9y, 1mf8, 1mik, 1nmk, 1oca, 1rmh, 1vbs, 1vbt, 2cpl, 2cyh, 2rma, 2rmb, 3cyh, 3cys, 4cyh, 5cyh, 1w8l, 1w8m, 1w8v
<i>H. sapiens</i>	CypB	1	1cyn
<i>H. sapiens</i>	SnuCyp-20	2	1mzw, 1qoi
<i>H. sapiens</i>	CypD	2	2biu, 2bit
<i>B. malayi</i>	CYP-1	3	1a58, 1a33, 1c5f
<i>M. musculus</i>	CypA	1	1w74
<i>M. tuberculosis</i>	CypC	1	2rmc
<i>C. elegans</i>	Cyp-3	3	1dyw, 1e3b, 1e8k
<i>C. elegans</i>	Cyp-5	1	1hop
<i>P. falciparum</i>	Cyp18	2	1qng, 1qnh
<i>B. taurus</i>	Cyp40	2	1ihg, 1iip
<i>E. coli</i>	CypB	4	1clh, 1csa, 1v9t, 1vai, 1j2a
<i>E. coli</i>	CypA	2	1lop, 2nul
<i>S. cerevisiae</i>	Cpr-1	1	1ist
<i>M. tuberculosis</i>	PPIA	1	1w74

Tabelle 7-3: Konservierte Aminosäurereste im aktiven Zentrum der auf ihre enzymatische Aktivität untersuchten Cyclophiline. Die Aktivität wurde mit dem Substrat Suc-AAPF-pNA gemessen.

Aminosäurerest (hCyp18- Nomenklatur)	Anzahl der Austausche	Organismus / Name des Proteins	Austausch zu	k_{kat}/K_M ($M^{-1} s^{-1}$)	Swissprot- Datenbank- Eintrag
I57	6	<i>C. elegans</i> / Cyp-9	V	$1,5 \cdot 10^4$	Q09637
		<i>C. elegans</i> / Cyp-16	V	$2 \cdot 10^3$ ^a	Q9XXI7
		<i>R. norvegicus</i> / MatrIn CYP	V	$1,0 \cdot 10^6$	O55035
		<i>H. sapiens</i> / NKCR_HUMAN	V	$7,5 \cdot 10^5$	P30414
		<i>S. cerevisiae</i> / Cpr7	V	$7 \cdot 10^4$	P47103
		<i>D. melanogaster</i> / Moca-CypA	V	$5,6 \cdot 10^4$	Q8ISE5
N102	5	<i>E. coli</i> / CypA	T	$5,71 \cdot 10^7$	P20752
		<i>E. coli</i> / CypB	T	$6,74 \cdot 10^7$	P23869
		<i>B. subtilis</i> / PPIB	H	$1,1 \cdot 10^6$	P35137
		<i>L. pneumophila</i> / Cyp18	R	$4,6 \cdot 10^6$	Q48822
		<i>O. volvulus</i> / Cyp16	S	$5,2 \cdot 10^2$ ^a	Q8IA80
L122	1	<i>C. elegans</i> / Cyp-9	C	$1,5 \cdot 10^4$	Q09637
H126	4	<i>E. coli</i> / CypA	Y	$5,71 \cdot 10^7$	P20752
		<i>E. coli</i> / CypB	Y	$6,74 \cdot 10^7$	P23869
		<i>C. elegans</i> / Cyp-10	Y	$1,9 \cdot 10^4$	P52017
		<i>P. falciparum</i> / CyP	N	n. b.	Q8I6S4

Das Enzym war mit dem Substrat Suc-AAPF-pNA nicht aktiv, der Wert wurde mit dem Substrat Suc-ALPF-pNA bestimmt.

Die Reste R55, F60, Q63, A101, Q111 und F113 waren in allen Sequenzen konserviert.

Tabelle 7-4: Relative Aktivitäten von rekombinant exprimierten hCyp18-Varianten [57]

Protein	% Aktivität relativ zum Wildtyp
Wildtyp	100
H54Q	15,0
R55A	0,1
F60A	0,32
Q111A	15,0
F113A	3,0
W121A	8,7
H126Q	0,53

Tabelle 7-5: Überblick über FKBP, welche auf ihre PPIase-Aktivität untersucht wurden und Zusammenfassung der Ergebnisse eines paarweisen Aminosäuresequenzvergleichs der jeweiligen PPIase-Domäne mit hFKBP12.

Organismus	Name des Proteins/ generischer Name	Swissprot- Datenbank- Eintrag	k_{kat}/K_M ($M^{-1} s^{-1}$)	Aminosäurereste der aktiven Zentrums von FKBP welche auf ihre PPIase-Aktivität untersucht wurden +) identischer Aminosäurerest zu hFKBP12 -) kein Aminosäurerest im Sequenzvergleich vorhanden																X ^{a)}	FK506 Inhibierung	Ref.
<i>H. sapiens</i>	FKBP12 ^{b)}	P20071	$1,6 \cdot 10^6$	Y	F	D	R	F	F	F	Q	E	I	W	Y	H	F	L	$K_i=0,5 \text{ nM}$	[281]		
<i>H. sapiens</i>	FKBP12,6	Q16645	$6,2 \cdot 10^5$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	F	+	+	+	L	$K_d=0,55 \text{ nM}$	[282]		
<i>H. sapiens</i>	FKBP13	P26885	$3,1 \cdot 10^6$	+	+	+	Q	+	+	G	Q	+	+	+	+	A	+	L	$K_i=74 \text{ nM}$	[283]		
<i>H. sapiens</i>	FKBP25	Q00688	aktiv	+	+	+	K	L	+	G	K	+	+	+	+	Q	+	A	$IC_{50}=400 \text{ nM}$	[284]		
<i>A. thaliana</i>	AhFKBP42	Q9LDC0	inaktiv	+	+	E	E	I	L	E	K	L	L	L	+	N	Y	L	keine Bindung	[72]		
<i>B. malayi</i>	FKBP13	O96335	$6,3 \cdot 10^4$	+	+	+	+	+	+	G	Q	+	+	+	+	S	+	L	$IC_{50}=1,7 \mu M$	[285]		
<i>B. taurus</i>	FKBP12	P18203	$6,6 \cdot 10^5$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	L	$K_i=0,25 \text{ nM}$	[51]		
<i>B. taurus</i>	FKBP25	P26884	$8 \cdot 10^5$	+	+	+	K	L	+	G	K	+	+	+	+	Q	+	A	$K_i=160 \text{ nM}$	[286]		
<i>C. burnetii</i>	CbMip / FKBP26	P51752	aktiv	+	+	+	+	A	+	K	S	+	+	+	+	A	+	F	n. b.	[287]		
<i>C. trachomatis</i>	chl-mip / FKBP27	P26623	aktiv	+	+	+	N	I	L	-	-	+	+	F	+	Q	+	F	n. b.	[288]		
<i>E. coli</i>	Trigger-Faktor / FKBP48	P22257	$6,5 \cdot 10^5$	V	+	T	K	+	L	G	R	+	F	F	G	S	L	L	k. I.	[67]		
<i>E. coli</i>	FKBP22	P39311	$1,3 \cdot 10^6$	+	+	+	+	A	+	-	-	+	+	+	A	+	L	L	$K_i=25 \text{ nM}$	[289]		
<i>E. coli</i>	slyD / FKBP21	P30856	$1,4 \cdot 10^4$	G	+	+	A	Y	Q	+	R	+	V	V	A	+	L	L	k. I.	[68]		
<i>H. cutirubrum</i>	HcFKBP33	Q9P9H4	$9,7 \cdot 10^5$	+	L	+	E	R	I	E	H	+	V	V	+	+	+	A	k. I.	[73]		
<i>M. genitalium</i>	Trigger-Faktor / FKBP51	P47480	$7,2 \cdot 10^3$	F	L	A	Q	Y	L	N	S	+	F	F	+	L	+	A	k. I.	[290]		

<i>M. jamaaschii</i>	MjFKBP18	Q57726	9,2·10 ⁵	I	Y	Y	Y	I	+	G	+	F	+	I	+	L	IC ₅₀ =170 nM	[74]
<i>M. jamaaschii</i>	MjFKBP26	Q58235	6,4·10 ²	L	I	N	F	V	+	E	+	I	T	L	I	L	70% bei 20 µM	[74]
<i>M. thermoautotrophicum</i>	FKBP28,3	O27197	3,6·10 ²	E	E	E	A	I	V	G	H	L	F	+	M	L	IC ₅₀ > 20 µM	[75]
<i>M. thermolithotrophicus</i>	MeFK / FKBP17	O52980	3,5·10 ⁵	D	A	G	+	L	+	G	Q	F	+	I	+	L	IC ₅₀ =250 nM	[291]
<i>N. crassa</i>	NcFKBP22	O60046	6,9·10 ⁵	+	+	+	+	+	+	G	Q	+	+	-	+	F	K _d =4,5 nM	[292]
<i>N. crassa</i>	NcFKBP / FKBP13	P20080	aktiv	+	+	+	+	L	+	G	Q	+	+	V	+	A	n. b.	[293]
<i>N. meningitidis</i>	NmFKBP / FKBP12	P25138	aktiv	+	+	+	+	L	I	G	Q	+	+	A	+	A	n. b.	[294]
<i>P. horikoshii</i>	PhFKBP29	k. E.	1,6·10 ³	D	I	Y	I	V	I	G	H	L	E	Q	Y	L	75% bei 20 µM	[295]
<i>S. cerevisiae</i>	yFKBP12	P20081	8,2·10 ⁷	+	+	+	+	+	C	G	Q	+	+	F	+	L	K _d =0,9 nM	[296]
<i>S. cerevisiae</i>	yFKBP13	P32472	5,4·10 ⁷	+	+	+	+	I	+	G	R	+	+	V	+	L	K _d =18 nM	[296]
<i>S. cerevisiae</i>	yFKBP70	P38911	aktiv	+	+	+	-	+	+	G	+	+	+	L	+	L	n. b.	[297]
<i>S. frugiperla</i>	FKBP46	Q26486	7,8·10 ⁶	+	M	F	K	+	+	K	+	+	+	S	+	L	IC ₅₀ =5 µM	[298]
<i>Thermococcus</i> <i>sp. KS-1</i>	TcFK / FKBP18	O93778	3,5·10 ²	+	L	V	Y	M	V	G	+	L	+	K	+	L	IC ₅₀ =7 µM	[73]
<i>V. faba</i>	FKBP15	Q41649	aktiv	+	+	+	+	I	+	G	Q	+	+	S	+	L	K _i =30 nM	[299]
<i>H. sapiens</i>	hFKBP51 Domäne I	Q13451	1,24·10 ⁶	+	+	+	+	+	+	G	Q	+	+	S	+	L	n. b.	[300]
<i>H. sapiens</i>	FKBP51 Domäne II	Q13451		L	+	+	+	+	V	H	D	I	F	K	Y			
<i>H. sapiens</i>	FKBP52 Domäne I	Q02790	3,8·10 ⁵	+	+	+	+	+	+	G	+	+	+	S	+	L	K _i =10 nM	[301]
<i>H. sapiens</i>	FKBP52 Domäne II	Q02790	inaktiv	L	+	+	+	+	I	N	D	P	L	K	Y		n. b.	[302]
<i>M. musculus</i>	FKBP51 Domäne I	Q64378	4,8·10 ⁵	+	+	+	+	+	+	G	Q	+	+	+	+	L	K _i =10-15 nM	[303]
<i>M. musculus</i>	FKBP51 Domäne II	Q64378		L	+	+	+	+	V	H	D	P	I	K	Y			

<i>O. cuniculus</i>	rFKBP59 Domäne I	P27124	1,2·10 ⁶	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	L	n. b.	[69]	
<i>O. cuniculus</i>	rFKBP59 Domäne II	P27124	0,02·10 ⁶	L	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	L	n. b.	[69]
<i>A. thaliana</i>	FKBP72 Domäne I	Q9M326	1,5·10 ⁴	C	V	E	I	D	S	K	+	L	+	L	+	+	+	+	+	+	+	+	+		n. b.	[304]
<i>A. thaliana</i>	FKBP72 Domäne II	Q9M326		I	I	F	-	Y	+	S	+	P	L	L	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
<i>A. thaliana</i>	FKBP72 Domäne III	Q9M326		+	Y	+	N	L	+	G	L	P	F	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
<i>M. musculus</i>	FKBP60 Domäne I	Q9Z247	aktiv	+	+	+	+	+	+	G	Q	+	M	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	L	n. b.	[305]
<i>M. musculus</i>	FKBP60 Domäne II	Q9Z247		+	+	+	+	Y	T	G	W	+	M	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
<i>M. musculus</i>	FKBP60 Domäne III	Q9Z247		+	+	+	+	+	+	G	Y	+	M	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
<i>M. musculus</i>	FKBP60 Domäne IV	Q9Z247		+	L	+	L	Y	I	G	Q	V	M	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
<i>M. musculus</i>	FKBP65 Domäne I	Q61576	6,5·10 ⁵	+	+	+	+	V	I	G	R	+	M	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A	IC ₅₀ =45 nM	[306]
<i>M. musculus</i>	FKBP65 Domäne II	Q61576		+	+	+	+	Y	T	G	W	+	M	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
<i>M. musculus</i>	FKBP65 Domäne III	Q61576		+	+	+	+	Y	T	G	Y	+	M	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
<i>M. musculus</i>	FKBP65 Domäne IV	Q61576		+	L	F	Y	Q	I	N	K	+	L	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			

Die Aktivität wurde, wie in den Publikationen beschrieben, mit dem Substrat Suc-AXPF-pNA bestimmt. Alle FKBP-Domänen von Multidomänen-FKBP wurden einzeln mit hFKBP12 verglichen. Die aufgeführte Aktivität bezieht sich auf das vollständige Protein, wenn nicht anders vermerkt. Der Aminosäuresequenzvergleich von MjFKBP18, MjFKBP26 und FKBP 28,3 mit hFKBP12 zeigte nur sehr schwache Übereinstimmungen, die erhaltenen Ergebnisse sollten deshalb mit Vorsicht interpretiert werden. Die Aussage „aktiv“ bedeutet, dass in der entsprechenden Publikation zwar ein Aktivitätstest durchgeführt, jedoch kein k_{cat}/K_M -Wert bestimmt wurde. Die Abkürzung k. I. steht für „keine Inhibierung“ und k. E. steht für „kein Eintrag“.

a) X steht für den Aminosäurerest in P1-Position des verwendeten Substrates (Suc-AXPF-pNA)

b) Für dieses Protein wurde die Anzahl der aktiven Zentren bestimmt [307].

Tabelle 7-6: Einträge von FKBP in der Proteinstrukturdatenbank

Organismus	Name des Proteins	Anzahl der Strukturen	RCSB-Datenbank-Eintrag
<i>A. thaliana</i>	AtFKBP13	1	1u79
<i>B. taurus</i>	FKBP12	2	1fkk, 1fkl
<i>C. elegans</i>	FKB-6	1	1r9h
<i>E. coli</i>	FKPA	3	1q6h, 1q6i, 1q6u
<i>E. coli</i>	Trigger-Faktor	1	1lip, 1w26
<i>H. sapiens</i>	FKBP12	33	1a7x, 1aui, 1b6c, 1bkf, 1bl4, 1d6o, 1d7h, 1d7i, 1d7j, 1eym, 1f40, 1fab, 1fkb, 1fkd, 1fkf, 1fkg, 1fkh, 1fki, 1fkj, 1fkr, 1fks, 1fkt, 1j4h, 1j4i, 1j4r, 1nsg, 1qpf, 1qpl, 1tco, 1fap, 2fke, 3fap, 4fap
<i>H. sapiens</i>	FKBP12.6	1	1c9h
<i>H. sapiens</i>	FKBP25	1	1pbk
<i>H. sapiens</i>	FKBP52	4	1n1a, 1p5q, 1q1c, 1qz2
<i>H. sapiens</i>	FKBP51	1	1kto
<i>L. pneumophila</i>	<i>L.p</i> Mip	1	1fd9
<i>M. genitalium</i>	Trigger-Faktor	1	1hvx
<i>M. thermolithotrophicus</i>	<i>M.</i> FK	1	1ix5
<i>O. cuniculus</i>	FKBP59	2	1rot, 1rou
<i>S. boliviensis</i>	FKBP51	1	1kt1
<i>S. cerevisiae</i>	FKBP12	1	1yat
<i>T. cruzi</i>	TcMip	1	1jvw
<i>V. cholerae</i>	Trigger-Faktor	1	1t11

Tabelle 7-7: Katalytische Aktivität von rekombinant exprimierten FKBP12-Varianten, bestimmt mit dem Substrat Suc-ALPF-pNA.

Enzym	k_{kat}/K_M ($M^{-1} s^{-1}$)	K_M	k_{kat}	Ref.
Wildtyp	$1,2 \cdot 10^{6b)}$	$5 \cdot 10^{-4} M^b)$	$600 s^{-1b)}$	[308]
	$3,5 \cdot 10^{6a)}$			[308]
	$1,2 \pm 0,4 \cdot 10^{6c)}$			[67]
	$2,2 \pm 0,2 \cdot 10^6$			[309]
	$3,6 \cdot 10^{6c)}$			$0,9-1,3 \cdot 10^{-3} M^c)$
Y26F	$\sim 1 \cdot 10^{5a)}$			[308]
F36L	$\sim 4 \cdot 10^{6a)}$			[308]
D37V	$3 \cdot 10^{5a)}$			[308]
D37L	$6,6 \pm 0,4 \cdot 10^{4c)}$			[67]
R42A	$1,1 \pm 0,2 \cdot 10^6$			[309]
F46L	$\sim 5 \cdot 10^{6a)}$			[308]
F48L	$\sim 0,9 \cdot 10^{6a)}$			[308]
Q53A	$1,8 \pm 0,4 \cdot 10^6$			[309]
W59A	$\sim 1 \cdot 10^{5a)}$			[308]
Y82L	$3,6 \cdot 10^{5c)}$	$0,7-1,0 \cdot 10^{-3} M^c)$	$20-24 s^{-1c)}$	[81]
Y82F	$2,6 \cdot 10^{5b)}$	$2,9 \cdot 10^{-4} M^b)$	$75 s^{-1b)}$	[308]
Y26F/Y82F	$6,4 \cdot 10^{4b)}$	$7,5 \cdot 10^{-4} M^b)$	$48 s^{-1b)}$	[308]
H87A	$1,9 \pm 0,2 \cdot 10^6$			[309]
F99Y	$6,4 \cdot 10^{4c)}$			[67]

a) Die Werte wurden von einem Diagramm abgelesen, der Aktivitätstest wurde bei 15°C durchgeführt.

b) Der Aktivitätstest wurde bei 5°C durchgeführt.

c) Der Aktivitätstest wurde bei 10°C durchgeführt.

Tabelle 7-8: Überblick über Parvuline, welche auf ihre PPIase-Aktivität untersucht wurden, und Zusammenfassung der Ergebnisse eines paarweisen Aminosäuresequenzvergleichs der jeweiligen PPIase-Domäne mit hPin1.

Organismus	Name des Protein / generischer Name	Swissprot-Datenbank-Eintrag	k_{kat}/K_M ($M^{-1} s^{-1}$)	Aminosäurereste der aktiven Zentren von Parvulinen, die auf ihre PPIase-Aktivität untersucht wurden +) identischer Aminosäurerest zu hPin1 -) kein Aminosäurerest im Sequenzvergleich vorhanden												Substrat	Ref.
				H	K	R	R	C	L	M	F	S	H				
<i>H. sapiens</i>	Pin1 / Par18	Q13526	$1,9 \cdot 10^7$	59	63	68	69	113	122	130	134	154	157		AA(pS)PR-pNA	[89]	
<i>H. sapiens</i>	Par14	Q9Y237	$3,9 \cdot 10^3$	+	+	-	-	D	+	+	+	F	+		Suc-ARPF-pNA	[96]	
<i>B. subtilis</i>	PrsA / Par33	P24327	$6 \cdot 10^3$	+	A	-	-	D	+	Q	+	Y	+		Suc-AKPF-pNA	[310]	
<i>E. coli</i>	Par10	P39159	$1,35 \cdot 10^7$	+	+	-	-	+	+	+	+	F	+		Suc-ALPF-pNA	[96]	
<i>E. coli</i>	SurA / Par47 Domäne I	P21202	$1,9 \cdot 10^4$	+	P	P	T	D	M	L	+	V	+		Suc-ALPF-pNA	[96]	
<i>E. coli</i>	SurA / Par47 Domäne II	P21202		+	+	-	-	D	+	F	+	F	+				
<i>E. coli</i>	PpiD / Par68	P77241	$3,4 \cdot 10^6$	-	Q	-	-	I	+	I	L	V	L		Suc-AEPPF-pNA	[311]	
<i>A. thaliana</i>	AtPar13	Q9SI42	$2,7 \cdot 10^6$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		Ac-AA(pS)PF-pNA	[312]	
<i>D. lanata</i>	DIPar13	Q9LEK8	$1,5 \cdot 10^7$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		Ac-A(pS)PY-pNA	[313]	
<i>M. domestica</i>	MdPar13	Q94G00	$3,1 \cdot 10^6$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		Ac-AA(pS)PF-pNA	[312]	
<i>N. crassa</i>	Ssp1 / Par21	O60045	$6,5 \cdot 10^6$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		Ac-AA(pS)PF-pNA	[314]	
<i>S. cerevisiae</i>	Ptf1 / Par22	P22696	$1,7 \cdot 10^7$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		Ac-A(pS)PY-pNA	[313]	
<i>X. laevis</i>	Pin1 / Par18	Q9J9K6	aktiv	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		nicht angegeben	[315]	

Die aufgelisteten enzymatischen Aktivitäten wurden wie in den entsprechenden Publikationen beschrieben bestimmt. Beide Parvulin-Domänen des *E. coli* SurA wurden einzeln mit der PPIase-Domäne des hPin1 verglichen, die angegebene Aktivität wurde mit dem gesamten Protein bestimmt. Die Aussage „aktiv“ bedeutet, dass in der entsprechenden Publikation zwar ein Aktivitätstest durchgeführt, jedoch kein k_{kat}/K_M -Wert bestimmt wurde.

Tabelle 7-9: Einträge von Parvulinen in der Proteinstrukturdatenbank

Organismus	Name des Proteins	Anzahl der Strukturen	RCSB-Datenbank-Eintrag
<i>H. sapiens</i>	Pin1	4	1nmv, 1nmw, 1pin, 1f8a
<i>H. sapiens</i>	Par14	2	1eq3, 1fjd
<i>A. thaliana</i>	Pin1At	1	1j6y
<i>C. albicans</i>	Ess1	1	1yw5
<i>E. coli</i>	Par10	2	1jns, 1jnt
<i>E. coli</i>	SurA	1	1m5y

Tabelle 7-10: Absolute und relative Viskositäten der verwendeten Lösungen bei 10°C in 35 mM HEPES (pH 7,8)

Anteil Viskosogen (% w/w)	Glycerol		Rohrzucker		PVP360	
	η_{abs}	η_{rel}	η_{abs}	η_{rel}	η_{abs}	η_{rel}
0	1,3	1	1,3	1	1,3	1
0,5	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	3,5	2,7
1,5	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	7,1	5,5
5	1,7	1,3	1,5	1,2	n. b.	n. b.
10	1,98	1,5	1,7	1,3	n. b.	n. b.
15	2,4	1,8	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
20	2,8	2,2	2,6	2	n. b.	n. b.
30	4,0	3,1	4,7	3,6	n. b.	n. b.
40	6,3	4,8	9	6,9	n. b.	n. b.

Die absolute Viskosität (η_{abs}) wurde in mPa s angegeben.

Tabelle 7-11: hCyp18/CsA-Interaktion, Temperaturabhängigkeit der Parameter K_A , ΔH_{ITC} , $T\Delta S_{\text{ITC}}$ und ΔG_{ITC} in 25 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5

T (K)	ΔG_{ITC} (kcal mol ⁻¹)	K_A (10 ⁸ M ⁻¹)	ΔH_{ITC} (kcal mol ⁻¹)	$T\Delta S_{\text{ITC}}$ (kcal mol ⁻¹)
278,5	-10,3	1,1	-5,7	4,5
285,3	-10,5	1,0	-8,9	1,5
293,0	-10,7	0,97	-12,1	-1,4
298,0	-10,9	0,88	-14,7	-3,8
306,0	-10,7	0,46	-17,8	-7,0

Tabelle 7-12: hCyp18/CsA-Interaktion, Temperaturabhängigkeit der Parameter K_A , ΔH_{ITC} , $T\Delta S_{ITC}$ und ΔG_{ITC} in 30% Glycerol, 25 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5

T (K)	ΔG_{ITC} (kcal mol ⁻¹)	K_A (10 ⁸ M ⁻¹)	ΔH_{ITC} (kcal mol ⁻¹)	$T\Delta S_{ITC}$ (kcal mol ⁻¹)
280,7	-10,2	0,9	-11,6	-1,3
288,0	-10,6	1,2	-14,5	-3,8
293,2	-10,6	0,86	-16,0	-5,4
298,0	-10,5	0,61	-18,6	-7,8
303,0	-10,2	0,25	-21,2	-11,0

Tabelle 7-13: hCyp18/CsA-Interaktion, Temperaturabhängigkeit der Parameter K_A , ΔH_{ITC} , $T\Delta S_{ITC}$ und ΔG_{ITC} in D₂O, 25 mM Natriumphosphatpuffer pD 7,5

T (K)	ΔG_{ITC} (kcal mol ⁻¹)	K_A (10 ⁸ M ⁻¹)	ΔH_{ITC} (kcal mol ⁻¹)	$T\Delta S_{ITC}$ (kcal mol ⁻¹)
280,7	-10,7	2,1	-6,2	4,5
283,5	-11,0	2,7	-7,7	3,3
287,9	-11,0	2,1	-9,6	1,4
293,2	-11,2	2,3	-11,6	-0,3
298,0	-11,1	1,5	-14,8	-3,6
303,0	-11,0	0,79	-17,1	-6,2

Tabelle 7-14: hCyp18/Suc-AFPF-pNA-Interaktion, Temperaturabhängigkeit der Parameter K_A , ΔH_{ITC} , $T\Delta S_{ITC}$ und ΔG_{ITC} , in 25 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5

T (K)	ΔG_{ITC} (kcal mol ⁻¹)	K_A (10 ⁴ M ⁻¹)	ΔH_{ITC} (kcal mol ⁻¹)	$T\Delta S_{ITC}$ (kcal mol ⁻¹)
276,2	-4,7	5,5	-6,3	-1,6
278,7	-4,7	5,2	-6,7	-1,9
283,1	-4,6	3,5	-7,2	-2,7
288,2	-4,7	3,9	-8,6	-3,9
288,8	-4,4	2	-9,4	-5,0
290,7	-4,3	1,9	-9,9	-5,6
293,2	-4,3	1,5	-10,3	-6,0
298,2	-4,2	1,1	-11,7	-7,5

Tabelle 7-15: Temperaturabhängigkeit des *cis/trans*-Gleichgewichts AAP bei pH 2,1 und pH 7,5, ermittelt durch NMR-spektroskopische Untersuchungen (durchgeführt von Dr. Lücke)

T (K)	% <i>cis</i> pH 7,5	% <i>cis</i> pH 2,1
278	16,4	6,8
283	17,1	6,9
288	17,7	7,1
293	18,2	7,2
298	18,9	7,4

Tabelle 7-16: Temperaturabhängigkeit des *cis/trans*-Gleichgewicht von AP pH 2,1 und pH 7,5, ermittelt durch NMR-spektroskopische Untersuchungen (durchgeführt von Dr. Lücke)

T (K)	% <i>cis</i> pH 7,5	% <i>cis</i> pH 2,1
278	34,4	8,6
283	35,5	8,9
288	36,7	9,2
293	37,8	9,6
298	39,2	9,9

Tabelle 7-17: Resultate der pH-Wert-Sprungexperimente einer wässrigen Lösung AP pH 2,1 zu 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5. Die Messung erfolgte mittels ITC.

T (K)	$k_{c/t}$ (s ⁻¹)	$\Delta H^0_{c/t}$ (cal/mol)
278,8	$2,4 \cdot 10^{-4}$	2262,1
283,2	$4,3 \cdot 10^{-4}$	2569,7
285,2	$5,5 \cdot 10^{-4}$	1457,1
288,2	$8,7 \cdot 10^{-4}$	2338,7
293,2	$1,8 \cdot 10^{-3}$	n. b.
295,2	$2,4 \cdot 10^{-3}$	n. b.

Tabelle 7-18: Resultate der pH-Wert-Sprungexperimente einer wässrigen Lösung AP pH 7,5 zu 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 2,1. Die Messung erfolgte mittels ITC.

T (K)	$k_{c/t}$ (s⁻¹)	$\Delta H^0_{c/t}$ (cal/mol)
278,2	$1,1 \cdot 10^{-3}$	1359,4
283,2	$1,9 \cdot 10^{-3}$	1049,8
283,2	$2,5 \cdot 10^{-3}$	n. b.
285,2	$2,9 \cdot 10^{-3}$	1243,4
288,2	$3,9 \cdot 10^{-3}$	1397,1
293,2	$6,3 \cdot 10^{-3}$	1482,5
298,2	$9,7 \cdot 10^{-3}$	n. b.

Tabelle 7-19: Resultate der pH-Wert-Sprungexperimente einer wässrigen Lösung AAP pH 2,1 zu 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5. Die Messung erfolgte mittels ITC.

T (K)	$k_{c/t}$ (s⁻¹)	$\Delta H^0_{c/t}$ (cal/mol)
283,2	$4,6 \cdot 10^{-4}$	n. b.
286,2	$6,4 \cdot 10^{-4}$	2162,7
288,2	$7,2 \cdot 10^{-4}$	n. b.
289,2	$1,0 \cdot 10^{-3}$	2282,7
290,2	$1,3 \cdot 10^{-3}$	2498,1
293,2	$1,9 \cdot 10^{-3}$	2022,1
296,2	$2,8 \cdot 10^{-3}$	1442,1

Tabelle 7-20: Resultate der pH-Wert-Sprungexperimente einer wässrigen Lösung AAP pH 7,5 zu 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 2,1. Die Messung erfolgte mittels ITC.

T (K)	$k_{c/t}$ (s⁻¹)	$\Delta H^0_{c/t}$ (cal/mol)
277,9	$1 \cdot 10^{-3}$	n. b.
281,3	$2 \cdot 10^{-3}$	1021,3
283,2	$2,4 \cdot 10^{-3}$	n. b.
285,2	$3,3 \cdot 10^{-3}$	1468,6
287,2	$3,2 \cdot 10^{-3}$	680,5
289,2	$4,6 \cdot 10^{-3}$	1415,7
292,2	$5,4 \cdot 10^{-3}$	1336,4
293,2	$7 \cdot 10^{-3}$	1440,7

Tabelle 7-21: Resultate der LiCl/TFE-Sprungexperimente einer AP-Lösung gelöst in 0,47 M LiCl/TFE zu 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5. Die Messung erfolgte mittels ITC.

T (K)	$k_{c/t}$ (s ⁻¹)	$\Delta H_{c/t}^0$ (cal/mol)
285,2	$8 \cdot 10^{-4}$	3815,6
288,5	$1,1 \cdot 10^{-3}$	n. b.
289,9	$1,3 \cdot 10^{-3}$	4223,8
294,2	$2,5 \cdot 10^{-3}$	5321,8
296,2	$2,7 \cdot 10^{-3}$	n. b.
298,2	$3,8 \cdot 10^{-3}$	2678,7
298,2	$3,9 \cdot 10^{-3}$	1979,3

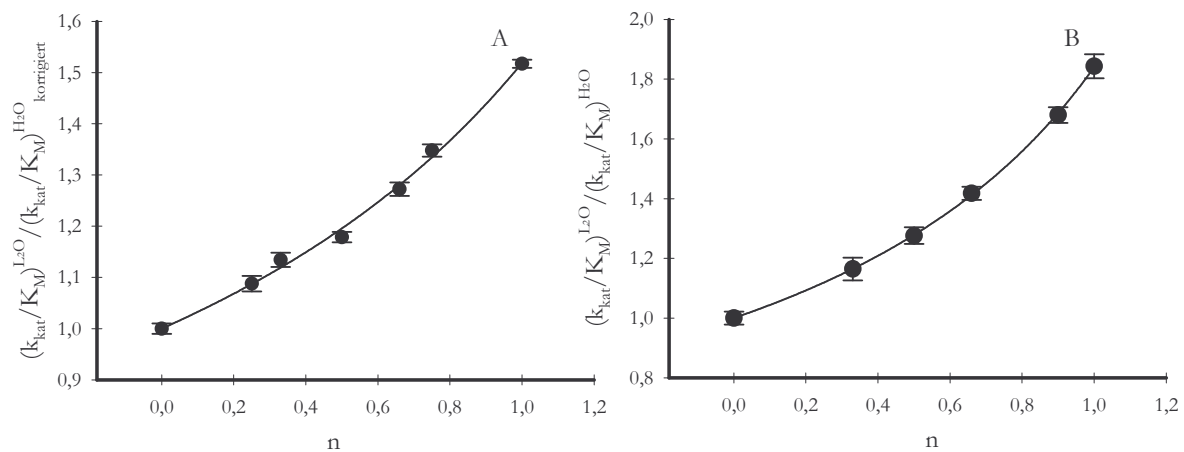


Abbildung 28: Darstellung des korrigierten Protonen-Inventur-Experimentes für A) hCyp18 und B) *E. coli* Par10. Die Parameter (ϕ^T , ϕ^R) von Gleichung 23 wurden an die Messwerte mittels nichtlinearer Regression angepasst. Für hCyp18 ergaben sich die Fraktionierungsfaktoren $\phi^T=0,92$ und $\phi^R=0,61$. Für *E. coli* Par10 wurde die Faktoren $\phi^T=0,91$ und für $\phi^R=0,49$ bestimmt.

Danksagung

Prof. Dr. G. Fischer möchte ich für die Möglichkeit danken, in der Max-Planck-Forschungststelle für Enzymologie der Proteinfaltung diese Arbeit anfertigen zu können. Im Besonderen möchte ich mich für die große Freiheit, mit der ich dieses Thema bearbeiten durfte, und das entgegengebrachte Interesse am Fortschritt der Arbeit bedanken.

Herrn Dr. Rahfeld möchte ich für die Ratschläge und Tipps sowie für die Bereitstellung verschiedener Proteine danken, ohne die die Arbeit im Messlabor wohl noch länger gedauert hätte.

Herrn Dr. Kamphausen und Frau Dr. Schiene-Fischer möchte ich für die Herstellung einiger der in der Arbeit benutzten Überexpressionsklone danken.

Herrn Daum danke ich für die Präparation und Bereitstellung der hPin1-Varianten.

Frau Schierhorn und Herrn Rücknagel möchte ich für die Durchführung der Proteinsequenzierung sowie die Aufnahme der Massenspektren danken.

Herrn Lücke danke ich für die Durchführung und Interpretation der NMR-spektrometrischen Messungen.

Bei Herrn Wawra und Herrn Wildemann möchte ich mich für die Synthese und Bereitstellung des Polyprolinpeptides bedanken.

Frau Clemens, Frau Gersching und Frau Ross möchte ich für die Unterstützung und Nachsicht im Labor danken.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Wille bedanken, der mir in unzähligen Diskussionen die Augen für so manches Problem öffnete und nicht zuletzt durch seine Kritik am Gelingen dieser Arbeit einen großen Anteil hat.

Bei Bettina Mech möchte ich mich nicht nur für die Übersetzung dieser Arbeit ins Deutsche bedanken.

Besonders möchte ich meinen Eltern danken, die mich unabhängig davon, ob mein Berufswunsch Dieseltriebfahrzeugschlosser, Physiker oder Biochemiker war, immer ermutigt und unterstützt haben, meine Ziele zu verwirklichen.

Publikationen

Bayer, P. and **J. Fanghanel**, *Fringe gives a saccharine to notch*. Trends Biochem Sci, **2000**. **25**(10): p. 485-6.

Sekerina, E., J.U. Rahfeld, J. Muller, **J. Fanghanel**, C. Rascher, G. Fischer, and P. Bayer, *NMR solution structure of hPar14 reveals similarity to the peptidyl prolyl cis/trans isomerase domain of the mitotic regulator hPin1 but indicates a different functionality of the protein*. J Mol Biol, **2000**. **301**(4): p. 1003-17.

Sekerina, E. Rahfeld, J.U., **Fanghanel, J.**, Müller, J., Rascher, C., Fischer, G., and Bayer, *Structure, Self-organization and Stability of Proteins: Experiments and Models: NMR solution structure of hPar14*. Nova Acta Leopoldina Supplementum, **2001**(16): p. 149-150.

Kamphausen, T., **J. Fanghanel**, D. Neumann, B. Schulz, and J.U. Rahfeld, *Characterization of Arabidopsis thaliana AtFKBP42 that is membrane-bound and interacts with Hsp90*. Plant J, **2002**. **32**(3): p. 263-76

Kohler, R., **J. Fanghanel**, B. König, E. Luneberg, M. Frosch, J.U. Rahfeld, R. Hilgenfeld, G. Fischer, J. Hacker, and M. Steinert, *Biochemical and functional analyses of the Mip protein: influence of the N-terminal half and of peptidylprolyl isomerase activity on the virulence of Legionella pneumophila*. Infect Immun, **2003**. **71**(8): p. 4389-97.

Fanghanel, J. and G. Fischer, *Thermodynamic characterization of the interaction of human cyclophilin 18 with cyclosporin A*. Biophys Chem, **2003**. **100**(1-3): p. 351-66.

Fanghanel, J., *Enzymatic catalysis of the peptidyl-prolyl bond rotation: are transition state formation and enzyme dynamics directly linked?* Angew Chem Int Ed Engl, **2003**. **42**(5): p. 490-2.

Fanghaenel, J. and G. Fischer, *Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl cis/trans isomerases*. Front Biosci **2004**. **9**: p. 3453-3478

Manteca, A., T. Kamphausen, **J. Fanghanel**, G. Fischer and J. Sanchez, *Cloning and characterization of a Streptomyces antibioticus ATCC11891 cyclophilin related to Gram negative bacteria cyclophilins*. FEBS Lett **2004**. **572**(1-3): p. 19-26

Edlich, F., M. Weiwad, F. Erdmann, **J. Fanghanel**, F. Jarczowski, J.U. Rahfeld and G. Fischer, *Ca²⁺/Calmodulin-induced hFKBP38 activity influences Bcl-2 function in neuronal cells*. Mol Cell, Submitted

Lebenslauf

Zur Person

Jörg Fanghänel
Centre for Interdisciplinary Research, Tohoku University
Aramaki Aza Aoba, Aoba-ku, Sendai
980-8578, JAPAN
geboren am 7.4.1973 in Halle/Saale
ledig

Ausbildung

9/1979-1989 Besuch der Polytechnischen Oberschule "Albrecht Dürer" in Halle/Saale
9/1989-1990 Ausbildung zum "Dieseltriebfahrzeugschlosser mit Abitur", Deutsche Reichsbahn in Halle/Saale
9/1990-1992 Besuch der „Spezialklassen für Chemie“ an der Technischen Hochschule „Carl Schorlemmer“, in Merseburg, Abitur 08/1992
10/1992-1993 Physikstudium an der Universität Leipzig (2 Semester)
10/1993-1998 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diplomarbeit zum Thema „Untersuchungen zu Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen aus Legionella Pneumophila“ an der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung
Abschluss: Diplom-Biochemiker (Prädikat: „Sehr Gut“)
12/1998-1/1999 zweimonatiger Forschungsaufenthalt im Institut für Infektionsbiologie an der Universität Würzburg
1/1999-11/1999 Forschungsaufenthalt an der „Rockefeller University“, New York
3/2000-2004 Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Arbeit zum Thema:
„Untersuchungen zum Katalysemechanismus von Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen“
1/2005- wissenschaftlicher Mitarbeiter im „Centre for Interdisciplinary Research“, Tohoku University in Sendai, Japan

Stipendien:

2000-2002 Stipendiat des Fonds der chemischen Industrie
1995-2000 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
1995 Sprachstipendium des DAAD

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich bisher mit dieser Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, noch an einer anderen Einrichtung um die Erlangung eines akademischen Grades beworben habe. Ich versichere weiterhin, dass die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Benutzung der angegeben Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Halle / Saale, im April 2005

Jörg Fanghänel