



Max-Planck-Forschungsstelle
für Enzymologie der Proteinfaltung

Prototypische PPlasen in der Signaltransduktion

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades Doktor rerum naturalium

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Sebastian Mathea,

geboren am 9. Juli 1978 in Blankenburg/Harz

Gutachter

1 Gunter Fischer

2 Mike Schutkowski

3 Reinhard Wetzker

verteidigt am

12. Oktober 2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	FKBP12 als Modulator von Proteinaktivitäten	1
1.1.1	FKBP12 als Teil des RyR1-Komplexes	3
1.1.2	Die Rolle von FKBP12 in der T β R-Signaltransduktion	5
1.1.3	Aktivierung und zelluläre Funktion des EGFR	8
1.2	Die Beteiligung von Cyclophilin A an physiologischen Prozessen	13
1.2.1	CypA wird zur Differenzierung von Nervenzellen benötigt	14
1.2.2	CypA als Chemoattraktor für Leukozyten	15
1.3	Zielstellung	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Chemikalien, Antikörper und Plasmide	19
2.2	Expression und Reinigung rekombinanter Proteine	21
2.2.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i> M15-Zellen	21
2.2.2	Proteinexpression mittels Baculoviren in Sf9-Zellen	21
2.2.3	Reinigung der prototypischen PPlasen	22
2.2.4	Reinigung der EGFR-Fragmente	24
2.3	Protein- und Peptidanalytik	25
2.3.1	EGF-Markierung mit TAMRA	25
2.3.2	SDS-PAGE	25
2.3.3	Western-Blot-Analyse	26
2.3.4	Ko-Immunpräzipitation	27
2.3.5	<i>Pull down</i> -Assay	28
2.3.6	Bestimmung der PPlase-Aktivität durch isomerspezifische Proteolyse	29
2.3.7	Autophosphorylierung von EGFR in A-431-Zelllysaten	30
2.3.8	Autophosphorylierung von EGFR ₆₆₉₋₁₂₁₀	30
2.3.9	Phosphorylierung des Peptids Shc-Y317 durch EGFR ₆₆₉₋₁₀₂₂	31
2.3.10	HPLC	31

2.4	Zellkultur	32
2.4.1	Erhaltung der verwendeten Zelllinien	32
2.4.2	Transfektion von Sf9-Zellen	32
2.4.3	Transfektion von humanen Krebszellen	33
2.4.4	Induktion von RNAi in humanen Krebszellen	33
2.4.5	Erstellung von Zelllysaten	34
2.4.6	Konfokal-Mikroskopie	35
2.4.7	FACS-Analyse	36
2.4.8	<i>Scratch migration</i> -Assay	36
2.4.9	Chemotaxis-Assay	37
2.4.10	P19-Zell-Differenzierung	37
2.4.11	MTT-Assay	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Die Modulation der EGFR-Kinaseaktivität durch FKBP12	39
3.1.1	Der Einfluss von FKBP12 auf die Kinaseaktivität von EGFR	39
3.1.1.1	Der Einfluss von FKBP12 auf die Autophosphorylierung von EGFR in A-431-Zell-Lysaten	39
3.1.1.2	Die Herstellung des Fragments EGFR ₆₆₉₋₁₂₁₀	41
3.1.1.3	Der Einfluss von FKBP12 auf die Autophosphorylierung von EGFR ₆₆₉₋₁₂₁₀	42
3.1.1.4	Die Herstellung des Fragments EGFR ₆₆₉₋₁₀₂₂	45
3.1.1.5	Der Einfluss von FKBP12 auf die Kinaseaktivität von EGFR ₆₆₉₋₁₀₂₂	46
3.1.2	Die physikalische Interaktion zwischen FKBP12 und EGFR	48
3.1.2.1	<i>Pull down</i> von EGFR mit GST-FKBP12	48
3.1.2.2	Ko-Immunpräzipitation von FKBP12 mit EGFR ₆₆₉₋₁₂₁₀	49
3.1.2.3	Untersuchung der zellulären Lokalisierung von FKBP12 und EGFR	50
3.1.3	Der Einfluss von FKBP12 auf die EGFR-vermittelte Signaltransduktion	53
3.1.3.1	Der Einfluss der intrazellulären FKBP12-Konzentration auf die EGF-induzierte EGFR-Autophosphorylierung	53
3.1.3.2	Der EGFR-vermittelte Einfluss des intrazellulären FKBP12 auf den Zellzyklus in HeLa-Zellen	55
3.1.3.3	Der Einfluss der FKBP12-Inhibition auf die Motilität von HeLa-Zellen	57

3.2	Die Etablierung eines Zellkultur-basierten Assays zur Untersuchung von CypA-Inhibitoren	60
3.2.1	Der Einfluss der CypA-Inhibition auf die RA-induzierte P19-Zell-Differenzierung	60
3.2.1.1	Die RA-induzierte P19-Zell-Differenzierung	60
3.2.1.2	Untersuchung der Zytotoxizität von CsA für P19-Zellen	63
3.2.1.3	Der Einfluss von CsA auf die RA-induzierte P19-Zell-Differenzierung	64
3.2.2	CypA als Chemoattraktor für Leukozyten	65
3.2.2.1	Etablieren der Technik Chemotaxis-Assay	65
3.2.2.2	Vorbereitung und Charakterisierung des Chemoattraktors CypA	67
3.2.2.3	Der Einfluss von CypA auf das Migrationsverhalten von Leukozyten	68
4	Diskussion	73
4.1	Die Modulation der EGFR-Kinaseaktivität durch FKBP12	73
4.1.1	FKBP12 inhibiert die Kinaseaktivität von EGFR	73
4.1.2	FKBP12 inhibiert den EGFR nicht durch einfache Bindung, sondern durch Katalyse einer <i>cis/trans</i> -Isomerisierung	77
4.1.3	Die Modulation der EGFR-vermittelten Signaltransduktion durch FKBP12	80
4.2	Die Etablierung eines Zellkultur-basierten Assays zur Untersuchung von CypA-Inhibitoren	84
4.2.1	Die Inhibition von CypA durch CsA hat keinen Einfluss auf die RA-induzierte P19-Zell-Differenzierung	84
4.2.2	CypA ist kein Chemoattraktor für Leukozyten	86
4.3	Zusammenfassung	89
5	Literaturverzeichnis	90
6	Anhang	101

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CI	Chemotaktischer Index
COSMIC	<i>Catalogue of Somatic Mutations in Cancer</i>
CsA	Cyclosporin A
CypA	Cyclophilin A
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEAE	Diethylaminoethyl
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's-Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrosprayionisierung
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FKBP12	FK506-bindendes Protein mit dem Molekulargewicht 12 kDa
FKBP12.6	FK506-bindendes Protein mit dem Molekulargewicht 12,6 kDa
FMLP	<i>N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin</i>
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
FSC	Vorwärtsstreuung
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	n-2-Hydroxyethylpiperacin-n-2-Ethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IC ₅₀	<i>inhibitory concentration 50 %</i>
K _D	Dissoziationskonstante
K _M	Michaeliskonstante
LC ₅₀	<i>lethal concentration 50 %</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight</i>

MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MIP-1 α	<i>macrophage inflammatory protein 1α</i>
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NF-AT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOESY	<i>nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PTB	<i>phosphotyrosine binding</i>
PMNL	Polymorphonukleäre Leukozyten
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
RA	all- <i>trans</i> -Retinsäure
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute-1640-Medium</i>
RyR1	Ryanodin-Rezeptor-1
RyR2	Ryanodin-Rezeptor-2
SH2	<i>Src-homology 2</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Seitwärtsstreuung
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamin
T β R-I	<i>transforming growth factor-β receptor type 1</i>
T β R-II	<i>transforming growth factor-β receptor type 2</i>
TBT	<i>tris buffered tween</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TGF- α	<i>transforming growth factor-α</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
V _{Reaktion}	Reaktionsgeschwindigkeit
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 FKBP12 als Modulator von Proteinaktivitäten

Im Jahre 1987 beschrieben japanische Wissenschaftler das Peptidmakrolid FK506 (Ochiai *et al.*, 1987a). Der Naturstoff war aus dem gram-positiven Bakterium *Streptomyces tsukubaensis* isoliert worden (Kino *et al.*, 1987). Eine Eigenschaft von FK506 ist die Suppression der zellulären Immunantwort von Säugetieren (Sawada *et al.*, 1987). Aufgrund dieser Eigenschaft verhindert FK506 die Abstoßung von Organen nach Allotransplantationen (Ochiai *et al.*, 1987b). Über den Wirkmechanismus von FK506 war wenig bekannt, bis ein intrazellulärer Bindungspartner, das FK506-bindende Protein mit dem Molekulargewicht 12 kDa (kurz FKBP12, Swiss-Prot-Eintrag P62942), identifiziert wurde (Siekierka *et al.*, 1989a). Es erwies sich, dass der Komplex aus FKBP12 und FK506 die enzymatische Aktivität der Phosphatase Calcineurin inhibiert (Liu *et al.*, 1991). Die Inhibition von Calcineurin wiederum verhindert in T-Lymphozyten die Translokation des Transkriptionsfaktors NF-AT vom Zytoplasma in den Kern (Clipstone *et al.*, 1992). Dadurch kommt es nicht zur Aktivierung und Vermehrung der T-Lymphozyten (Ho *et al.*, 1996). FKBP12 wurde in allen darauf untersuchten humanen Geweben nachgewiesen, besonders hoch ist die Expression in der Großhirnrinde (Maki *et al.*, 1990, Steiner *et al.*, 1992). Da FK506 in Säugetieren nicht vorkommt, wird die Vermittlung der Immunsuppression durch FKBP12 als *gain of function* angesehen.

Während der Charakterisierung von FKBP12 stellte sich heraus, dass es sich bei dem Protein um eine Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase (kurz PPlase) handelt (Siekierka *et al.*, 1989b, Harding *et al.*, 1989). PPlasen sind in der Lage, die *cis/trans*-Isomerisierung der imidischen Peptidbindung *N*-terminal von Prolin-Resten zu katalysieren, und zwar sowohl in Peptiden (Fischer *et al.*, 1984a) als auch in Proteinen (Lang *et al.*, 1987, Aumüller und Fischer, 2008). Eine physiologische Bedeutung der PPlase-Aktivität von FKBP12 wird vermutet, konnte aber bislang nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden (siehe **1.1.1** und **1.1.2**).

Durch die Analyse von cDNA-Banken und die Sequenzierung des menschlichen Genoms wurden 17 humane Proteine mit Sequenzbereichen, die der Sequenz von FKBP12 homolog sind, identifiziert (Galat, 2004). Das Ein-Domänen-Protein FKBP12

kann als Prototyp einer Familie von Proteinen betrachtet werden. Diese so genannten FK506-bindenden Proteine mit Molekulargewichten zwischen 12 und 135 kDa unterscheiden sich im Expressionsmuster, in der zellulären Lokalisierung und in der physiologischen Funktion (Galat, 2004).

Die Untersuchung von FKBP12-defizienten Mäusen zeigte, dass FKBP12 kein essentielles Protein ist (Shou *et al.*, 1998). Allerdings sterben die meisten FKBP12-defizienten Mäuse bereits im Embryonalstadium an dilatativer Kardiomyopathie. Außerdem weisen einige der Embryonen als Anecephalie klassifizierte Fehlentwicklungen des Nervensystems auf. FKBP12 beeinflusst also die Entwicklung oder die Funktion ganz unterschiedlicher, aber nicht aller Gewebe (Shou *et al.*, 1998). Inzwischen sind mehrere Interaktionspartner von FKBP12 beschrieben (**Tabelle 1**).

Tabelle 1: Proteine, für die eine Interaktion mit FKBP12 beschrieben ist.

Interaktionspartner	biologische Aktivität	Erstbeschreibung
RyR1	Ca ²⁺ -Kanal	Collins, 1991
TβR-I	Rezeptor-Serin/Threoninkinase	Wang <i>et al.</i> , 1994
IP ₃ R	Ca ²⁺ -Kanal	Cameron <i>et al.</i> , 1995
EGFR	Rezeptor-Tyrosinkinase	Lopez-Illasaca <i>et al.</i> , 1998
HMG1/2 (<i>S. cerevisiae</i>)	DNA-Bindung bei rDNA-Transkription	Dolinski <i>et al.</i> , 1999
TRPC3/6/7	Ca ²⁺ -Kanal	Sinkins <i>et al.</i> , 2004
Aspartokinase (<i>S. cerevisiae</i>)	AS-Biosynthese	Arévalo-Rodríguez <i>et al.</i> , 2004
α-Synuclein	Bildung filamentöser Aggregate	Meuvis <i>et al.</i> , 2010
H-Ras	GTPase	Ahearn <i>et al.</i> , 2011

Bei den meisten Interaktionspartnern von FKBP12 handelt es sich um membranständige Rezeptoren oder Ionenkanäle. Die in **Tabelle 1** aufgeführten Interaktionspartner sind sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von FKBP12 funktional. Ihre biologische Aktivität wird von FKBP12 lediglich moduliert. Im Folgenden werden molekulare und physiologische Aspekte des Einflusses von FKBP12 auf die Funktion des RyR1, des TβR-1 und des EGFR erläutert.

1.1.1 FKBP12 als Teil des RyR1-Komplexes

Bei der Untersuchung von tryptisch verdaulichem Ryanodin-Rezeptor-1 aus Kaninchen (kurz RyR1, Swiss-Prot-Eintrag des humanen Rezeptors P21817) wurde ein 15-meres Peptid identifiziert, dessen Sequenz dem N-Terminus von FKBP12 entspricht (Collins *et al.*, 1991). Als Ursache dafür wurde die Ko-Reinigung von RyR1 und FKBP12 angenommen. Außerdem gelang es, den RyR1 unter Verwendung von Anti-FKBP12 AK aus Skelettmuskel-Präparationen zu isolieren (Jayaraman *et al.*, 1992). Die Interaktion wurde durch die Inkubation des mit FKBP12 gesättigten RyR1 mit ^{35}S -markiertem FKBP12 untersucht. Aus der Geschwindigkeit des FKBP12-Austauschs wurde ein K_D -Wert von 330 ± 160 nM abgeleitet (Timerman *et al.*, 1995). Die Inkubation des RyR1/FKBP12-Komplexes in Gegenwart von FK506 beziehungsweise Rapamycin führt zur Dissoziation des Komplexes (Timerman *et al.*, 1993). Trotzdem wurde vorgeschlagen, dass die Bindung nicht durch das aktive Zentrum von FKBP12 vermittelt wird (Samsó *et al.*, 2006).

Anlass zu diesem Vorschlag gaben Strukturdaten des RyR1/FKBP12-Komplexes. Der RyR1 enthält zwölf Transmembranhelices, je vier Moleküle lagern sich zu einem Ca^{2+} -Kanal zusammen. Aufgrund der Größe (als Tetramer 2,3 MDa) und der Membranständigkeit des Rezeptors ist bislang keine Kristallstruktur verfügbar. Durch Kryoelektronen-Mikroskopie wurden Strukturen sowohl des RyR1-Tetramers als auch des RyR1/FKBP12-Heterooktamers ermittelt. Diese Strukturen wurden voneinander subtrahiert, die Differenz stellt FKBP12 dar (Wagenknecht *et al.*, 1997). Die Auflösung von 16 Å war hoch genug, um nicht nur die Position, sondern auch die Orientierung des FKBP12 zu beschreiben (Samsó *et al.*, 2006). Deshalb konnte eine Kristallstruktur von FKBP12 (Burkhard *et al.*, 2000) in die Darstellung integriert werden. Es zeigte sich, dass FKBP12 die Interaktion über den Loop H87-I90 und die von den Resten Q3, E31 und D32 gebildete Oberflächenregion vermittelt (Samsó *et al.*, 2006). Die Dissoziation des RyR1-FKBP12-Komplexes durch FK506 käme danach durch sterische Hinderung und elektrostatische Abstoßung zwischen FK506 und dem RyR1 zustande. Dieser Befund wird durch das Verhalten von FKBP12-Varianten gestützt. F36Y, W59H und F99Y zeichnen sich durch eine stark reduzierte PPlase-Aktivität aus (Timerman *et al.*, 1995). Trotzdem binden sie den RyR1 ähnlich gut wie WT-FKBP12 und haben im Ca^{2+} -Aufnahme-Assay nahezu den gleichen Einfluss auf die Durchlässigkeit des RyR1 wie WT-FKBP12 (Timerman *et al.*, 1995).

Eine ähnliche Interaktion wie zwischen RyR1 und FKBP12 wurde auch für die Isoformen beider Proteine, RyR2 und FKBP12.6, beschrieben (Timerman *et al.*, 1994, Betzenhauser und Marks, 2010). RyR2 und FKBP12.6 wurden fluoreszenzmarkiert, dann wurde der RyR2/FKBP12.6-Komplex mittels FRET untersucht. Aus den Energietransfereffizienzen wurde geschlussfolgert, dass auch die Bindung von FKBP12.6 an RyR2 nicht durch das aktive Zentrum von FKBP12.6 vermittelt wird (Cornea *et al.*, 2010).

Die FKBP12-Bindungsstelle befindet sich zwischen den als *handle* und *clamp* bezeichneten RyR1-Regionen (Samsó *et al.*, 2009). In Übereinstimmung damit wird dem AS-Rest V2461 eine Schlüsselrolle für die Vermittlung der Interaktion zugeschrieben. Die RyR1-Varianten V2461G, V2461E und V2461I sind nicht in der Lage, FKBP12 zu binden (Gaburjakova *et al.*, 2001). Die Phosphorylierung von S2843 durch Proteinkinase A bewirkt die Dissoziation des RyR1/FKBP12-Komplexes (Reiken *et al.*, 2003), obwohl S2843 mehr als 100 Å von der FKBP12-Bindungsstelle entfernt liegt (Meng *et al.*, 2007). Die Dissoziation des Komplexes durch Phosphorylierung konnte allerdings von einer anderen Arbeitsgruppe nicht reproduziert werden (Xiao *et al.*, 2004). Auch andere posttranslationale Modifikationen des RyR1, nämlich die S-Nitrosylierung und die S-Glutathionylierung von Cystein-Resten, verringern die Affinität des RyR1 zu FKBP12 (Aracena *et al.*, 2005).

Die Öffnungs-Wahrscheinlichkeit des Ca^{2+} -Kanals RyR1 ist unter anderem vom Membranpotential und der Anwesenheit von Ca^{2+} - bzw. Mg^{2+} -Ionen abhängig. Sie kann *in vitro* durch die Inkorporation einzelner Kanäle in planare Lipidmembranen untersucht werden (Mayrleitner *et al.*, 1994). Der Vergleich von FKBP12-enthaltenden mit FKBP12-freien Kanälen brachte Aufschluss über die Funktion der PPLase. Bei einer *cis*- Ca^{2+} -Konzentration von 0,1 μM sind die FKBP12-freien Kanäle deutlich häufiger geöffnet als die FKBP12-enthaltenden Kanäle. FKBP12 erhöht also den Schwellenwert für die Kanalöffnung. Ein weiterer Befund dieser Experimente war, dass in Abwesenheit von FKBP12 Kanäle beobachtet werden, deren Durchlässigkeiten weder dem geschlossenen noch dem geöffneten Zustand zuzuordnen sind. FKBP12 verhindert die Populierung von *subconductance states* und stabilisiert dadurch den geschlossenen Zustand des RyR1 (Ahern *et al.*, 1997).

In Säugetieren ist der RyR1 hauptsächlich im sarkoplasmatischen Retikulum von Skelett-Muskelfasern lokalisiert. Wenn die Muskelfasern durch einen Nervenimpuls

angeregt werden, ist der RyR1 für Ca^{2+} -Ionen durchlässig, anderenfalls ist er für Ca^{2+} -Ionen undurchlässig. Die physiologische Rolle des RyR1 liegt also in der Erregungs-Kontraktions-Kopplung. Um den Einfluss von FKBP12 auf die RyR1-Funktionalität zu untersuchen, wurden mit dem *Cre/loxP*-System Mäuse generiert, die ausschließlich in ihrer Skelett-Muskulatur FKBP12-defizient sind (Tang *et al.*, 2004). Der Vergleich der kontraktiven Eigenschaften des *Extensor digitorum longus*-Muskels mit dem entsprechenden Wildtyp-Muskel zeigte, dass FKBP12 die Muskelspannung bei einem Tetanus um bis zu 32 % steigert. Bei der Untersuchung des *Soleus*-Muskels wurde kein Einfluss von FKBP12 beobachtet, und bei der Untersuchung des *Diaphragma*-Muskels wurde sogar der gegenteilige Effekt, also die Absenkung der Muskelspannung, festgestellt (Tang *et al.*, 2004). Aufgrund der mangelnden Eindeutigkeit der Ergebnisse werden Modelle für die Modulation der physiologischen RyR1-Aktivität durch FKBP12 noch immer kontrovers diskutiert (Feng *et al.*, 2010).

Störungen in der RyR1-Funktion wurden als maßgeblich für die Ausbildung der Duchenne-Muskeldystrophie vorgeschlagen (Bellinger *et al.*, 2009). Menschen, die von dieser genetischen Erkrankung betroffen sind, verfügen über kein funktionales Dystrophin. Im Maus-Modell schlägt sich diese Defizienz in verstärkter S-Nitrosylierung des RyR1 nieder. Damit einher gehen die Dissoziation des RyR1/FKBP12-Komplexes, der pathologische Einstrom von Ca^{2+} -Ionen ins Zytoplasma und die Zerstörung der Skelett-Muskelfasern (Bellinger *et al.*, 2009).

1.1.2 Die Rolle von FKBP12 in der T β R-Signaltransduktion

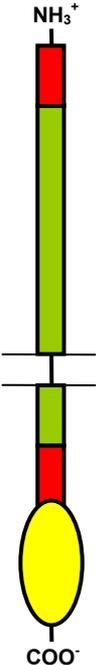
Ein weiterer physiologischer Interaktionspartner von FKBP12 wurde durch Anwendung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems gefunden (Wang *et al.*, 1994). Es handelt sich dabei um den Typ-1-Rezeptor des *transforming growth factor- β* (kurz T β R-I, Swiss-Prot-Eintrag P36897). Mittels Ko-Immünpräzipitation konnte die Bindung von FKBP12 an den T β R-I bestätigt werden. Die FKBP12-Variante D37G, die sich durch eine reduzierte PPlase-Aktivität auszeichnet, ist nicht in der Lage, den T β R-I zu binden. Außerdem wird die Bindung durch die Anwesenheit von FK506 verhindert. Aus diesen Befunden wurde geschlussfolgert, dass die T β R-I/FKBP12-Interaktion durch das aktive Zentrum von FKBP12 vermittelt wird (Wang *et al.*, 1994).

Der T β R-I setzt sich aus der N-terminalen extrazellulären Domäne, einer Transmembranhelix, der GS-Region und der C-terminalen Kinasedomäne zusammen

(**Tabelle 2**). Wenn die GS-Region phosphoryliert ist, kann FKBP12 den T β R-I nicht binden (Wang *et al.*, 1996). Deshalb galt es als wahrscheinlich, dass sich die Bindungsstelle von FKBP12 innerhalb der GS-Region befindet. Diese Vermutung wurde durch die Ko-Kristallisation von FKBP12 mit dem intrazellulären Fragment des T β R-I (AS 162-503) bestätigt (Huse *et al.*, 1999). FKBP12 lagert sich über sein aktives Zentrum an L195 und L196 des T β R-I an. Dies ist insofern überraschend, als aufgrund der PPIase-Aktivität von FKBP12 erwartet worden war, dass sich ein Prolinrest innerhalb des Bindemotivs befindet. Bislang ist die Struktur des T β R-I/FKBP12-Komplexes die einzige, die FKBP12 an einen physiologischen Interaktionspartner gebunden zeigt.

Tabelle 2: Domänenstruktur des T β R-I.

AS	Bezeichnung	Funktion
1-24	Signalpeptid	Expression in das ER
25-125	extrazelluläre Domäne	Bindung von Hormonen der TGF- β -Familie Dimerisierung mit T β R-II
126-147	Transmembran-Helix	
148-174	Juxtamembran-Region	
175-204	GS-Region	enthält fünf Phosphorylierungsstellen für T β R-II Bindung von Smad2 bzw. Smad3
205-503	Kinasedomäne	Phosphorylierung von Smad2 bzw. Smad3



In Abwesenheit spezifischer extrazellulärer Liganden befindet sich der T β R-I als Homooligomer an der Zelloberfläche (Derynck und Zhang, 2003). Zytokine der *transforming growth factor- β* -Superfamilie induzieren die Bildung von Heterotetrameren aus je zwei Molekülen T β R-I und T β R-II. Daraufhin phosphoryliert der T β R-II die Reste T185, T186, S187, S189 und S191 in der GS-Region des T β R-I. Der somit aktivierte T β R-I ist in der Lage, die Proteine Smad2 beziehungsweise Smad3 zu binden und zu

phosphorylieren. Die phosphorylierten Smad-Proteine sind dann im Zellkern an der Transkriptions-Regulation beteiligt (Derynck und Zhang, 2003).

Für die Funktion von FKBP12 bei der T β R-Signaltransduktion sind mehrere Modelle vorgeschlagen worden. Ein Modell stützt sich auf den Umstand, dass Mv1Lu-Zellen (ATCC-Nummer CCL-64), die ausschließlich T β R-I-Varianten exprimieren, die nicht zur FKBP12-Bindung in der Lage sind, eine höhere Basalaktivität für die Smad2-Phosphorylierung zeigen. Zellen, die außerdem über keinen aktiven T β R-II verfügen, zeigen diese höhere Basalaktivität nicht. Die Inhibition von FKBP12 in WT-Zellen wiederum bewirkt erhöhte Basalaktivität (Chen *et al.*, 1997). Eventuell erschwert also FKBP12 die Phosphorylierung von T β R-I durch T β R-II. Dann würde FKBP12 die Aktivierung von T β R-I verhindern, wenn die Rezeptoren trotz der Abwesenheit von extrazellulären Liganden interagieren. Außerdem hätte die Bindung von FKBP12 an T β R-I zur Folge, dass geringe Liganden-Konzentrationen nicht zur Induktion einer zellulären Antwort ausreichen (Wang und Donahoe, 2004).

Ein anderes Modell basiert auf der Untersuchung der Smad2-Translokation in COS-1-Zellen (ATCC-Nummer CRL-1650). Die myristoylierte Variante T204D des intrazellulären Fragments des T β R-I bewirkt die Translokation von Smad2 in den Zellkern, auch wenn kein T β R-II vorhanden ist. FKBP12 verhindert die Translokation, und die zusätzliche Gabe von FK506 nivelliert den Effekt von FKBP12 (Stockwell und Schreiber, 1998). Deshalb wurde vorgeschlagen, dass FKBP12 einen Inhibitor der Kinaseaktivität des T β R-I darstellt, und dass die Phosphorylierung der GS-Region die Dissoziation von FKBP12 und damit die Aktivierung des T β R-I bewirkt (Wang und Donahoe, 2004).

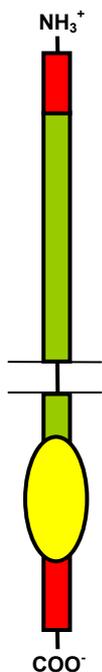
Bereits bei der Erstcharakterisierung von FKBP12-defizienten Mäusen hatten die Autoren auf das normal entwickelte Urogenitalsystem hingewiesen und betont, dass die T β R-Signaltransduktion durch das Fehlen von FKBP12 nicht beeinträchtigt sein könne (Shou *et al.*, 1998). Durch die Untersuchung von FKBP12-defizienten embryonalen Maus-Fibroblasten kam eine andere Arbeitsgruppe zu dem gleichen Schluss. In einem Luciferase-Reportergen-Assay wurde kein Unterschied zu WT-Zellen detektiert, auch der Schwellenwert für die TGF- β -induzierte Wachstumshemmung war identisch (Bassing *et al.*, 1998). An dieser Stelle wird deutlich, dass die physiologische Funktion von FKBP12 experimentell schwer zugänglich ist, da FKBP12 lediglich modulierend auf die untersuchten Enzymaktivitäten wirkt (Wang und Donahoe, 2004).

1.1.3 Aktivierung und zelluläre Funktion des EGFR

Die Rezeptor-Tyrosinkinase *epidermal growth factor receptor* (kurz EGFR, Swiss-Prot-Eintrag P00533) stellt aufgrund ihrer zentralen Bedeutung für die humane Physiologie und Krebsentstehung eines der meistuntersuchten Proteine überhaupt dar (Lemmon und Schlessinger, 2010). Ein Ligand des EGFR, der *epidermal growth factor* (kurz EGF, Swiss-Prot-Eintrag P01133), wurde bereits in den 1960er Jahren von Stanley Cohen isoliert und charakterisiert (Cohen, 1964). Aus der murinen Unterkieferspeicheldrüse gewonnener EGF wurde mit ^{125}I und einem photoaktivierbaren Quervernetzer modifiziert und dem Medium von 3T3-Zellen (ATCC-Nummer CCL-92) zugefügt. Nachdem der EGF an die Zellen gebunden hatte, erfolgte eine kurze UV-Bestrahlung der Ansätze. Durch SDS-PAGE und Autoradiographie wurde ein Rezeptor für EGF mit dem Molekulargewicht 180 kDa identifiziert (Das *et al.*, 1977). Der EGFR besteht aus einem N-terminalen extrazellulären Teil, einer Membran-durchspannenden α -Helix, der Juxtamembran-Region, der Kinasedomäne und der C-terminalen regulatorischen Region (Ullrich *et al.*, 1984, **Tabelle 3**).

Tabelle 3: Domänenstruktur des EGFR.

AS	Bezeichnung	Funktion
1-24	Signalpeptid	Expression in das ER
25-645	extrazelluläre Region	Bindung von Wachstumsfaktoren dadurch Aktivierung der Kinase
646-668	Transmembran-Helix	
669-711	Juxtamembran-Region	Vermittlung der Homo- bzw. Heterodimerisierung
712-979	Kinasedomäne	<i>trans</i> -Autophosphorylierung Phosphorylierung von Signaltransduktions-Proteinen
980-1210	regulatorische Region	enthält mehrere Autophosphorylierungsstellen Bindung von Signaltransduktions-Proteinen



Der EGFR gehört zur Proteinausstattung so unterschiedlicher Gattungen wie *Caenorhabditis*, *Drosophila* und *Homo*. Sowohl die Sequenz als auch die Funktion des EGFR sind innerhalb der Metazoa konserviert (Citri und Yarden, 2006). Im Menschen wird die universelle Bedeutung des EGFR dadurch unterstrichen, dass er in allen Organen exprimiert wird. In der Placenta ist der Gehalt an EGFR-mRNA besonders hoch (<http://biogps.gnf.org/>).

Als Rezeptor für extrazelluläre Wachstumsfaktoren ist der EGFR in der Plasmamembran lokalisiert und tritt dort gehäuft in *lipid rafts* auf (Mineo *et al.*, 1999). Dabei handelt es sich um Mikrodomänen der Membran, die sich durch einen hohen Anteil an Cholesterin und Membranproteinen auszeichnen (Le Roy und Wrana, 2005). Der EGFR liegt nicht ausschließlich als Monomer vor, auch wenn er keinen extrazellulären Liganden gebunden hat. Oligomerisierter EGFR wurde einerseits durch Quervernetzungs-Experimente (Moriki *et al.*, 2001) und andererseits durch *image correlation*-Spektroskopie nachgewiesen. Mit Hilfe der letztgenannten Technik wurde für die Oberfläche von HEK-293-Zellen (ATCC-Nummer CRL-1573) in Abwesenheit von extrazellulären Liganden ein EGFR-Oligomerisierungsgrad von 2,2 ermittelt (Clayton *et al.*, 2005). Zumindest teilweise muss der EGFR folglich als Dimer oder als Oligomer höherer Ordnung vorgelegen haben (Clayton *et al.*, 2008). An dieser Stelle sei angemerkt, dass der EGFR nicht nur Homooligomere bilden kann. Alle Mitglieder der ErbB-Familie, die neben dem EGFR aus den Rezeptoren ErbB2, ErbB3 und ErbB4 besteht, sind zur Ausbildung von Heterokomplexen mit den jeweils anderen Rezeptoren der ErbB-Familie befähigt (Citri und Yarden, 2006).

Die N-terminale extrazelluläre Region des EGFR enthält vier Domänen, bezeichnet als L1, CR1, L2 und CR2. Mittels Röntgenkristallographie wurde herausgefunden, dass die Domänen CR1 und CR2 so miteinander interagieren, dass die Struktur einer gespannten Feder ähnelt (Ferguson *et al.*, 2003). Bisher sind sieben extrazelluläre Liganden des EGFR beschrieben, darunter EGF und TGF- α (Citri und Yarden, 2006). Die Bindung eines dieser Liganden verbrückt die Domänen L1 und L2 und bewirkt dadurch starke konformationelle Änderungen, die eine 130°-Rotation um eine zwischen CR1 und L2 befindliche Achse beinhalten (Burgess *et al.*, 2003). In der resultierenden, als *extended* bezeichneten Konformation sind Bereiche der Domänen CR1 und CR2 exponiert, die den extrazellulären Bereich des EGFR zur Dimerisierung befähigen (Ogiso *et al.*, 2002). Im Unterschied zu anderen Rezeptor-Tyrosinkinasen, bei denen

extrazelluläre Liganden direkt an der Dimerisierung beteiligt sind (Lemmon und Schlessinger, 2010), wird die Dimerisierung des EGFR ausschließlich durch die Oberfläche des Rezeptors vermittelt (Burgess *et al.*, 2003).

Die Bindung eines extrazellulären Liganden aktiviert die Kinasedomäne des EGFR. Lange blieb unverstanden, wie der EGFR die extrazelluläre in die intrazelluläre Information umwandelt. Erst kürzlich wurde von der Arbeitsgruppe Kuriyan ein molekulares Modell für diesen Vorgang vorgeschlagen (Jura *et al.*, 2009). Danach liegt der ligandenfreie EGFR entweder als Monomer oder als symmetrisches Dimer vor. In beiden Zuständen ist die Kinasedomäne autoinhibiert. Die Dimerisierung wird von den C-Termini der Kinasedomänen vermittelt, wie aus einer Kristallstruktur des EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ geschlussfolgert wurde (Jura *et al.*, 2009). Die Bindung zweier Liganden an die extrazellulären Regionen bewirkt die N-terminale Dimerisierung. Daraus folgen Änderungen der Struktur auch im intrazellulären Teil des EGFR. Durch Kontakte der Kinasedomäne eines Rezeptormonomers (des Donors) mit der Juxtamembran-Region des anderen Rezeptormonomers (des Akzeptors) entsteht ein asymmetrisches Dimer, in dem der Donor die Kinase des Akzeptors allosterisch aktiviert. Die Hypothese vom Auftreten eines asymmetrischen Dimers wird durch eine Kristallstruktur des EGFR₆₉₆₋₁₀₂₂ und durch die Konzentrationsabhängigkeit der spezifischen Kinaseaktivität des gleichen Fragments gestützt (Zhang *et al.*, 2006). Mittels dynamischer Lichtstreuung wurde für die Dimerisierung des EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ ein K_D -Wert von 200 nM ermittelt, wobei nicht feststeht, ob es sich bei dem beobachteten Dimer um das symmetrisch-inaktive, das asymmetrisch-aktive oder ein Gemisch beider Spezies handelte (Jura *et al.*, 2009).

Das aktivierte EGFR-Dimer stellt den Kern eines Signaltransduktions-Komplexes dar. Zunächst phosphoryliert der Akzeptor Tyrosinreste in der regulatorischen Region des Donors (Honegger *et al.*, 1989). Dieser Prozess wird als *trans*-Autophosphorylierung bezeichnet. Dadurch entstehen Bindestellen für SH2- beziehungsweise PTB-Domänen von Signaltransduktions-Proteinen (Pawson *et al.*, 2007). Die Phosphorylierung dieser Proteine löst Signalkaskaden aus, an denen mindestens 322 Spezies, darunter 202 Proteinspezies, beteiligt sind (Oda *et al.*, 2005). Beispiele für Substrate des EGFR sind Grb2, das als Adaptor letztlich die Phosphorylierung von Erk1/2 bewirken kann und somit an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist (Mebratu und Tesfaigzi, 2009), und PLC- γ 1, die über die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat die

Zellmotilität beeinflusst (Xie *et al.*, 2010). Eine deterministische Modellierung des Netzwerks ist bislang nicht möglich und wird auch in näherer Zukunft nicht möglich sein (Lemmon und Schlessinger, 2010). Zusammenfassend lässt sich aber sagen, dass der EGFR eine Schlüsselstellung für die Steuerung kritischer zellulärer Prozesse innehat (Oda *et al.*, 2005).

Membranbereiche mit aktiviertem EGFR-Dimer stülpen sich ein und schnüren sich als Vesikel von der Zellmembran ab. Bereits zwei Minuten nach der Bindung eines extrazellulären Liganden wird der EGFR in frühen Endosomen detektiert, wobei sowohl die Clathrin-abhängige (Jiang *et al.*, 2003) als auch die Clathrin-unabhängige Internalisierung (Yamazaki *et al.*, 2002) beschrieben sind. Die E3-Ubiquitin-Ligase Cbl bindet das autophosphorylierte Tyr1069 des EGFR. Die Monoubiquitinylierung des EGFR durch Cbl wird als eine Voraussetzung für die Internalisierung angesehen (Huang *et al.*, 2007). Während dieser Vorgänge fährt die Tyrosinkinase des EGFR fort, Signaltransduktions-Proteine zu phosphorylieren. Es wurde sogar vorgeschlagen, dass Endosomen die eigentliche Lokalisierung der EGFR-Aktivität darstellen (Miaczynska *et al.*, 2004). Das weitere Schicksal des EGFR ist unter anderem von dem Liganden abhängig, der die Aktivierung und Internalisierung ausgelöst hat. Das Milieu in frühen Endosomen ist leicht sauer (pH 6,0 - 6,5). Unter diesen Bedingungen kann zum Beispiel TGF- α den Rezeptor nicht mehr binden. Dieser wird daraufhin deubiquitinyliert, dephosphoryliert und in die Zellmembran zurücktransportiert (French *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu ist die Bindung von EGF an den Rezeptor auch in frühen Endosomen stabil. Deshalb reifen die den EGFR enthaltenden Endosomen zu multivesikulären Körpern und schließlich zu Lysosomen. Dort werden EGF und EGFR dann degradiert (Miller *et al.*, 1986).

Mutationen im *EGFR*-Gen können zu konstitutiver Aktivität des EGFR oder zu erhöhter Konzentration an EGFR führen. Da der EGFR an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist, ermöglichen solche Mutationen unter Umständen Krebszellen die klonale Expansion (Yarden und Sliwkowski, 2001). Im *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (COSMIC) sind zahlreiche in Krebszellen gefundene *EGFR*-Mutationen aufgeführt (Forbes *et al.*, 2010). So liegt zum Beispiel in 35 % aller Glioblastome das *EGFR*-Gen in erhöhter Kopienzahl vor. Dieser Genotyp korreliert mit schnellerem Wachstum der Krebszellen und geringerer Überlebenszeit der Erkrankten (Libermann *et al.*, 1985). In nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen wird konstitutiv aktiver EGFR exprimiert. Dieser

als EGFRvIII bezeichneten Variante fehlen in der extrazellulären Region 267 Aminosäuren. Dadurch kommt es in Abwesenheit von Liganden zur Bildung von aktivem Dimer und unkontrolliertem Zellwachstum (Garcia de Palazzo *et al.*, 1993). A-431-Zellen (ATCC-Nummer CRL-1555) zeichnen sich durch ein um den Faktor 40 erhöhtes EGFR-Expressionsniveau aus (Masui *et al.*, 1993). Deshalb sind A-431-Zell-Membranpräparationen für die Untersuchung der *trans*-Autophosphorylierung des EGFR gut geeignet (Honegger *et al.*, 1989). Die Anwesenheit der PPlase FKBP12 in solchen Membranpräparation verlangsamt die Autophosphorylierung deutlich (Lopez-Illasaca *et al.*, 1998). Befindet sich zusätzlich FK506 im Ansatz, ist kein Einfluss von FKBP12 mehr festzustellen. Weiterhin wurde gezeigt, dass die FKBP12-Varianten D37L beziehungsweise F99Y, die sich durch eine stark reduzierte PPlase-Aktivität auszeichnen, die Autophosphorylierung des EGFR kaum beeinflussen. Dadurch wird eine Beteiligung des aktiven Zentrums von FKBP12 an der Inhibition der Autophosphorylierung nahelegt (Lopez-Illasaca *et al.*, 1998).

1.2 Die Beteiligung von Cyclophilin A an physiologischen Prozessen

Die humane PPIase Cyclophilin A (kurz CypA, Swiss-Prot-Eintrag P62937) ist unter mehreren Gesichtspunkten interessant. Zum einen bindet CypA das zyklische Peptid Cyclosporin A (kurz CsA, Handschumacher *et al.*, 1984). Ähnlich wie FK506/FKBP12 inhibiert der gebildete Komplex die enzymatische Aktivität der Phosphatase Calcineurin und supprimiert dadurch die zelluläre Immunantwort von Säugetieren (Liu *et al.*, 1991, Ho *et al.*, 1996). Des Weiteren wurde beschrieben, dass CypA die Infektion von T-Lymphozyten mit dem humanen Immundefizienz-Virus moduliert (Luban *et al.*, 1993, Strebel *et al.*, 2009) und dass die Anwesenheit von CypA eine Voraussetzung für die Replikation von Hepatitis-C-Viren ist (Yang *et al.*, 2008). Aller Wahrscheinlichkeit nach stellen weder die Vermittlung der Immunsuppression noch die Vermittlung der viralen Pathogenität eine physiologische Funktion von CypA dar.

Das 18 kDa-Protein wird in allen darauf untersuchten humanen Geweben hoch exprimiert, die CypA-Konzentration liegt zwischen 0,8 µg/mg Protein in der Haut und 2,8 µg/mg Protein in der Großhirnrinde (Ryffel *et al.*, 1991). CypA-defiziente Mäuse sind lebensfähig, ihr interessantester Phänotyp ist die Neigung zu allergischen Erkrankungen (Colgan *et al.*, 2004). Medizinisch relevant ist hier der Einfluss von CypA auf die Entstehung von allergischem Asthma (Gwinn *et al.*, 2006) und rheumatoider Arthritis (Yang *et al.*, 2008). Außerdem ist CypA an der Ausbildung abdominalen Aortenaneurysmen beteiligt (Sato *et al.*, 2009).

Neben diesen entzündlichen Prozessen, an denen extrazellulär vorliegendes CypA beteiligt ist, wurde für intrazelluläres CypA eine Aufgabe bei Wachstum und Differenzierung von Nervenzellen vorgeschlagen (Nahreini *et al.*, 2006). So wurde gezeigt, dass Stammzellen mit verringerter CypA-Expression nicht mehr in der Lage sind, in Nervenzellen zu differenzieren (Song *et al.*, 2004). Außerdem interagiert CypA mit dem Protein *apoptosis-inducing factor* und moduliert dadurch die Chromatinolyse (Candé *et al.*, 2004). Auch die Funktion des Tumorsuppressors p53 wird durch CypA beeinflusst (Baum *et al.*, 2009). In Hefe reguliert CypA den nukleären Export des Zinkfinger-Proteins Zpr1 (Ansari *et al.*, 2002). Diese Aufzählung der physiologischen Funktionen von CypA ist nicht vollständig, einen Überblick bietet eine Publikation der Arbeitsgruppe Galat (Galat und Bua, 2010).

In den letzten Jahrzehnten wurde intensiv an niedermolekularen CypA-Inhibitoren geforscht. Besonderes Augenmerk lag dabei auf nicht immunsuppressiven CsA-Derivaten (Rosenwirth *et al.*, 1994), auf isoenzymspezifischen nicht-peptidischen Inhibitoren (Daum *et al.*, 2009) und auf nicht zellgängigen CsA-Derivaten (Malesevic *et al.*, 2010). Die Suche erfolgte zum Beispiel nach der Fähigkeit der niedermolekularen Substanzen, die PPLase-Aktivität von CypA zu inhibieren oder ein fluoreszenzmarkiertes CsA-Derivat aus einem CypA/CsA-Komplex zu verdrängen. In den Abschnitten **1.2.1** und **1.2.2** werden zwei experimentelle Ansätze erläutert, die eventuell dazu geeignet sind, die Inhibition einer physiologischen CypA-Funktion im zellulären Kontext zu untersuchen.

1.2.1 CypA wird zur Differenzierung von Nervenzellen benötigt

P19-Zellen (ATCC-Nummer CRL-1825) sind Embryonalkarzinom-Zellen. Sie sind durch die Implantation eines sieben Tage alten Mausembryos in den Hoden einer erwachsenen C3H/He-Maus entstanden. Aus den Tumorzellen wurden mehrere Zellklone gewonnen, und einer dieser Klone wurde P19 genannt (McBurney und Rogers, 1982). P19-Zellen vereinen Eigenschaften von Krebszellen und von embryonalen Stammzellen. Einerseits lassen sie sich unbegrenzt vermehren und lagern und sind üblichen Zellkultur-Techniken wie Transfektion oder Selektion zugänglich. Andererseits sind sie pluripotent, also in der Lage, auf äußere, chemische Reize hin in unterschiedliche Zelltypen zu differenzieren. Werden P19-Zellen zum Beispiel in Gegenwart von *all-trans*-Retinsäure (kurz RA) kultiviert, differenzieren sie in Fibroblast-artige, als Monoschicht wachsende Zellen und in Neuron-artige, auf dieser Monoschicht wachsende Zellen (Jones-Villeneuve *et al.*, 1982). Das Voranschreiten der Differenzierung lässt sich mikroskopisch oder durch die Untersuchung von Zelllysaten mittels Western-Blot-Analyse verfolgen. Differenzierte Zellen zeigen ein verändertes Expressionsmuster. Neurofilament-M, β -Tubulin III und HNK-1-Antigen werden exklusiv in Neuron-artigen Zellen exprimiert (McBurney, 1993).

Durch einen RNAi-basierten Ansatz wurde gezeigt, dass CypA essentiell für die RA-induzierte Differenzierung von P19-Zellen ist (Song *et al.*, 2004). Dazu wurden P19-Zellklone etabliert, die sich durch ein reduziertes CypA-Expressionsniveau auszeichnen. Werden diese *knockdown*-Zellen nun in Gegenwart von RA kultiviert, bilden sie weder die für Neuron-artige Zellen charakteristischen Dendriten aus, noch

exprimieren sie den neuronalen Marker Neurofilament-M. Besonders interessant ist der Umstand, dass selbst bei einer CypA-Restaktivität von 20 % keine Differenzierung der P19-Zellen zu verzeichnen ist. Durch die transiente Expression von CypA in den CypA-*knockdown*-Zellen kann die Fähigkeit zur Differenzierung wieder hergestellt werden (Song *et al.*, 2004). Diese Befunde bilden möglicherweise eine Grundlage für die Untersuchung des Einflusses niedermolekularer Substanzen auf eine zellphysiologische Funktion von CypA. Eine Voraussetzung dafür ist, dass die Inhibition der PPlase-Aktivität von CypA die gleiche Wirkung hat wie die verminderte Expression von CypA.

1.2.2 CypA als Chemoattraktor für Leukozyten

Die aktive räumliche Bewegung von eukaryotischen Zellen wird als Zellmigration bezeichnet. Im Unterschied zur Chemokinese (ungerichtete Bewegung) und zur Haptotaxis (Zellen binden einen an der extrazellulären Matrix immobilisierten Liganden) wird die Richtung der Chemotaxis durch den Konzentrationsgradienten eines löslichen Liganden vorgegeben (Lauffenburger und Horwitz, 1996, **Abbildung 1a**). Liganden, die eukaryotische Zellen zur Chemotaxis anregen, heißen Chemoattraktoren oder Chemokine. Wenn eine zur Chemotaxis befähigte Zelle den Konzentrationsgradienten eines entsprechenden Chemoattraktors detektiert, wird eine Vielzahl konzertierter Prozesse in Gang gesetzt. Dazu gehören die Bildung von Lamellipodien, Umlagerungen im Aktinskelett, das Anheften am Substrat in Bewegungsrichtung vorn und das Ablösen vom Substrat in Bewegungsrichtung hinten (Lauffenburger und Horwitz, 1996). Chemotaxis spielt zum Beispiel bei der Embryogenese, der Immunantwort, der Wundheilung und der Metastasierung eine Rolle (Pollard und Cooper, 2009).

Es gibt unterschiedliche Methoden zur Untersuchung chemotaktischer Prozesse (Zigmond *et al.*, 2001). Eine dieser Methoden ist der Filter-Assay. Er kann in einer Boyden-Kammer durchgeführt werden (Boyden, 1962). Die Durchführung von Chemotaxis-Experimenten in einer Boyden-Kammer mit zum Beispiel 48 Wells (**Abbildung 1b**) hat den Vorteil, dass viele Bedingungen parallel untersucht werden können und dass die Resultate quantifizierbar sind. Das ermöglicht die Erstellung von Konzentrationsreihen und eine statistische Auswertung. Außerdem erlauben die kleinen Wells den Einsatz kleiner Volumina an Chemoattraktor-Lösung (25 µl).

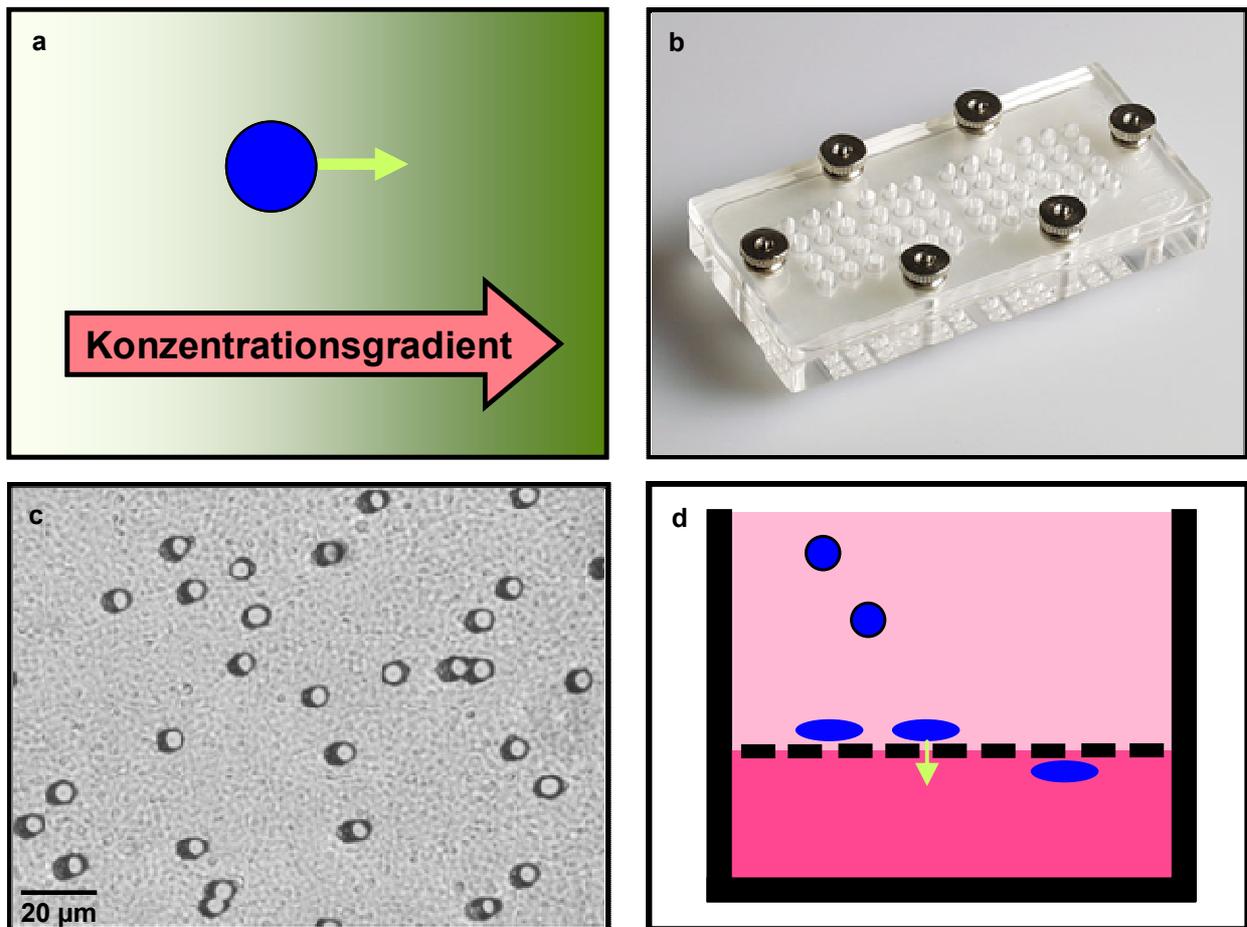


Abbildung 1: Die 48-Well-Boyden-Kammer. (a) Eine Zelle (**blau**) bewegt sich in Richtung des Konzentrationsgradienten. (b) Foto der zusammengebauten Boyden-Kammer. (c) Mikroskopische Aufnahme der perforierten Membran (Porendurchmesser 5 µm). (d) Schematischer Querschnitt durch ein Well der Boyden-Kammer. Zellen (**blau**) sinken zu Boden, heften sich an die perforierte Membran, wandern aufgrund des Konzentrationsgradienten hindurch und verbleiben an der Unterseite der Membran.

Jedes Well der Boyden-Kammer besteht aus zwei Kompartimenten. Im unteren wird der Chemoattraktor vorgelegt, in das obere wird die Zellsuspension gefüllt. Beide Kompartimente sind durch eine perforierte Membran voneinander getrennt (**Abbildung 1c**). Der Porendurchmesser der Membran richtet sich nach der Größe der untersuchten Zellen. Die sich im oberen Kompartiment befindenden Zellen sinken aufgrund ihrer im Vergleich zum Medium größeren Dichte auf die Membran. Dort detektieren sie den Konzentrationsgradienten des Chemoattraktors, heften sich an, durchqueren die Membran und verbleiben an der Unterseite der Membran (**Abbildung 1d**). Zur Auswertung werden die Zellen an der Unterseite der Membran fixiert, gefärbt und am Mikroskop gezählt.

CypA wurde im Wachstumsmedium von aktivierten Makrophagen (Sherry *et al.*, 1992) und von Prostata-Krebszellen (Andersen *et al.*, 2003) nachgewiesen. In der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis wurde eine erhöhte Konzentration an CypA festgestellt (Billich *et al.*, 1997). Bei oxidativem Stress wird CypA von Zellen der vaskulären glatten Muskulatur über einen vesikulären Mechanismus sekretiert (Jin *et al.*, 2000, Suzuki *et al.*, 2006). Das Vorkommen von extrazellulärem CypA legt die Vermutung nahe, dass es sich bei der PPlase um einen Chemoattraktor handelt. Tatsächlich wurde für verschiedene Gruppen von Leukozyten und für mehrere von Leukozyten abgeleitete Krebszell-Linien gezeigt, dass sie sich von CypA zur Chemotaxis anregen lassen (**Tabelle 4**).

Tabelle 4: Zelltypen, für die Chemotaxis mit CypA als Chemoattraktor gezeigt wurde.

Zelltyp	Beschreibung	Referenz
Neutrophile	aus humanem Blut isoliert	Sherry <i>et al.</i> , 1992
Monozyten	aus humanem Blut isoliert	Sherry <i>et al.</i> , 1992
HL-60/Clone 15	von humanen Promyelozyten abgeleitet mit DMSO in Neutrophile differenziert	Xu <i>et al.</i> , 1992
CHO	von den Ovarien chinesischer Hamster abgeleitet rekombinante Expression von CD147	Yurchenko <i>et al.</i> , 2002
PMNL	aus dem Peritoneum der Maus isoliert	Arora <i>et al.</i> , 2005
CD4 ⁺ -T	aus der Milz der Maus isoliert und mit ConA aktiviert	Damsker <i>et al.</i> , 2007
THP-1	von humanen Monozyten abgeleitet	Payeli <i>et al.</i> , 2008
Jurkat	von humanen T-Lymphozyten abgeleitet	Yang <i>et al.</i> , 2008

Diese Befunde bilden möglicherweise eine Grundlage für die Untersuchung des Einflusses niedermolekularer Substanzen auf die Funktion des extrazellulären CypA. Einer der in **Tabelle 4** aufgelisteten Zelltypen war mittels CypA zur Chemotaxis anzuregen. Die Inhibition des Chemoattraktors sollte dann dazu führen, dass keine Chemotaxis mehr auftritt.

1.3 Zielstellung

Die Modulation der EGFR-Kinaseaktivität durch FKBP12

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war die Interaktion zwischen dem EGFR und FKBP12 auf molekularer Ebene näher zu untersuchen. Es war herauszufinden, wie FKBP12 die Autophosphorylierung des EGFR moduliert und welche Rolle die PPIase-Aktivität von FKBP12 dabei spielt. Außerdem sollte ein möglicher Einfluss von FKBP12 auf die EGFR-vermittelte Signaltransduktion in humanen Krebszellen untersucht werden.

Inhibitoren der zellphysiologischen CypA-Funktion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war ein Zellkultur-basiertes Testsystem zu etablieren, mit dessen Hilfe der Einfluss von niedermolekularen Substanzen auf die zellphysiologische Funktion von CypA untersucht werden kann. Die Inhibition des intrazellulären CypA sollte die Differenzierung von Nervenzellen verhindern, und die Inhibition des extrazellulären CypA sollte die Chemotaxis von Leukozyten verhindern.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Antikörper und Plasmide

Die verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht gesondert gekennzeichnet, von Sigma-Aldrich (St. Louis) bezogen.

Tabelle 5: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper.

Bezeichnung	Antigen	Firma	Katalog-Nummer
Anti-EGFR AK	AS 985-996 des EGFR	Sigma-Aldrich	E3138
Anti-PhosphoY AK	Phospho-L-Tyrosin	Sigma-Aldrich	T1325
Anti-PhosphoY869 AK	nicht spezifiziertes Peptid	Cell Signaling	2231
Anti-PhosphoY1016 AK	nicht spezifiziertes Peptid	antibodies-online GmbH	ABIN150734
Anti-PhosphoY1069 AK	nicht spezifiziertes Peptid	Cell Signaling	2237
Anti-PhosphoY1092 AK	nicht spezifiziertes Peptid	Cell Signaling	2234
Anti-PhosphoY1197 AK	nicht spezifiziertes Peptid	Cell Signaling	4407
Anti-FKBP12 AK	rekombinantes FKBP12	nicht kommerziell	-
Anti- β -Aktin AK	nicht spezifiziertes Peptid	Santa Cruz Biotechnology	sc-1616
Anti-NF-M AK	NF-M aus Schwein	BioLegend	626301

Die Klonierungen wurden nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 2001) durchgeführt. Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (Ipswich), Phusion-DNA-Polymerase von Finnzymes (Espoo), T4-Ligase von Fermentas (Vilnius) und Primer von MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

pGEX-FKBP12

Vektor: pGEX-4T-1 (GE Healthcare, Chalfont St. Giles)
 kloniert von: Cordelia Schiene-Fischer
 Restriktionsenzyme: EcoRI und NotI
 Verwendung: Expression von GST-FKBP12 in *E. coli* M15

pQE60-FKBP12

Vektor: pQE60 (Qiagen, Hilden)
 kloniert von: Thomas Tradler
 Restriktionsenzyme: HindIII und NcoI
 Verwendung: Expression von FKBP12 in *E. coli* M15

pQE70-CypA

Vektor: pQE70 (Qiagen, Hilden)
 kloniert von: Thomas Tradler
 Restriktionsenzyme: HindIII und SphI
 Verwendung: Expression von CypA in *E. coli* M15

pCMV-Tag2B-EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀

Vektor: pCMV-Tag2B (Agilent Technologies, Santa Clara)
 Primer: 5' -GATCGAGATATCCGAAGGCGCCACATCGTTTCG-3'
 5' -GTCGATCTCGAGTTATGCTCCAATAAATTCCTG-3'
 Restriktionsenzyme: EcoRV und XhoI
 Verwendung: transiente Expression von EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ mit N-terminalem FLAG-Tag in humanen Krebszellen

pEGFP-FKBP12

Vektor: pEGFP-C1 (BD Biosciences Clontech, Franklin Lakes)
 Primer: 5' -GAATAAGCTTCGATGGGAGTGCAGGTGGAAACC-3'
 5' -CCTCTAGATCATTCCAGTTTTAGAAGCTC-3'
 Restriktionsenzyme: HindIII und XbaI
 Verwendung: transiente Expression von eGFP-FKBP12 in humanen Krebszellen

pFastBac1-EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂

Vektor: pFastBac1 (Invitrogen, Carlsbad)
 Primer: 5' -CTGCGGCCGCGATGGGGGGTTCTTGGAGCCATCCGCAGTTTGAAAAACGAAGGCGCCACATC-3'
 5' -CGCTCGAGTCATGCGAAGTTGGAGTCTG-3'
 Restriktionsenzyme: NotI und XhoI
 Verwendung: Transfektion in Sf9-Zellen zur Generierung von Baculoviren zur Expression von EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ mit N-terminalem Strep-Tag

pFastBac1-EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀

Vektor: pFastBac1 (Invitrogen, Carlsbad)
 Primer: 5' -CTGCGGCCGCGATGGGGGGTTCTTGGAGCCATCCGCAGTTTGAAAAACGAAGGCGCCACATC-3'
 5' -CGCTCGAGTCATGCTCCAATAAATTCCTG-3'
 Restriktionsenzyme: NotI und XhoI
 Verwendung: Transfektion in Sf9-Zellen zur Generierung von Baculoviren zur Expression von EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ mit N-terminalem Strep-Tag

2.2 Expression und Reinigung rekombinanter Proteine

2.2.1 Proteinexpression in *E. coli* M15-Zellen

Zunächst wurden 3x 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Klon der *E. coli* M15-Zellen angeimpft und für 16 Stunden unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

LB-Medium:	10 g/l	Pepton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl
	100 mg/l	Ampicillin
	10 mg/l	Kanamycin

Dann wurden 6x 1000 ml LB-Medium mit je 50 ml dieser Vorkultur angeimpft und unter Schütteln bei 37°C inkubiert, bis die OD der Zellsuspension zwischen 0,5 und 0,6 lag. Anschließend wurde die Proteinexpression durch IPTG (1 mM) induziert. Nach erneuter Inkubation bei 37°C für 4 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation (5.500x g, 10 Minuten, 4°C) pellettiert. Das Pellett wurde bei -80°C gelagert.

2.2.2 Proteinexpression mittels Baculoviren in Sf9-Zellen

Zunächst wurden $2 \cdot 10^8$ Sf9-Zellen in 100 ml TriEx™ Insect Cell Medium (Novagen, Darmstadt) aufgenommen. Dann wurde 1 ml einer Suspension der entsprechenden rekombinanten Baculoviren zugefügt (rund $1 \cdot 10^9$ pfu, siehe 2.4.2). Der Ansatz wurde für 72 Stunden unter Schütteln bei RT inkubiert. Die infizierten Sf9-Zellen wurden durch Zentrifugation (300x g, 5 Minuten, 20°C) pellettiert. Das Pellett wurde bei -80°C gelagert.

2.2.3 Reinigung der prototypischen PPlasen

Reinigung von FKBP12

Die Reinigung von FKBP12 wurde ähnlich wie in der Literatur beschrieben durchgeführt (Standaert *et al.*, 1990). Zunächst wurden 10 g des entsprechenden *E. coli* M15-Pellets in 35 ml Lysepuffer resuspendiert.

Lysepuffer:	10 mM	Tris-HCl	pH 7,5
	1 Tablette/35 ml	Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Basel)	

Die Suspension wurde dreimal durch die French-Press Aminco (SLM Instruments, Urbana) passagiert, dies führte zur Lyse der Zellen. Anschließend wurde das Lysat zentrifugiert (100.000x g, 45 Minuten, 4°C). Der pH-Wert des Überstands wurde mit Tris auf 7,5 eingestellt, und das Volumen wurde mit Wasser auf 100 ml gebracht. Für die säulenchromatographische Auftrennung des Proteingemisches wurde das ÄKTAprime-System (GE Healthcare, Chalfont) eingesetzt. Alle Trennungen wurden bei 4°C durchgeführt. Im ersten Reinigungsschritt wurde das Lysat auf einen Anionenaustauscher geladen.

Schritt 1	Säule	HiTrap DEAE FF
Anionentauscher	Säulenvolumen	10 ml
	Flussrate	2 ml/min
	Laufpuffer	10 mM Tris-HCl pH 7,5
	Elutionspuffer	Laufpuffer mit 1 M NaCl
	Gradientvolumen	200 ml
	Fraktionsvolumen	5 ml

Alle Fraktionen wurden durch SDS-PAGE in 15 %igen Gelen und Coomassie-Färbung analysiert. FKBP12 hatte nicht an die Säule gebunden. Deshalb wurden die Fraktionen des Durchlaufs vereinigt und im zweiten Reinigungsschritt auf einen Kationenaustauscher gebracht, nachdem der pH-Wert mit MES auf 6,7 eingestellt worden war.

Schritt 2	Säule	HiTrap SP FF
Kationentauscher	Säulenvolumen	5 ml
	Flussrate	2 ml/min
	Laufpuffer	10 mM MES pH 6,7
	Elutionspuffer	Laufpuffer mit 1 M NaCl
	Gradientvolumen	200 ml
	Fraktionsvolumen	5 ml

Erneut wurden alle Fraktionen durch PAGE in 15 %igen Gelen und Coomassie-Färbung analysiert. FKBP12 hatte an die Säule gebunden und wurde durch den Elutionspuffer von der Säule eluiert. Die rekombinantes Protein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und unter Verwendung eines Konzentrierungs-Röhrchens (Millipore, Billerica) auf 2,2 ml eingeeengt. Im dritten Reinigungsschritt wurde diese Lösung auf eine Gelfiltrationssäule gebracht.

Schritt 3	Säule	HiLoad 16/60 Superdex 75 pg
Gelfiltration	Säulenvolumen	120 ml
	Flussrate	1 ml/min
	Laufpuffer	20 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl
	Fraktionsvolumen	2 ml

FKBP12 eluierte bei 88,5 ml. Die rekombinantes Protein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und im vierten Reinigungsschritt über eine Endotoxin-Entfernungssäule geleitet.

Schritt 4	Säule	EndoTrap®red
Endotoxin-Entfernung	Säulenvolumen	1 ml
	Flussrate	1 ml/min
	Laufpuffer	20 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl

Der Durchlauf wurde aufgefangen und unter Verwendung eines Konzentrierungs-Röhrchens (Millipore, Billerica) auf rund 1 ml eingeeengt. Die Proteinlösung wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Konzentration an FKBP12 lag bei 640 µM.

Reinigung von CypA

Die Reinigung von CypA wurde wie unter **2.2.3** für FKBP12 beschrieben durchgeführt (Liu *et al.*, 1990). Die Elution von der Gelfiltrationssäule erfolgte bei 80,1 ml. Die Konzentration der finalen CypA-Lösung lag bei 272 μ M.

2.2.4 Reinigung der EGFR-Fragmente

Zunächst wurden rund 1,5 g des entsprechenden Sf9-Zell-Pellets in 45 ml Lysepuffer suspendiert.

Lysepuffer:	50 mM	Tris-HCl	pH 8,0
	500 mM	NaCl	
	2 mM	DTT	
	1 Tablette/90 ml	Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Basel)	

Dann wurde die Suspension mit Ultraschall behandelt, dadurch wurden die Zellen aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde zentrifugiert (100.000x g, 45 Minuten, 4°C). Der das rekombinante Protein enthaltende Überstand wurde auf eine Affinitäts-Chromatographie-Säule gebracht.

Affinitäts-Chromatographie	Säule	StrepTrap HP
	Säulenvolumen	1 ml
	Flussrate	1 ml/min
	Laufpuffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl
	Elutionspuffer	Laufpuffer mit 2,5 mM Desthiobiotin
	Fraktionsvolumen	2 ml

Alle Fraktionen wurden durch PAGE in 10 %igen Gelen und Coomassie-Färbung analysiert. Die EGFR-Fragmente befanden sich in den Elutionsfraktionen. Diese wurden vereinigt und unter Verwendung eines Konzentrierungs-Röhrchens (Millipore, Billerica) in Reaktionspuffer umgepuffert.

Reaktionspuffer:	20 mM	HEPES	pH 7,4
	150 mM	NaCl	
	2 mM	DTT	

Die Proteinlösungen wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Konzentration an EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ lag bei 2,5 μ M, die an EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ bei 1 μ M.

2.3 Protein- und Peptidanalytik

2.3.1 EGF-Markierung mit TAMRA

Die Markierung des EGF mit TAMRA wurde von Tobias Aumüller durchgeführt. Zunächst wurden 0,2 mg rekombinantes EGF (Sigma-Aldrich, St. Louis) in 100 µl Markierungspuffer angelöst.

Markierungspuffer: 100 mM NaHCO₃ pH 8,3

Anschließend wurden 2 µl einer Lösung von 5(6)-TAMRA, SE (20 mM, Molecular Probes, Eugene) in DMSO zugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT inkubiert. Dann wurden 10 µl Sättigungspuffer zugegeben.

Sättigungspuffer: 100 mM Tris-HCl pH 8,3

Schließlich wurde das TAMRA-EGF über HPLC gereinigt, lyophilisiert, in 100 µl PBS aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.3.2 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurde ähnlich wie in der Literatur beschrieben (Laemmli, 1970) unter Verwendung des Minigel-Twin-Systems (Biometra, Jena) durchgeführt. Die Gele enthielten 7,5, 10 bzw. 15 % polymerisiertes Acrylamid und *N,N'*-Methylenbisacrylamid im Verhältnis 37,5 : 1. Während der Elektrophorese wurde die Stromstärke bei konstant 15 mA gehalten.

Laufpuffer: 25 mM Tris-HCl pH 8,3
190 mM Glycin
3,5 mM SDS

Als Molekulargewichts-Standards dienten die Proteine des PageRuler™ (Fermentas, Vilnius).

2.3.3 Western-Blot-Analyse

Zunächst wurden die Proteine aus einem SDS-Gel (siehe 2.7.1) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde die Western-Blot-Kammer Fastblot B43 (Biometra, Jena) eingesetzt. 3 Lagen Whatman-Papier, die Nitrozellulosemembran, das SDS-Gel und 3 weitere Lagen Whatman-Papier wurden in der Kammer gestapelt. Alle Bestandteile dieses Stapels waren mit Transferpuffer getränkt.

Transferpuffer:	25 mM	Tris-HCl	pH 8,3
	150 mM	Glycin	
	10 %	Methanol	

Für 40 Minuten wurde eine Spannung angelegt, die Stromstärke wurde bei konstant 200 mA gehalten. Danach wurde die Nitrozellulosemembran entnommen und für 1 Stunde in 10 ml 2 %igem Milchpulver in TBT-Puffer bei RT inkubiert.

TBT-Puffer:	50 mM	Tris-HCl	pH 7,5
	150 mM	NaCl	
	0,2 %	Tween 20	

Dann wurde sie gemeinsam mit 1 ml Lösung 1 in eine Klarsichtfolie eingeschweißt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Lösung 1 in TBT:	2 %	Milchpulver
	1:50 bis 1:1000	primärer AK

Anschließend wurde die Membran dreimal für 20 Minuten mit je 20 ml TBT-Puffer gewaschen. Im Folgenden wurden 10 ml Lösung 2 zugegeben und die Membran für 60 Minuten bei RT inkubiert.

Lösung 2 in TBT:	2 %	Milchpulver
	1:1000	entsprechender sekundärer AK

Der sekundäre AK war mit HRP konjugiert (Sigma-Aldrich, St. Louis). Schließlich wurde die Membran dreimal für 5 Minuten mit je 20 ml TBT-Puffer gewaschen. Nachdem je 1 ml der ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Chalfont) zugegeben worden war, wurde die Chemilumineszenz der Membran an der CCD-Kamera Chemi-Smart 5000 (PepLab, Erlangen) untersucht.

2.3.4 Ko-Immunpräzipitation

Ausgegangen wurde von HeLa-Zellen, die transient das rekombinante Protein FLAG-EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ exprimierten. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte HeLa-Zellen. Die nahezu konfluent gewachsenen Zellen je einer 75 cm²-Flasche wurden zweimal mit PBS gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS wurden je 600 µl Lysepuffer zugefügt.

Lysepuffer:	50 mM	HEPES	pH 7,4
	150 mM	NaCl	
	1 Tablette/10 ml	Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Basel)	

Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von der Wachstumsfläche geschabt. Dann wurden die Suspensionen mit Ultraschall behandelt, dadurch wurden die Zellen aufgeschlossen. Die Zellysate wurden zentrifugiert (100.000x g, 45 Minuten, 4°C), die Überstände wurden für die Ko-Immunpräzipitation eingesetzt.

Dazu wurden zunächst 20 µl Anti-FLAG M2 Affinitäts-Gel (Sigma-Aldrich, St. Louis) in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen vorgelegt. Dann wurden je 400 µl Lysepuffer zugefügt. Die Ansätze wurden für 5 Minuten inkubiert. Diese und alle folgenden Inkubationen wurden unter Schütteln bei 4°C durchgeführt. Die Ansätze wurden zentrifugiert (1.000x g, 1 Minute, 4°C), die Überstände wurden verworfen. Daraufhin wurden je 400 µl des FLAG-EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ enthaltenden Zellysats zugefügt. Außerdem wurden die gekennzeichneten FKBP-Inhibitoren beigemischt. Die Ansätze wurden für 2 Stunden inkubiert und anschließend zentrifugiert (1.000x g, 1 Minute, 4°C). Die Überstände wurden verworfen, den Pelletts wurden 50 µl Elutionspuffer zugefügt. Es folgte eine Inkubation für 5 Minuten.

Elutionspuffer:	100 µg/ml	FLAG-Peptid	
	50 mM	HEPES	pH 7,4
	150 mM	NaCl	
	1 Tablette/10 ml	Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Basel)	

Danach wurden die Ansätze zentrifugiert (1.000x g, 1 Minute, 4°C). Je 30 µl der Überstände wurden in 30 µl SDS-Probenpuffer überführt. Nach einer Inkubation für 5 Minuten bei 95°C wurden die Proben durch Western-Blot-Analyse unter Verwendung von Anti-EGFR AK und Anti-FKBP12 AK untersucht.

2.3.5 Pull down-Assay

Das Fusionsprotein GST-FKBP12 und das Kontrollprotein GST wurden in *E. coli* M15-Zellen exprimiert (siehe 2.4.1). Die Zellen wurden aufgeschlossen und die Lysate zentrifugiert (siehe 2.5.1). Der *Pull down* wurde am ÄKTAprime-System (GE Healthcare, Chalfont) unter Verwendung einer Säule mit immobilisiertem Glutathion durchgeführt. Die Arbeitstemperatur lag bei 4°C. Zunächst wurden 10 ml der GST-FKBP12 bzw. GST enthaltenden Lösungen auf die Säule gebracht. Anschließend wurde die Säule mit Laufpuffer gespült, bis die Absorption bei 280 nm des Durchlaufs kleiner als 1 mAU war.

Pull down	Säule	GSTrap FF
	Säulenvolumen	1 ml
	Flussrate	0,5 ml/min
	Laufpuffer	50 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, 0,1 % NP-40
	Elutionspuffer	Laufpuffer mit 10 mM Glutathion
	Fraktionsvolumen	0,2 ml

A-431-Zellen wurden in 150 cm²-Flaschen kultiviert, bis sie nahezu konfluent gewachsen waren. Dann wurden sie zweimal mit PBS gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS wurde je 1 ml Lysepuffer zugefügt.

Lysepuffer:	50 mM	HEPES	pH 7,4
	150 mM	NaCl	
	2 mM	DTT	
	1 %	NP-40	
	1 Tablette/10 ml	Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Basel)	

Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von der Wachstumsfläche geschabt. Die resultierende Suspension wurde durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren homogenisiert, für 30 Sekunden gevortext und zentrifugiert (100.000x g, 30 Minuten, 4°C). Anschließend wurden je 5 ml des Überstandes auf die Säule gebracht. Das darin enthaltene Zelllysate entsprach ungefähr drei 150 cm²-Flaschen. Danach wurde die Säule mit Laufpuffer gespült, bis die Absorption bei 280 nm des Durchlaufs kleiner als 15 mAU war. Es folgte die Elution, die Elutionsfraktionen wurden aufgefangen. Die Fraktionen mit der jeweils maximalen Absorption bei 280 nm wurden in SDS-

Probenpuffer überführt und für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Diese Proben wurden durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung und durch Western-Blot-Analyse untersucht.

2.3.6 Bestimmung der PPlase-Aktivität durch isomerspezifische Proteolyse

Die Messungen wurden ähnlich wie in der Literatur beschrieben (Fischer *et al.*, 1984a) durchgeführt. Die Messtemperatur lag bei 10°C. Das Gesamtvolumen jedes Messansatzes betrug 1.600 µl. Darin enthalten waren 0,4 mg/ml α-Chymotrypsin, 0,4 - 10 nM der untersuchten PPlase und 50 µM des jeweiligen Substrats (Suc-AXPF-pNA). Einige Ansätze enthielten außerdem 10 µM eines PPlase-Inhibitors.

Messpuffer:	35 mM	HEPES	pH 7,8
--------------------	-------	-------	--------

Zunächst wurden Messpuffer und α-Chymotrypsin-Lösung für 3 Minuten in einer Küvette präinkubiert. Dann wurden Inhibitor-Lösung und PPlase-Lösung zugefügt. Schließlich wurde die Reaktion durch Beimengung des Substrats gestartet. Am UV/Vis-Spektrometer 8453 (Agilent Technologies, Santa Clara) wurde die zeitliche Änderung der Absorption des Messansatzes bei 390 nm verfolgt. Mit dem Programm SigmaPlot (SYSTAT, San Jose) wurden die Daten an das Zeitgesetz 1. Ordnung angepasst. Die so ermittelten k_{obs} -Werte wurden gegen die PPlase-Konzentrationen aufgetragen. Dadurch ergab sich für FKBP12 und Suc-ALPF-pNA ein $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von $2,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, die PPlase-Aktivität von FKBP12 war durch FK506 bzw. Rapamycin vollständig inhibierbar. Für CypA und Suc-AAPF-pNA ergab sich ein $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von $2,0 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, die PPlase-Aktivität von CypA war durch CsA vollständig inhibierbar. Diese Befunde stimmen mit bereits publizierten Ergebnissen überein (Zoldák *et al.*, 2009).

2.3.7 Autophosphorylierung von EGFR in A-431-Zelllysaten

In einer 75 cm²-Flasche nahezu konfluent gewachsene A-431-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden 600 µl Lysepuffer zugefügt.

Lysepuffer:	50 mM	HEPES	pH 7,4
	150 mM	NaCl	
	2 mM	DTT	
	1 %	NP-40	
	1 Tablette/10 ml	Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Basel)	

Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von der Wachstumsfläche gekratzt und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Die Lösung wurde in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, für 30 Sekunden gevortext und zentrifugiert (14.500x g, 10 Minuten, 4°C). 60 µl-Aliquots des Überstandes wurden mit 15 µl EGF-Lösung (2 µM) und 15 µl MgCl₂-Lösung (80 mM) versetzt. Dann wurden den Reaktionsansätzen 15 µl von Lösungen der jeweiligen Effektoren zugefügt. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 30 Minuten. Anschließend wurde die Autophosphorylierung durch die Gabe von 15 µl ATP-Lösung (16 mM) gestartet. Erneut wurden die Reaktionsansätze für 60 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden sie in 120 µl SDS-Probenpuffer überführt und für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Die Untersuchung der Proben erfolgte mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung von Anti-EGFR AK und mehreren Phosphorylierungsstellen-spezifischen AK.

2.3.8 Autophosphorylierung von EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀

28,9 µl-Aliquots einer Lösung von EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ (1 µM) in Reaktionspuffer (siehe 2.2.4) wurden mit 4 µl MgCl₂-Lösung (100 mM) versetzt. Außerdem wurden je 3,1 µl von Lösungen der jeweiligen Effektoren zugefügt. Darauf folgte eine Inkubation der Reaktionsansätze für 30 Minuten bei 25°C. Dann wurden je 6,3 µl der Reaktionsansätze in 7,7 µl SDS-Probenpuffer überführt und für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Die Autophosphorylierung wurde durch die Gabe von je 3,3 µl ATP-Lösung (20 mM) gestartet. Die Reaktionsansätze wurden bei 25°C inkubiert. Nach 5, 10, 20 und 40 Minuten wurden je 7 µl der Reaktionsansätze in 7 µl SDS-Probenpuffer überführt und für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

2.3.9 Phosphorylierung des Peptids Shc-Y317 durch EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂

16 µl-Aliquots einer Lösung von EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ (0,63 µM) in Reaktionspuffer (siehe 2.5.2) wurden mit 4 µl MgCl₂-Lösung (100 mM) und 8 µl Shc-Y317-Lösung (1,1 mM) versetzt. Das Peptid Shc-Y317 mit der AS-Sequenz RELFDDPSYVNVQNLDK wurde von Günther Jahreis synthetisiert und gereinigt. Außerdem wurden je 8 µl von Lösungen der jeweiligen Effektoren zugefügt. Darauf folgte eine Inkubation der Reaktionsansätze für 30 Minuten bei 25°C. Dann wurden je 9 µl der Reaktionsansätze in 3,5 µl Abstopplösung überführt.

Abstopplösung: 250 mM EDTA

Anschließend wurde die Phosphorylierung von Shc-Y317 durch das Versetzen der Reaktionsansätze mit 3 µl ATP-Lösung (20 mM) gestartet. Die Ansätze wurden bei 25°C inkubiert. Nach 7,5 und nach 15 Minuten wurden je 10 µl der Reaktionsansätze in 2,5 µl Abstopplösung überführt. Die Analyse der Proben erfolgte durch HPLC.

2.3.10 HPLC

Die Proben mit dem Volumen 12,5 µl wurden mit je 12,5 µl HPLC-Probenpuffer versetzt. Pro Lauf wurden 20 µl Probe in die Probenschleife injiziert.

HPLC-Probenpuffer: 50 % Essigsäure

Die Trennungen erfolgten an einer Class-LC10-Anlage (Shimadzu, Kyoto) unter Verwendung einer Vydac 218TP C18-Säule (Abmessungen 250x4,6 mm, Partikelgröße 5 µm, Grace, Columbia). Die Arbeitstemperatur lag bei 40°C, die Flussrate betrug 1 ml/min. Als Laufmittel dienten Wasser und Acetonitril, denen jeweils 0,1 % TFA beigemischt war. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten von 10-40 % Acetonitril innerhalb von 30 Minuten. Mit einem UV-Diodenarray-Detektor wurde die Absorption des Durchlaufs bei 220 und bei 280 nm gemessen.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Erhaltung der verwendeten Zelllinien

Die in **Tabelle 6** angeführten Zelllinien wurden nach den Vorgaben der ATCC (Manassas) kultiviert. DMEM und RPMI wurden von PAA (Linz), TriEx Insect Cell Medium von Novagen (Darmstadt) und FBS von Biowest (Nuaille) bezogen.

Tabelle 6: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Zelllinien.

Name	ATCC-Nummer	Medium	Temperatur (°C)	CO ₂ (%)
A-431	CRL-1555	DMEM mit 10% FBS	37	8,5
HeLa	CCL-2	DMEM mit 10% FBS	37	8,5
HL-60 Clone 15	CRL-1964	RPMI mit 10% FBS	37	5,0
Jurkat	TIB-125	RPMI mit 10% FBS	37	5,0
P19	CRL-1825	α-MEM mit 10% FBS	37	5,0
Sf9	CRL-1711	TriEx Insect Cell Medium	25	-
THP-1	TIB-202	RPMI mit 10% FBS	37	5,0

2.4.2 Transfektion von Sf9-Zellen

Zur Generierung von Baculoviren wurden Sf9-Zellen mit Nanofectin (PAA, Linz) transfiziert. Für die Transfektion von rund 200.000 Zellen in einem Well einer 6-Well-Platte wurde eine Lösung von 3 µg DNA (pFastBac1-EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ oder pFastBac1-EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀) in 100 µl Saline erstellt.

Saline: 150 mM NaCl

Außerdem wurden 9,6 µl Nanofectin in 90,6 µl Saline aufgenommen. Dann wurde die Nanofectin-Suspension zu der DNA-Lösung pipettiert. Die entstandene DNA-Komplex-Suspension wurde durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren durchmischt, für 15 Minuten bei RT inkubiert und dem sich im Well befindenden Medium tropfenweise zugefügt. Dann wurde die Platte für 18 Stunden bei 25°C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, und schließlich wurden 2 ml Medium zugefügt. Nach erneuter Inkubation für 72 Stunden bei 25°C enthielt das Medium den entsprechenden Virus.

befindenden Medium tropfenweise zugefügt. Dann wurde die Platte für 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, und schließlich wurden 2 ml Medium zugefügt. Nach erneuter Inkubation für 48 Stunden bei 37°C standen die Zellen für FACS-Messungen oder die Untersuchung der EGF-induzierten EGFR-Autophosphorylierung zur Verfügung.

2.4.5 Erstellung von Zelllysaten

Die in einem Well einer 6-Well-Platte nahezu konfluent gewachsenen Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen.

PBS:	6 mM	NaH ₂ PO ₄	pH 7,4
	136 mM	NaCl	
	4 mM	KCl	

Nach dem Absaugen des PBS wurden 50 µl Lysepuffer zugefügt.

Lysepuffer in PBS:	1 %	NP-40
	1 Tablette/10 ml	Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Basel)

Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von der Wachstumsfläche geschabt, Die resultierende Suspension wurde durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren homogenisiert, in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, für 30 Sekunden gevortext und zentrifugiert (14.500x g, 10 Minuten, 4°C). 40 µl des Überstandes wurden in 40 µl SDS-Probenpuffer überführt und für 5 Minuten bei 95°C inkubiert.

SDS-Probenpuffer:	150 mM	Tris-HCl	pH 6,8
	80 mM	SDS	
	10 %	Glycerin	
	5 %	Mercaptoethanol	
		Bromphenolblau	

Die Proben konnten nun durch SDS-PAGE oder Western-Blot-Analyse untersucht werden.

2.4.6 Konfokal-Mikroskopie

30 µl Medium mit rund 25.000 Zellen wurden in einen Kanal eines µ-Slide VI (ibidi, Martinsried) gefüllt. Anschließend wurde die Platte für 4 Stunden bei 37°C inkubiert, um das Anheften der Zellen zu ermöglichen. Daraufhin wurden weitere 100 µl Medium in den Kanal gefüllt, gefolgt von einer weiteren Inkubation bei 37°C für 14 Stunden. Zum Fixieren wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 10 Minuten in 100 µl 4 %iger Formaldehyd-Lösung in PBS inkubiert. Diese und alle folgenden Inkubationen erfolgten bei RT. Erneut wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um dann für 1 Minute in 100 µl Methanol inkubiert zu werden. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und für 5 Minuten in 100 µl 2 %iger Glycin-Lösung in PBS inkubiert. Schließlich wurden die Zellen für 60 Minuten in 100 µl 4 %igem Milchpulver in PBS inkubiert. Zum Färben wurden zunächst 100 µl Lösung 1 in den Kanal gefüllt und die Platte für 60 Minuten inkubiert.

Lösung 1 in PBS:	4 %	Milchpulver
	10 µg/ml	DAPI
	1:100	primäre AK

Anschließend wurden die Zellen dreimal für 5 Minuten mit 100 µl 4 %igem Milchpulver in PBS gewaschen. Dann wurden 100 µl Lösung 2 zugegeben und die Platte für 60 Minuten inkubiert.

Lösung 2 in PBS:	4 %	Milchpulver
	1:100	entsprechende sekundäre AK

Die sekundären AK waren mit AlexaFluor488 bzw. Rhodamine Red-X konjugiert (Molecular Probes, Eugene). Die Zellen wurden zweimal für 5 Minuten mit 100 µl 4 %igem Milchpulver in PBS und zweimal mit 100 µl PBS gewaschen. Dann wurde das Präparat am Konfokal-Mikroskop Confocal C1 (Nikon, Tokio) analysiert. Dabei wurden das Objektiv PL APO 60x (Oil) und eine Auflösung von 512 x 512 Pixeln gewählt. Dargestellt sind Falschfarbenbilder, wobei die gewählte Farbe ungefähr der des jeweils emittierten Lichtes entspricht.

2.4.7 FACS-Analyse

Die in einem Well einer 6-Well-Platte wachsenden HeLa-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 500 µl Trypsin-Lösung (0,5 mg/ml) zugefügt. Die Platte wurde für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurden 500 µl Medium zugefügt und die Zellsuspension in ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Mit der Tischzentrifuge wurden die Zellen pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 500 µl 80 %igem Ethanol resuspendiert und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 500 µl Messpuffer resuspendiert und für 1 Stunde bei RT inkubiert.

Messpuffer in PBS:	100 µg/ml	RNase A
	50 µg/ml	Propidiumiodid

Anschließend wurden die Proben am FACSort (Becton-Dickinson, Franklin Lakes) vermessen. Die Zellzyklus-Profile wurden mit dem Programm FlowJo (Tree Star, Ashland) ausgewertet. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt. Angegeben sind das arithmetische Mittel und die Standardabweichung der Anzahl der sich in den jeweiligen Zellzyklus-Phasen befindenden Zellen.

2.4.8 Scratch migration-Assay

Der *scratch migration*-Assay wurde ähnlich wie in der Literatur beschrieben durchgeführt (Dioufa *et al.*, 2010). Nahezu konfluent gewachsene HeLa-Zellen in einem Well einer 6-Well-Platte wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 18 Stunden bei 37°C in Serum-freiem DMEM inkubiert. Dann wurden die gekennzeichneten Effektoren zugefügt, gefolgt von einer erneuten Inkubation bei 37°C für 4 Stunden. Mit einer Pipettenspitze wurde ein Spalt mit einer Breite von rund 600 µm in die Zellschicht geritzt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und dem Zufügen von Serum-freiem DMEM mit den entsprechenden Effektoren wurde das Schließen des Spaltes am Mikroskop TE-DH100W (Nikon, Tokio) dokumentiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass immer wieder derselbe Ausschnitt des Präparats analysiert wurde. Alle 24 Stunden wurde das Medium gewechselt. Der Einfluss jedes Effektors wurde dreifach bestimmt. Angegeben sind das arithmetische Mittel und die Standardabweichung der jeweiligen Spaltbreite.

2.4.9 Chemotaxis-Assay

Der Chemotaxis-Assay wurde ähnlich wie in der Literatur beschrieben (Boyden, 1962) unter Verwendung einer 48-Well-Boyden-Kammer (Neuro Probe, Gaithersburg) durchgeführt. Zunächst wurden je 26 µl einer 0,1 %igen BSA-Lösung in Serum-freiem RPMI-Medium in den unteren Kompartimenten der auf 37°C temperierten Kammer vorgelegt. Außerdem enthielten diese Lösungen die angegebenen Konzentrationen des jeweiligen Chemoattraktors. Dann wurde eine perforierte Polycarbonat-Membran (PVP-frei, Porendurchmesser 5 µm, Porendichte $4 \cdot 10^3$ Poren/mm²) mit der glänzenden Seite nach oben aufgelegt. Nachdem auch die Dichtung und die Deckkammer aufgebracht waren, wurde die Kammer verschraubt. In jedes Kompartiment wurden 50 µl Zellsuspension in RPMI/BSA gefüllt (Zelldichte je nach Zelltyp $1 \cdot 10^5$ - $8 \cdot 10^5$ Zellen/ml). Anschließend wurde die Kammer für 45 Minuten - 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Membran entnommen, und ihre obere Seite wurde mit PBS gewaschen. An dieser Seite verbliebene Zellen wurden abgeschabt. Die Membran wurde auf einen Objektträger gelegt und getrocknet. Schließlich wurden 3 Tropfen Färbelösung auf die Membran gebracht und ein weiterer Objektträger auf die Membran gelegt.

Färbelösung in PBS: 5 µg/ml DAPI

Nach 5 Minuten wurde am Mikroskop TE-DH100W (Nikon, Tokio) ein Fluoreszenzbild jedes Wells aufgenommen (Anregung 340-380 nm, Detektion 435-458 nm). Die fluoreszierenden Zellkerne wurden gezählt. Der Einfluss jeder Chemoattraktor-Konzentration wurde vierfach bestimmt. Angegeben sind das arithmetische Mittel und die Standardabweichung des jeweiligen chemotaktischen Indexes.

2.4.10 P19-Zell-Differenzierung

Die Differenzierung wurde ähnlich wie in der Literatur beschrieben durchgeführt (Jones-Villeneuve *et al.*, 1982). Rund 200.000 exponentiell wachsende P19-Zellen in 2 ml Medium wurden in die Wells einer 6-Well-Platte mit hydrophiler Wachstumsfläche (Katalog-Nummer 3471, Corning, New York) gesät. Dem Medium wurde RA zugefügt (500 nM). Die Platte wurde für 2 Tage bei 37°C inkubiert. Die während dieser Zeit gebildeten Sphäroide wurden durch Zentrifugation (300x g, 5 Minuten, 20°C) pellettiert und die Überstände verworfen. Die Sphäroide wurden mit PBS gewaschen, in 200 µl

Trypsin-Lösung (0,5 mg/ml) resuspendiert und für 5 Minuten bei 20°C inkubiert. Anschließend wurden 2 ml Medium zugefügt. Die Zellsuspensionen wurden in die Wells einer 6-Well-Platte gesät und für 3 Tage bei 37°C inkubiert. Die Untersuchung der Zellen erfolgte mittels Western-Blot-Analyse oder Konfokal-Mikroskopie.

2.4.11 MTT-Assay

Der MTT-Assay wurde ähnlich wie in der Literatur beschrieben durchgeführt (Mosmann, 1983). Rund 7.000 exponentiell wachsende HeLa- bzw. P19-Zellen in 66 µl Medium wurden in die Wells einer 96-Well-Platte gesät und für 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden jedem Well 66 µl CsA enthaltendes Medium zugefügt. Die CsA-Endkonzentrationen lagen bei 0, 0,39, 0,78, 1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25,0, 50,0 bzw. 100 µM. Die Platte wurde für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurden jedem Well 66 µl MTT in Medium (1 mg/ml) zugefügt und die Platte für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Schließlich wurde das Medium abgenommen und jedem Well 100 µL DMSO zugefügt. Am Plattenlesegerät VersaMax (Molecular Devices, Sunnyvale) wurden die Extinktionen bei 570 nm bestimmt. Einige Wells hatten zellfreies Medium enthalten. Die Extinktion der in diesen Wells befindlichen Lösung diente als Leerwert und wurde von den anderen Extinktionen subtrahiert. Die Extinktion der Lösungen in den Wells, denen kein CsA zugefügt worden war, entsprach der relativen Zellzahl 100 %. Der Einfluss jeder CsA-Konzentration wurde dreifach bestimmt. Angegeben sind das arithmetische Mittel und die Standardabweichung der relativen Zellzahlen.

3 Ergebnisse

3.1 Die Modulation der EGFR-Kinaseaktivität durch FKBP12

3.1.1 Der Einfluss von FKBP12 auf die Kinaseaktivität von EGFR

3.1.1.1 Der Einfluss von FKBP12 auf die Autophosphorylierung von EGFR in A-431-Zelllysaten

Zunächst wurde der Einfluss von FKBP12 auf die Autophosphorylierung des Volllängen-EGFR untersucht, um die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Wetzker zu reproduzieren (Lopez-Illasaca *et al.*, 1998). Dazu wurden exponentiell wachsende A-431-Zellen gewaschen, mittels NP-40 lysiert und das Lysat durch Zentrifugation geklärt. Das geklärte Lysat enthielt 0,8 μM FKBP12. Die Konzentration wurde durch densitometrische Analyse eines Western-Blots unter Verwendung von Anti-FKBP12 AK bestimmt. Als Standards dienten Lösungen von rekombinantem FKBP12 (**Abbildung 2a**). Dem geklärten Lysat wurden EGF (250 nM) und Mg^{2+} -Ionen (10 mM) zugefügt. Die entstandene Lösung stellte ein zellfreies System zur Untersuchung der Autophosphorylierung des EGFR dar.

Ein Aliquot der Lösung wurde mit dem FKBP-Inhibitor FK506 (10 μM) versetzt. Dadurch befand sich nahezu kein aktives FKBP12 im Reaktionsansatz. Einem zweiten Aliquot wurde ein entsprechendes Volumen an Puffer zugefügt. In diesem Reaktionsansatz befanden sich 0,4 μM FKBP12. Einem dritten Aliquot wurde rekombinantes FKBP12 (5 μM) zugefügt. In diesem Reaktionsansatz befanden sich insgesamt 5,4 μM FKBP12. Die drei Reaktionsansätze wurden für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Autophosphorylierung durch die Zugabe von ATP (2 mM) gestartet. Nach erneuter Inkubation für 60 Minuten auf Eis wurde die Reaktion durch Überführung der Reaktionsansätze in SDS-Probenpuffer und Inkubation bei 95°C gestoppt. Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden durch SDS-PAGE in 7,5 %igen Gelen aufgetrennt. Die Detektion des EGFR und des phosphorylierten EGFR erfolgte mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung von Anti-EGFR AK und mehreren Phosphorylierungsstellen-spezifischen AK (**Abbildung 2b**).

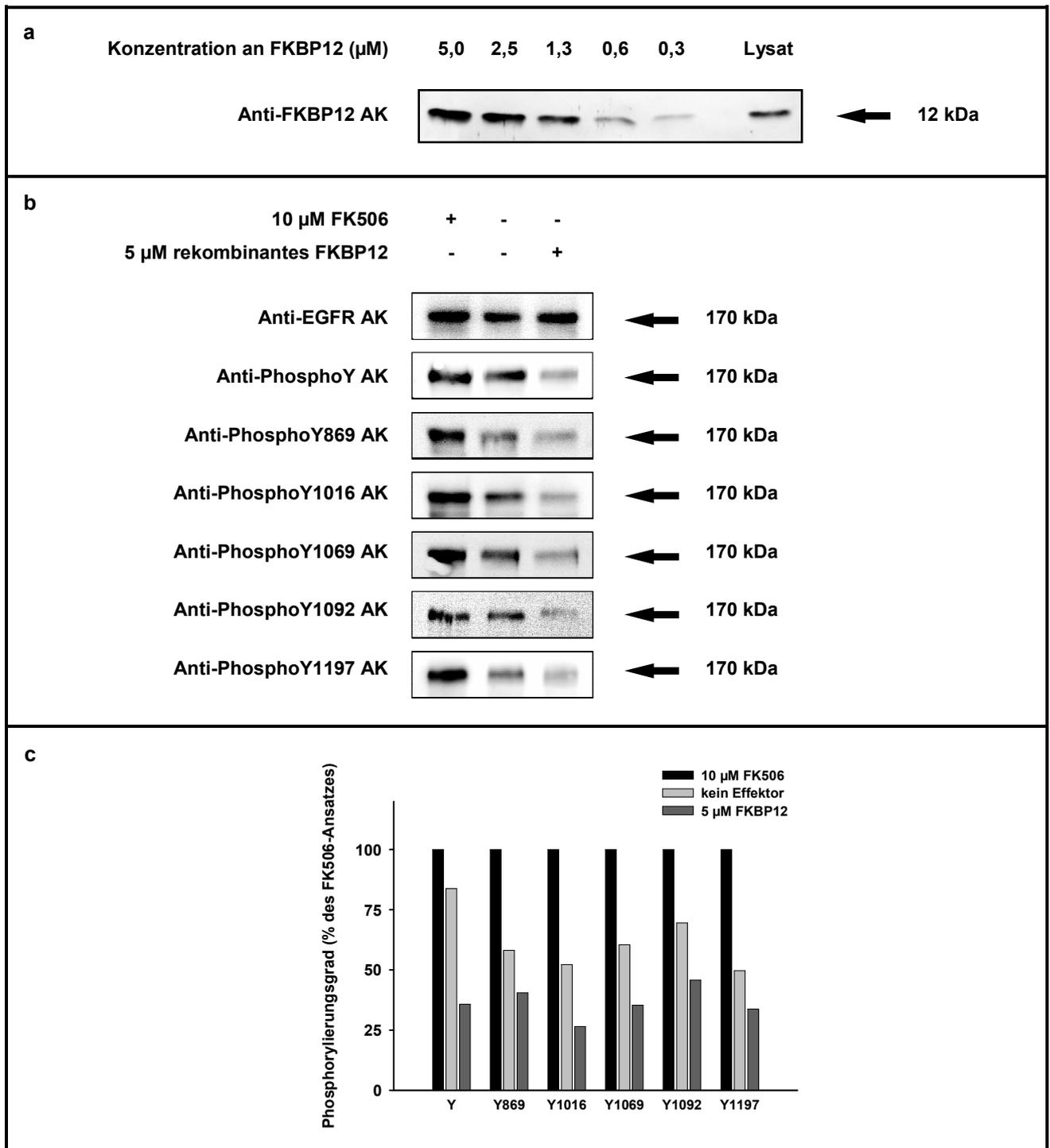


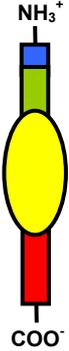
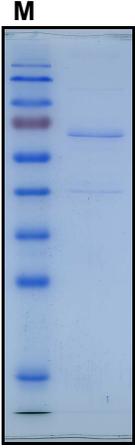
Abbildung 2: Der Einfluss von FKBP12 auf die Autophosphorylierung von EGFR in A-431-Zell-Lysaten. (a) Lösungen von rekombinatem FKBP12 und A-431-Zelllysate wurden mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Durch Densitometrie wurde in A-431-Zelllysate eine FKBP12-Konzentration von $0,8 \mu\text{M}$ ermittelt. (b) A-431-Zelllysate wurde in Gegenwart von FK506, keinem Effektor bzw. FKBP12 für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Autophosphorylierung durch Zufügen von ATP gestartet. Die Detektion erfolgte durch Western-Blot-Analyse unter Verwendung von Anti-EGFR AK und mehreren Phosphorylierungsstellen-spezifischen AK. (c) Bestimmung des relativen Phosphorylierungsgrades der einzelnen Phosphorylierungsstellen durch densitometrische Analyse der Western-Blots. 250 nM EGF, 10 mM Mg^{2+} , $10 \mu\text{M}$ FK506, $5 \mu\text{M}$ FKBP12, 2 mM ATP, Reaktionszeit 60 min, Temperatur 0°C .

Alle Reaktionsansätze enthielten die gleiche Menge an EGFR. Der EGFR war an allen untersuchten Tyrosin-Resten phosphoryliert. Für alle untersuchten Tyrosin-Reste hing der Grad der Phosphorylierung von der im Reaktionsansatz vorhandenen Menge an aktivem FKBP12 ab. Je mehr aktives FKBP12 vorhanden war, desto niedriger war der Phosphorylierungsgrad. Die Western-Blots wurden densitometrisch analysiert. 5,4 μM aktives FKBP12 bewirkten einen um 64 % reduzierten Gesamtphosphorylierungsgrad im Vergleich zu dem Reaktionsansatz, der nahezu kein aktives FKBP12 enthielt (**Abbildung 2c**).

3.1.1.2 Die Herstellung des Fragments EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀

Das in 3.1.1.1 eingesetzte zellfreie System enthielt neben dem EGFR und FKBP12 eine Vielzahl anderer Proteine. Das beschriebene Experiment gibt keinen Aufschluss darüber, ob FKBP12 direkt mit dem EGFR interagiert oder ob andere Proteine den Einfluss von FKBP12 vermitteln. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde das Fragment EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ rekombinant hergestellt (**Tabelle 7**). Es umfasst den gesamten intrazellulären Bereich des Rezeptors (Ullrich *et al.*, 1984). Die extrazelluläre Region und die Transmembran-Helix des EGFR wurden durch einen Strep-Tag II ersetzt.

Tabelle 7: Das Fragment EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀. SDS-PAGE in einem 10 %igen Gel, Färbung mit Coomassie.

Konstrukt	Beschreibung	SDS-PAGE
EGFR ₆₆₉₋₁₂₁₀	 <p>Strep-Tag Juxtamembran-Region Kinasedomäne regulatorische Region</p> <p>AS-Sequenz: MGGWSHPQFEK-EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀</p>	 <p>M</p> <p>← 64 kDa</p>

EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ wurde mit dem Bac-to-Bac[®]-System (Invitrogen, Carlsbad) in TriEx[™]-Zellen (Novagen, Darmstadt) exprimiert und über eine Streptactin-Säule (IBA, Göttingen) gereinigt. Anschließend wurde es unter Verwendung eines Konzentrierungs-Röhrchens (Millipore, Billerica) umgepuffert. Eine Stammlösung mit der Konzentration 1 µM wurde in 20 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl und 2 mM DTT bei -80°C gelagert.

3.1.1.3 Der Einfluss von FKBP12 auf die Autophosphorylierung von EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀

Zunächst wurde untersucht, ob EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ zur Autophosphorylierung befähigt ist. Dazu wurden einer Lösung von EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ Mg²⁺-Ionen (10 mM) und ATP (2 mM) zugefügt, ein Kontrollansatz enthielt kein ATP. Anschließend wurde das Gemisch für 60 Minuten bei 25°C inkubiert, in SDS-Probenpuffer überführt und für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden durch SDS-PAGE in einem 10 %igen Gel und Coomassie-Färbung analysiert (**Abbildung 3**). Während der Inkubation in Gegenwart von ATP wurde EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ autophosphoryliert. Dabei änderte sich die Laufhöhe des Proteins im SDS-Gel von 64 kDa zu 75 kDa.

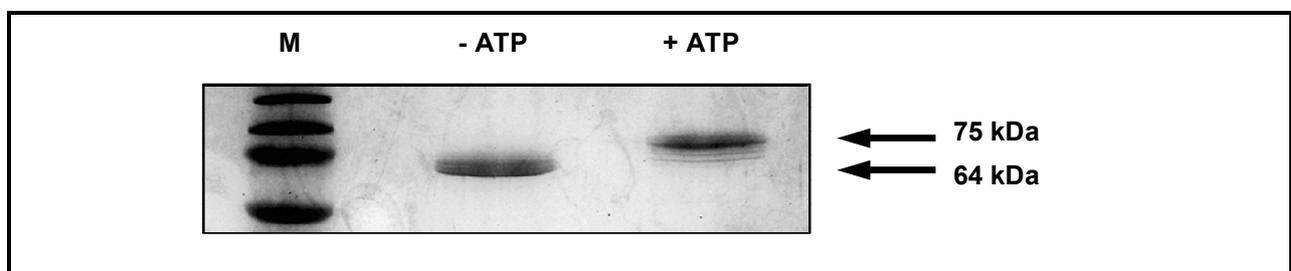


Abbildung 3: Autophosphorylierung von EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀. Das rekombinante Protein wurde in Abwesenheit oder Anwesenheit von ATP inkubiert. Anschließend wurden die Proben durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. 10 mM Mg²⁺, 2 mM ATP, Reaktionszeit 60 min, Temperatur 25°C, 10 %iges Gel.

Dann wurden die Phosphorylierungsgrade von EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ und Phospho-EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ untersucht. Die beiden dominanten Banden aus **Abbildung 3** wurden ausgeschnitten, tryptisch verdaut und von Angelika Schierhorn mittels Nano-LC MS untersucht (Agilent Technologies, Santa Clara). Die Spektren befinden sich im Anhang. Die Sequenzabdeckung lag für EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ bei 76 % und für Phospho-EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ bei 62 %. Für jeden Tyrosin-Rest, für den Autophosphorylierung beschrieben ist (Morandell *et al.*, 2008), wurde in EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ das nicht-phosphorylierte Peptid und in Phospho-EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ das entsprechende phosphorylierte Peptid detektiert. Einige nicht-

phosphorylierte beziehungsweise phosphorylierte Peptide wurden sowohl in EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ als auch in Phospho-EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ detektiert. Aus dem Verhältnis der Peakflächen der phosphorylierten und der nicht-phosphorylierten Peptide ließ sich der Phosphorylierungsgrad der einzelnen Tyrosin-Reste abschätzen (McLachlin und Chait, 2001, **Tabelle 8**). Es zeigte sich, dass EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ an 8 % der Tyrosin-Reste phosphoryliert war (arithmetisches Mittel der Phosphorylierungsgrade aus **Tabelle 8**). Wahrscheinlich war die Phosphorylierung bereits während der Expression des EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ in den TriExTM-Zellen erfolgt. Phospho-EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ war an 94 % der Tyrosin-Reste phosphoryliert (arithmetisches Mittel der Phosphorylierungsgrade aus **Tabelle 8**).

Tabelle 8: Phosphorylierungsgrade der einzelnen Tyrosinreste in EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ und Phospho-EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀. Die Banden aus **Abbildung 3** wurden von Angelika Schierhorn mittels Nano-LC MS untersucht. Anhand der Peakflächen wurde der Phosphorylierungsgrad abgeschätzt.

Tyrosinrest	EGFR ₆₆₉₋₁₂₁₀ (Phosphorylierungsgrad in %)	Phospho-EGFR ₆₆₉₋₁₂₁₀ (Phosphorylierungsgrad in %)
869	0	100
998	5	77
1016	3	100
1069	0	81
1092	19	100
1110	13	100
1172	20	90
1197	0	100
gesamt	8	94

Im Folgenden wurde der Einfluss von FKBP12 auf die Autophosphorylierung von EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ untersucht. Dazu wurde EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ (0,5 µM) ohne Effektor oder in Gegenwart von FKBP12 (5 µM) für 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Ein Kontrollansatz enthielt zusätzlich zu FKBP12 den FKBP-Inhibitor FK506 (10 µM), ein weiterer Kontrollansatz enthielt anstelle von FKBP12 die PPlase CypA (5 µM). CypA verfügt über eine andere Substratspezifität als FKBP12 und ist deshalb als Kontrollprotein gut geeignet. Durch die Zugabe von ATP (2 mM) wurde die Autophosphorylierung gestartet, zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen. Diese Proben wurden durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert (**Abbildung 4**).

Das Experiment wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Banden des EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ und des Phospho-EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ wurden densitometrisch quantifiziert. Mit fortschreitender Inkubationszeit nahm die Menge an EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ ab, gleichzeitig nahm die Menge an Phospho-EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ zu. Aufgrund der sukzessiven Phosphorylierung der regulatorischen Region (Guo *et al.*, 2003) wurde außerdem EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ detektiert, dessen Phosphorylierungsgrad zwischen 8 und 94 % lag.

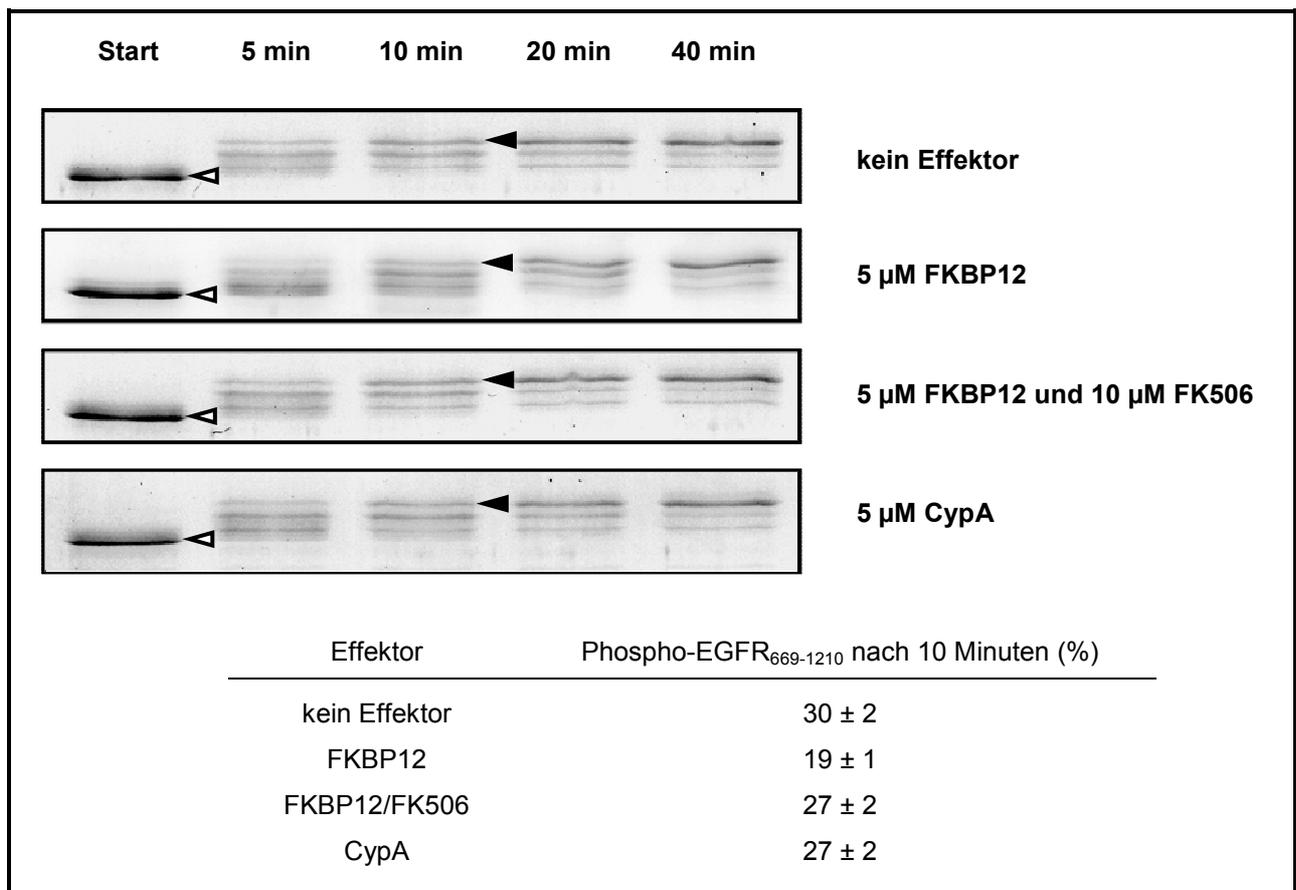


Abbildung 4: Der Einfluss von FKBP12 auf die Autophosphorylierung von EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀. Das rekombinante Protein wurde in Gegenwart der aufgeführten Effektoren der Autophosphorylierung unterzogen. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. **Weisse Pfeilköpfe** EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ vor der Phosphorylierung. **Schwarze Pfeilköpfe** Phospho-EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ nach 10 Minuten. Die anderen Banden entsprechen teilweise phosphoryliertem EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀. Gezeigt sind repräsentative Gele der Dreifachbestimmung. Durch Densitometrie wurde die Menge an Phospho-EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ nach 10 Minuten ermittelt. 10 mM Mg²⁺, 2 mM ATP, Temperatur 25°C, 10 %ige Gele.

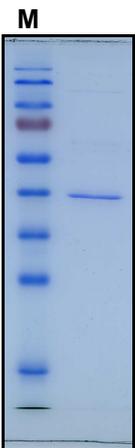
Die Gegenwart von FKBP12 bewirkte langsamere Autophosphorylierung. Der größte Unterschied zwischen der Menge an Phospho-EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ im Ansatz ohne Effektor und im FKBP12 enthaltenden Ansatz bestand 10 Minuten nach Reaktionsbeginn. Der Ansatz ohne Effektor enthielt nach 10 Minuten 30 ± 2 % Phospho-EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀. Dieser

Wert ist der Quotient aus dem Volumen der durch den schwarzen Pfeilkopf gekennzeichneten Bande und dem Volumen der durch den weißen Pfeilkopf gekennzeichneten Bande. Der FKBP12 enthaltende Ansatz enthielt nach 10 Minuten nur $19 \pm 1 \%$ Phospho-EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀. Damit war ein direkter Einfluss von FKBP12 auf die Autophosphorylierung gezeigt. In Gegenwart von FK506 hatte FKBP12 ebenso wie CypA kaum einen Einfluss auf die Autophosphorylierung (jeweils $27 \pm 2 \%$).

3.1.1.4 Die Herstellung des Fragments EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂

Bei der unter 3.1.1.3 beschriebenen Autophosphorylierung fungierte EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ gleichzeitig als Tyrosinkinase und als Phosphorylierungssubstrat. Um herauszufinden, ob FKBP12 eher die Enzym- oder die Substrateigenschaften des EGFR beeinflusst, wurde das Fragment EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ rekombinant hergestellt (**Tabelle 9**) und zur Phosphorylierung eines alternativen Substrats eingesetzt. EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ unterscheidet sich von EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ durch die Deletion der regulatorischen Region, in der sich fast alle durch Autophosphorylierung phosphorylierbaren Tyrosinreste befinden (Morandell *et al.*, 2008). Die Reinigung und Lagerung erfolgte wie in 3.1.1.2 für EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ beschrieben.

Tabelle 9: Das Fragment EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂. SDS-PAGE in einem 10 %igen Gel, Färbung mit Coomassie.

Konstrukt	Beschreibung	SDS-PAGE
EGFR ₆₆₉₋₁₀₂₂	 <p>Strep-Tag Juxtamembran-Region Kinasedomäne</p> <p>AS-Sequenz: MGSWSHPQFEK-EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂</p>	

3.1.1.5 Der Einfluss von FKBP12 auf die Kinaseaktivität von EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂

Der EGFR ist nicht nur zur Autophosphorylierung befähigt, er ist auch in der Lage, Tyrosin enthaltende Peptide zu phosphorylieren (Hsu *et al.*, 1990). Zum Beispiel ist das vom *SHC-transforming protein 1* (Swiss-Prot-Eintrag P29353) abgeleitete Peptid

Shc-Y317: RELFDDPSYVNVQNLDK (AS 309-325 des *SHC-transforming protein 1*)

ein Substrat des EGFR (Fan *et al.*, 2004). Einer Lösung von Shc-Y317 (220 μM) und EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ (0,25 μM) wurde ATP (2 mM) zugefügt. Aliquots des Reaktionsansatzes wurden zu verschiedenen Zeitpunkten in EDTA-Lösung überführt, um die Reaktion abzustoppen. Diese Proben wurden mittels HPLC untersucht (**Abbildung 5a**). Vor der Reaktion hatte Shc-Y317 eine Retentionszeit von 17,61 Minuten (blaues Laufprofil). Der Peak wurde aufgefangen und von Angelika Schierhorn mittels ESI MS untersucht (FlexAnalysis, Bruker Daltonics, Billerica). Das ermittelte Molekulargewicht entsprach dem für Shc-Y317 errechneten Molekulargewicht (gemessen 2051,0 Da, errechnet 2051,2 Da, Abweichung 0,01 %). Nach 120 Minuten Reaktionszeit hatte das Peptid eine Retentionszeit von 16,66 Minuten (rotes Laufprofil). Auch dieser Peak wurde aufgefangen und massenspektrometrisch untersucht. Das ermittelte Molekulargewicht entsprach dem für Phospho-Shc-Y317 errechneten Molekulargewicht (gemessen 2130,9 Da, errechnet 2130,2 Da, Abweichung 0,03 %).

Die dem Shc-Y317 entsprechenden Peaks wurden in den Grenzen 17,47 und 17,81 Minuten integriert. Die dem Phospho-Shc-Y317 entsprechenden Peaks wurden in den Grenzen 16,50 und 16,84 Minuten integriert (**Abbildung 5a**). Die Peakflächen wurden in die Konzentrationen umgerechnet und in Abhängigkeit von der Reaktionszeit aufgetragen (**Abbildung 5b**). Nach 120 Minuten war Shc-Y317 fast vollständig phosphoryliert, das bei der Retentionszeit 17,61 Minuten verbleibende Signal wurde vermutlich durch eine Verunreinigung des Peptids hervorgerufen. Während der ersten 15 Minuten der Reaktion nahm die Konzentration an Phospho-Shc-Y317 linear zu. Der Anstieg entsprach der Reaktionsgeschwindigkeit V_{Reaktion} .

Nun wurde der Einfluss von FKBP12 auf die Kinaseaktivität von EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ untersucht (**Abbildung 5c**). Dazu wurden die Phosphorylierungsansätze vor dem Beginn der Reaktion für 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Die Ansätze enthielten entweder keinen Effektor, FKBP12 (5 μM), FKBP12 (5 μM) und zusätzliches FK506 (10 μM) oder CypA (5 μM). Die Experimente wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt. FKBP12

inhibierte die Kinaseaktivität von $EGFR_{669-1022}$. V_{Reaktion} wurde von $5,0 \pm 0,1$ auf $3,0 \pm 0,1 \mu\text{M}/\text{min}$ reduziert. FKBP12/FK506 beziehungsweise CypA hatten einen nur geringen Einfluss auf die Kinaseaktivität (V_{Reaktion} von $4,2 \pm 0,2$ beziehungsweise $4,6 \pm 0,4 \mu\text{M}/\text{min}$).

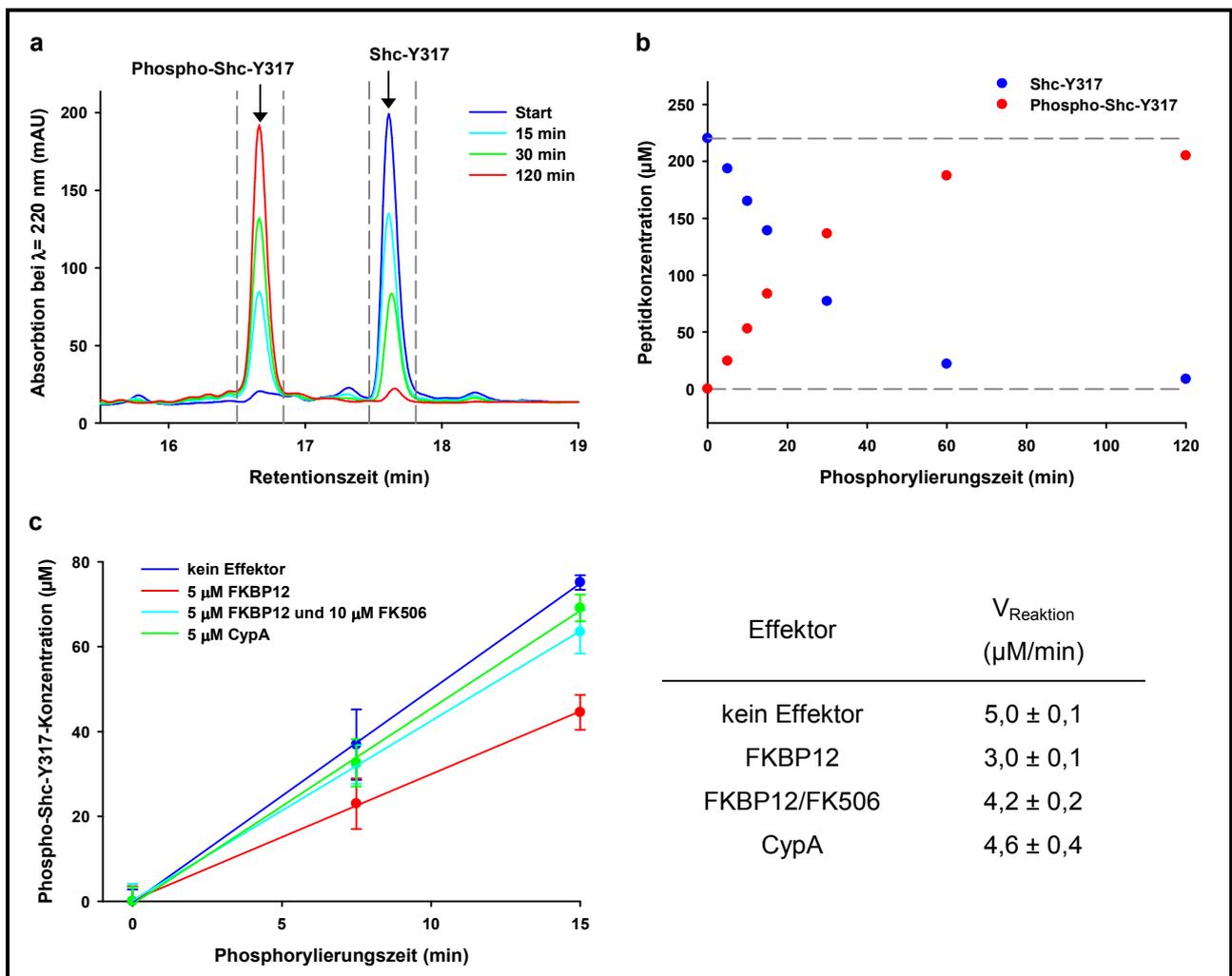


Abbildung 5: Der Einfluss von FKBP12 auf die Kinaseaktivität von $EGFR_{669-1022}$. (a) Phosphorylierung von Shc-Y317. Einer Lösung von $EGFR_{669-1022}$ und Shc-Y317 wurde ATP zugefügt, dadurch wurde die Phosphorylierung gestartet. Zu den gekennzeichneten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, diese wurden mittels HPLC analysiert. Dargestellt sind die HPLC-Profile. (b) Die Peakflächen des Shc-Y317 und des Phospho-Shc-Y317 wurden ermittelt, in die Konzentrationen umgerechnet und gegen die Reaktionszeit aufgetragen. Während der ersten 15 Minuten der Reaktion war die Reaktionsgeschwindigkeit konstant. (c) Dem Reaktionsansatz wurden die gekennzeichneten Effektoren zugefügt. Nach Inkubation für 30 Minuten wurde die Phosphorylierung durch Zufügen von ATP gestartet. Das Experiment wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt. Aus den erhaltenen Daten wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten und die Standardabweichungen errechnet. $0,25 \mu\text{M}$ $EGFR_{669-1022}$, $220 \mu\text{M}$ Shc-Y317, 10 mM Mg^{2+} , 2 mM ATP, Temperatur 25°C .

3.1.2 Die physikalische Interaktion zwischen FKBP12 und EGFR

3.1.2.1 Pull down von EGFR mit GST-FKBP12

Im Folgenden wurde versucht, mittels *Pull down* eine Bindung des EGFR an FKBP12 nachzuweisen. Der *Pull down* wurde am ÄKTAprime-System (GE Healthcare, Chalfont St Giles) unter Verwendung einer 1 ml-Glutathion-Säule durchgeführt. Durch diesen experimentellen Ansatz konnte einerseits ein großes Volumen der den EGFR enthaltenden Lösung eingesetzt werden, andererseits konnte die Absorption des Durchlaufs bei $\lambda = 280$ nm bestimmt werden (siehe 2.3.5).

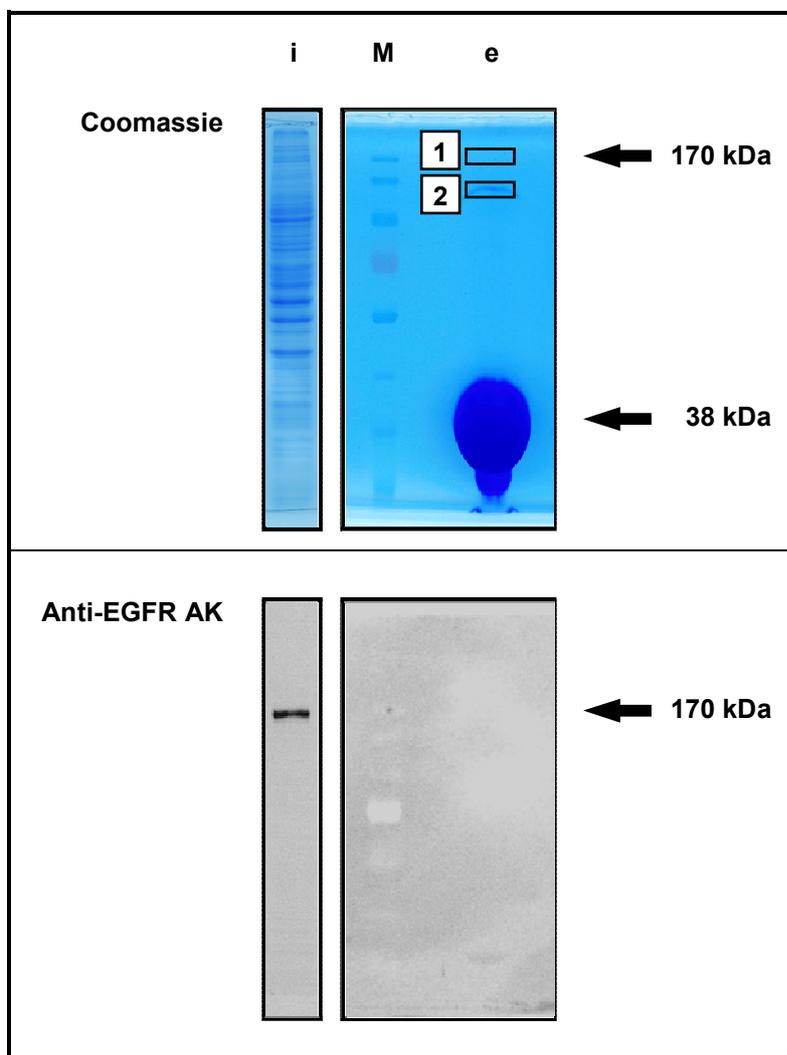


Abbildung 6: Pull down von EGFR mit GST-FKBP12. Eine 1 ml-Glutathion-Säule wurde mit GST-FKBP12 beladen. Dann wurde A-431-Zelllysat über die Säule geleitet. Die Elution erfolgte mittels Glutathion-Lösung. Der Input (i), ein Proteingrößenmarker (M) und das Eluat (e) wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (oben) bzw. Western-Blot-Analyse unter Verwendung von Anti-EGFR AK (unten) untersucht. Die beiden gekennzeichneten Gelbereiche wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht. 10 mM Glutathion, 7,5 %ige Gele, Temperatur 4°C.

Zunächst wurde GST-FKBP12 enthaltendes *E. coli*-Lysat über die Säule geleitet, bis das am Säulenmaterial immobilisierte Glutathion durch GST-FKBP12 abgesättigt war. Anschließend wurde die Säule mit Bindungspuffer gewaschen. Dann wurde A-431-

Zellysat in Bindungspuffer über die Säule geleitet, und schließlich wurden das GST-FKBP12 und die etwaigen Interaktionspartner mit einer Lösung von Glutathion (10 mM) in Bindungspuffer eluiert. Das Eluat wurde mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse untersucht (**Abbildung 6**).

Die durch schwarze Rahmen gekennzeichneten Bereiche wurden aus dem Gel geschnitten, tryptisch verdaut und von Angelika Schierhorn mittels MALDI-TOF MS untersucht (Ultraflex II, Bruker Daltonics, Billerica). Der EGFR zeigte keine Bindung an GST-FKBP12. Weder wurde im Coomassie-gefärbten Gel eine Bande mit der Laufhöhe 170 kDa detektiert, noch konnte im **Gelstück 1** der EGFR massenspektrometrisch identifiziert werden, noch wurde durch Western-Blot-Analyse unter Verwendung von Anti-EGFR AK eine Bande mit der Laufhöhe 170 kDa detektiert (**Abbildung 6**). Es wurden auch keine anderen GST-FKBP12-Interaktionspartner gefunden. Bei der massenspektrometrischen Analyse von **Gelstück 2** wurden ausschließlich von GST oder von FKBP12 stammende Peptide identifiziert.

3.1.2.2 Ko-Immunpräzipitation von FKBP12 mit EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀

Als Ausgangsmaterial dienten HeLa-Zellen, die mit dem Plasmid pCMV-Tag2B-EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ transfiziert waren und dadurch das rekombinante Fragment EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ exprimierten. EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ war mit einem N-terminalen FLAG-Tag versehen. Die Zellen wurden durch Ultraschall lysiert und die Lysate durch Zentrifugation geklärt. Aliquots der Lysate wurden in Gegenwart von Agarose-Beads, an die Anti-FLAG AK konjugiert war, für 30 Minuten inkubiert. Während dieser Zeit sollten EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ und etwaige Interaktionspartner an die Beads binden. In je einem Ansatz befanden sich die FKBP-Inhibitoren FK506 (10 µM) bzw. Rapamycin (10 µM). Dann wurden die Beads gewaschen, und schließlich wurden spezifisch gebundene Proteine durch Inkubation in Gegenwart des FLAG-Peptides (100 µg/ml) eluiert. Der Input, die Überstände und die Eluate wurden mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung von Anti-EGFR AK und Anti-FKBP12 AK untersucht (**Abbildung 7**).

Dabei zeigte sich, dass EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ exprimiert worden war, dass der Großteil des EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ an die Beads gebunden hatte, und dass EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ spezifisch von den Beads eluiert worden war. Das zelluläre FKBP12 wurde lediglich im Input und in den Überständen detektiert. Eine Bindung von FKBP12 an EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ konnte auch durch Ko-Immunpräzipitation nicht nachgewiesen werden.

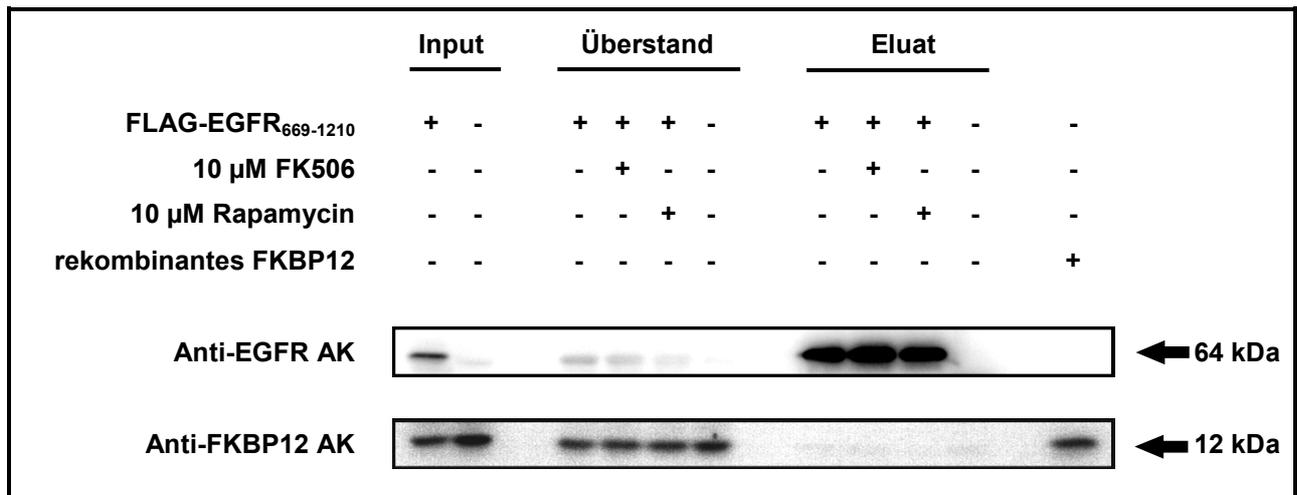


Abbildung 7: Ko-Immünpräzipitation von FKBP12 mit EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀. HeLa-Zellen, die mit einem N-terminalen FLAG-Tag konjugierten EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ exprimierten, wurden lysiert und für 30 Minuten mit Agarose-Beads inkubiert, an die Anti-FLAG AK immobilisiert war. Zwei Ansätze waren FK506 bzw. Rapamycin beigemischt. Die Elution erfolgte durch das FLAG-Peptid. Der Input, die Überstände, die Eluate und rekombinantes FKBP12 wurden mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung von Anti-EGFR AK und Anti-FKBP12 AK untersucht. Temperatur 0°C, FLAG-Peptid 100 µg/ml, FK506 10 µM, Rapamycin 10 µM.

3.1.2.3 Untersuchung der zellulären Lokalisierung von FKBP12 und EGFR

Zunächst wurden A-431-Zellen untersucht, die mit dem Plasmid pEGFP-FKBP12 transfiziert waren und dadurch das Fusionsprotein eGFP-FKBP12 exprimierten. Die exponentiell wachsenden Zellen wurden durch Formaldehyd und Methanol fixiert, anschließend wurde die DNA mit DAPI und der EGFR mit Anti-EGFR AK und einem Rhodamine Red-X-konjugierten Anti-Maus AK gefärbt. Dann erfolgte die mikroskopische Untersuchung (Confocal C1, Nikon, Tokio) des Präparats (**Abbildung 8**).

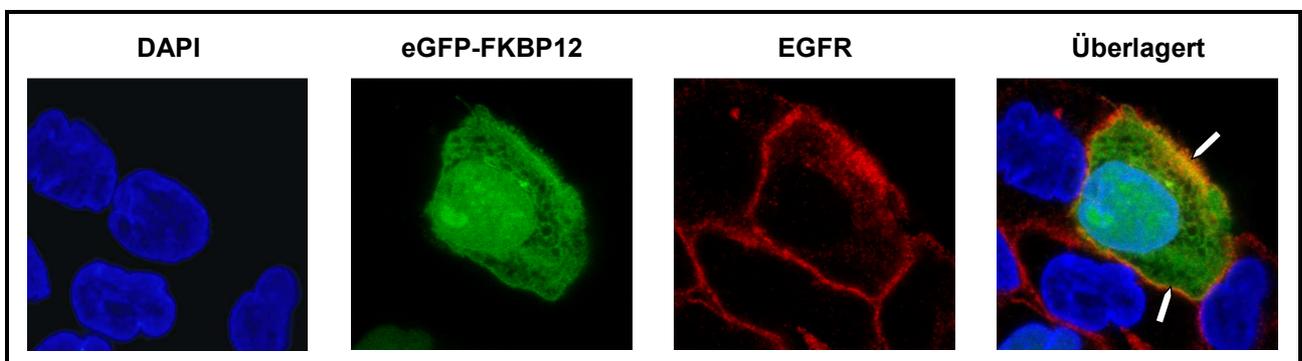


Abbildung 8: Die Lokalisierungen von eGFP-FKBP12 und EGFR in A-431-Zellen. Exponentiell wachsende, eGFP-FKBP12 exprimierende A-431-Zellen wurden mit Formaldehyd und Methanol fixiert. Die DNA wurde mit DAPI, der EGFR mit Anti-EGFR AK und einem Rhodamine Red-X-konjugierten Anti-Maus AK gefärbt. Das Präparat wurde am Konfokalmikroskop untersucht. Die weißen Pfeile markieren die Ko-Lokalisierung von EGFR und eGFP-FKBP12. Mikroskop Confocal C1 (Nikon, Tokio).

Das Fusionsprotein eGFP-FKBP12 war über die gesamte Zelle verteilt, dabei war eine Präferenz für den Zellkern und die Zellmembran zu verzeichnen. Diese Präferenz wurde für eGFP allein nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt). Der überwiegende Teil des EGFR lokalisierte im Bereich der Zellmembran. In der Überlagerung des grünen und des roten Farbkanals signalisierte eine Gelbfärbung die Ko-Lokalisierung der beiden Proteine (weiße Pfeile in **Abbildung 8**, ganz rechts). Aufgrund ihrer gemeinsamen Lokalisierung sind FKBP12 und EGFR in der Lage, intrazellulär Kontakt zu haben.

Die Bindung von EGF an den EGFR bewirkt die Autophosphorylierung des EGFR und die Internalisierung des EGF/EGFR-Komplexes (Haigler *et al.*, 1978). Es wurde untersucht, ob sich eGFP-FKBP12 an den dabei entstehenden Vesikeln anreichert. Dazu wurden exponentiell wachsende HeLa-Zellen mit dem Plasmid pEGFP-FKBP12 transfiziert und so zur Expression von eGFP-FKBP12 angeregt. Dann wurden die Zellen für 2 Stunden in Serum-freiem Medium inkubiert. Anschließend wurde EGF zugesetzt, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff TAMRA markiert war (TAMRA-EGF, 100 nM). Nach 10 Sekunden wurde das Medium abgenommen und durch frisches, kein TAMRA-EGF enthaltendes Medium ersetzt. Der Verlauf der Internalisierung des TAMRA-EGF wurde am Konfokalmikroskop (Confocal C1, Nikon, Tokio) verfolgt (**Abbildung 9**).

Die Internalisierung lief wie bereits beschrieben ab (Haigler *et al.*, 1978). 30 Sekunden nach Zugabe des TAMRA-EGF war die Fluoreszenz als Ring um die Zellen zu erkennen, offensichtlich hatte also TAMRA-EGF den sich an der Zelloberfläche befindenden EGFR gebunden. Nach 5 Minuten war ein Teil der Fluoreszenz noch immer im Bereich der Plasmamembran lokalisiert, der andere Teil befand sich in kleinen, punkartigen Strukturen im Zellinneren. Wahrscheinlich handelte es sich bei diesen Strukturen um Endosomen. Das bedeutete, dass TAMRA-EGF die Autophosphorylierung und Internalisierung des EGFR bewirkt hatte. Nach 30 Minuten wurde im Bereich der Plasmamembran keine Fluoreszenz mehr detektiert. Im Zellinneren waren größere Strukturen von unregelmäßiger Form lokalisiert. Die TAMRA-EGF/EGFR enthaltenden Endosomen hatten sich also zu multivesikulären Körpern vereinigt, ein Teil des TAMRA-EGF war zu diesem Zeitpunkt unter Umständen schon lysosomal degradiert.

Das Fusionsprotein eGFP-FKBP12 war zu jedem Zeitpunkt über die gesamte Zelle verteilt, eine Akkumulation an den TAMRA-EGF/EGFR enthaltenden Vesikeln konnte nicht detektiert werden (**Abbildung 9**).

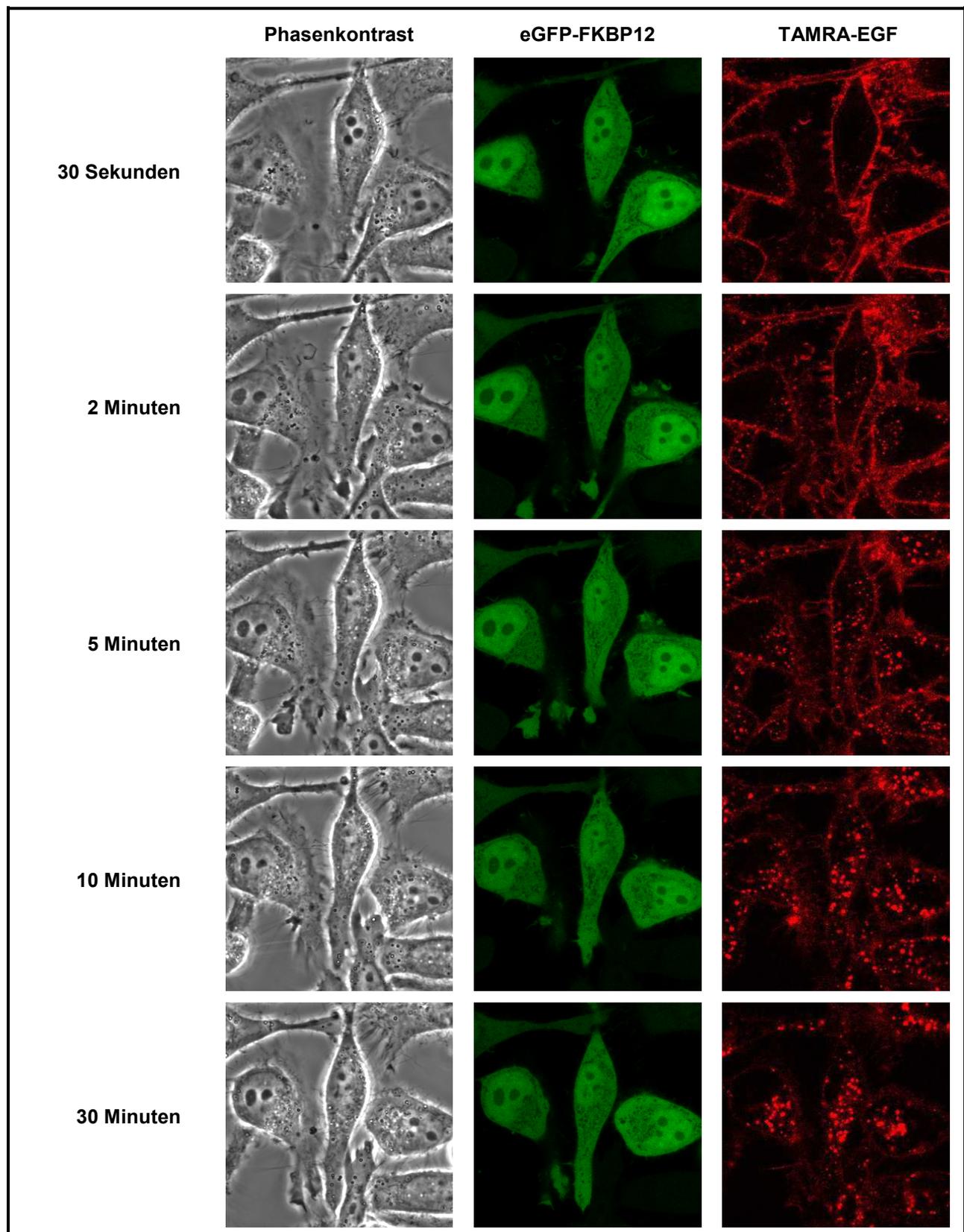


Abbildung 9: Internalisierung von TAMRA-EGF. Exponentiell wachsende, eGFP-FKBP12 exprimierende HeLa-Zellen wurden für 10 Sekunden in Medium inkubiert, das TAMRA-EGF enthält. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden dann am Konfokalmikroskop Bilder der Zellen aufgenommen. 100 nM TAMRA-EGF, Temperatur 37°C, Mikroskop Confocal C1 (Nikon, Tokio).

3.1.3 Der Einfluss von FKBP12 auf die EGFR-vermittelte Signaltransduktion

3.1.3.1 Der Einfluss der intrazellulären FKBP12-Konzentration auf die EGF-induzierte EGFR-Autophosphorylierung

Die Inkubation von HeLa-Zellen in Gegenwart von EGF bewirkt die Autophosphorylierung des EGFR (Johannessen *et al.*, 2000). Um den Einfluss von FKBP12 auf diese Autophosphorylierung zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit unterschiedlich hoher FKBP12-Expression generiert. Einerseits wurden Zellen, die einen durch RNAi reduzierten FKBP12-Gehalt aufwiesen, mit Zellen verglichen, denen lediglich Kontroll-RNA transfiziert worden war (**Abbildung 10**).

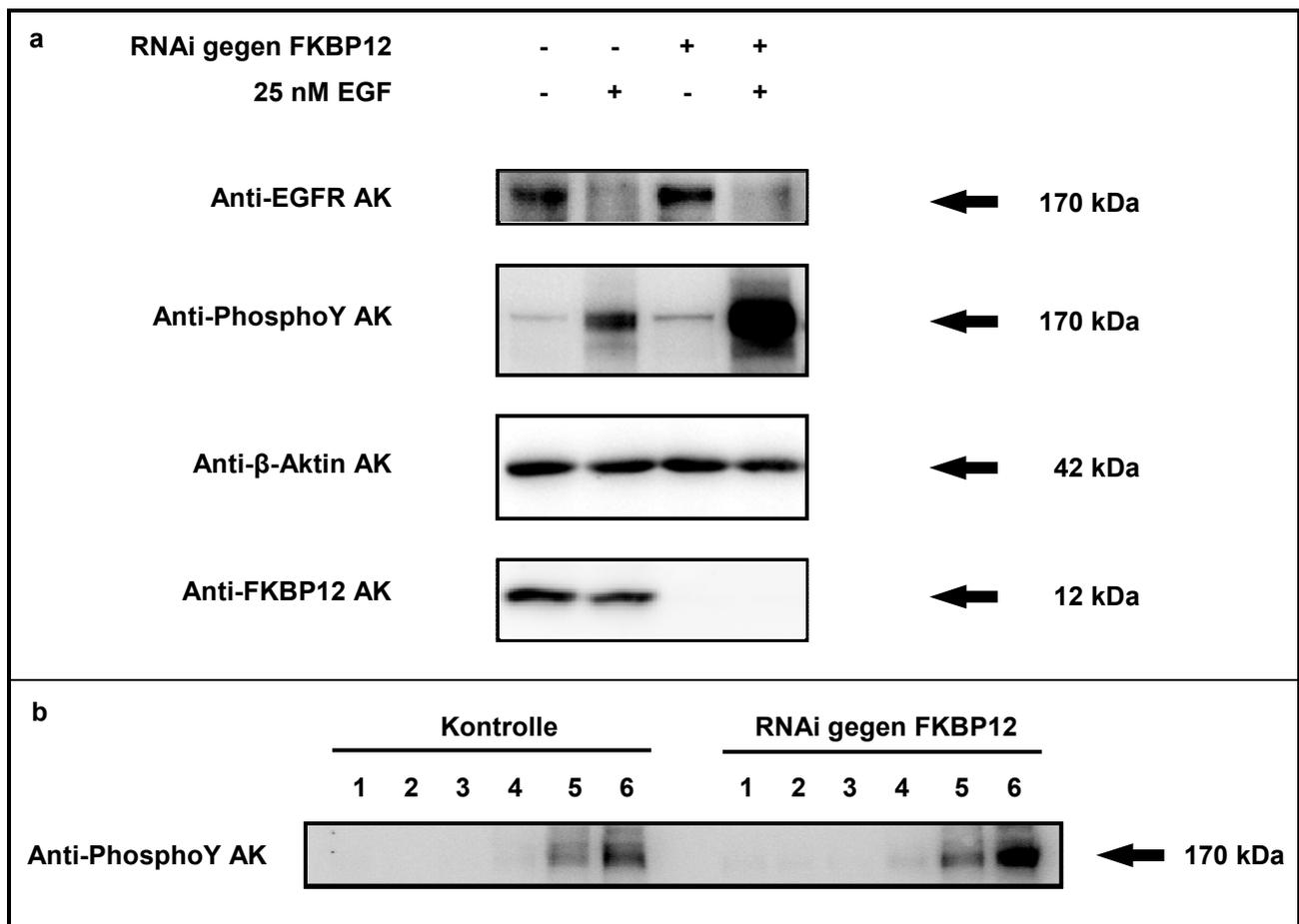


Abbildung 10: Zellen mit durch RNAi reduzierter FKBP12-Expression phosphorylieren den EGFR stärker als Kontroll-Zellen. (a) HeLa-Zellen wurden für 2 Stunden in Serum-freiem Medium kultiviert, anschließend wurde EGF (25 nM) zugefügt. Nach zwei Minuten wurden die Zellen lysiert und die Lysate mittels Western-Blot-Analyse untersucht. (b) Dem Medium wurden unterschiedliche Konzentrationen an EGF zugefügt. Ansonsten wurde das Experiment wie unter (a) beschrieben durchgeführt. EGF-Konzentrationen 1- kein EGF, 2- 0,0025 nM, 3- 0,025 nM, 4- 0,25 nM, 5- 2,5 nM, 6- 25 nM. 7,5 bzw. 15 %ige PA-Gele.

Die durch Western-Blot-Analyse und Densitometrie ermittelten intrazellulären FKBP12-Konzentrationen betragen hier 50 nM beziehungsweise 1 μ M. Andererseits wurden Zellen, die das rekombinante Fusionsprotein eGFP-FKBP12 exprimierten, mit Zellen verglichen, die nur eGFP exprimierten (**Abbildung 11**). Die durch Western-Blot-Analyse und Densitometrie ermittelten Gesamtkonzentrationen an intrazellulärem FKBP12 betragen hier 5 μ M beziehungsweise 1 μ M.

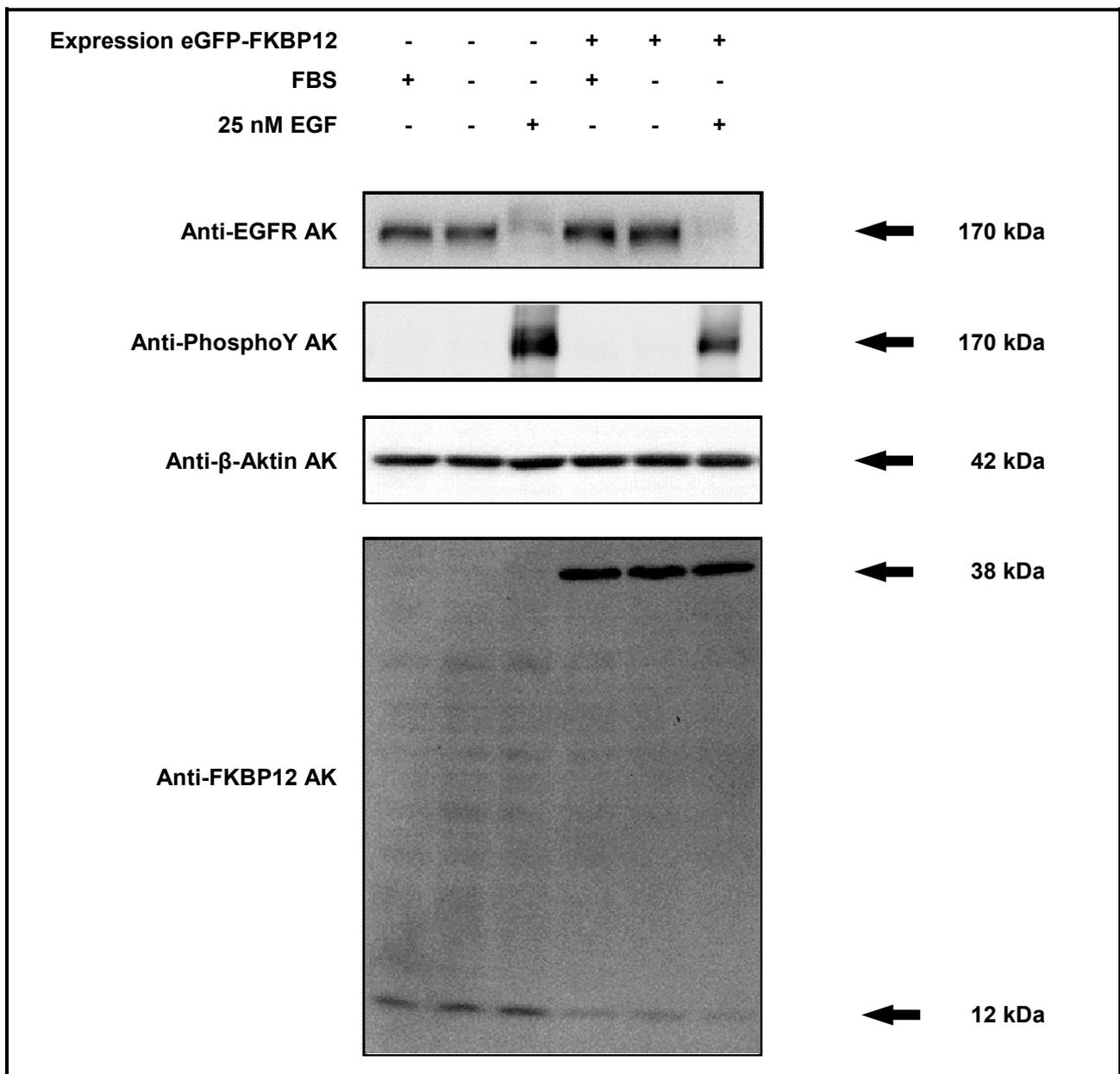


Abbildung 11: Zellen, die rekombinantes eGFP-FKBP12 exprimieren, phosphorylieren den EGFR schwächer als Kontroll-Zellen, die lediglich eGFP exprimieren. HeLa-Zellen wurden für 2 Stunden in Serum-freiem Medium kultiviert, anschließend wurde EGF zugefügt. Nach zwei Minuten wurden die Zellen lysiert und die Lysate mittels Western-Blotting analysiert. 25 nM EGF, 7,5 bzw. 15 %ige PA-Gele.

Die Zellen wurden für zwei Stunden in Serum-freiem Medium inkubiert, anschließend wurde EGF (25 nM) zugefügt. Nach zwei Minuten wurden die Zellen lysiert und die Lysate mittels Western-Blot-Analyse untersucht (**Abbildungen 10a und 11**). Weder die reduzierte Expression von FKBP12 durch RNAi noch die zusätzliche Expression von eGFP-FKBP12 hatten einen Einfluss auf die Expression des EGFR. Nach der Gabe von EGF wurde in allen Ansätzen weniger EGFR detektiert. Wie bereits beschrieben (Zwang und Yarden, 2006) sind die Ursachen dafür in der beginnenden Degradierung des EGFR und in der Heterogenität des Molekulargewichts des EGFR durch Phosphorylierung und Ubiquitinylierung zu sehen. Außerdem erkannte der Anti-EGFR AK den phosphorylierten EGFR schlechter als den nicht phosphorylierten EGFR, da sich in unmittelbarer Nachbarschaft des vom Anti-EGFR AK gebundenen Epitops (**Tabelle 5**) eine Autophosphorylierungsstelle befindet (**Tabelle 8**).

Vor der Gabe von EGF war der EGFR kaum phosphoryliert. Die Anwesenheit von EGF bewirkte die Autophosphorylierung des EGFR. Der Grad der Autophosphorylierung war von der FKBP12-Konzentration abhängig. Zellen, die eine durch RNAi reduzierte FKBP12-Konzentration aufwiesen, enthielten deutlich mehr phosphorylierten EGFR als Zellen, denen lediglich Kontroll-RNA transfiziert worden war (**Abbildung 10a**). Zellen, die eGFP-FKBP12 exprimierten, enthielten weniger phosphorylierten EGFR als Zellen, die nur eGFP exprimierten (**Abbildung 11**).

Außerdem wurde untersucht, ob die reduzierte Expression von FKBP12 den Schwellenwert an EGF beeinflusst, ab dem die Autophosphorylierung des EGFR durch Western-Blot-Analyse nachweisbar ist (Bassing *et al.*, 1998, **Abbildung 10b**). Dies war nicht der Fall. Unabhängig vom Gehalt der Zellen an FKBP12 lag der Schwellenwert zwischen 0,025 und 0,25 nM EGF.

3.1.3.2 Der EGFR-vermittelte Einfluss des intrazellulären FKBP12 auf den Zellzyklus in HeLa-Zellen

Der EGFR ist in vielen humanen Krebszell-Linien an der Regulation des Zellzyklus beteiligt (Santiskulvong *et al.*, 2001, Hanada *et al.*, 2006). Das heißt, die EGFR-Aktivität beeinflusst die Verteilung exponentiell wachsender Zellen auf die Phasen des Zellzyklus. FKBP12 moduliert die EGFR-Aktivität in HeLa-Zellen. Deshalb wurden der Einfluss der FKBP12-Inhibition und der reduzierten FKBP12-Expression durch RNAi auf die Zellzyklusverteilung exponentiell wachsender HeLa-Zellen untersucht.

Dazu wurden je 200.000 HeLa-Zellen in die Wells einer 6-Well-Platte gesät und für 72 Stunden inkubiert. Ein Ansatz enthielt den FKBP-Inhibitor FK506 (10 μ M), ein Kontrollansatz das Lösungsmittel Ethanol. Die Zellen weiterer Ansätze wurden mit kurzer, doppelsträngiger RNA transfiziert. Die Sequenzen der RNA wurden so gewählt, dass entweder RNAi gegen FKBP12 ausgelöst wurde oder nicht (**Abbildung 10a unten**). Anschließend wurden die Zellen aller Ansätze mittels Trypsin von der Wachstumsfläche abgelöst, durch Ethanol fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid interkaliert in die zelluläre DNA. Die Fluoreszenz der Zellen war also dem DNA-Gehalt proportional.

25.000 Partikel einer jeden Probe wurden am FACSsort (Becton-Dickinson, Franklin Lakes) analysiert. Zunächst wurde die Seitwärts- gegen die Vorwärtsstreuung aufgetragen (exemplarisch für Kontrolle Ethanol **Abbildung 12a**) und ein Gate um alle Partikel gelegt, die in Größe und Oberflächenbeschaffenheit ungefähr einer fixierten Zelle entsprachen. Danach wurde die Anzahl dieser Zellen gegen die relative Fluoreszenzintensität aufgetragen (exemplarisch für Kontrolle Ethanol **Abbildung 12b**). Die Anregung erfolgte bei $\lambda = 488$ nm, die Detektion bei $\lambda = 633$ nm. Signale $< G1$ kommen zum Beispiel durch Apoptose oder Scherkräfte während der Präparation zustande, Signale $> G2/M$ kommen zum Beispiel durch Zellen mit abweichender Chromosomenzahl oder mehrkernige Zellen zustande. Die Experimente wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Zellzyklus-Profile wurden mit dem Programm FlowJo (Tree Star, Ashland) ausgewertet (**Abbildung 12c**).

55 ± 1 % beziehungsweise 54 ± 1 % der Zellen der Kontrollansätze befanden sich in der G1-Phase. Sowohl die Inhibition von FKBP12 als auch die reduzierte FKBP12-Expression durch RNAi verminderte die Anzahl dieser Zellen deutlich (FK506 41 ± 1 %, FKBP12-*knockdown* 45 ± 4 %). Gleichzeitig stieg der Anteil der $< G1$ -Zellen und der $> G2/M$ -Zellen, während der Anteil der S-Zellen und der G2/M-Zellen nahezu unverändert blieb.

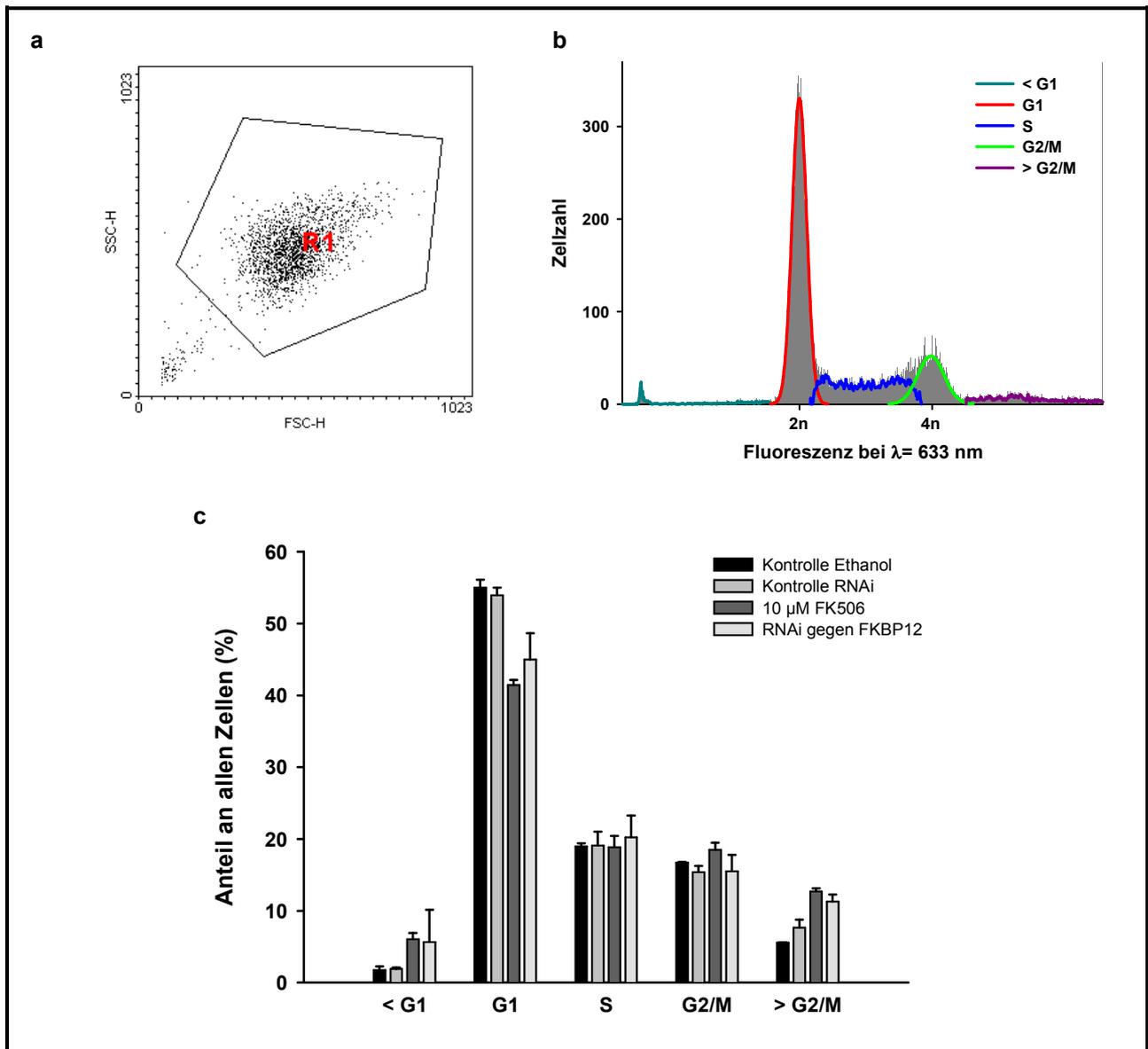


Abbildung 12: Zellen mit reduzierter FKBP12-Aktivität verteilen sich anders auf die Phasen des Zellzyklus als Kontrollzellen. Intrazelluläres FKBP12 wurde durch FK506 inhibiert oder durch RNAi niedriger exprimiert. Die unterschiedlich behandelten HeLa-Zellen wurden für 72 Stunden kultiviert, mit Trypsin von der Wachstumsfläche gelöst, mit Ethanol fixiert, mit Propidiumiodid gefärbt und schließlich am FACSsort analysiert. **(a)** Auftragung der Vorwärts- gegen die Seitwärtsstreuung (Kontrolle Ethanol). Das gekennzeichnete Gate umschließt diejenigen Zellen, die zur Auswertung herangezogen wurden. **(b)** Auftragung der Zellzahl gegen die Fluoreszenz bei $\lambda = 633 \text{ nm}$ (Kontrolle Ethanol). Die Zellzyklusprofile wurden mit dem Programm FlowJo ausgewertet. **(c)** Zellzyklusverteilungen der unterschiedlich behandelten Zellen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel und die Standardabweichungen der Dreifachbestimmung.

3.1.3.3 Der Einfluss der FKBP12-Inhibition auf die Motilität von HeLa-Zellen

Der EGFR ist auch an der Regulation der Zellmotilität beteiligt (Barrandon und Green, 1987). Eine Möglichkeit zur Untersuchung der Zellmotilität ist der *scratch migration*-Assay. Dabei wird eine Monoschicht nahezu konfluent gewachsener Zellen unter

Zuhilfenahme einer Pipettenspitze eingeritzt. Dann wird das Schließen des entstandenen Spaltes beobachtet. Die Geschwindigkeit dieses Prozesses variiert in Abhängigkeit von den gewählten Wachstumsbedingungen.

Mit Spalten versehene HeLa-Zell-Monoschichten wurden in Serum-freiem DMEM inkubiert, das Schließen der Spalte wurde am Mikroskop dokumentiert, angegeben sind die arithmetischen Mittel und die Standardabweichungen der Sechsfachbestimmung (**Abbildung 13**).

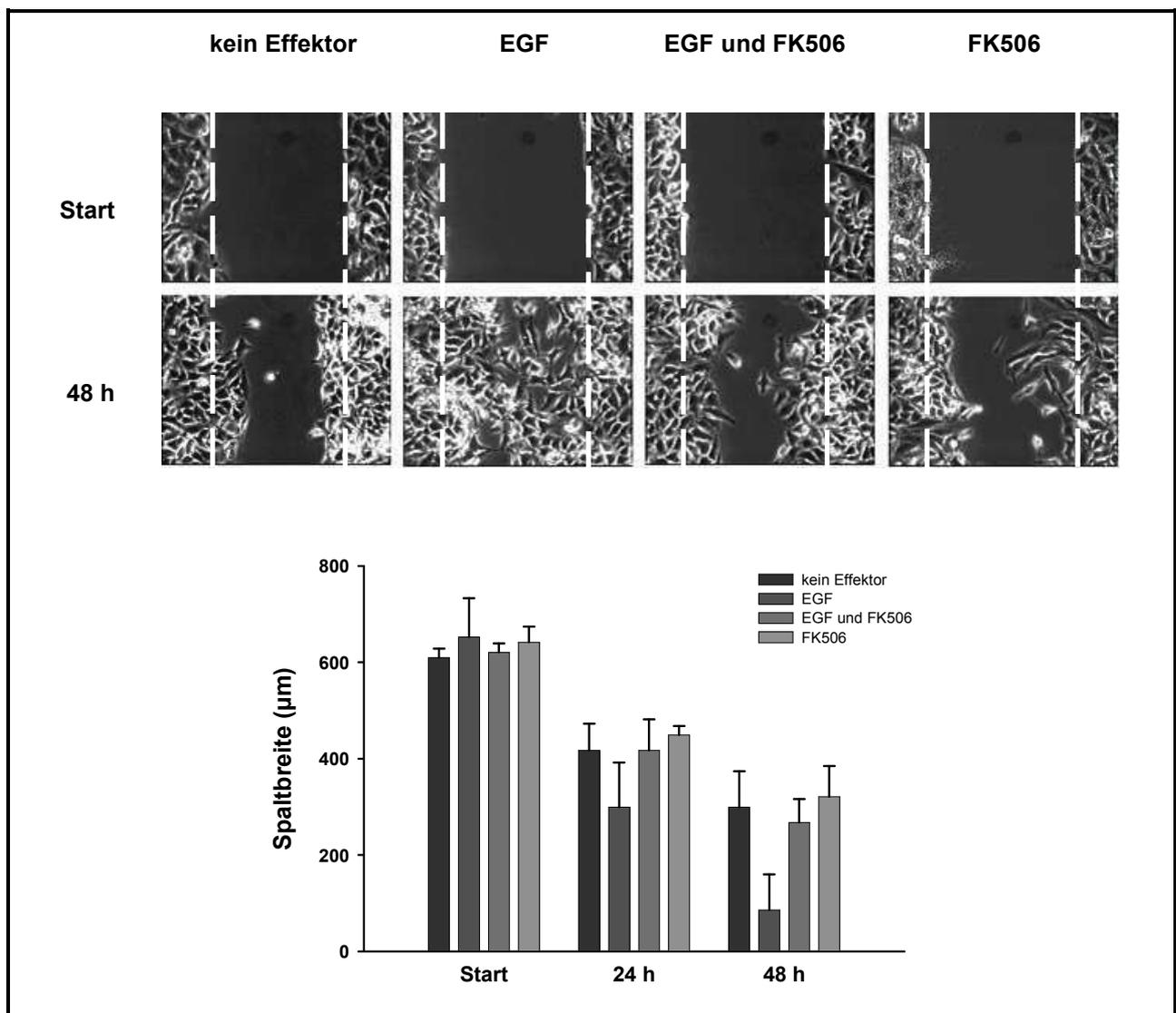


Abbildung 13: Die Einflüsse von EGF und FK506 im *scratch migration*-Assay. Nahezu konfluent gewachsene HeLa-Zell-Monolayer wurden mit einer Pipettenspitze eingeritzt und in Serum-freiem DMEM inkubiert. Dem Medium waren EGF, FK506 oder eine Kombination beider Effektoren beigemischt. Die Spaltschließung wurde am Mikroskop verfolgt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel und die Standardabweichungen der Sechsfachbestimmung. 15 nM EGF, 10 µM FK506, Temperatur 37°C.

Zu Beginn der Beobachtung betrug die Spaltbreite im Kontrollansatz $610 \pm 19 \mu\text{m}$. Nach 48 Stunden betrug die Spaltbreite $300 \pm 74 \mu\text{m}$, die Spalte hatten sich also ungefähr zur Hälfte geschlossen. EGF beschleunigte die Spaltschließung, in Anwesenheit von EGF im Medium (15 nM) waren die Spalte nach 48 Stunden nahezu vollständig geschlossen (Spaltbreite $86 \pm 74 \mu\text{m}$). Die zusätzliche Anwesenheit des FKBP-Inhibitors FK506 im Medium ($10 \mu\text{M}$) verhinderte, dass EGF die Spaltschließung beschleunigte (Spaltbreite $268 \pm 49 \mu\text{m}$), während FK506 allein keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Spaltschließung hatte ($321 \pm 64 \mu\text{m}$). Rapamycin hatte im *scratch migration*-Assay den gleichen Einfluss wie FK506 (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurde das Migrationsverhalten von FKBP12-*knockdown*-Zellen untersucht. Die Transfektion der HeLa-Zellen mit kurzer doppelsträngiger RNA (sowohl unspezifische Kontrolle als auch RNAi gegen FKBP12) und die anschließende Inkubation in Serum-freiem Medium hatte aber massiven Zelltod zur Folge. Deshalb konnten die erhaltenen Daten nicht ausgewertet werden.

3.2 Die Etablierung eines Zellkultur-basierten Assays zur Untersuchung von CypA-Inhibitoren

3.2.1 Der Einfluss der CypA-Inhibition auf die RA-induzierte P19-Zell-Differenzierung

3.2.1.1 Die RA-induzierte P19-Zell-Differenzierung

Zunächst war es nötig, die RA-induzierte P19-Zell-Differenzierung zu etablieren (siehe **2.4.10**, Jones-Villeneuve *et al.*, 1982). Dazu wurden exponentiell wachsende P19-Zellen in 6-Well-Platten mit hydrophiler Wachstumsfläche gesät. Die ansonsten adhärennten P19-Zellen (**Abbildung 14a**) konnten sich wegen der hydrophilen Beschichtung nicht am Boden der Wells anheften. Infolgedessen bildeten die Zellen große Aggregate, die Sphäroide genannt werden (**Abbildung 14b**). Den zur Differenzierung bestimmten Ansätzen wurden 500 nM all-*trans*-Retinsäure (kurz RA) zugefügt. Die Anwesenheit von RA im Medium bewirkte das Auftreten von Zelltrümmern. Außerdem waren die gebildeten Sphäroide etwas kleiner, ebenmäßiger in der Form und optisch dichter (**Abbildung 14c**). Nach zwei Tagen wurden die Sphäroide durch Zentrifugation geerntet, gewaschen und durch Inkubation in Gegenwart von Trypsin aufgelöst. Anschließend wurden die Zellen in 6-Well-Platten ohne hydrophile Beschichtung der Wachstumsfläche gesät und für weitere drei Tage inkubiert.

Diejenigen Zellen, die während der Sphäroidbildung nicht dem Einfluss von RA ausgesetzt waren, zeigten den gleichen Phänotyp wie die Zellen vor der Prozedur (**Abbildung 14d**), während die in Gegenwart von RA inkubierten Zellen einen veränderten Phänotyp zeigten (**Abbildung 14e**). Eine Population von Fibroblast-artigen Zellen bildete eine Monoschicht, und eine Population von Neuron-artigen Zellen wuchs als zweite Schicht auf dieser Monoschicht. Die Neuron-artigen Zellen waren durch kleine Zellkörper und lange Dendriten gekennzeichnet. Mehrere dieser Zellkörper hatten sich knotenförmig zusammen gelagert (**Abbildung 14e, schwarzer Pfeil**), und die Knoten waren durch ein Geflecht von Dendriten miteinander verbunden (**Abbildung 14e, weißer Pfeil**). Die mikroskopische Untersuchung der Zellen legte also den Schluss nahe, dass eine Differenzierung stattgefunden hatte (McBurney, 1993).

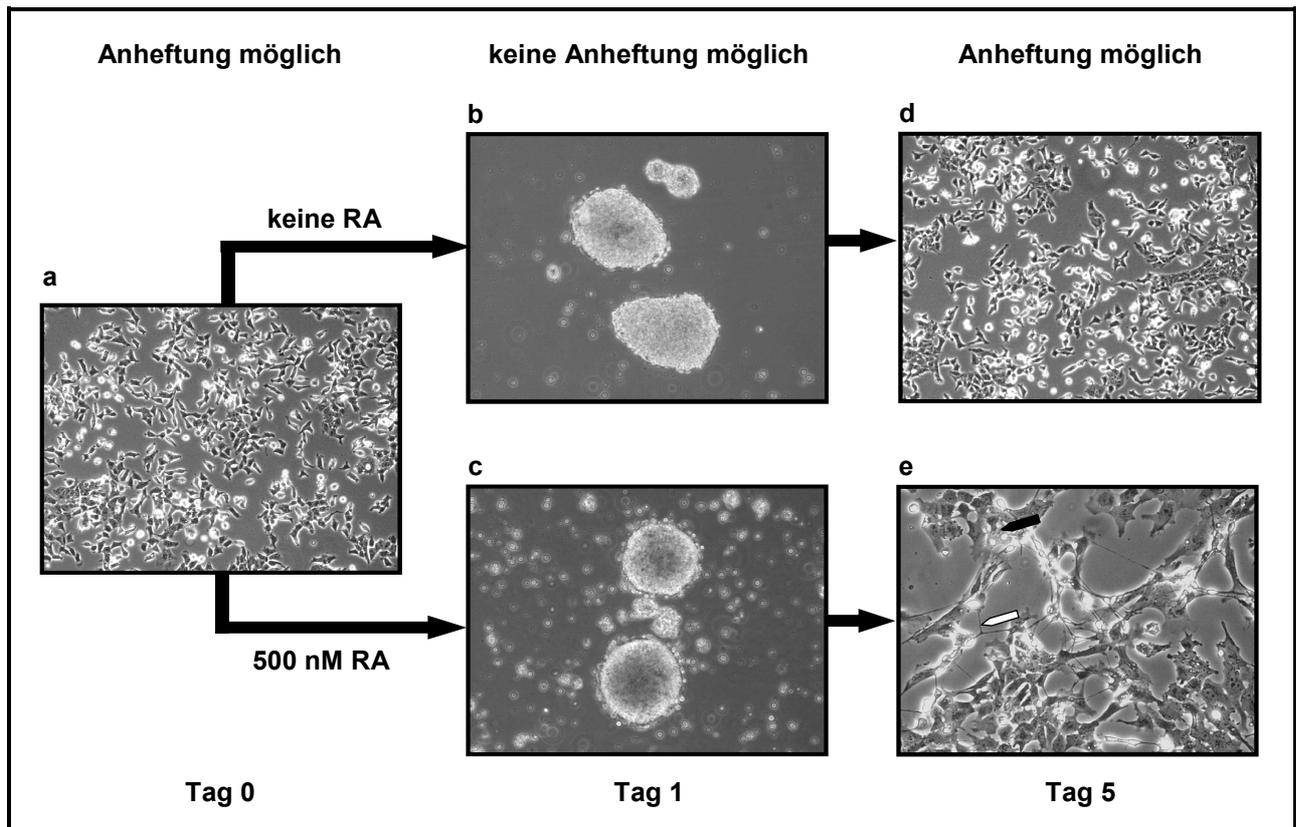


Abbildung 14: RA-induzierte Differenzierung von P19-Zellen. (a) Exponentiell wachsende P19-Zellen. (b) In Abwesenheit von RA entstandene Sphäroide. (c) In Anwesenheit von 500 nM RA entstandene Sphäroide. (d) Sphäroide aus (b) wurden tryptisch aufgelöst und neu ausgesät. Phänotyp wie in (a). (e) Sphäroide aus (c) wurden tryptisch aufgelöst und neu ausgesät. Neuron-artiger bzw. Fibroblast-artiger Phänotyp. Zu erkennen sind knotenförmige Zusammenlagerungen Neuron-artiger Zellen (**schwarzer Pfeil**) und Dendriten (**weißer Pfeil**).

Die differenzierten P19-Zellen wurden nun mittels Konfokal-Mikroskopie näher untersucht. Die Zellen wurden mit Formaldehyd fixiert, die DNA wurde mit DAPI gefärbt, und das Protein Neurofilament-M (kurz NF-M), welches ausschließlich in Neuronen an der Ausbildung von Intermediär-Filamenten beteiligt ist, wurde mit einem Anti-NF-M AK und einem Rhodamine Red-X-markierten Anti-Maus AK gefärbt. Im Phasenkontrast-Bild waren wiederum zusammen gelagerte Zellkörper (**Abbildung 15a, blauer Pfeil**) und das Dendritengeflecht (**Abbildung 15a, roter Pfeil**) zu erkennen. Im konfokalen Fluoreszenz-Bild zeigte sich, dass die Zellkörper der Neuron-artigen Zellen fast völlig vom Kern ausgefüllt wurden (**Abbildung 15b, blau**) und dass NF-M nur in den Neuron-artigen Zellen, nicht aber in den Fibroblast-artigen Zellen exprimiert wurde (**Abbildung 15b, rot**).

Schließlich wurden die in **Abbildung 14d** und die in **Abbildung 14e** dargestellten Zellen gewaschen, durch Detergenz lysiert und die Lysate durch Zentrifugation geklärt.

Die Überstände wurden in SDS-Probenpuffer überführt. Dann wurden die Proben mittels SDS-PAGE (10 %ige Gele) und Western-Blot-Analyse untersucht. Dabei wurden ein Anti- β -Aktin AK als Kontrolle für gleiche Probenmengen und ein Anti-NF-M AK eingesetzt (**Abbildung 15c**). Wie bereits beschrieben (McBurney, 1993) wurde NF-M ausschließlich in derjenigen Probe detektiert, die aus den differenzierten Zellen gewonnen worden war. Die Technik Western-Blot-Analyse unter Verwendung von Anti-NF-M AK war folglich geeignet, eindeutig zwischen differenzierten und nicht differenzierten P19-Zellen zu unterscheiden.

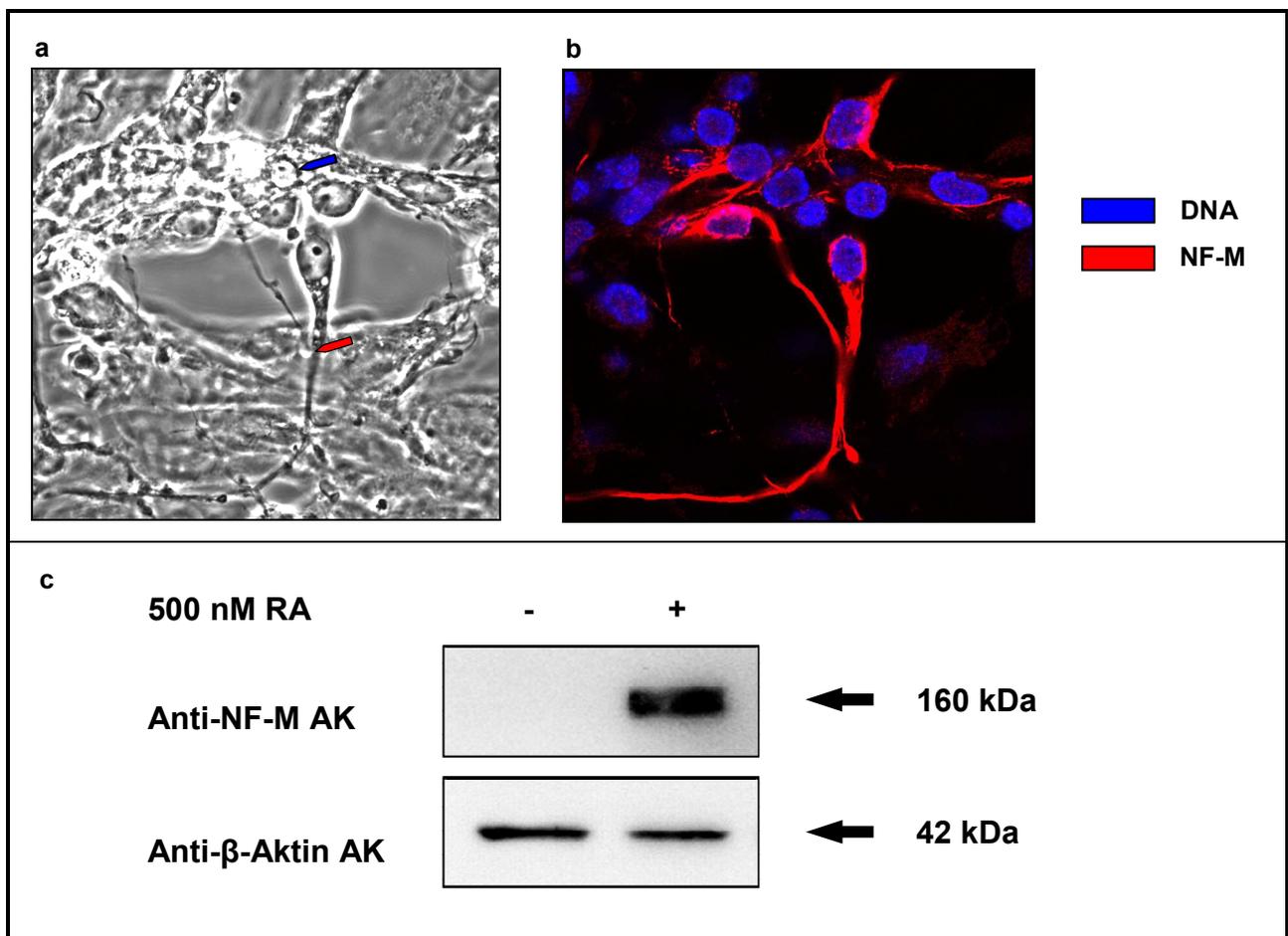


Abbildung 15: Charakterisierung der differenzierten P19-Zellen. (a) Differenzierte P19-Zellen wurden mit Formaldehyd fixiert und am Konfokalmikroskop untersucht. In der Phasenkontrast-Aufnahme sind ein Knoten Neuron-artiger Zellen (**blauer Pfeil**) und Dendriten (**roter Pfeil**) zu erkennen. (b) Die DNA wurde mit DAPI (**blau**), NF-M mit einem Anti-NF-M AK und einem Rhodamine Red-X-markierten Anti-Maus AK gefärbt (**rot**). Mikroskop Confocal C1 (Nikon, Tokio). (c) Untersuchung von P19-Zelllysaten mittels Western-Blot-Analyse. Die Zellen waren in Anwesenheit oder Abwesenheit von RA kultiviert worden. Die Anwesenheit von RA im Medium hatte die Expression von NF-M bewirkt.

3.2.1.2 Untersuchung der Zytotoxizität von CsA für P19-Zellen

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die RA-induzierte P19-Zell-Differenzierung durch die Inhibition des intrazellulären CypA unterdrückt werden kann (Song *et al.*, 2004). Für den Nachweis der Konzepttauglichkeit wurde das zyklische Peptid CsA eingesetzt. CsA ist zellgängig (Fabre *et al.*, 1989) und inhibiert CypA mit einem K_i von 3 nM (Fischer *et al.*, 1989). Nachteilig an der Substanz ist, dass sie neben CypA auch andere Cyclophiline inhibiert und dass sie im Komplex mit CypA die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-AT beeinflusst (Liu *et al.*, 1991). Die CsA-Konzentration im Medium sollte hoch sein, damit CypA möglichst vollständig inhibiert wird. Andererseits ist CsA für einige Zelllinien bereits in einer Konzentration von 0,8 μM zytotoxisch (Justo *et al.*, 2003).

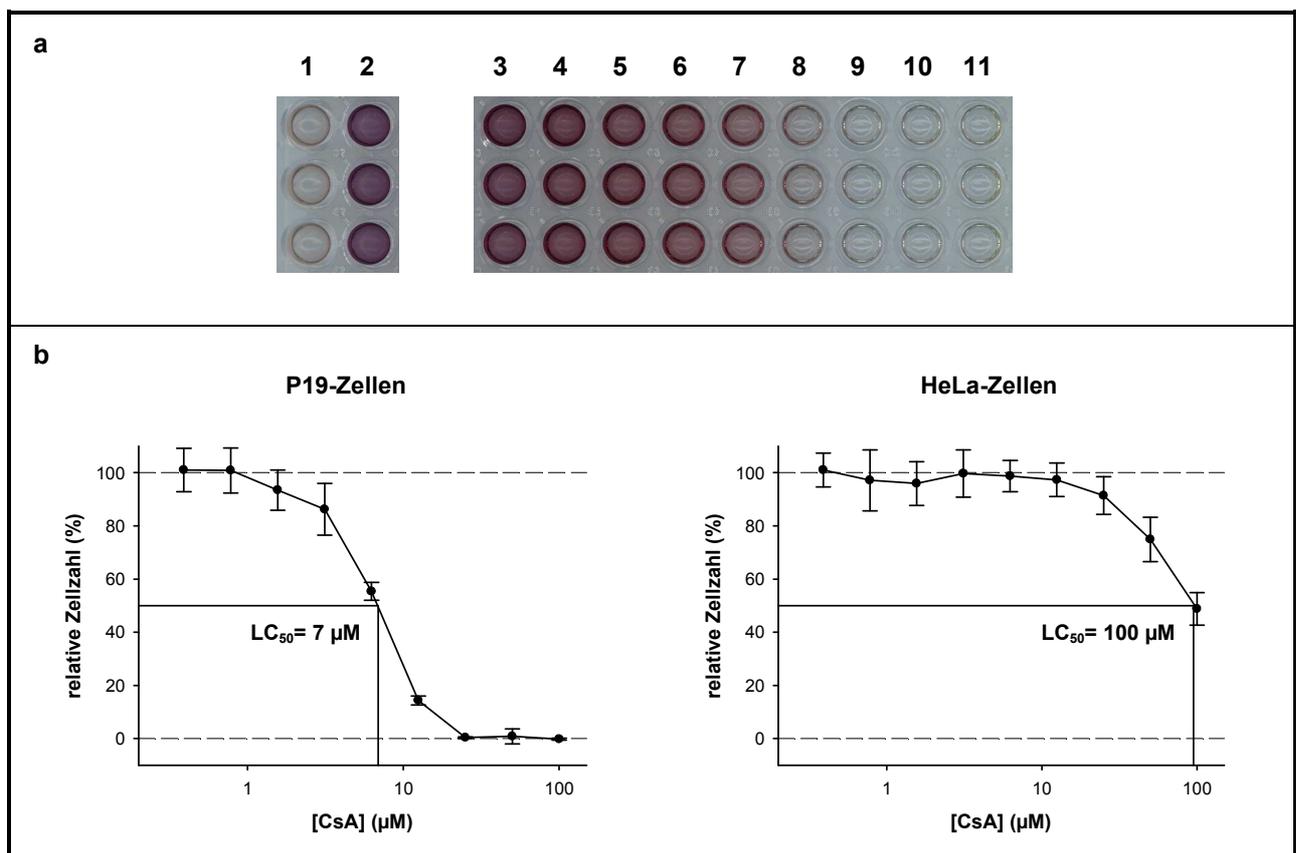


Abbildung 16: Dosis-Wirkungs-Beziehung zur Bestimmung der Zytotoxizität von CsA für P19-Zellen und HeLa-Zellen (MTT-Assay). (a) Exponentiell wachsende P19-Zellen wurden in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an CsA für 24 Stunden in einer 96-Well-Platte inkubiert. 1- keine Zellen, 2- kein CsA, 3- 0,39 μM , 4- 0,78 μM , 5- 1,56 μM , 6- 3,13 μM , 7- 6,25 μM , 8- 12,5 μM , 9- 25 μM , 10- 50 μM , 11- 100 μM . Anschließend wurden lebende Zellen mit MTT gefärbt. Dargestellt sind Ausschnitte eines Fotos der 96-Well-Platte. Jede Bedingung wurde in Dreifachbestimmung untersucht. (b) Das arithmetische Mittel der Absorptionen der sich in den Wells befindenden Lösungen bei $\lambda = 570 \text{ nm}$ wurden gegen die CsA-Konzentration aufgetragen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen.

Deshalb wurde zunächst die Zytotoxizität von CsA für P19-Zellen untersucht. Dazu wurde der MTT-Assay eingesetzt (siehe **2.4.11**, Mosmann, 1983). Exponentiell wachsende P19-Zellen wurden in die Wells einer 96-Well-Platte gesät. Nachdem sie sich angeheftet hatten, wurden dem Medium unterschiedliche Mengen an CsA zugefügt (Konzentrationsbereich 0 - 100 μM). Nach 24-stündiger Inkubation wurde dem Medium MTT beigemischt. Stoffwechselnde Zellen bildeten nun aus dem wasserlöslichen Farbstoff MTT ein wasserunlösliches Formazan, das sich am Boden der Wells absetzte. Das Medium wurde abgenommen und das Formazan in DMSO gelöst (**Abbildung 16a**). Dann wurden am Plattenlesegerät VersaMax (Molecular Devices, Sunnyvale) die Absorptionen der sich in den Wells befindenden Lösungen bei $\lambda = 570 \text{ nm}$ bestimmt. Die mittlere Absorption in den Wells, denen keine Zellen zugefügt worden waren (**Abbildung 16a, 1**), entsprach der relativen Zellzahl 0 %. Die mittlere Absorption in den Wells, denen zwar Zellen, aber kein CsA zugefügt worden war, entsprach der relativen Zellzahl 100 % (**Abbildung 16a, 2**). Die relative Zellzahl wurde gegen die CsA-Konzentration aufgetragen (**Abbildung 16b**). Zum Vergleich wurde auch die Zytotoxizität von CsA auf HeLa-Zellen untersucht. Der LC_{50} -Wert für P19-Zellen wurde mit 7 μM , der LC_{50} -Wert für HeLa-Zellen mit 100 μM bestimmt. Die höchste Konzentration, bei der CsA fast keinen Einfluss auf das Wachstum von P19-Zellen hatte, lag bei 2 μM . Für den Versuch, durch Inhibition von CypA die RA-induzierte Differenzierung der P19-Zellen zu unterdrücken, wurde deshalb diese Konzentration an CsA im Medium gewählt.

3.2.1.3 Der Einfluss von CsA auf die RA-induzierte P19-Zell-Differenzierung

Nun wurde das in Abschnitt **3.2.1.1** beschriebene Experiment wiederholt, mit dem Unterschied, dass sich sowohl während der Sphäroidbildung als auch während der anschließenden Differenzierung der P19-Zellen 2 μM CsA im Medium befanden. Die Auswertung erfolgte wiederum mittels Western-Blot-Analyse (**Abbildung 17**).

In allen Proben wurde β -Aktin detektiert, in der aus RA- und CsA-behandelten Zellen gewonnenen Probe befand sich allerdings bedeutend weniger β -Aktin als in den anderen Proben. Der zytotoxische Effekt von CsA wurde durch die gleichzeitige Anwesenheit von RA verstärkt. Die Auswertung des unter Verwendung von Anti-NF-M AK entwickelten Western-Blots zeigte, dass RA die P19-Zellen zur Differenzierung angeregt hatte, unabhängig davon, ob sich CsA im Medium befunden hatte oder nicht.

Die mikroskopische Untersuchung der Ansätze stützte diesen Befund. Die Zelldichte im RA und CsA enthaltenden Ansatz war geringer als die Zelldichte in den anderen Ansätzen. Die wenigen verbliebenen Zellen hatten sich aber deutlich zum Neuronartigen Phänotyp hin differenziert (Daten nicht gezeigt).

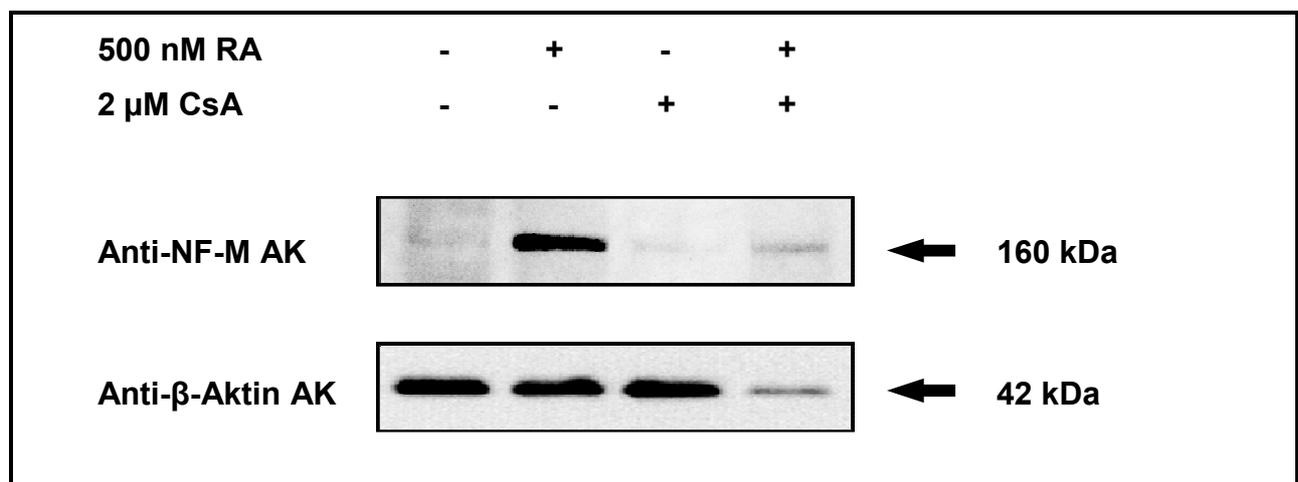


Abbildung 17: Einfluss von CsA auf die P19-Zell-Differenzierung. Untersuchung von P19-Zelllysaten mittels Western-Blot-Analyse. Die Zellen waren in Anwesenheit oder Abwesenheit von RA und CsA kultiviert worden. NF-M wurde ausschließlich in Anwesenheit von RA exprimiert. CsA hatte Einfluss auf die Anzahl, nicht aber auf die Differenzierung der P19-Zellen.

3.2.2 CypA als Chemoattraktor für Leukozyten

3.2.2.1 Etablieren der Technik Chemotaxis-Assay

Das Cytokin *Stromal cell-derived factor-1 α* (kurz SDF-1 α , Swiss-Prot-Eintrag P48061) ist ein gut charakterisierter Chemoattraktor für Jurkat-Zellen (Hesselgesser *et al.*, 1998). An diesem Zell-Chemoattraktor-Paar wurden die optimalen Bedingungen für die Chemotaxis ermittelt (siehe 2.4.9). Alle Experimente wurden in Serum-freiem RPMI-Medium mit 0,1 % BSA durchgeführt. RPMI-Medium ist für die Kultivierung von Leukozyten geeignet. FBS enthält eine Vielzahl chemotaktisch aktiver Substanzen, die den Assay stören würden. BSA wurde zugefügt, um die Anlagerung der Peptid- bzw. Proteinchemoattraktoren an die Gefäßwand zu verhindern. Der Chemoattraktor SDF-1 α wurde im unteren Kompartiment des Boyden-Kammer-Wells vorgelegt. Die perforierte Membran bestand aus Polycarbonat und war nicht mit PVP behandelt, der Porendurchmesser betrug 5 μ m, die Porendichte 4 \cdot 10³ Poren/mm². Exponentiell wachsende Jurkat-Zellen wurden durch Scherkräfte vereinzelt, gewaschen und so in

RPMI-Medium mit 0,1 % BSA aufgenommen, dass eine Zelldichte von $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml erreicht wurde. Dann wurde die Zellsuspension in das obere Kompartiment des Boyden-Kammer-Wells gefüllt, und die Kammer wurde für 120 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dem Abschaben der sich an der Oberseite der Membran befindenden Zellen wurden die sich an der Unterseite der Membran befindenden Zellen durch Antrocknen an der Membran fixiert, und die Zellkerne wurden mittels DAPI gefärbt. Anschließend wurden am Fluoreszenz-Mikroskop Bilder der entsprechenden Bereiche der Membran aufgenommen (**Abbildungen 18a und b**).

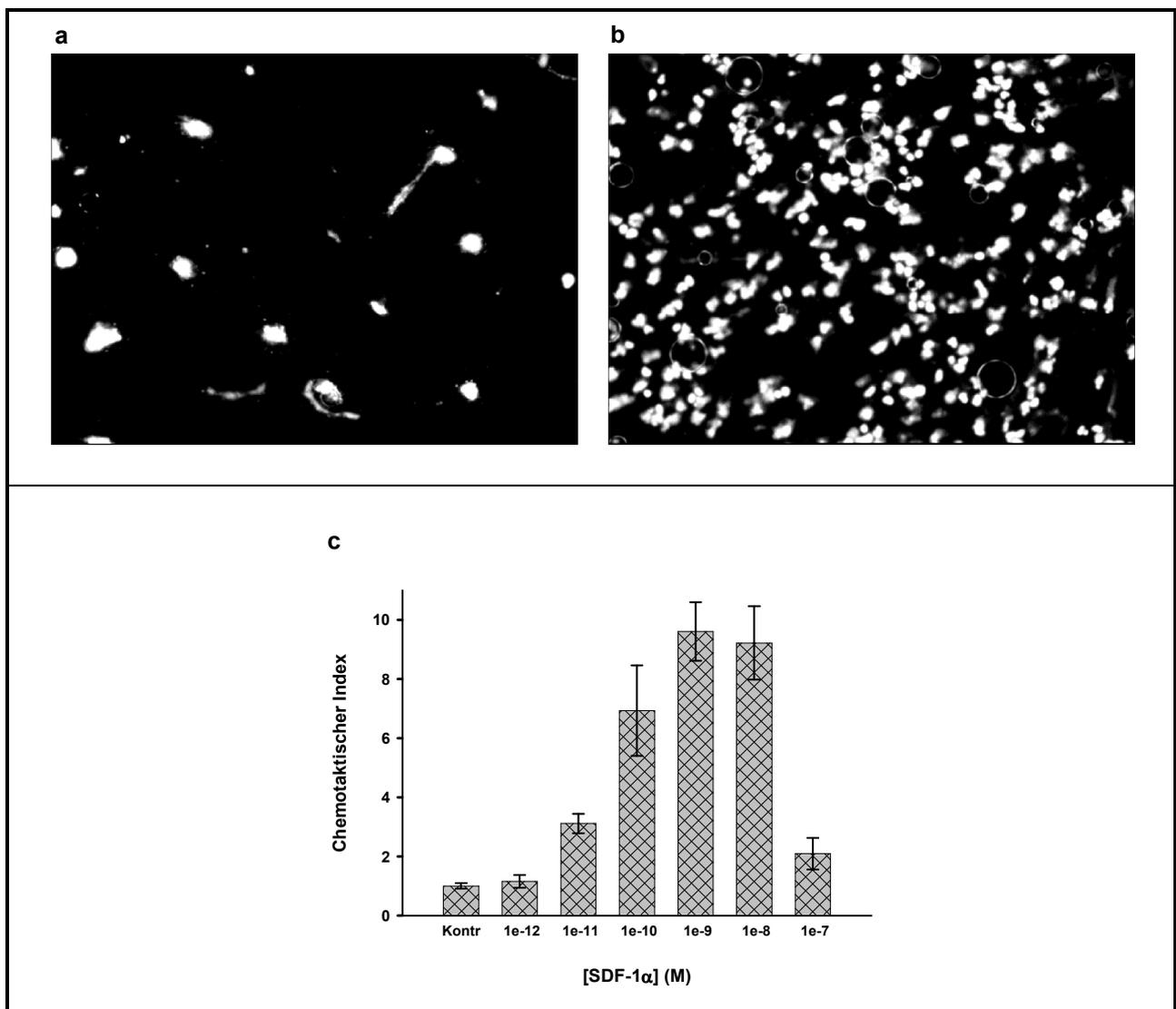


Abbildung 18: Chemotaxis von Jurkat-Zellen zum Chemoattraktor SDF-1α. Gezeigt sind Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen der mit DAPI gefärbten Membran. (a) Kein SDF-1α im unteren Kompartiment (19 Zellkerne). (b) $1 \cdot 10^{-9}$ M SDF-1α im unteren Kompartiment (225 Zellkerne). (c) Abhängigkeit der Chemotaktischen Indizes von der SDF-1α-Konzentration. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel und die Standardabweichungen von Vierfachbestimmungen. Zelldichte $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/ml, Migrationszeit 120 min.

Durch Unregelmäßigkeiten in der Membran oder durch Luftblasen waren die Zellen in einigen Wells nicht homogen gewandert. Deshalb konnte nicht jedes Well zur Auswertung herangezogen werden. Jede experimentelle Bedingung wurde mindestens in Vierfachbestimmung getestet. Die Zellkerne wurden gezählt, das arithmetische Mittel und die Standardabweichung wurden errechnet. Aus diesen Werten wurde schließlich der Chemotaktische Index (kurz CI) ermittelt.

$$\text{CI} = \frac{\text{Zellkernzahl}_{\text{mit Attraktor}}}{\text{Zellkernzahl}_{\text{ohne Attraktor}}}$$

Im Falle der Jurkat-Zellen lag die SDF-1 α -Konzentration, bei der die größte Anregung zur Chemotaxis beobachtet wurde, bei $1 \cdot 10^{-9}$ M, der CI betrug $9,6 \pm 1,0$ (**Abbildung 18c**). Dieser Wert ist im Vergleich der Literaturwerte hoch ($5,0 \pm 0,4$ Hesselgesser *et al.*, 1998, $4,8 \pm 0,1$ Fischer *et al.*, 2004).

3.2.2.2 Vorbereitung und Charakterisierung des Chemoattraktors CypA

CypA wurde in *E. coli* M15-Zellen exprimiert und mittels Anionenaustausch-Chromatographie, Kationenaustausch-Chromatographie und Gelfiltration gereinigt (siehe 2.2.3, Liu *et al.*, 1990). Um die Proteinlösung Endotoxin-frei zu machen, wurde abschließend eine EndoTrap[®]red-Säule (Hyglos GmbH, Regensburg) verwendet.

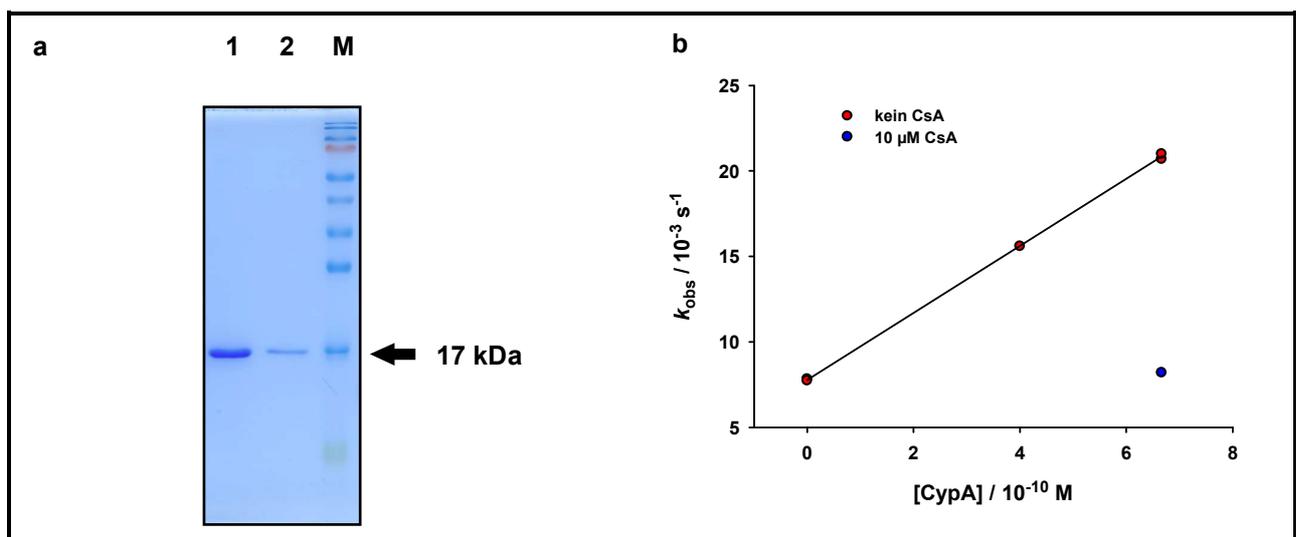


Abbildung 19: Charakterisierung des gereinigten CypA. (a) Coomassie-gefärbtes PA-Gel. 1 87 pmol CypA; 2 17 pmol CypA. (b) Bestimmung der PPlase-Aktivität mittels isomerspezifischer Proteolyse. $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert $2,0 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; Substrat Suc-AAPF-pNA; Temperatur 10°C ; Puffer RPMI-Medium mit 0,1 % BSA.

Die Entfernung der Endotoxine war wichtig, da eine Endotoxin-Kontamination im Chemotaxis-Assay falschpositive Ergebnisse hervorrufen kann (Rosenbaum *et al.*, 1984, Payeli *et al.*, 2008). Im Coomassie-gefärbten PA-Gel war das aufkonzentrierte Protein bandenrein (**Abbildung 19a**), die Konzentration der resultierenden CypA-Stammlösung betrug 272 μM . Schließlich wurde die PPlase-Aktivität gegenüber dem Substrat Suc-AAPF-pNA nach der Methode der isomerspezifischen Proteolyse ermittelt (siehe **2.3.6**, Fischer *et al.*, 1984). Gemessen wurde in der Lösung, die auch für die Chemotaxis-Experimente verwendet werden sollte (RPMI-Medium mit 0,1 % BSA). Bei 10°C entsprach der ermittelte $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert dem in der Literatur beschriebenen Wert von $2,0 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Liu *et al.*, 1990). Die PPlase-Aktivität war durch CsA inhibierbar (**Abbildung 19b**).

3.2.2.3 Der Einfluss von CypA auf das Migrationsverhalten von Leukozyten

Nun wurde der Einfluss dieses Endotoxin-freien CypA auf das Migrationsverhalten von vier Leukozyten-Gruppen untersucht: in Neutrophile differenzierte HL-60-Zellen, THP-1-Zellen, humane Neutrophile und polymorphonukleäre Leukozyten aus dem Peritoneum der Maus (kurz Maus-PMNL).

Differenzierte HL-60/Clone 15-Zellen (ATCC-Nummer CRL-1964)

Die promyelozytischen Zellen wurden zunächst für acht Tage in Gegenwart von 1,25 % DMSO kultiviert, um ihre Differenzierung in Neutrophil-artige Zellen zu bewirken (Collins, 1987). Die Chemotaxis fand dann in RPMI-Medium supplementiert mit 0,1 % BSA statt und dauerte 60 Minuten. Es wurden $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingesetzt. Als Positivkontrolle diente das formylierte Tripeptid FMLP. Für jede Konzentration wurde eine Vierfachbestimmung durchgeführt. Die Chemotaktischen Indizes (kurz CI) wurden in Abhängigkeit von der Attraktorkonzentration aufgetragen (**Abbildung 20**). Tatsächlich wurden die differenzierten HL-60-Zellen durch die Positivkontrolle FMLP zur Chemotaxis angeregt. Die maximale Anregung erfolgte bei $1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ FMLP, der CI betrug $3,8 \pm 0,9$. Im Gegensatz dazu hatte CypA unter den gewählten Bedingungen keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten der differenzierten HL-60-Zellen. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Befunden der Arbeitsgruppe Lyttle (Xu *et al.*, 1992).

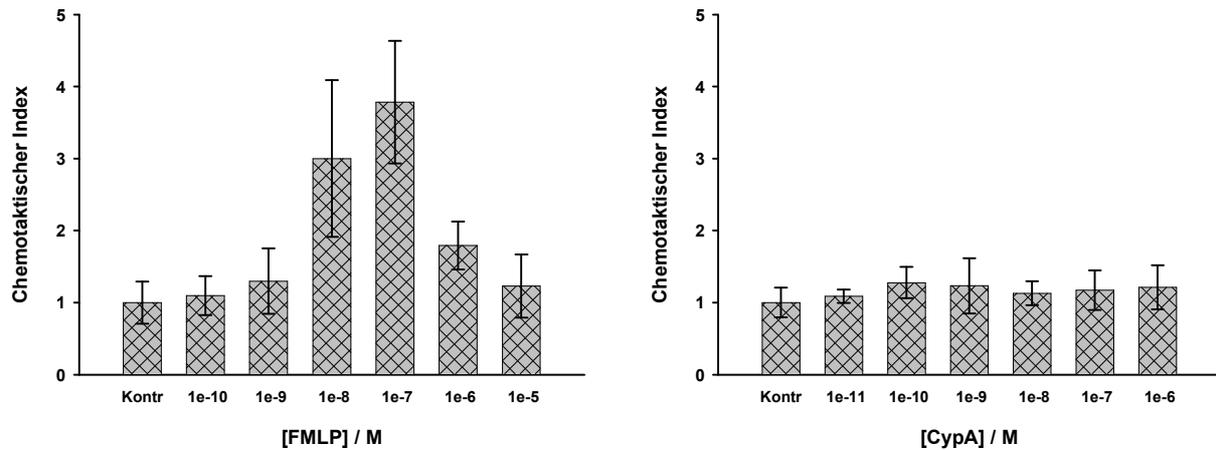


Abbildung 20: Einfluss von FMLP bzw. CypA auf das Migrationsverhalten von differenzierten HL-60-Zellen. Aufgetragen sind die chemotaktischen Indizes in Abhängigkeit von der Chemoattraktorkonzentration. Zelldichte $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml, Migrationszeit 60 Minuten, CI bei $1 \cdot 10^{-7}$ M FMLP $3,8 \pm 0,9$. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel und die Standardabweichungen von Vierfachbestimmungen.

Im Methodenteil der genannten Publikation (Xu *et al.*, 1992) waren die experimentellen Bedingungen des Chemotaxis-Assays nicht detailliert beschrieben. Deshalb wurden im Folgenden mehrere experimentelle Parameter variiert, um die differenzierten HL-60-Zellen eventuell doch durch CypA zur Chemotaxis anzuregen (**Tabelle 10**).

Tabelle 10: Variation der experimentellen Parameter für die CypA-induzierte Chemotaxis der differenzierten HL-60-Zellen.

Parameter	Variation
Konzentration an BSA im RPMI-Medium	kein BSA, 0,1 %, 0,3 % und 1 %
Migrationszeit	30 Minuten, 60 Minuten und 120 Minuten
Vorbereitung der Zellen	Inkubation in Serum-freiem Medium für 24 Stunden
CypA	Batch
Konzentration an CypA	$2,5 \cdot 10^{-9}$ M, $5 \cdot 10^{-9}$ M, $1 \cdot 10^{-8}$ M, $2 \cdot 10^{-8}$ M, $4 \cdot 10^{-8}$ M und $8 \cdot 10^{-8}$ M
Anbieter der perforierten Membran	Osmonics (Minnetonka) und Neuro Probe (Gaithersburg)

Auch unter den veränderten experimentellen Bedingungen regte CypA die differenzierten HL-60-Zellen nicht zur Chemotaxis an.

THP-1-Zellen (ATCC-Nummer TIB-202)

Die von humanen Monozyten abgeleiteten Zellen wurden gewaschen und so in Medium aufgenommen, dass die Zelldichte bei $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml lag. Die Chemotaxis fand in RPMI-Medium supplementiert mit 0,1 % BSA statt, die Migrationszeit betrug 90 Minuten. Eine Positivkontrolle wie zum Beispiel das Chemokin MCP-1 (Kruszynski *et al.*, 2006) stand leider nicht zur Verfügung. Für jede Konzentration wurde eine Vierfachbestimmung durchgeführt. Die chemotaktischen Indizes wurden in Abhängigkeit von der Attraktorkonzentration aufgetragen (**Abbildung 21**). CypA regte die THP-1-Zellen trotz der mehrfachen Wiederholung des Versuchs nicht zur Chemotaxis an. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Befunden der Arbeitsgruppe Tanner (Payeli *et al.*, 2008).

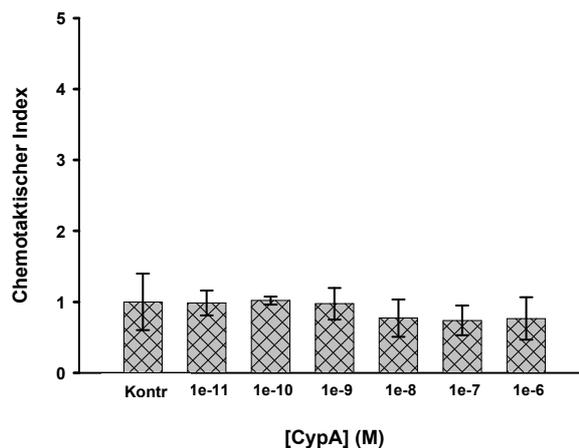


Abbildung 21: Einfluss von CypA auf das Migrationsverhalten von THP-1-Zellen. Aufgetragen sind die chemotaktischen Indizes in Abhängigkeit von der Chemoattraktorkonzentration. Zelldichte $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml, Migrationszeit 120 Minuten. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel und die Standardabweichungen von Vierfachbestimmungen.

Humane Neutrophile

Die Zellen wurden aus dem Blut eines gesunden männlichen Spenders gewonnen (Clark und Nauseef, 2001). Zunächst wurde das Vollblut mit Dextran versetzt, um Erythrozyten zu sedimentieren. Mit dem Überstand wurde anschließend eine Ficoll-Paque-Zentrifugation durchgeführt, um mononukleäre Zellen abzureichern. Das Pellett wurde resuspendiert, noch immer kontaminierende Erythrozyten wurden einer hypotonischen Lyse unterzogen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellett, welches nun zum überwiegenden Teil aus Neutrophilen bestand, in RPMI-Medium supplementiert mit 0,1 % BSA resuspendiert. Dabei wurde die Zelldichte auf $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt.

Die Zellen wurden direkt im Anschluss an die Präparation im Chemotaxis-Assay untersucht. Als Positivkontrolle diente FMLP, die Migrationszeit betrug 45 Minuten. Für jede Konzentration wurde eine Vierfachbestimmung durchgeführt. Die chemotaktischen Indizes wurden in Abhängigkeit von der Attraktorkonzentration aufgetragen (**Abbildung 22**). Die humanen Neutrophilen wurden durch FMLP zur Chemotaxis angeregt. Die maximale Anregung wurde bei $1 \cdot 10^{-7}$ M FMLP detektiert, der CI lag bei $2,0 \pm 0,1$. CypA hatte keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten der humanen Neutrophilen. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Befunden der Arbeitsgruppe Cerami (Sherry *et al.*, 1992).

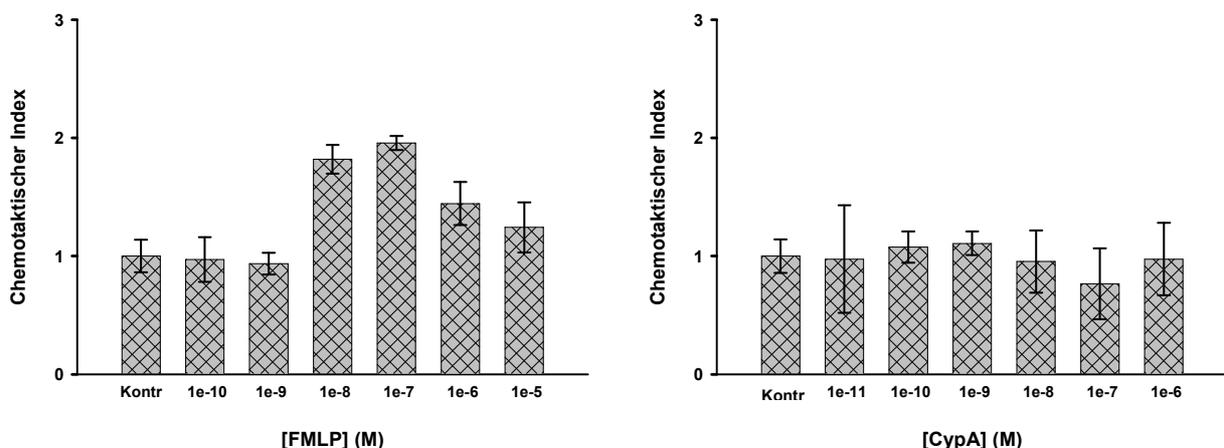


Abbildung 22: Einfluss von FMLP bzw. CypA auf das Migrationsverhalten von humanen Neutrophilen. Aufgetragen sind die chemotaktischen Indizes in Abhängigkeit von der Chemoattraktorkonzentration. Zelldichte $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml, Migrationszeit 45 Minuten, CI bei $1 \cdot 10^{-7}$ M FMLP $2,0 \pm 0,1$. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel und die

Standardabweichungen von Vierfachbestimmungen.

Peritoneale Maus-PMNL

Auf die Vermutung hin, dass lymphatische Zellen eher auf CypA reagieren könnten als direkt aus Blut gewonnene Leukozyten, wurden peritoneale Maus-PMNL im Chemotaxis-Assay untersucht. Die Präparation der Zellen wurde von Dr. Thomas Müller (Universitätsklinikum Kröllwitz, Halle) durchgeführt. Einer Maus wurden 5 ml einer Glykogen-Lösung (1 mg/ml in PBS) in das Peritoneum injiziert (Stehle *et al.*, 2006). Nach 45 Minuten wurde die Maus getötet, und die sich im Peritoneum befindende Suspension wurde der Maus entnommen. Darin waren nun PMNL enthalten. Die Suspension wurde zentrifugiert, und das Pellett wurde so in RPMI-Medium supplementiert mit 0,1 % BSA resuspendiert, dass die Zelldichte bei $8 \cdot 10^5$ Zellen/ml lag. Direkt im Anschluss an die Präparation wurden die peritonealen Maus-PMNL im Chemotaxis-Assay untersucht. Als Positivkontrolle diente wiederum FMLP, die Migrationszeit betrug 120 Minuten. Für jede Konzentration wurde eine Vierfachbestimmung durchgeführt. Die chemotaktischen Indizes wurden in Abhängigkeit von der Attraktorkonzentration aufgetragen (**Abbildung 23**). Die peritonealen Maus-PMNL wurden durch FMLP zur Chemotaxis angeregt. Die maximale Anregung wurde bei $1 \cdot 10^{-6}$ M FMLP detektiert, der CI lag bei $2,8 \pm 0,7$. CypA hatte keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten der peritonealen Maus-PMNL. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Befunden der Arbeitsgruppe Constant (Arora *et al.*, 2005).

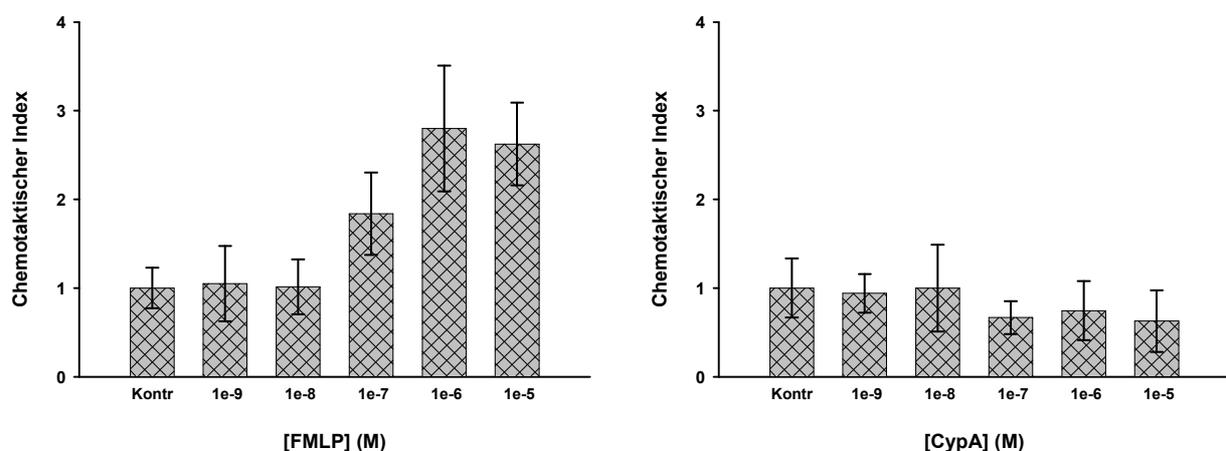


Abbildung 23: Einfluss von FMLP bzw. CypA auf das Migrationsverhalten von peritonealen Maus-PMNL. Aufgetragen sind die chemotaktischen Indizes in Abhängigkeit von der Chemoattraktorkonzentration. Zelldichte $8 \cdot 10^5$ Zellen/ml, Migrationszeit 120 Minuten, CI bei $1 \cdot 10^{-6}$ M FMLP $2,8 \pm 0,7$. Dargestellt sind die arithmetischen Mittel und die Standardabweichungen von Vierfachbestimmungen.

4 Diskussion

4.1 Die Modulation der EGFR-Kinaseaktivität durch FKBP12

4.1.1 FKBP12 inhibiert die Kinaseaktivität von EGFR

Lysate von exponentiell wachsenden A-431-Zellen stellen ein homogenes System zur Untersuchung der EGFR-Autophosphorylierung dar (Honegger *et al.*, 1989). Das Detergenz NP-40 solubilisiert den Rezeptor, und der Ligand EGF aktiviert den Rezeptor. Die Autophosphorylierung beginnt nach der Gabe von ATP. Der Phosphorylierungsgrad des EGFR nach Inkubation für 60 Minuten ist von der PPlase FKBP12 abhängig (**Abbildung 2b**). Je mehr aktives FKBP12 sich im Ansatz befindet, desto geringer ist der Phosphorylierungsgrad. Die densitometrische Analyse von Western-Blots zeigt, dass 5,4 μM FKBP12 den Phosphorylierungsgrad von zum Beispiel Y1016 um 74 % und den von Y1092 um 54 % verringern (**Abbildung 2c**). Für den Einfluss von FKBP12 sind mehrere Erklärungen möglich. FKBP12 könnte die Aktivierung des EGFR durch EGF inhibieren, könnte durch Interaktion mit der regulatorischen Region des EGFR die Autophosphorylierungsstellen abschirmen oder könnte die Dephosphorylierung des Rezeptors beschleunigen. Da sich im Lysat viele potentielle Adaptorproteine befinden, könnte der Einfluss von FKBP12 direkter oder indirekter Natur sein. Genauerer Einblick in den Wirkmechanismus von FKBP12 wurde durch den Einsatz rekombinanter EGFR-Varianten gewonnen.

FKBP12 kommt sowohl zytoplasmatisch (Siekierka *et al.*, 1989a) als auch extrazellulär (Bang *et al.*, 1995) vor. Die biologischen Aktivitäten der Transmembranproteine RyR1, T β R-I, IP₃R und TRPC3/6/7 (**Tabelle 1**) werden durch FKBP12 moduliert. Dabei interagiert FKBP12 ausschließlich mit den intrazellulären Domänen der Proteine (Samsó *et al.*, 2009, Huse *et al.*, 1999, Cameron *et al.*, 1997, Sinkins *et al.*, 2004). Daher lag die Vermutung nahe, dass der Einfluss von FKBP12 auf den Phosphorylierungsgrad des EGFR ebenfalls durch den intrazellulären Teil des Rezeptors vermittelt wird. Mit EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ wurde ein Fragment hergestellt, das den gesamten intrazellulären Teil des EGFR beinhaltet. Dieses Fragment ist, ähnlich wie das Vollängen-Protein, zur Autophosphorylierung befähigt (Gregoriou *et al.*, 1995).

Die Autophosphorylierung des *fibroblast growth factor receptor 1* (kurz FGFR1, Swiss-Prot-Eintrag P11362) erfolgt nach einem streng geordneten sequentiellen Mechanismus (Furdui *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu werden die Tyrosinreste der regulatorischen Region des EGFR sukzessive, aber nicht in einer bestimmten Reihenfolge autophosphoryliert (Guo *et al.*, 2003). Jeder Tyrosinrest der regulatorischen Region stellt ein Substrat mit eigenen enzymkinetischen Parametern dar. Der Einfluss der Sekundärstruktur auf diese Parameter lässt sich durch die Phosphorylierung von Peptiden, die vom EGFR abgeleitet sind, untersuchen. Das 17mer Peptid EGFR₁₀₈₄₋₁₁₀₀ enthält Y1092. Der $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert für die Phosphorylierung von EGFR₁₀₈₄₋₁₁₀₀ durch den EGFR beträgt $16,0 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Fan *et al.*, 2004). Das Peptid EGFR₁₁₀₂₋₁₁₁₈ enthält Y1110. Der $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert für die Phosphorylierung dieses Peptids durch den EGFR beträgt $2,7 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Fan *et al.*, 2004). Die beiden $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte unterscheiden sich um den Faktor 6. Wenn die Tyrosinreste in die regulatorische Region des EGFR eingebettet sind, können die Unterschiede aufgrund der Tertiärstruktur bedeutend größer sein. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine regulatorische Region, die bereits an sieben Tyrosinresten phosphoryliert ist, ein schlechteres Substrat darstellt als eine noch nicht phosphorylierte regulatorische Region. Bei der Autophosphorylierung von EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ laufen also gleichzeitig viele Reaktionen mit sehr unterschiedlichen Geschwindigkeiten ab. Die nahezu vollständige Autophosphorylierung von EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ ändert die Laufhöhe des Proteins im SDS-Gel von 64 kDa zu 75 kDa. Deshalb ist es möglich, den Verlauf der Autophosphorylierung von EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ mittels SDS-PAGE, Coomassie-Färbung und densitometrischer Quantifizierung zu verfolgen (**Abbildung 4**). 10 Minuten nach Beginn der Reaktion liegen $30 \pm 2 \%$ des EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ vollständig phosphoryliert vor. FKBP12 inhibiert die Autophosphorylierung. Wenn sich $5 \mu\text{M}$ FKBP12 im Reaktionsansatz befinden, sind 10 Minuten nach Beginn der Reaktion nur $19 \pm 1 \%$ des EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ vollständig phosphoryliert. FKBP12 muss direkt mit EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ interagieren, da sich keine potentiellen Adaptorproteine im Reaktionsansatz befinden. Die PPIase CypA beeinflusst die Autophosphorylierung nicht, die Inhibition durch FKBP12 kann deshalb als spezifisch betrachtet werden. In Gegenwart des FKBP-Inhibitors FK506 hatte FKBP12 keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Autophosphorylierung. Dies ist ein Hinweis auf die Beteiligung des aktiven Zentrums von FKBP12 an der Inhibition der Autophosphorylierung. FKBP12 könnte entweder die Aktivität der Tyrosinkinasedomäne

oder die Substrateigenschaften der regulatorischen Region modulieren. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde die Phosphorylierung eines alternativen Substrats untersucht.

Das Fragment EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ besteht fast ausschließlich aus der Juxtamembran-Region und der Kinasedomäne des EGFR. Deshalb ist es für die Untersuchung der Phosphorylierung von Peptiden geeignet (Borowski *et al.*, 1998). Ein Peptidsubstrat ist das vom *SHC-transforming protein 1*, einem physiologischen Substrat des EGFR, abgeleitete Shc-Y317 (Fan *et al.*, 2004). Das 17mer Peptid wird von EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ an einem Tyrosinrest phosphoryliert. Während der ersten 15 Minuten der Reaktion nimmt die Konzentration an Phospho-Shc-Y317 linear zu, der Anstieg entspricht der Reaktionsgeschwindigkeit V_{Reaktion} . Bei einer EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂-Konzentration von 0,25 μM beträgt V_{Reaktion} $5,0 \pm 0,1 \mu\text{M}/\text{min}$. Dieser Wert stimmt gut mit bereits publizierten Werten überein (4,5 $\mu\text{M}/\text{min}$, Qiu *et al.*, 2009, beziehungsweise 6,0 $\mu\text{M}/\text{min}$, Jura *et al.*, 2009). Die Kinaseaktivität von EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ wird durch FKBP12 inhibiert. Wenn sich 5 μM FKBP12 im Phosphorylierungsansatz befinden, hat EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ eine Restaktivität von 60 %. Eine Interaktion zwischen Shc-Y317 und FKBP12 als Ursache der Inhibition ist unwahrscheinlich. Zum einen ist das in Shc-Y317 enthaltene DP-Motiv ein schlechtes Substrat für FKBP12 (Zoldák *et al.*, 2009), zum anderen lag das Peptid in fast 50-fachem Überschuss gegenüber FKBP12 vor.

Das EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂-Monomer verfügt über keine katalytische Aktivität (Zhang *et al.*, 2006). Durch Dimerisierung entsteht entweder ein symmetrisches, katalytisch ebenfalls inaktives Dimer (Jura *et al.*, 2009) oder ein asymmetrisches, katalytisch aktives Dimer (Red Brewer *et al.*, 2009). Für die Dimerisierung wird ein durch dynamische Lichtstreuung ermittelter K_D -Wert von 200 nM angegeben (Jura *et al.*, 2009). Dieser K_D -Wert sagt nichts über die Natur des entstandenen Dimers aus. Die in einer Lösung von EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ enthaltenen Spezies sind in **Tabelle 10a** schematisch dargestellt. Die Möglichkeit der Kettenbildung durch die asymmetrische Interaktion wird in dem Schema nicht berücksichtigt.

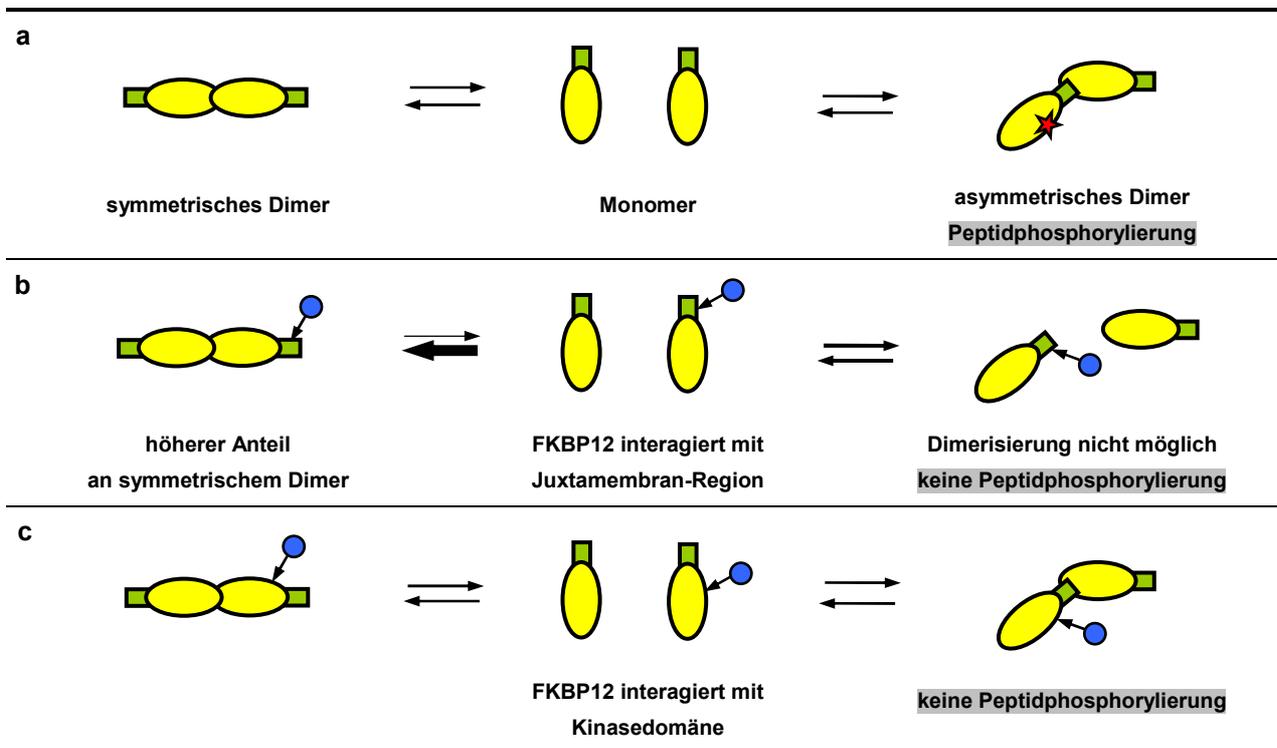
Für die Inhibition der Kinaseaktivität von EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ durch FKBP12 sind verschiedene Mechanismen denkbar (**Tabelle 10b und c**). So könnte die Interaktion zwischen EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ und FKBP12 die Bildung des asymmetrischen, katalytisch aktiven Dimers und damit die allosterische Aktivierung von EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ verhindern. Das Gleichgewicht der EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂-Spezies wäre dann in Richtung des symmetrischen, katalytisch

inaktiven Dimers verschoben. Eine andere Möglichkeit besteht in der Interaktion von FKBP12 mit dem asymmetrischen, katalytisch aktiven Dimer und einer daraus folgenden Inhibition.

Die Juxtamembran-Region von EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ enthält zwei Prolinreste (P691 und P694). Die Substitution je eines dieser Reste gegen Alanin verhindert die allosterische Aktivierung völlig (Red Brewer *et al.*, 2009). Deshalb hätte wahrscheinlich auch die Interaktion von FKBP12 mit einem dieser Prolinreste Auswirkungen auf die Bildung des asymmetrischen Dimers (**Tabelle 10b**).

Die Kinasedomäne von EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ enthält 20 Prolinreste. Sieben davon sind Teil von VP-, IP- beziehungsweise LP-Motiven (P733, P741, P877, P919, P934, P990 und P1019). Peptidyl-Prolyl-Bindungen, bei denen sich *N*-terminal vom Prolin eine hydrophobe AS befindet, werden von FKBP12 besonders gut erkannt (Zoldák *et al.*, 2009). Sechs dieser Prolinreste sind Oberflächen-exponiert (Zhang *et al.*, 2006) und dadurch für FKBP12 zugänglich. V876 und P877 befinden sich in der Nähe des aktiven Zentrums von EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ (Zhang *et al.*, 2006). Die Interaktion von FKBP12 mit

Tabelle 10: Mögliche Mechanismen der Inhibition der Kinaseaktivität von EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ durch FKBP12. (a) Dimerisierungen von EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂. (b) Interaktion von FKBP12 mit der Juxtamembran-Region. (c) Interaktion von FKBP12 mit der aktivierten Kinasedomäne.



diesem Motiv hätte wahrscheinlich Auswirkungen auf die Kinaseaktivität des asymmetrischen Dimers (**Tabelle 10c**). Aus den im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten lässt sich nicht schlussfolgern, nach welchem Mechanismus FKBP12 die Kinaseaktivität des EGFR tatsächlich inhibiert.

4.1.2 FKBP12 inhibiert den EGFR nicht durch einfache Bindung, sondern durch Katalyse einer *cis/trans*-Isomerisierung

Weder durch den *Pull down* von EGFR mit GST-FKBP12 noch durch die Ko-Immunpräzipitation von FKBP12 mit FLAG-EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ konnte eine Bindung von FKBP12 an den EGFR nachgewiesen werden (**Abbildungen 6 und 7**). Wie ist dieser Befund mit der Inhibition der Kinaseaktivität des EGFR durch FKBP12 in Einklang zu bringen?

Der beschriebene *Pull down*-Assay wurde nicht nur mit immobilisiertem GST-FKBP12, sondern auch mit anderen immobilisierten PPlasen durchgeführt. Für GST-Pin1 (Swiss-Prot-Eintrag Q13526) wurden so zum Beispiel 69 Bindungspartner reproduzierbar identifiziert. Im Coomassie-gefärbten SDS-Gel waren die Banden der Bindungspartner deutlich zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Pin1 vermittelt Protein-Protein-Interaktionen über seine *N*-terminale WW-Domäne (Lu *et al.*, 1996). Die K_D -Werte für die Bindungen liegen zwischen 5 und 80 μM (Verdecia *et al.*, 2000). Bindungen mit K_D -Werten im unteren mikromolaren Bereich sind also durch *Pull down* nachweisbar.

Wenn FKBP12 die Kinaseaktivität von EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ durch einfache Bindung inhibieren würde, ließe sich nach dem Massenwirkungsgesetz ein K_D -Wert für die Bindung berechnen. Dazu wird von folgenden Annahmen ausgegangen.

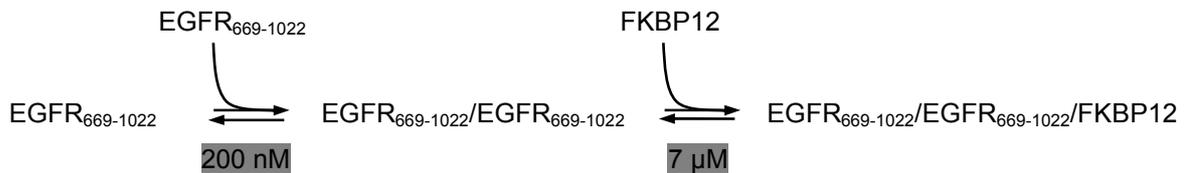
$[\text{EGFR}_{669-1022}]$	= 0,25 μM	Konzentration an EGFR ₆₆₉₋₁₀₂₂
K_D	= 200 nM	K_D für die Dimerisierung von EGFR ₆₆₉₋₁₀₂₂ (Jura <i>et al.</i> , 2009)
$V_{\text{Reaktion1}}$	= 5,0 $\mu\text{M}/\text{min}$	V_{Reaktion} in Abwesenheit von FKBP12 (Abbildung 5)
$[\text{FKBP12}]$	= 5 μM	Konzentration an FKBP12
$V_{\text{Reaktion2}}$	= 3,0 $\mu\text{M}/\text{min}$	V_{Reaktion} in Anwesenheit von FKBP12 (Abbildung 5)

Die Existenz des symmetrischen EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂-Dimers wird für die Berechnungen vernachlässigt.

Nach dem in **Tabelle 10b** beschriebenen Modell inhibiert FKBP12 die allosterische Aktivierung von EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂. Der K_D -Wert für eine einfache Bindung von FKBP12 an EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ läge in diesem Fall bei 6 μM .



Nach dem in **Tabelle 10c** beschriebenen Modell inhibiert FKBP12 das asymmetrische, katalytisch aktive Dimer. Der K_D -Wert für eine einfache Bindung von FKBP12 an EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ läge in diesem Fall bei 7 μM .



Diese K_D -Werte liegen im unteren mikromolaren Bereich. Eine einfache Bindung von FKBP12 an EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ hätte durch *Pull down* beziehungsweise Ko-Immunitäzitation nachweisbar sein müssen. Vermutlich inhibiert also FKBP12 die Kinaseaktivität von EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ nicht durch einfache Bindung, sondern durch die Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung einer Peptidyl-Prolyl-Bindung an der Oberfläche von EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂.

Wenn ein natives Protein zwei Konformationen einnehmen kann, die sich durch *cis/trans*-Isomerisierung einer Peptidyl-Prolyl-Bindung ineinander überführen lassen, wird diese Konformationsänderung als *native state*-Isomerisierung bezeichnet (Andreotti, 2003). Solche *native state*-Isomerisierungen wurden für mehrere Proteine nachgewiesen, zum Beispiel für das humane Strukturprotein Fibrillin-1 (Swiss-Prot-Eintrag P35555, Yuan *et al.*, 1998), die humane Tyrosinkinase Itk (Swiss-Prot-Eintrag Q08881, Brazin *et al.*, 2002) und das humane Adaptorprotein Crk (Swiss-Prot-Eintrag P46108, Sarkar *et al.*, 2007). *Native state*-Isomerisierungen lassen sich durch NMR-Spektroskopie beobachten, fallen aber nur dann durch NOE-Signalverdopplung auf, wenn unter den Messbedingungen Populationen in der *cis*- und in der *trans*-Konformation in ähnlichen Konzentrationen existieren. Deshalb ist davon auszugehen, dass *native state*-Isomerisierungen bedeutend häufiger vorkommen, als die Anzahl der

bisher publizierten Strukturen vermuten lässt (Andreotti, 2003). PPlasen katalysieren *native state*-Isomerisierungen (Brazin *et al.*, 2002, Pappenberger *et al.*, 2003, Sarkar *et al.*, 2007). Die Katalyse von *native state*-Isomerisierungen wird als eine physiologische Funktion von PPlasen diskutiert (Lu *et al.*, 2007).

Die PPlase-Aktivität der FKBP12-Varianten D37L und F99Y ist stark eingeschränkt, trotzdem binden sie ihre Substrate mit ähnlicher Affinität wie WT-FKBP12 (Fanghänel und Fischer, 2004). Diese PPlase-inaktiven Varianten inhibieren die EGFR-Autophosphorylierung kaum (Lopez-Illasaca *et al.*, 1998). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass FKBP12 den EGFR durch die Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung einer Peptidyl-Prolyl-Bindung inhibiert.

Im folgenden wird ein EGFR-Motiv vorgestellt, das für eine *native state*-Isomerisierung in Frage kommt. Die imidische Bindung zwischen den AS-Resten V876 und P877 des EGFR befindet sich am C-Terminus des *activation loop*. Die Kristallstruktur der Arbeitsgruppe Carpenter (Red Brewer *et al.*, 2009) bildet den flexiblen *activation loop* nicht ab, die Kristallstruktur der Arbeitsgruppe Kuriyan (Zhang *et al.*, 2006) zeigt die VP-Bindung in der *trans*-Konformation. Auf die Konformation in Lösung lässt sich daraus aber nur bedingt schließen (Andreotti, 2003). Angenommen, im EGFR-Monomer läge diese Bindung in der *trans*-Konformation vor. Durch die asymmetrische Dimerisierung des EGFR kommt es zu ausgeprägten strukturellen Veränderungen in der Kinasedomäne des Akzeptors (Red Brewer *et al.*, 2009). Dadurch könnte die *cis*-Konformation der VP-Bindung zur energetisch begünstigten Konformation werden. Wäre die Kinasedomäne nur aktiv, wenn die VP-Bindung in der *trans*-Konformation vorliegt, würde FKBP12 die Inaktivierung des EGFR beschleunigen und dadurch die Kinaseaktivität inhibieren. Die Aktivität wäre erst wieder hergestellt, nachdem die Dissoziation des Dimers, die Isomerisierung der VP-Bindung in die *trans*-Konformation und eine erneute Dimerisierung erfolgt wäre. Ein solcher Mechanismus der transienten Aktivierung des EGFR ließe sich durch NMR-Spektroskopie beweisen. Unter anderem wegen der in **Tabelle 10a** dargestellten Dimerisierungen ist aber bislang keine NMR-Struktur von EGFR₆₆₉₋₁₀₂₂ veröffentlicht worden.

4.1.3 Die Modulation der EGFR-vermittelten Signaltransduktion durch FKBP12

Durch die konfokalmikroskopische Untersuchung mehrerer humaner Krebszell-Linien wurde gezeigt, dass der EGFR und FKBP12 intrazellulären Kontakt haben können. In A-431-Zellen, die sich durch eine besonders hohe Expression von EGFR auszeichnen (Masui *et al.*, 1993), hat das über die gesamte Zelle verteilte Fusionsprotein eGFP-FKBP12 eine Präferenz für die Lokalisierung an der Zellmembran, in der sich auch der EGFR befindet (**Abbildung 8**). In HeLa-Zellen, die mittels EGF zur Autophosphorylierung und Internalisierung des EGFR angeregt worden sind (Haigler *et al.*, 1978), akkumuliert eGFP-FKBP12 aber nicht an den durch die Internalisierung des EGFR entstandenen Endosomen (**Abbildung 9**). Für den Nachweis einer solchen Akkumulierung ist der K_D -Wert der Interaktion wahrscheinlich zu hoch.

Die Inhibition der EGFR-Kinaseaktivität durch FKBP12 lässt sich in den zellulären Kontext übertragen. Wenn HeLa-Zellen durch EGF zur Autophosphorylierung des EGFR angeregt werden, ist der Phosphorylierungsgrad des EGFR von der intrazellulären FKBP12-Konzentration abhängig. Je höher die intrazelluläre FKBP12-Konzentration ist, desto geringer ist der Phosphorylierungsgrad. Dies wurde unter Verwendung von HeLa-Zellen mit den intrazellulären FKBP12-Konzentrationen 50 nM, 1 μ M beziehungsweise 5 μ M gezeigt (**Abbildungen 10a und 11**). Eine physiologische Funktion von FKBP12 könnte darin liegen, die Antwort der Zellen auf extrazelluläre EGFR-Liganden zu modulieren.

FKBP12 interagiert neben dem EGFR auch mit dem T β R-I (Wang und Donahoe, 2004). Im Zusammenhang mit dieser Interaktion wurde für FKBP12 eine Aufgabe bei der Unterdrückung der T β R-I-Basalaktivität vorgeschlagen (Chen *et al.*, 1997). Die Basalaktivität des EGFR in HeLa-Zellen lag an der Detektionsgrenze der Western-Blot-Analyse. Ein Zusammenhang zwischen der intrazellulären FKBP12-Konzentration und der Basalaktivität des EGFR konnte nicht nachgewiesen werden (**Abbildung 11**). Des Weiteren wurde vorgeschlagen, dass FKBP12 den Schwellenwert, ab dem TGF- β eine Aktivierung des T β R-I bewirkt, erhöht (Chen *et al.*, 1997). Deshalb wurde der Schwellenwert, ab dem EGF eine durch Western-Blot-Analyse nachweisbare Autophosphorylierung des EGFR in HeLa-Zellen bewirkt, ermittelt. Ein Einfluss der intrazellulären FKBP12-Konzentration auf diesen Schwellenwert konnte nicht nachgewiesen werden (**Abbildung 10b**). Die Aktivierung des EGFR durch EGF löst

mehrere zelluläre Signalkaskaden aus (Oda *et al.*, 2005). Infolgedessen werden zum Beispiel die Proteine *extracellular signal-regulated kinase 1/2* (kurz ERK-1/2, Swiss-Prot-Einträge P27361 und P28482) phosphoryliert (Howe *et al.*, 1992). Ein Einfluss der intrazellulären FKBP12-Konzentration auf den Phosphorylierungsgrad von ERK-1/2 konnte durch Western-Blot-Analyse nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich im kaskadenartigen Verlauf der intrazellulären Signalübertragung (Lemmon und Schlessinger, 2010).

Durch den experimentellen Ansatz der kurzen Inkubation (2 - 5 Minuten) der Zellen in Gegenwart von EGF wurde zwar die Inhibition der EGFR-Autophosphorylierung durch FKBP12 gezeigt, der Phosphorylierungsgrad von ERK-1/2 änderte sich aber nicht. Deshalb wurde der langfristige Einfluss (2 - 3 Tage) der intrazellulären FKBP12-Konzentration auf vom EGFR regulierte zelluläre Prozesse wie das Durchlaufen des Zellzyklus und die Zellmotilität untersucht. Der Nachteil dieser Herangehensweise liegt darin, dass die beobachteten Effekte nicht zwingend auf die Inhibition der EGFR-Kinaseaktivität durch FKBP12 zurückzuführen sind. FKBP12 moduliert auch die Aktivität anderer Signaltransduktionsproteine. So steuert FKBP12 zum Beispiel die Depalmitoylierung von H-Ras (Swiss-Prot-Eintrag P01112, Ahearn *et al.*, 2011). Deshalb sind die im Folgenden diskutierten Ergebnisse nicht als Beweise für, sondern als Hinweise auf eine zellphysiologische Bedeutung der Inhibition der EGFR-Kinaseaktivität durch FKBP12 zu verstehen.

Der EGFR ist an der Regulation des Zellzyklus beteiligt (Mebratu und Tesfaigzi, 2009). Für den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus ist aktivierter EGFR vonnöten (Santiskulvong *et al.*, 2001). Die Überexpression des EGFR in CV-1-Zellen (ATCC-Nummer CCL-70) beschleunigt den Eintritt der Zellen in die S-Phase (Bill *et al.*, 2004), während die Inkubation von Lungenkrebszellen in Gegenwart von Erlotinib, einem Inhibitor der EGFR-Kinaseaktivität (Kim und Murren, 2002), G1-Arrest bewirkt (Ling *et al.*, 2007). Sowohl die Inhibition der PPlase-Aktivität von FKBP12 durch FK506 als auch die reduzierte Expression von FKBP12 durch RNAi beeinflussen die Verteilung exponentiell wachsender HeLa-Zellen auf die Phasen des Zellzyklus (**Abbildung 12**). Die Anzahl der Zellen, die sich in der G1-Phase des Zellzyklus befinden, wird deutlich verringert. Dieses Ergebnis kann durch die Modulation der EGFR-Kinaseaktivität durch FKBP12 erklärt werden. Die reduzierte FKBP12-Aktivität bewirkt erhöhte EGFR-Kinaseaktivität (**Abbildung 10a**). Die erhöhte EGFR-Kinaseaktivität beschleunigt den

Übergang der HeLa-Zellen von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus (Bill *et al.*, 2004) und verringert dadurch die Anzahl der Zellen in der G1-Phase. Der verfrühte Eintritt in die S-Phase führt dazu, dass der Anteil von Zellen mit einem DNA-Gehalt $< G1$ und $> G2/M$ steigt (Cheng *et al.*, 2003). Eine Funktion von FKBP12 bei der Regulation des Zellzyklus wurde bereits von der Arbeitsgruppe Snyder vorgeschlagen (Aghdasi *et al.*, 2001). Aus FKBP12-defizienten Mäusen gewonnene Fibroblasten wachsen langsamer als WT-Fibroblasten. Im Unterschied zu den unter Verwendung von HeLa-Zellen gewonnenen Ergebnissen erhöht die Depletion von FKBP12 den Anteil der primären Fibroblasten in der G1-Phase des Zellzyklus (Aghdasi *et al.*, 2001). Die primären Fibroblasten unterscheiden sich im Expressionsmuster der den Zellzyklus regulierenden Proteine und in der Regulation des Zellzyklus von HeLa-Zellen (<http://biogps.gnf.org/>). Deshalb kann die Verringerung der FKBP12-Konzentration in den Fibroblasten einen anderen Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus haben als in den HeLa-Zellen.

Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung von FKBP12 an der Regulation der EGFR-Kinaseaktivität wurde durch den *scratch migration*-Assay gewonnen (Dioufa *et al.*, 2010). Dabei wird eine Spalte in eine Monoschicht adhärenter Zellen geritzt. Die Monoschicht reagiert auf die Unterbrechung der Zell-Zell-Kontakte mit dem Schließen der Spalte (Yarrow *et al.*, 2004). Die Ansätze werden in Serum-freiem Medium inkubiert, um die Zellteilung zu verhindern. Deshalb ist das Schließen der Spalte auf die Motilität der Zellen zurückzuführen. Die Anwesenheit von EGF im Medium erhöht die Motilität von HeLa-Zellen (**Abbildung 13**, Barrandon und Green, 1987). Die erhöhte Motilität ist durch das Zusammenspiel mehrerer vom EGFR ausgehender Signaltransduktionswege zu erklären (Feigin und Muthuswamy, 2008). Zum Beispiel führt der PLC γ 1-Weg zur Freisetzung von PIP $_2$ -gebundenem Gelsolin. Dadurch wird die Zelle in die Lage versetzt, Filopodien und Lamellipodien auszubilden (Chen *et al.*, 1996). Der Ras/MAPK-Weg führt zur Disassemblierung von fokalen Adhäsionen und damit zu einer schwächeren Anheftung der Zellen an die Wachstumsfläche (Xie *et al.*, 1998). Über den Cdc42/Rac-Weg wird die Verzweigung von Aktinfilamenten in den Lamellipodien reguliert (El-Sibai *et al.*, 2007). Die genannten Signaltransduktionswege beeinflussen sich gegenseitig (Oda *et al.*, 2005). Die FKBP12-Inhibitoren FK506 und Rapamycin verhindern die Anregung der HeLa-Zellmotilität durch EGF (**Abbildung 13**). Da die Inhibition von FKBP12 zu höherer EGFR-Kinaseaktivität führt (**Abbildung 5**), war erwartet worden, dass die Anwesenheit der Inhibitoren im Medium die Anregung der

HeLa-Zellmotilität durch EGF noch verstärkt. Die Erhöhung der EGFR-Kinaseaktivität führt aber nicht zwangsläufig zur Verstärkung einer zellulären Antwort. Zum Beispiel regen 3 pM EGF im Medium A-431-Zellen zur Zellteilung an, während 3 nM EGF die Zellteilung inhibieren (Kawamoto *et al.*, 1983), und die Anregung von PC-12-Zellen (ATCC-Nummer CRL-1721) mit ein und derselben Konzentration an EGF führt in Abhängigkeit vom EGFR-Expressionsniveau entweder zur Zellteilung oder zur Differenzierung in Nervenzellen (Marshall, 1995). Diese gegensätzlichen Antworten auf ein Signal gleicher Art, aber unterschiedlicher Intensität werden durch ein differentielles Wirken von negativen und positiven Rückkopplungs-Mechanismen erklärt (Lemmon und Schlessinger, 2010). Wenn sich kein EGF im Medium befindet, bewirken weder FK506 noch Rapamycin eine Änderung der HeLa-Zellmotilität. Da beide Substanzen gleichermaßen die Erhöhung der HeLa-Zellmotilität durch EGF verhindern, beruht ihr Einfluss wahrscheinlich nicht auf der Inhibition von Calcineurin oder mTOR, sondern auf der Inhibition von FKBP12 und der damit einhergehenden Erhöhung der EGFR-Kinaseaktivität.

4.2 Die Etablierung eines Zellkultur-basierten Assays zur Untersuchung von CypA-Inhibitoren

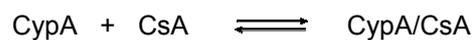
4.2.1 Die Inhibition von CypA durch CsA hat keinen Einfluss auf die RA-induzierte P19-Zell-Differenzierung

P19-Zellen lassen sich durch Inkubation in Gegenwart von all-*trans*-Retinsäure (kurz RA) zur Differenzierung in Neuron-artige Zellen anregen (**Abbildung 15**, Jones-Villeneuve *et al.*, 1982). Es ist aber nicht möglich, diese Differenzierung durch die Inhibition der PPlase CypA zu verhindern (**Abbildung 17**). Dieser Befund ist in Kenntnis der Ergebnisse der Arbeitsgruppe Chiu (Song *et al.*, 2004) nicht erwartet worden. Die Arbeitsgruppe Chiu hat gezeigt, dass P19-Zellen mit einem um 80 % verminderten CypA-Expressionsniveau nicht durch RA zur neuronalen Differenzierung angeregt werden. Warum hat die Inhibition von CypA durch CsA nicht den gleichen Effekt wie die durch RNAi verminderte Expression von CypA?

Eine Erklärungsmöglichkeit besteht darin, dass CypA seine Aufgabe bei der P19-Zell-Differenzierung auch erfüllen kann, wenn es als CypA/CsA-Komplex vorliegt. CsA bindet die Oberflächenregion von CypA, in der auch die PPlase-Aktivität lokalisiert ist (Mikol *et al.*, 1993). Fast alle bisher beschriebenen Funktionen von CypA werden über diese Oberflächenregion vermittelt und sind deshalb durch CsA inhibierbar (Fischer *et al.*, 1989, Luban *et al.*, 1993, Gwinn *et al.*, 2006, Yang *et al.*, 2008, Satoh *et al.*, 2009). Eine Ausnahme bildet hier das Protein *apoptosis-inducing factor* (kurz AIF, Swiss-Prot-Eintrag O95831). Im Komplex mit CypA verfügt AIF über DNase-Aktivität, und diese Aktivität ist durch einen Überschuss an CsA nicht inhibierbar. Folgerichtig wird eine sekundäre Bindestelle am CypA vorgeschlagen (Candé *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse müssen allerdings vorsichtig interpretiert werden, da Präparationen von rekombinantem CypA aus *E. coli* wiederholt mit Endonuklease I kontaminiert waren (Manteca und Sanchez, 2004). Die Bindung von CsA an das aktive Zentrum von CypA hat quasi keinen Einfluss auf die Tertiärstruktur von CypA (Mikol *et al.*, 1993). In Anbetracht einer sekundären Bindestelle könnte der CypA/CsA-Komplex die gleiche Aufgabe bei der P19-Zell-Differenzierung erfüllen wie CypA allein.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen die Konzentration an nicht CsA-gebundenem CypA zu hoch ist. Im

Folgendes wird versucht, diese Konzentration abzuschätzen. Die zur Differenzierung bestimmten P19-Zellen wurden in Medium kultiviert, das 2 μM CsA enthielt. Das Volumen des Mediums in einem Well einer 6-Well-Platte (rund 2 ml) war bedeutend größer als das Volumen der darin wachsenden Zellen (rund 20 μl). CsA diffundiert nahezu ungehindert durch die Zellmembran (Fabre *et al.*, 1986). Wenn ein etwaiger aktiver Transport des CsA aus der Zelle vernachlässigt wird (Tsuji *et al.*, 1993), liegt die Konzentration an intrazellulärem, freiem CsA bei mindestens 1 μM . Die Gesamtkonzentration an CsA ist jedoch höher. Die hochaffine Bindung des Inhibitors an intrazelluläre Cyclophiline verhindert die freie Diffusion, dadurch akkumulieren die Zellen CsA (Fabre *et al.*, 1986). Wird das folgende intrazelluläre Gleichgewicht angenommen:



[CsA]	> 1 μM	Konzentration an intrazellulärem, freiem CsA
[CypA] + [CypA/CsA]	< 25 μM	Gesamtkonzentration an intrazellulärem CypA (Ryffel <i>et al.</i> , 1991)
K_D	= 3 nM	Dissoziationskonstante (Fischer <i>et al.</i> , 1989)

ergibt sich aus dem Massenwirkungsgesetz, dass in den P19-Zell-Differenzierungsansätzen mindestens 99,7 % des intrazellulären CypA den Inhibitor CsA gebunden haben. Die *CypA-knockdown*-Zellen der Arbeitsgruppe Chiu wiesen eine residuale CypA-Konzentration von 20 % auf (Song *et al.*, 2004). Eine unvollständige Inhibition des intrazellulären CypA durch CsA ist also wahrscheinlich nicht die Ursache dafür, dass die P19-Zellen bei Inkubation in Gegenwart von RA unverändert in Neuron-artige Zellen differenzieren.

CsA bindet nicht nur CypA, sondern auch zahlreiche weitere Cyclophiline (Davis *et al.*, 2010). Außerdem inhibiert der CypA/CsA-Komplex die Phosphatase Calcineurin (Liu *et al.*, 1991). Eine dieser Eigenschaften bewirkt sicherlich die Zytotoxizität von CsA (**Abbildung 16**), und unter Umständen ermöglicht eine dieser Eigenschaften die RA-induzierte Differenzierung auch dann, wenn kein aktives CypA in den P19-Zellen vorhanden ist.

Obwohl CypA in allen Geweben hoch exprimiert wird (Ryffel *et al.*, 1991), ist es in Mäusen kein essentielles Protein. CypA-defiziente Mäuse verfügen über ein normal entwickeltes Nervensystem (Colgan *et al.*, 2004). Eine wichtige physiologische Funktion während der neuronalen Differenzierung hat CypA deshalb vermutlich nicht. Mit

Zellkultur-Experimenten wurde aber gezeigt, dass eine reduzierte CypA-Expression die RA-induzierte neuronale Differenzierung verhindert (Song *et al.*, 2004). Durch die Inhibition von CypA mit CsA lässt sich die RA-induzierte neuronale Differenzierung nicht verhindern. Erklärungen dafür können eine sekundäre Bindestelle am CypA, eine unvollständige Inhibition des CypA oder durch die Verwendung des Inhibitors CsA hervorgerufene Nebenwirkungen sein.

4.2.2 CypA ist kein Chemoattraktor für Leukozyten

Das Chemokin SDF-1 α regte Jurkat-Zellen zur Chemotaxis an (**Abbildung 18**), und das formylierte Tripeptid FMLP regte mehrere Arten von Leukozyten zur Chemotaxis an (**Abbildungen 20, 22 und 23**). Die dabei ermittelten CI-Werte decken sich mit bereits publizierten Werten oder sind höher (Xu *et al.*, 1992, Hesselgesser *et al.*, 1998, Fischer *et al.*, 2004). Deshalb ist davon auszugehen, dass die Chemotaxis-Experimente technisch einwandfrei durchgeführt wurden. Das untersuchte CypA war im Coomassie-Gel bandenrein, und es verfügte auch unter den im Chemotaxis-Assay herrschenden Pufferbedingungen über die erwartete PPIase-Aktivität (**Abbildung 19**, Liu *et al.*, 1990). Eventuell kontaminierende Lipopolysaccharide (kurz LPS) waren in einem gesonderten Reinigungsschritt entfernt worden. Die untersuchten Leukozyten wurden entweder direkt von der Stammsammlung ATCC (Manassas) bezogen oder kurz vor dem Chemotaxis-Assay aus biologischem Material präpariert.

Trotzdem regte CypA weder differenzierte HL-60-Zellen, noch THP-1-Zellen, noch humane Neutrophile, noch PMNL aus dem Peritoneum der Maus zur Chemotaxis an. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente deuten darauf hin, dass CypA kein Chemoattraktor für Leukozyten ist, obwohl genau das mehrfach vorgeschlagen wurde (**Tabelle 4**). Im Folgenden wird versucht, Ursachen für die publizierten, wahrscheinlich falsch-positiven Ergebnisse zu finden.

CypA wurde erstmals im Jahr 1992 als Chemoattraktor beschrieben (Sherry *et al.*, 1992). In der Arbeitsgruppe Cerami wurden aus Mäusen präparierte Makrophagen in Gegenwart von LPS kultiviert und dadurch zur Sekretion eines Proteins mit dem Molekulargewicht 18 kDa angeregt. Dieses Protein wurde mittels Ionenaustauschchromatografie angereichert und als CypA identifiziert. Die so gewonnene Proteinlösung regte humane Neutrophile zur Chemotaxis an. Zwei Punkte seien hier kritisch angemerkt. Zum einen verfügte die Proteinlösung nur über knapp 3 % der für

CypA zu erwartenden PPlase-Aktivität (Liu *et al.*, 1990, Sherry *et al.*, 1992). Dies lässt Zweifel an der Identität oder dem nativen Faltungszustand des angereicherten Proteins aufkommen. Zum anderen war die Proteinlösung aus Medium gewonnen worden, das eine hohe Konzentration an LPS enthielt. Die gewählte Reinigungsstrategie war nicht geeignet, die LPS aus der Lösung zu entfernen (Anspach und Hilbeck, 1995, Sherry *et al.*, 1992). LPS als Membranbestandteile gramnegativer Bakterien stellen potente Chemoattraktoren dar (Hofstad und Sveen, 1979). Deshalb induziert eine Kontamination der Chemoattraktor-Lösung mit LPS im Chemotaxis-Assay falsch-positive Ergebnisse.

Ebenfalls im Jahr 1992 wurde von der Arbeitsgruppe Lyttle gezeigt, dass CypA in Neutrophile differenzierte HL-60-Zellen zur Chemotaxis anregt (Xu *et al.*, 1992). Auffällig waren hier die angegebenen CypA-Konzentrationen. Bei einer CypA-Konzentration von $1 \cdot 10^{-12}$ M wurde ein CI von $4,0 \pm 0,4$ bestimmt. Dieser Befund ist unwahrscheinlich, da selbst Chemokine wie zum Beispiel RANTES oder MIP-1 α bei Konzentrationen $\leq 1 \cdot 10^{-11}$ M im Boyden-Kammer-Assay keine Chemotaxis mehr auslösen (Proudfoot *et al.*, 2001). Die Arbeitsgruppe Lyttle hat auch postuliert, dass es sich bei FKBP12, der anderen prototypischen PPlase, um einen Chemoattraktor handelt (Leiva und Lyttle, 1992).

Den umfassendsten Beitrag zum Verständnis der CypA-induzierten Chemotaxis haben die Arbeitsgruppen Bukrinsky und Constant geleistet. Von diesen Arbeitsgruppen wurde vorgeschlagen, dass CypA für folgende Zellarten als Chemoattraktor dient: CHO-Zellen, die den putativen CypA-Rezeptor Cd147 rekombinant exprimieren (Yurchenko *et al.*, 2002), PMNL aus dem Peritoneum der Maus (Arora *et al.*, 2005) und Milzzellen, die mit Concanavalin A behandelt worden waren, so dass sie in CD4⁺-T-Zellen differenzierten (Damsker *et al.*, 2007). Laut den Methodenteilen der Publikationen wurde ausschließlich das von Calbiochem (Darmstadt) vertriebene CypA verwendet. Die Arbeitsgruppe Tanner hat mehrere kommerziell erhältliche CypA-Präparationen in Bezug auf Reinheit und PPlase-Aktivität miteinander verglichen (Payeli *et al.*, 2008). Das CypA von Calbiochem war stark mit nicht proteinogenen Substanzen kontaminiert und verfügte über keine messbare PPlase-Aktivität (Payeli *et al.*, 2008). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die aufgezählten Zellarten nicht durch in der nativen Konformation vorliegendes CypA zur Chemotaxis angeregt worden sind. Die trotzdem

beobachtete Chemotaxis wurde dann vermutlich durch die kontaminierenden Substanzen hervorgerufen.

CypA ist nicht das einzige Protein, dessen Rolle als Cytokin umstritten ist (Galat und Bua, 2010). Das Protein *macrophage migration inhibitory factor* (kurz MIF, Swiss-Prot-Eintrag P14174) wurde als Cytokin beschrieben, das Leukozyten zur Sekretion von zum Beispiel TNF- α , IL-1 β und IL-6 anregt (Calandra *et al.*, 1995). Unter Verwendung von nachweislich LPS-freiem MIF konnten diese Ergebnisse nicht reproduziert werden (Kudrin *et al.*, 2006). Stattdessen wurde vorgeschlagen, dass MIF nicht als Cytokin, sondern als extrazelluläres Enzym fungiert (Kudrin und Ray, 2008). MIF verfügt über Thiolprotein-Oxidoreduktase-Aktivität (Kleemann *et al.*, 1998). In Analogie dazu handelt es sich bei CypA möglicherweise auch nicht um ein Cytokin im klassischen Sinne, sondern um ein extrazellulär vorkommendes Protein, das zum Beispiel durch seine PPlase-Aktivität die Wirkung eines Cytokins oder mehrerer Cytokine moduliert (Galat und Bua, 2010).

4.3 Zusammenfassung

Die Modulation der EGFR-Kinaseaktivität durch FKBP12

FKBP12 inhibiert die Kinaseaktivität des EGFR. Der Einfluss von FKBP12 ist spezifisch und wird durch FK506 unterdrückt. Möglicherweise wird die Inhibition der EGFR-Kinaseaktivität durch die Katalyse einer *native state*-Isomerisierung des EGFR vermittelt. FKBP12 und EGFR können intrazellulär Kontakt haben. Die EGF-induzierte EGFR-Kinaseaktivität ist von der intrazellulären FKBP12-Konzentration abhängig. Außerdem beeinflusst FKBP12 vom EGFR gesteuerte zellphysiologische Prozesse wie das Durchlaufen des Zellzyklus und die Zellmotilität.

Inhibitoren der zellphysiologischen CypA-Funktion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte kein Zellkultur-basierter Assay zur Untersuchung von CypA-Inhibitoren etabliert werden. Das Bemühen darum scheiterte am Ausfindig-Machen einer zellulären Funktion von CypA, deren Inhibition einen nachweisbaren Effekt hervorruft. Die Inhibition von CypA durch CsA hat keinen Einfluss auf die RA-induzierte P19-Zell-Differenzierung. CypA ist kein Chemoattraktor für Leukozyten.

5 Literaturverzeichnis

- Aghdasi B, Ye K, Resnick A, Huang A, Ha HC, Guo X, Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH (2001). FKBP12, the 12-kDa FK506-binding protein, is a physiologic regulator of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(5):2425-30.
- Ahearn IM, Tsai FD, Court H, Zhou M, Jennings BC, Ahmed M, Fehrenbacher N, Linder ME, Philips MR (2011). FKBP12 binds to acylated h-ras and promotes depalmitoylation. *Mol Cell* 41(2):173-85.
- Ahern GP, Junankar PR, Dulhunty AF (1997). Subconductance states in single-channel activity of skeletal muscle ryanodine receptors after removal of FKBP12. *Biophys J* 72(1):146-62.
- Albers MW, Williams RT, Brown EJ, Tanaka A, Hall FL, Schreiber SL (1993). FKBP-rapamycin inhibits a cyclin-dependent kinase activity and a cyclin D1-Cdk association in early G1 of an osteosarcoma cell line. *J Biol Chem* 268(30):22825-9.
- Andersen H, Jensen ON, Eriksen EF (2003). A proteome study of secreted prostatic factors affecting osteoblastic activity: identification and characterisation of cyclophilin A. *Eur J Cancer* 39(7):989-95.
- Ansari H, Greco G, Luban J (2002). Cyclophilin A peptidyl-prolyl isomerase activity promotes ZPR1 nuclear export. *Mol Cell Biol* 22(20):6993-7003.
- Anspach FB, Hilbeck O (1995). Removal of endotoxins by affinity sorbents. *J Chromatogr A* 711(1):81-92.
- Aracena P, Tang W, Hamilton SL, Hidalgo C (2005). Effects of S-glutathionylation and S-nitrosylation on calmodulin binding to triads and FKBP12 binding to type 1 calcium release channels. *Antioxid Redox Signal* 7(7-8):870-81.
- Arévalo-Rodríguez M, Pan X, Boeke JD, Heitman J (2004). FKBP12 controls aspartate pathway flux in *Saccharomyces cerevisiae* to prevent toxic intermediate accumulation. *Eukaryot Cell* 3(5):1287-96.
- Arora K, Gwinn WM, Bower MA, Watson A, Okwumabua I, MacDonald HR, Bukrinsky MI, Constant SL (2005). Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses. *J Immunol* 175(1):517-22.
- Aumüller T, Fischer G (2008). Bioactivity of folding intermediates studied by the recovery of enzymatic activity during refolding. *J Mol Biol* 376(5):1478-92.
- Bang H, Müller W, Hans M, Brune K, Swandulla D (1995). Activation of Ca²⁺ signaling in neutrophils by the mast cell-released immunophilin FKBP12. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(8):3435-8.
- Barrandon Y, Green H (1987). Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor. *Cell* 50(7):1131-7.
- Bassing CH, Shou W, Muir S, Heitman J, Matzuk MM, Wang XF (1998). FKBP12 is not required for the modulation of transforming growth factor beta receptor I signaling activity in embryonic fibroblasts and thymocytes. *Cell Growth Differ* 9(3):223-8.
- Baum N, Schiene-Fischer C, Frost M, Schumann M, Sabapathy K, Ohlenschläger O, Grosse F, Schlott B (2009). The prolyl cis/trans isomerase cyclophilin 18 interacts with the tumor suppressor p53 and modifies its functions in cell cycle regulation and apoptosis. *Oncogene* 28(44):3915-25.
- Bellinger AM, Reiken S, Carlson C, Mongillo M, Liu X, Rothman L, Matecki S, Lacampagne A, Marks AR (2009). Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat Med* 15(3):325-30.

- Betzenhauser MJ, Marks AR (2010). Ryanodine receptor channelopathies. *Pflugers Arch* 460(2):467-80.
- Billich A, Winkler G, Aschauer H, Rot A, Peichl P (1997). Presence of cyclophilin A in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 185(5):975-80.
- Borowski P, Kornetzky L, Laufs R (1998). Properties of the proteolytically generated catalytic domain (42 kDa kinase) of epidermal growth factor receptor: comparison with holoenzyme. *J Biochem* 123(3):380-5.
- Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes (1962). *J Exp Med* 115:453-66.
- Brazin KN, Mallis RJ, Fulton DB, Andreotti AH (2002). Regulation of the tyrosine kinase Itk by the peptidyl-prolyl isomerase cyclophilin A. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(4):1899-904.
- Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, Yokoyama S (2003). An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 12(3):541-52.
- Burkhard P, Taylor P, Walkinshaw MD (2000). X-ray structures of small ligand-FKBP complexes provide an estimate for hydrophobic interaction energies. *J Mol Biol* 295(4):953-62.
- Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A, Bucala R (1995). MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 377(6544):68-71.
- Cameron AM, Steiner JP, Sabatini DM, Kaplin AI, Walensky LD, Snyder SH (1995). Immunophilin FK506 binding protein associated with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates calcium flux. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(5):1784-8.
- Cameron AM, Nucifora FC Jr, Fung ET, Livingston DJ, Aldape RA, Ross CA, Snyder SH (1997). FKBP12 binds the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor at leucine-proline (1400-1401) and anchors calcineurin to this FK506-like domain. *J Biol Chem* 272(44):27582-8.
- Candé C, Vahsen N, Kouranti I, Schmitt E, Daugas E, Spahr C, Luban J, Kroemer RT, Giordanetto F, Garrido C, Penninger JM, Kroemer G (2004). AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene* 23(8):1514-21.
- Chen YG, Liu F, Massague J (1997). Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J* 16(13):3866-76.
- Cheng G, Lewis AE, Meinkoth JL (2003). Ras stimulates aberrant cell cycle progression and apoptosis in rat thyroid cells. *Mol Endocrinol* 17(3):450-9.
- Citri A, Yarden Y (2006). EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(7):505-16.
- Clark RA, Nauseef WM (2001). Isolation and functional analysis of neutrophils. *Curr Protoc Immunol* Chapter 7:Unit 7.23.
- Clayton AH, Walker F, Orchard SG, Henderson C, Fuchs D, Rothacker J, Nice EC, Burgess AW (2005). Ligand-induced dimer-tetramer transition during the activation of the cell surface epidermal growth factor receptor-A multidimensional microscopy analysis. *J Biol Chem* 280(34):30392-9.
- Clayton AH, Orchard SG, Nice EC, Posner RG, Burgess AW (2008). Predominance of activated EGFR higher-order oligomers on the cell surface. *Growth Factors* 26(6):316-24.
- Clipstone NA, Crabtree GR (1992). Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 357(6380):695-7.

- Cohen S (1964). Isolation and biological effects of an epidermal growth-stimulating protein. *Natl Cancer Inst Monogr* 13:13-37.
- Colgan J, Asmal M, Neagu M, Yu B, Schneidkraut J, Lee Y, Sokolskaja E, Andreotti A, Luban J (2004). Cyclophilin A regulates TCR signal strength in CD4+ T cells via a proline-directed conformational switch in Itk. *Immunity* 21(2):189-201.
- Collins JH (1991). Sequence analysis of the ryanodine receptor: possible association with a 12K, FK506-binding immunophilin/protein kinase C inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 178(3):1288-90.
- Collins SJ (1987). The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* 70(5):1233-44.
- Cornea RL, Nitu FR, Samsó M, Thomas DD, Fruen BR (2010). Mapping the ryanodine receptor FK506-binding protein subunit using fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 285(25):19219-26.
- Damsker JM, Bukrinsky MI, Constant SL (2007). Preferential chemotaxis of activated human CD4+ T cells by extracellular cyclophilin A. *J Leukoc Biol* 82(3):613-8.
- Das M, Miyakawa T, Fox CF, Pruss RM, Aharonov A, Herschman HR (1977). Specific radiolabeling of a cell surface receptor for epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(7):2790-4.
- Daum S, Schumann M, Mathea S, Aumüller T, Balsley MA, Constant SL, de Lacroix BF, Kruska F, Braun M, Schiene-Fischer C (2009). Isoform-specific inhibition of cyclophilins. *Biochemistry* 48(26):6268-77.
- Davis TL, Walker JR, Campagna-Slater V, Finerty PJ, Paramanathan R, Bernstein G, MacKenzie F, Tempel W, Ouyang H, Lee WH, Eisenmesser EZ, Dhe-Paganon S (2010). Structural and biochemical characterization of the human cyclophilin family of peptidyl-prolyl isomerases. *PLoS Biol* 8(7):e1000439.
- Derynck R, Zhang YE (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425(6958):577-84.
- Dioufa N, Schally AV, Chatzistamou I, Moustou E, Block NL, Owens GK, Papavassiliou AG, Kiaris H (2010). Acceleration of wound healing by growth hormone-releasing hormone and its agonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(43):18611-5.
- Dolinski KJ, Heitman J (1999). Hmo1p, a high mobility group 1/2 homolog, genetically and physically interacts with the yeast FKBP12 prolyl isomerase. *Genetics* 151(3):935-44.
- Fabre I, Fabre G, Lena N, Cano JP (1986). Kinetics of uptake and intracellular binding of Cyclosporine A in RAJ1 cells, in vitro. *Biochem Pharmacol* 35(23):4261-6.
- Fan YX, Wong L, Deb TB, Johnson GR (2004). Ligand regulates epidermal growth factor receptor kinase specificity: activation increases preference for GAB1 and SHC versus autophosphorylation sites. *J Biol Chem* 279(37):38143-50.
- Feng W, Barrientos GC, Cherednichenko G, Yang T, Padilla IT, Truong K, Allen PD, Lopez JR, Pessah IN (2010). Functional and Biochemical Properties of RyR1 Channels from Heterozygous R163C Malignant Hyperthermia Susceptible Mice. *Mol Pharmacol* Epub ahead of print.
- Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho HS, Leahy DJ, Lemmon MA (2003). EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* 11(2):507-17.
- Fischer AM, Mercer JC, Iyer A, Ragin MJ, August A (2004). Regulation of CXC chemokine receptor 4-mediated migration by the Tec family tyrosine kinase ITK. *J Biol Chem* 279(28):29816-20.
- Fischer G, Bang H, Berger E, Schellenberger A (1984). Conformational specificity of chymotrypsin toward proline-containing substrates. *Biochim Biophys Acta* 791(1):87-97.

- Fischer G, Bang H, Mech C (1984). Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomed Biochim Acta* 43(10):1101-11.
- Fischer G, Wittmann-Liebold B, Lang K, Kiefhaber T, Schmid FX (1989). Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* 337(6206):476-8.
- Forbes SA, Tang G, Bindal N, Bamford S, Dawson E, Cole C, Kok CY, Jia M, Ewing R, Menzies A, Teague JW, Stratton MR, Futreal PA (2010). COSMIC (the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer): a resource to investigate acquired mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res* 38 (Database issue):D652-7.
- French AR, Tadaki DK, Niyogi SK, Lauffenburger DA (1995). Intracellular trafficking of epidermal growth factor family ligands is directly influenced by the pH sensitivity of the receptor/ligand interaction. *J Biol Chem* 270(9):4334-40.
- Furdui CM, Lew ED, Schlessinger J, Anderson KS (2006). Autophosphorylation of FGFR1 kinase is mediated by a sequential and precisely ordered reaction. *Mol Cell* 21(5):711-7.
- Gaburjakova M, Gaburjakova J, Reiken S, Huang F, Marx SO, Roseblit N, Marks AR (2001). FKBP12 binding modulates ryanodine receptor channel gating. *J Biol Chem* 276(20):16931-5.
- Galat A (2004). A note on clustering the functionally-related paralogues and orthologues of proteins: a case of the FK506-binding proteins (FKBPs). *Comput Biol Chem* 28(2):129-40.
- Galat A, Bua J (2010). Molecular aspects of cyclophilins mediating therapeutic actions of their ligands. *Cell Mol Life Sci* 67(20):3467-88.
- Garcia de Palazzo IE, Adams GP, Sundareshan P, Wong AJ, Testa JR, Bigner DD, Weiner LM (1993). Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 53(14):3217-20.
- Gregoriou M, Jones PF, Timms JF, Yang JJ, Radford SE, Rees AR (1995). Physicochemical characterization of the cytoplasmic domain of the epidermal growth factor receptor and evidence for conformational changes associated with its activation by ammonium sulphate. *Biochem J* 306 (Pt 3):667-78.
- Gridelli C, Maione P, Rossi A (2008). The potential role of mTOR inhibitors in non-small cell lung cancer. *Oncologist* 13(2):139-47.
- Guo L, Kozlosky CJ, Ericsson LH, Daniel TO, Cerretti DP, Johnson RS (2003). Studies of ligand-induced site-specific phosphorylation of epidermal growth factor receptor. *J Am Soc Mass Spectrom* 14(9):1022-31.
- Gwinn WM, Damsker JM, Falahati R, Okwumabua I, Kelly-Welch A, Keegan AD, Vanpouille C, Lee JJ, Dent LA, Leitenberg D, Bukrinsky MI, Constant SL (2006). Novel approach to inhibit asthma-mediated lung inflammation using anti-CD147 intervention. *J Immunol* 177(7):4870-9.
- Haigler H, Ash JF, Singer SJ, Cohen S (1978). Visualization by fluorescence of the binding and internalization of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *Proc Natl Acad Sci USA* 75(7):3317-21.
- Hanada N, Lo HW, Day CP, Pan Y, Nakajima Y, Hung MC (2006). Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor. *Mol Carcinog* 45(1):10-7.
- Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW (1984). Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226(4674):544-7.
- Harding MW, Galat A, Uehling DE, Schreiber SL (1989). A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* 341(6244):758-60.

- Hesselgesser J, Liang M, Hoxie J, Greenberg M, Brass LF, Orsini MJ, Taub D, Horuk R (1998). Identification and characterization of the CXCR4 chemokine receptor in human T cell lines: ligand binding, biological activity, and HIV-1 infectivity. *J Immunol* 160(2):877-83.
- Ho S, Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, Graef I, Fiorentino D, Nourse J, Crabtree GR (1996). The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol* 80(3 Pt 2):S40-5.
- Hofstad T, Sveen K. The chemotactic effect of *Bacteroides fragilis* lipopolysaccharide (1979). *Rev Infect Dis* 1(2):342-6.
- Honegger AM, Kris RM, Ullrich A, Schlessinger J (1989). Evidence that autophosphorylation of solubilized receptors for epidermal growth factor is mediated by intermolecular cross-phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(3):925-9.
- Howe LR, Leever SJ, Gómez N, Nakielny S, Cohen P, Marshall CJ (1992). Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* 71(2):335-42.
- Hsu CY, Mohammadi M, Nathan M, Honegger A, Ullrich A, Schlessinger J, Hurwitz DR (1990). Generation of recombinant cytoplasmic domain of epidermal growth factor receptor with intrinsic protein tyrosine kinase activity. *Cell Growth Differ* 1(4):191-200.
- Huang F, Goh LK, Sorkin A (2007). EGF receptor ubiquitination is not necessary for its internalization. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(43):16904-9.
- Huse M, Chen YG, Massagué J, Kuriyan J (1999). Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12. *Cell* 96(3):425-36.
- Jayaraman T, Brillantes AM, Timmerman AP, Fleischer S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Marks AR (1992). FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem* 267(14):9474-7.
- Jiang X, Huang F, Marusyk A, Sorkin A (2003). Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits. *Mol Biol Cell* 14(3):858-70.
- Jin ZG, Melaragno MG, Liao DF, Yan C, Haendeler J, Suh YA, Lambeth JD, Berk BC (2000). Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. *Circ Res* 87(9):789-96.
- Johannessen LE, Ringerike T, Molnes J, Madhus IH (2000). Epidermal growth factor receptor efficiently activates mitogen-activated protein kinase in HeLa cells and Hep2 cells conditionally defective in clathrin-dependent endocytosis. *Exp Cell Res* 260(1):136-45.
- Jones-Villeneuve EM, McBurney MW, Rogers KA, Kalnins VI (1982). Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J Cell Biol* 94(2):253-62.
- Jordan M, Wurm F (2004). Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. *Methods* 33(2):136-43.
- Jura N, Endres NF, Engel K, Deindl S, Das R, Lamers MH, Wemmer DE, Zhang X, Kuriyan J (2009). Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell* 137(7):1293-307.
- Justo P, Lorz C, Sanz A, Egido J, Ortiz A (2003). Intracellular mechanisms of cyclosporin A-induced tubular cell apoptosis. *J Am Soc Nephrol* 14(12):3072-80.
- Kim TE, Murren JR (2002). Erlotinib OSI/Roche/Genentech. *Curr Opin Investig Drugs* 3(9):1385-95.
- Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H (1987). FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot (Tokyo)* 40(9):1249-55.

- Kleemann R, Kapurniotu A, Frank RW, Gessner A, Mischke R, Flieger O, Jüttner S, Brunner H, Bernhagen J (1998). Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase. *J Mol Biol* 280(1):85-102.
- Kruszynski M, Stowell N, Das A, Seideman J, Tsui P, Brigham-Burke M, Nemeth JF, Sweet R, Heavner GA (2006). Synthesis and biological characterization of human monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and its analogs. *J Pept Sci* 12(1):25-32.
- Kudrin A, Ray D (2008). Cunning factor: macrophage migration inhibitory factor as a redox-regulated target. *Immunol Cell Biol* 86(3):232-8.
- Kudrin A, Scott M, Martin S, Chung CW, Donn R, McMaster A, Ellison S, Ray D, Ray K, Binks M (2006). Human macrophage migration inhibitory factor: a proven immunomodulatory cytokine? *J Biol Chem* 281(40):29641-51.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-5.
- Lang K, Schmid FX, Fischer G (1987). Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature* 329(6136):268-70.
- Lauffenburger DA, Horwitz AF (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84(3):359-69.
- Le Roy C, Wrana JL (2005). Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(2):112-26.
- Leiva MC, Lyttle CR (1992). Leukocyte chemotactic activity of FKBP and inhibition by FK506. *Biochem Biophys Res Commun* 186(2):1178-83.
- Lemmon MA, Schlessinger J (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141(7):1117-34.
- Liebermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, Soreq H, Whittle N, Waterfield MD, Ullrich A, Schlessinger J (1985). Amplification and overexpression of the EGF receptor gene in primary human glioblastomas. *J Cell Sci Suppl* 3:161-72.
- Ling YH, Li T, Yuan Z, Haigentz M Jr, Weber TK, Perez-Soler R (2007). Erlotinib, an effective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, induces p27KIP1 up-regulation and nuclear translocation in association with cell growth inhibition and G1/S phase arrest in human non-small-cell lung cancer cell lines. *Mol Pharmacol* 72(2):248-58.
- Liu J, Albers MW, Chen CM, Schreiber SL, Walsh CT (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 USA* 87(6):2304-8.
- Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66(4):807-15.
- Lopez-Illasaca M, Schiene C, Küllertz G, Tradler T, Fischer G, Wetzker R (1998). Effects of FK506-binding protein 12 and FK506 on autophosphorylation of epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 273(16):9430-4.
- Lu KP, Hanes SD, Hunter T (1996). A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* 380(6574):544-7.
- Lu KP, Finn G, Lee TH, Nicholson LK (2007). Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer. *Nat Chem Biol* 3(10):619-29.

- Luban J, Bossolt KL, Franke EK, Kalpana GV, Goff SP (1993). Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* 73(6):1067-78.
- Maki N, Sekiguchi F, Nishimaki J, Miwa K, Hayano T, Takahashi N, Suzuki M (1990). Complementary DNA encoding the human T-cell FK506-binding protein, a peptidylprolyl cis-trans isomerase distinct from cyclophilin. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(14):5440-3.
- Malesević M, Kühling J, Erdmann F, Balsley MA, Bukrinsky MI, Constant SL, Fischer G (2010). A cyclosporin derivative discriminates between extracellular and intracellular cyclophilins. *Angew Chem Int Ed Engl* 49(1):213-5.
- Manteca A, Sanchez J (2004). Recombinant cyclophilins lack nuclease activity. *J Bacteriol* 186(18):6325-6.
- Masui H, Castro L, Mendelsohn J (1993). Consumption of EGF by A431 cells: evidence for receptor recycling. *J Cell Biol* 120(1):85-93.
- Mayrleitner M, Timerman AP, Wiederrecht G, Fleischer S (1994). The calcium release channel of sarcoplasmic reticulum is modulated by FK-506 binding protein: effect of FKBP-12 on single channel activity of the skeletal muscle ryanodine receptor. *Cell Calcium* 15(2):99-108.
- McBurney MW, Rogers BJ (1982). Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Dev Biol* 89(2):503-8.
- McBurney MW (1993). P19 embryonal carcinoma cells. *Int J Dev Biol* 37(1):135-40.
- McLachlin DT, Chait BT (2001). Analysis of phosphorylated proteins and peptides by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol* 5(5):591-602.
- Mebratu Y, Tesfaigzi Y (2009). How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* 8(8):1168-75.
- Meng X, Xiao B, Cai S, Huang X, Li F, Bolstad J, Trujillo R, Airey J, Chen SR, Wagenknecht T, Liu Z (2007). Three-dimensional localization of serine 2808, a phosphorylation site in cardiac ryanodine receptor. *J Biol Chem* 282(35):25929-39.
- Meuvis J, Gerard M, Desender L, Baekelandt V, Engelborghs Y (2010). The conformation and the aggregation kinetics of alpha-synuclein depend on the proline residues in its C-terminal region. *Biochemistry* 49(43):9345-52.
- Miaczynska M, Pelkmans L, Zerial M (2004). Not just a sink: endosomes in control of signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 16(4):400-6.
- Mikol V, Kallen J, Pflügl G, Walkinshaw MD (1993). X-ray structure of a monomeric cyclophilin A-cyclosporin A crystal complex at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol* 234(4):1119-30.
- Miller K, Beardmore J, Kanety H, Schlessinger J, Hopkins CR (1986). Localization of the epidermal growth factor (EGF) receptor within the endosome of EGF-stimulated epidermoid carcinoma (A431) cells. *J Cell Biol* 102(2):500-9.
- Mineo C, Gill GN, Anderson RG (1999). Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae. *J Biol Chem* 274(43):30636-43.
- Morandell S, Stasyk T, Skvortsov S, Ascher S, Huber LA (2008). Quantitative proteomics and phosphoproteomics reveal novel insights into complexity and dynamics of the EGFR signaling network. *Proteomics* 8(21):4383-401.
- Moriki T, Maruyama H, Maruyama IN (2001). Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *J Mol Biol* 311(5):1011-26.

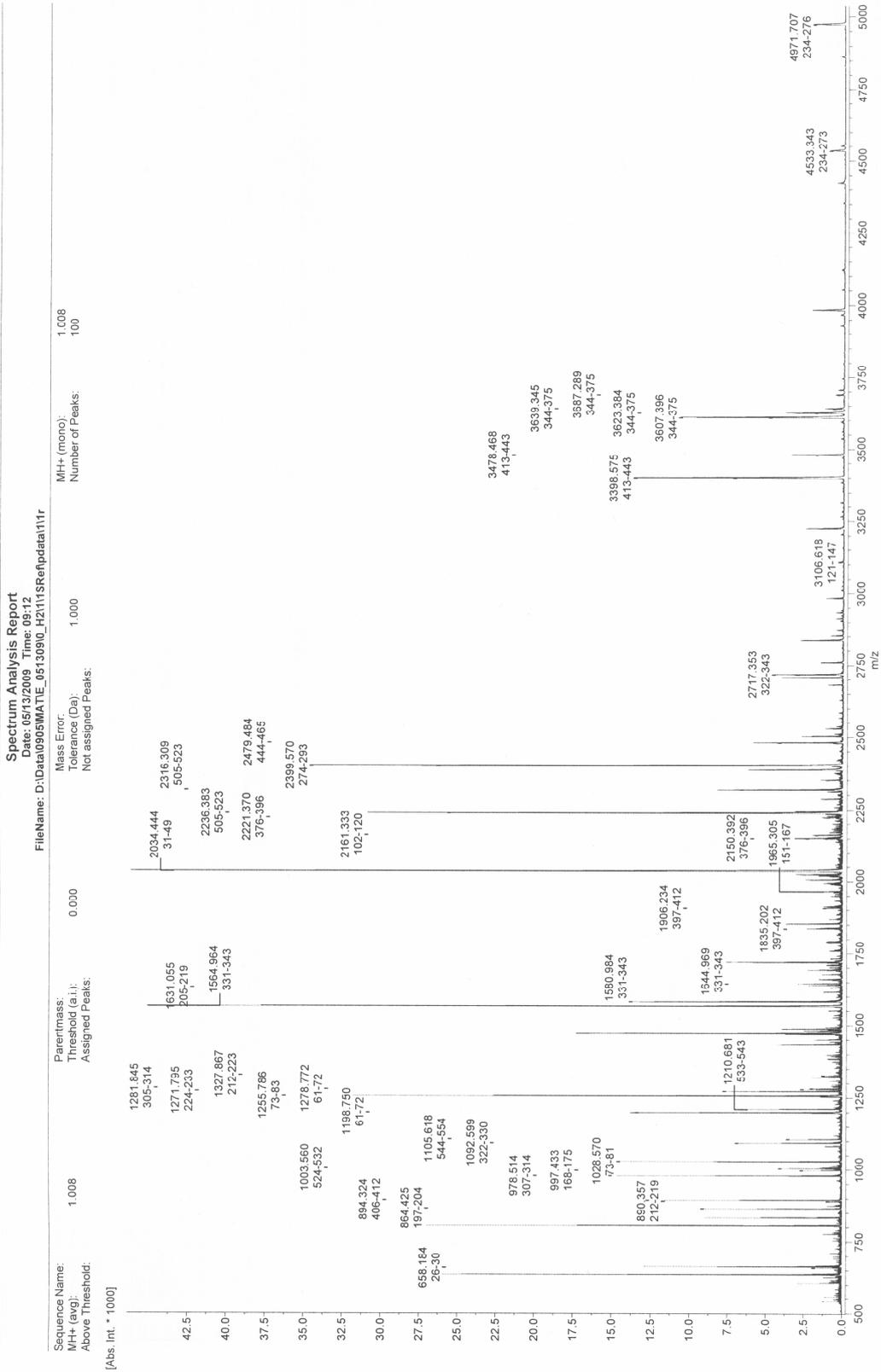
- Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2):55-63.
- Nahreini P, Hovland AR, Kumar B, Andreatta C, Edwards-Prasad J, Prasad KN (2001). Effects of altered cyclophilin A expression on growth and differentiation of human and mouse neuronal cells. *Cell Mol Neurobiol* 21(1):65-79.
- Ochiai T, Nakajima K, Nagata M, Suzuki T, Asano T, Uematsu T, Goto T, Hori S, Kenmochi T, Nakagoori T, *et al* (1987). Effect of a new immunosuppressive agent, FK 506, on heterotopic cardiac allotransplantation in the rat. *Transplant Proc* 19(1 Pt 2):1284-6.
- Ochiai T, Nagata M, Nakajima K, Sakamoto K, Asano T, Isono K (1987). Prolongation of canine renal allograft survival by treatment with FK-506. *Transplant Proc* 19(5 Suppl 6):53-6.
- Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H (2005). A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol* 1:2005.0010.
- Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, Yokoyama S (2002). Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 110(6):775-87.
- Pawson T (2007). Dynamic control of signaling by modular adaptor proteins. *Curr Opin Cell Biol* 19(2):112-6.
- Payeli SK, Schiene-Fischer C, Steffel J, Camici GG, Rozenberg I, Lüscher TF, Tanner FC (2008). Cyclophilin A differentially activates monocytes and endothelial cells: role of purity, activity, and endotoxin contamination in commercial preparations. *Atherosclerosis* 197(2):564-71.
- Pollard TD, Cooper JA (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326(5957):1208-12.
- Proudfoot AE, Power CA, Church DJ, Soler D, Mack M (2001). Cellular Assays of Chemokine Receptor Activation. *Curr Protoc Pharmacol* 14(12.4).
- Qiu C, Tarrant MK, Boronina T, Longo PA, Kavran JM, Cole RN, Cole PA, Leahy DJ (2009). In vitro enzymatic characterization of near full length EGFR in activated and inhibited states. *Biochemistry* 48(28):6624-32.
- Red Brewer M, Choi SH, Alvarado D, Moravcevic K, Pozzi A, Lemmon MA, Carpenter G (2009). The juxtamembrane region of the EGF receptor functions as an activation domain. *Mol Cell* 34(6):641-51.
- Reiken S, Lacampagne A, Zhou H, Kherani A, Lehnart SE, Ward C, Huang F, Gaburjakova M, Gaburjakova J, Rosembli N, Warren MS, He KL, Yi GH, Wang J, Burkhoff D, Vassort G, Marks AR (2003). PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure. *J Cell Biol* 160(6):919-28.
- Rosenbaum JT, Wong K, Perez HD, Raymond W, Howes EL Jr (1984). Characterization of endotoxin-induced C5-derived chemotactic activity in aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25(10):1184-91.
- Rosenwirth B, Billich A, Datema R, Donatsch P, Hammerschmid F, Harrison R, Hiestand P, Jaksche H, Mayer P, Peichl P, *et al* (1994). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive cyclosporine analog. *Antimicrob Agents Chemother* 38(8):1763-72.
- Ryffel B, Woerly G, Greiner B, Haendler B, Mihatsch MJ, Foxwell BM (1991). Distribution of the cyclosporine binding protein cyclophilin in human tissues. *Immunology* 72(3):399-404.
- Samsó M, Shen X, Allen PD (2006). Structural characterization of the RyR1-FKBP12 interaction. *J Mol Biol* 356(4):917-27.

- Samsó M, Feng W, Pessah IN, Allen PD (2009). Coordinated movement of cytoplasmic and transmembrane domains of RyR1 upon gating. *PLoS Biol* 7(4):e85.
- Santiskulvong C, Sinnott-Smith J, Rozengurt E (2001). EGF receptor function is required in late G(1) for cell cycle progression induced by bombesin and bradykinin. *Am J Physiol Cell Physiol* 281(3):C886-98.
- Sarkar P, Reichman C, Saleh T, Birge RB, Kalodimos CG (2007). Proline cis-trans isomerization controls autoinhibition of a signaling protein. *Mol Cell* 25(3):413-26.
- Satoh K, Nigro P, Matoba T, O'Dell MR, Cui Z, Shi X, Mohan A, Yan C, Abe J, Illig KA, Berk BC (2009). Cyclophilin A enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin II-induced aortic aneurysms. *Nat Med* 15(6):649-56.
- Sawada S, Suzuki G, Kawase Y, Takaku F (1987). Novel immunosuppressive agent, FK506. In vitro effects on the cloned T cell activation. *J Immunol* 139(6):1797-803.
- Sherry B, Yarlett N, Strupp A, Cerami A (1992). Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(8):3511-5.
- Shou W, Aghdasi B, Armstrong DL, Guo Q, Bao S, Charng MJ, Mathews LM, Schneider MD, Hamilton SL, Matzuk MM (1998). Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. *Nature* 391(6666):489-92.
- Sinkins WG, Goel M, Estacion M, Schilling WP (2004). Association of immunophilins with mammalian TRPC channels. *J Biol Chem* 279(33):34521-9.
- Siekierka JJ, Staruch MJ, Hung SH, Sigal NH (1989). FK-506, a potent novel immunosuppressive agent, binds to a cytosolic protein which is distinct from the cyclosporin A-binding protein, cyclophilin. *J Immunol* 143(5):1580-3.
- Siekierka JJ, Hung SH, Poe M, Lin CS, Sigal NH (1989). A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature* 341(6244):755-7.
- Song J, Lu YC, Yokoyama K, Rossi J, Chiu R (2004). Cyclophilin A is required for retinoic acid-induced neuronal differentiation in p19 cells. *J Biol Chem* 279(23):24414-9.
- Standaert RF, Galat A, Verdine GL, Schreiber SL (1990). Molecular cloning and overexpression of the human FK506-binding protein FKBP. *Nature* 346(6285):671-4.
- Stehle JR Jr, Willingham MC, Lin K, Cui Z (2006). A nonterminal method for frequent collection of mouse circulating proteins by peritoneal lavage. *Anal Biochem* 349(1):162-4.
- Steiner JP, Dawson TM, Fotuhi M, Glatt CE, Snowman AM, Cohen N, Snyder SH (1992). High brain densities of the immunophilin FKBP colocalized with calcineurin. *Nature* 358(6387):584-7.
- Stockwell BR, Schreiber SL (1998). TGF-beta-signaling with small molecule FKBP12 antagonists that bind myristoylated FKBP12-TGF-beta type I receptor fusion proteins. *Chem Biol* 5(7):385-95.
- Strebel K, Luban J, Jeang KT (2009). Human cellular restriction factors that target HIV-1 replication. *BMC Med* 7:48.
- Suzuki J, Jin ZG, Meoli DF, Matoba T, Berk BC (2006). Cyclophilin A is secreted by a vesicular pathway in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 98(6):811-7.
- Tang W, Ingalls CP, Durham WJ, Snider J, Reid MB, Wu G, Matzuk MM, Hamilton SL (2004). Altered excitation-contraction coupling with skeletal muscle specific FKBP12 deficiency. *FASEB J* 18(13):1597-9.

- Timerman AP, Ogunbumni E, Freund E, Wiederrecht G, Marks AR, Fleischer S (1993). The calcium release channel of sarcoplasmic reticulum is modulated by FK-506-binding protein. Dissociation and reconstitution of FKBP-12 to the calcium release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 268(31):22992-9.
- Timerman AP, Jayaraman T, Wiederrecht G, Onoue H, Marks AR, Fleischer S (1994). The ryanodine receptor from canine heart sarcoplasmic reticulum is associated with a novel FK-506 binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 198(2):701-6.
- Timerman AP, Wiederrecht G, Marcy A, Fleischer S (1995). Characterization of an exchange reaction between soluble FKBP-12 and the FKBP.ryanodine receptor complex. Modulation by FKBP mutants deficient in peptidyl-prolyl isomerase activity. *J Biol Chem* 270(6):2451-9.
- Tsuji A, Tamai I, Sakata A, Tenda Y, Terasaki T (1993). Restricted transport of cyclosporin A across the blood-brain barrier by a multidrug transporter, P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol* 46(6):1096-9.
- Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J, *et al* (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309(5967):418-25.
- Verdecia MA, Bowman ME, Lu KP, Hunter T, Noel JP (2000). Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains. *Nat Struct Biol* 7(8):639-43.
- Wagenknecht T, Radermacher M, Grassucci R, Berkowitz J, Xin HB, Fleischer S (1997). Locations of calmodulin and FK506-binding protein on the three-dimensional architecture of the skeletal muscle ryanodine receptor. *J Biol Chem* 272(51):32463-71.
- Wang T, Donahoe PK, Zervos AS (1994). Specific interaction of type I receptors of the TGF-beta family with the immunophilin FKBP-12. *Science* 265(5172):674-6.
- Wang T, Li BY, Danielson PD, Shah PC, Rockwell S, Lechleider RJ, Martin J, Manganaro T, Donahoe PK (1996). The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF beta family type I receptors. *Cell* 86(3):435-44.
- Wang T, Donahoe PK (2004). The immunophilin FKBP12: a molecular guardian of the TGF-beta family type I receptors. *Front Biosci* 9:619-31.
- Xiao B, Sutherland C, Walsh MP, Chen SR (2004). Protein kinase A phosphorylation at serine-2808 of the cardiac Ca²⁺-release channel (ryanodine receptor) does not dissociate 12.6-kDa FK506-binding protein (FKBP12.6). *Circ Res* 94(4):487-95.
- Xie Z, Peng J, Pennypacker SD, Chen Y (2010). Critical role for the catalytic activity of phospholipase C-gamma1 in epidermal growth factor-induced cell migration. *Biochem Biophys Res Commun* 399(3):425-8.
- Xu Q, Leiva MC, Fischkoff SA, Handschumacher RE, Lyttle CR (1992). Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. *J Biol Chem* 267(17):11968-71.
- Yamazaki T, Zaal K, Hailey D, Presley J, Lippincott-Schwartz J, Samelson LE (2002). Role of Grb2 in EGF-stimulated EGFR internalization. *J Cell Sci* 115(Pt 9):1791-802.
- Yang F, Chen X, Su J (2008). The role of CD147 in the proliferation, activation and chemotaxis of Jurkat cells induced by cyclophilin A. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 29(12):793-6.
- Yang F, Robotham JM, Nelson HB, Irsigler A, Kenworthy R, Tang H (2008). Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance in vitro. *J Virol* 82(11):5269-78.

- Yang Y, Lu N, Zhou J, Chen ZN, Zhu P (2008). Cyclophilin A up-regulates MMP-9 expression and adhesion of monocytes/macrophages via CD147 signalling pathway in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 47(9):1299-310.
- Yarden Y, Sliwkowski MX (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(2):127-37.
- Yarrow JC, Perlman ZE, Westwood NJ, Mitchison TJ (2004). A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC Biotechnol* 4:21.
- Yurchenko V, Zybarth G, O'Connor M, Dai WW, Franchin G, Hao T, Guo H, Hung HC, Toole B, Gallay P, Sherry B, Bukrinsky M (2002). Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. *J Biol Chem* 277(25):22959-65.
- Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA, Kuriyan J (2006). An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* 125(6):1137-49.
- Zigmond SH, Foxman EF, Segall JE (2001). Chemotaxis assays for eukaryotic cells. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 12:Unit 12.1.
- Zoldák G, Aumüller T, Lücke C, Hritz J, Oostenbrink C, Fischer G, Schmid FX (2009). A library of fluorescent peptides for exploring the substrate specificities of prolyl isomerases. *Biochemistry* 48(43):10423-36.
- Zwang Y, Yarden Y (2006). p38 MAP kinase mediates stress-induced internalization of EGFR: implications for cancer chemotherapy. *EMBO J* 25(18):4195-206.

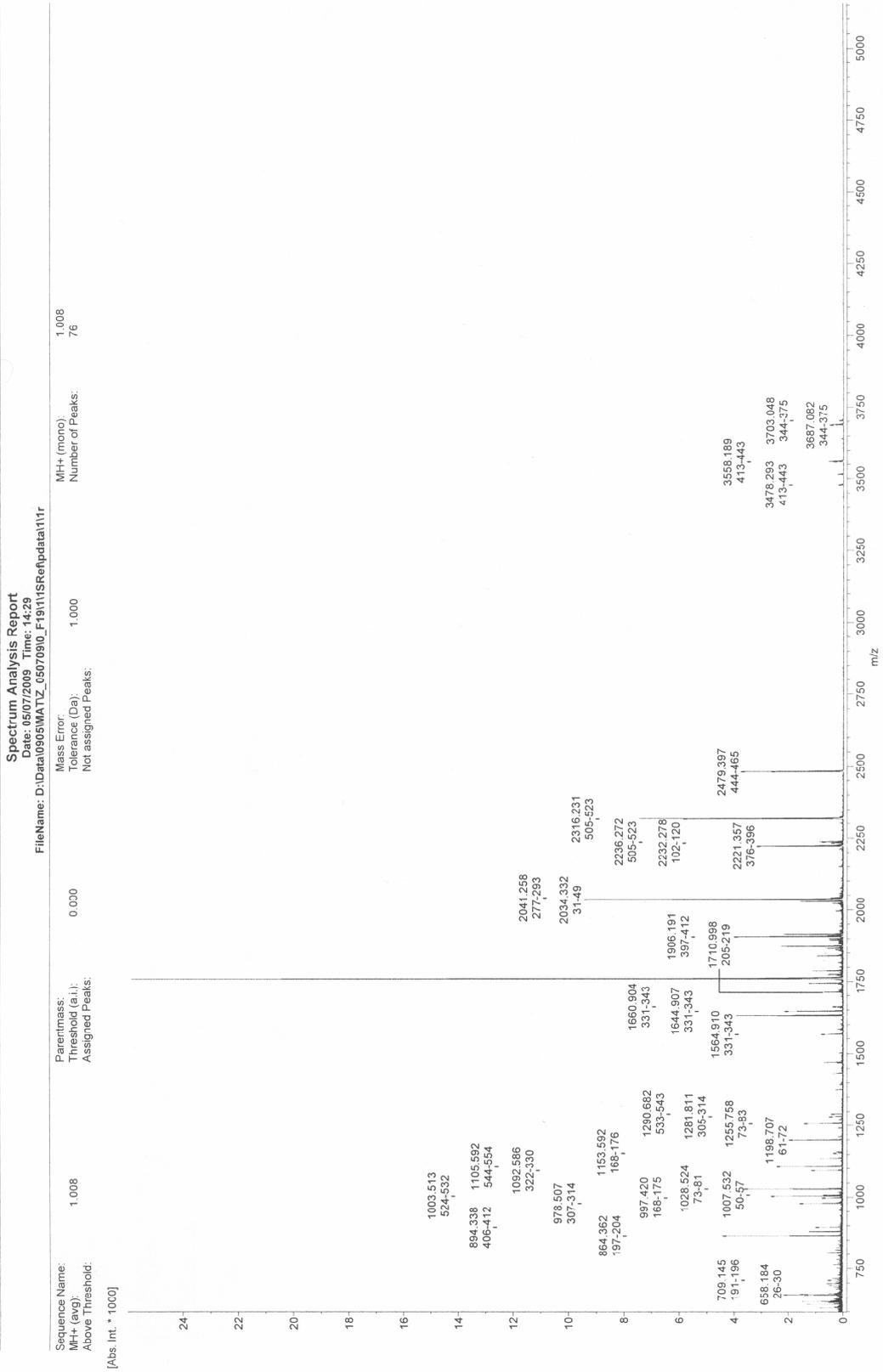
Ma



Massenspektrometrische Analyse von EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ (siehe 3.1.1.3). Die Coomassie-gefärbte Bande wurde aus dem SDS-Gel geschnitten und tryptisch verdaut. Die Analyse wurde von Angelika Schierhorn am Nano-LC MS vorgenommen (Agilent Technologies, Santa Clara).

MAL01

2



Massenspektrometrische Analyse von Phospho-EGFR₆₆₉₋₁₂₁₀ (siehe 3.1.1.3). Die Coomassie-gefärbte Bande wurde aus dem SDS-Gel geschnitten und tryptisch verdaut. Die Analyse wurde von Angelika Schierhorn am Nano-LC MS vorgenommen (Agilent Technologies, Santa Clara).

Danksagung

Den im Folgenden aufgeführten Personen danke ich für ihre Beiträge zur Entstehung der vorliegenden Arbeit:

Herrn Prof. Dr. Gunter Fischer für die Überlassung des interessanten Themas und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen an der Forschungsstelle,

Frau Dr. Cordelia Schiene-Fischer für die Betreuung und die konstruktiven Hinweise, die sich aus der Korrektur der Arbeit ergeben haben,

Herrn Dr. Günther Jahreis für die Synthese und die Reinigung der verwendeten Peptide,

Frau Dr. Angelika Schierhorn für die massenspektrometrische Untersuchung diverser Peptide und Proteine,

Frau Barbara Korge für Ordnung und Sauberkeit in unserem Labor und ihre stete Hilfsbereitschaft,

Herrn Dr. Markus Liebscher, Herrn Dr. Sebastian Daum, Frau Dr. Michaela Herzog, Frau Anna Schildbach, Herrn Erik Hinze, Herrn Michael Schumann, Herrn Mario Träger und Herrn Marten Villmow für viele Diskussionen über experimentelle Befunde und die Kaffeepause auf dem Balkon,

sowohl den bereits genannten als auch den bisher nicht genannten Mitarbeitern der Forschungsstelle für die gute Arbeitsatmosphäre.

Danke, danke, danke!

Lebenslauf

Name Sebastian Mathea
Geburtsdatum 9. Juli 1978
Geburtsort Blankenburg/Harz
Adresse A.-Bebel-Str 36, 06108, Halle (Saale)
Telefon 0176-21009569
E-Mail-Adresse mathea@enzyme-halle.mpg.de

9/1991 - 7/1997 Richard-von-Weizsäcker-Gymnasium (Thale/Harz)
Abschluss: Abitur

10/1998 - 9/2004 Studium der Biochemie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Halle)
Diplomthema: *Reaktivität und Enzymologie thioxylierter Peptide*
Abschluss: Diplom-Biochemiker

11/2004 - 1/2010 Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gunter Fischer
MPF für Enzymologie der Proteinfaltung (Halle)
Promotionsthema: *Prototypische PPIasen in der Signaltransduktion*

seit 4/2010 Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frank Bordusa
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Halle)
Projekt: *Enzymatische Modifikation von Membranproteinen an der Oberfläche lebender Zellen*

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst wurde. Von anderen Autoren übernommene Ausführungen sind als solche kenntlich gemacht. Es wurden nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet.

Halle (Saale), im April 2011

Sebastian Mathea.