Struktur und Funktion der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Domäne des humanen FK506-bindenden Proteins 37.7

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Miriam Linnert

geb. am 26.11.1982 in Rodewisch

Gutachter /in

1. Prof. Dr. G. Fischer
   Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle

2. Prof. Dr. M. T. Stubbs
   Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

3. Prof. Dr. J. Buchner
   Technische Universität München

Halle (Saale), 09.08.2012

Inhaltsverzeichnis I

Abkürzungsverzeichnis III

1. Einleitung 1
1.1. Das FK506-bindende Protein 37.7 1
1.1.1. Interaktionspartner von FKBP37.7 3
1.1.2. Die Interaktion von FKBP37.7 mit Hsp90 in Rezeptorkomplexen 5
1.2. Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen 7
1.2.1. Struktur der FK506-bindenden Proteine 8
1.2.2. Funktionen der FK506-bindenden Proteine 13
1.3. Zielstellung der Arbeit 15

2. Material & Methoden 16
2.1. Material 16
2.2. Methoden 21
2.2.1. Mikrobiologische Methoden 21
2.2.1.1. Kultivierung von *E. coli* 21
2.2.1.2. Herstellung von Glycerinkulturen 22
2.2.1.3. Herstellung chemisch kompetenter Zellen 22
2.2.1.4. Transformation von *E. coli* 22
2.2.1.5. Kultivierung humaner Zellen 22
2.2.1.6. Transfektion immortalisierter humaner Zellen 23
2.2.2. Molekularbiologische Methoden 24
2.2.2.1. Präparation von Plasmid-DNA 24
2.2.2.2. Polymerasekettenreaktion (PCR) 24
2.2.2.3. Restriktionsverdau 25
2.2.2.4. Ligation von DNA-Fragmenten 25
2.2.2.5. Ortsgerichtete Mutagenese 25
2.2.2.6. Kolonie-PCR 25
2.2.2.7. Isolation der Gesamt-RNA aus Zellen und Synthese von cDNA 26
2.2.2.8. Hergestellte Überexpressionsplasmide 26
2.2.3. Proteinbiochemische Methoden 28
2.2.3.1. Überexpressionstest 28
2.2.3.2. Zellaufschluss von *E. coli*-Zellen für die Proteinreinigung 28
2.2.3.3. Herstellung von Lysaten aus humanen Zellen 28
2.2.3.4. Prinzipien der Proteinreinigung 29
2.2.3.5. Reinigung der verwendeten Proteine 29
2.2.3.6. Dialyse und Proteinkonzentrierung 31
2.2.4. Analytische Methoden 31
2.2.4.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese 31
2.2.4.2. Zweidimensionale-Gelelektrophorese 32
2.2.4.3. Western-Blot und Proteindetektion durch Antikörper 32
2.2.4.4. Agarosegelelektrophorese 33
2.2.4.5. Konzentrationsbestimmung 33
2.2.4.6. CD-Spektroskopie 33
2.2.4.7. PPIase-Aktivitätstest 33
2.2.4.8. Chaperon-Aktivitätstest 34
2.2.4.9. Rückfaltung der S-carboxymethylierter RNase T1 35
2.2.4.10. Massenspektrometrische Analyse 35
2.2.4.11. Interaktionsexperimente mittels FK506-Affinitätsmatrix 35

2.2.4.12. Interaktionsexperimente mittels GSH-Sepharose 36
2.2.5. NMR-Spektroskopische Untersuchungen von FKBP37.7$^{1-166}$ 36
2.2.5.1. Anzucht von *E. coli* im M9-Minimalmedium 36
2.2.5.2. Sequentielle Zuordnung 36
2.2.5.3. Strukturrechnung 38

3. Ergebnisse 39
3.1. Bestimmung der Domänengrenzen von FKBP37.7 39
3.2. Klonierung, Überexpression, Reinigung von FKBP37.7 und verkürzten FKBP37.7-Varianten aus *E. coli* 41
3.3. Klonierung, Überexpression und Reinigung von FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ aus humanen HEK293-Zellen 45
3.4. Untersuchung der FK506-Bindung von FKBP37.7 47
3.5. Untersuchungen zur PPIase-Aktivität von FKBP37.7 51
3.6. Strukturaufklärung der PPIase-Domäne von FKBP37.7 mittels NMR-Spektroskopie 59
3.6.1. Verbesserung der Proteinstabilität und der Messbedingungen für die Strukturaufklärung 59
3.6.2. Die sequentielle Zuordnung der Resonanzen von FKBP37.7$^{1-166}$ 65
3.6.3. Die Proteinstruktur der PPIase-Domäne von FKBP37.7 71
3.7. Untersuchung der PPIase-Domäne von FKBP37.7 ohne βD-βE-Erweiterung 75
3.8. Untersuchungen zur Chaperon-Aktivität der PPIase-Domäne von FKBP37.7 78
3.9. Untersuchungen zu Protein-Protein-Interaktionen der PPIase-Domäne von FKBP37.7 81
3.9.1. Identifizierung neuer Bindepartner der FKBP37.7-PPIase-Domäne 81
3.9.2. Die Interaktion der PPIase-Domäne von FKBP37.7 mit rekombinant hergestelltem Hsp90 84

4. Diskussion 88
4.1. FKBP37.7 zeigt keine PPIase-Aktivität und keine Bindung an FK506 88
4.2. FKBP37.7 besitzt eine PPIase-Domäne mit einzigartiger Erweiterung 91
4.3. Mögliche Ursachen für die fehlende Aktivität 95
4.4. Funktionen der PPIase-Domäne von FKBP37.7 101

5. Zusammenfassung 107

6. Literaturverzeichnis

7. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
ABZ	Aminobenzoesäure
AhR	Arylhydrocarbon-Rezeptor
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bis-Tris	Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celcius
c	Zenti
C-terminal	Carboxy-terminal
CD	Circulardichroismus
CDC37	engl.: *Cell Division Cycle 37 Homolog* (*Saccharomyces cerevisiae*)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHAPS	3-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio-1-propansulfonat
CO	Carbonylkohlenstoffatom des Proteinrückgrates
CsA	Cyclosporin A
Cyp	Cyclophilin
δ	chemische Verschiebung
d	Dezi
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSZM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMAU	Ernst-Moritz-Arndt-Universität
ESI	engl.: *Electrospray Ionisation*
FCS	Fötales Kälberserum
FKBP	FK506-bindendes Protein; wenn nicht weiter bezeichnet human
FLAG	Oktapeptid: Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys
°	Grad
g	Erdbeschleunigung bzw. Gramm
GSH	Glutathion, reduziert
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HEPES	2-(4(-2-Hydroxyethyl)-1piperazinyl)-ethansulfonsäure
His_6	sechsfach Histidin
HPLC	engl.: *High-performance liquid chromatography*
Hsc	engl.: *Heat shock cognate*; wenn nicht weiter bezeichnet human
Hsp	engl.: *Heat shock protein*; Hitzeschockprotein; wenn nicht weiter bezeichnet human

HSQC	engl.: *Heteronuclear Single-Quantum Coherence spectroscopy*
IgG	Immunglobulin G
IPG	engl.: *Immobiline DryStrip*
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k	Kilo bzw. Geschwindigkeitskonstante
K_M	Michaelis-Konstante
l	Liter
LB	engl.: *lysogeny broth*
LC	engl.: *Liquid chromatography*
µ	Micro
m	Milli
M	Molar
MALDI	engl.: *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation*
MEM	engl.: *Modified Eagle Medium*
MHz	Megahertz
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MPF	Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle
n	Nano
N-terminal	Amino-terminal
Ni-NTA	engl.: *Nickel-Nitrilotriacetic acid*
NMR	Kernmagnetische Resonanz
NOE	engl.: *Nuclear Overhauser Effect*
NOESY	engl.: *Nuclear Overhauser enhancement and Exchange Spectroscoy*
NP40	Nonidet P-40
Nr.	Nummer
%	Prozent
p	Piko
Par	Parvulin
PDB	RCSB Protein Data Bank
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNA	Para-Nitroanilid
PPIase	Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
ppm	engl.: *Parts per milion*
PBS	engl.: *Phosphate Buffered Saline*
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RCM-T1	S-carboxymethylierte RNase T1
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	engl.: *Roswell Park Memorial Institute*
RT	Raumtemperatur
SlyD	engl.: *Sensitive to lysis D*
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOC	engl.: *Super Optimal Broth with Glucose*
Suc	Succinyl
SV	Säulenvolumen
TBS	engl.: *Tris Buffered Saline*
TBST	engl.: *Tris-Buffered Saline Tween-20*
TCEP-HCl	Tris(2-carboxyethyl)-phosphine-Hydrochlorid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Triflourethanol
TGF	engl.: Transforming Growth Factor
TPR	engl.: *Tetratricopeptide repeat*
TOCSY	engl.: *Total Correlation Spectroscopy*
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TROSY	engl.: *Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy*
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen je Volumen
Vis	Sichtbar
w/v	Masse je Volumen
YT	engl.: *Yeast Extract Tryptone*

Zur Abkürzung der Aminosäurenbezeichnungen wurden die Drei- bzw. Einbuchstabenkodierungen verwendet.

1. Einleitung

1.1. Das FK506-bindende Protein 37.7

Das FK506-bindende Protein 37.7 (FKBP37.7) wurde erstmals 1996 durch das Hefe-Zwei-Hybrid-System als Interaktionspartner des Hepatitis B Virus X-Proteins identifiziert und daher als Hepatitis B Virus X-assoziiertes Protein 2 (XAP2) bezeichnet [Carver & Bradfield, 1997]. Kurze Zeit später wurde FKBP37.7, ebenfalls durch das Hefe-Zwei-Hybrid-System, von zwei weiteren Arbeitsgruppen als Interaktionspartner des Arylhydrocarbon-Rezeptors (AhR) identifiziert und ist daher auch als Arylhydrocarbon-Rezeptor-interagierendes Protein (AIP) und als Arylhydrocarbon-Rezeptor-assoziiertes Protein 9 (ARA9) bekannt [Kuzhandaivelu *et al.*, 1996; Ma & Whitlock, 1997]. Das humane FKBP37.7 besteht aus 330 Aminosäuren, welche zwei Domänen bilden; eine N-terminal lokalisierte putative PPIase-Domäne vom FKBP-Typ und eine C-terminal lokalisierte, hoch-konservierte *Tetratricopeptide repeat*-Domäne (TPR-Domäne). Aufgrund der putativen PPIase-Domäne wird das Protein auch der FKBP-Familie (FK506-bindende Proteine) der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) zugeordnet und erhielt durch seine molekulare Masse von 37.7 kDa den Namen FKBP37.7 [Schiene-Fischer & Yu, 2001]. Zum damaligen Zeitpunkt waren keinerlei Daten zur Struktur verfügbar, somit erfolgte die Einteilung der Domänen nicht strukturell, sondern lediglich durch Sequenzvergleiche mit anderen Proteinen. Daher lässt es sich erklären, dass für FKBP37.7, trotz seiner Zugehörigkeit zur FKBP-Familie der PPIasen, bislang weder eine Bindung an FK506, noch eine PPIase-Aktivität festgestellt werden konnte [Carver *et al.*, 1998; Laenger *et al.*, 2009]. FKBP37.7 wird in Vertebraten ubiquitär exprimiert. Orthologe konnten zudem in anderen Eukaryoten gefunden werden. In allen untersuchten humanen Geweben konnte das Protein nachgewiesen werden, in besonders hohen Konzentrationen in Milz und Thymus, dagegen in der Lunge und Leber nur in geringen Konzentrationen [Carver & Bradfield, 1997; Meyer *et al.*, 1998]. Zellulär ist FKBP37.7 vorwiegend cytoplasmatisch lokalisiert, allerdings konnte es bei transienter Überexpression auch verstärkt im Zellkern detektiert werden [Kuzhandaivelu *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 2000].

Trotz der nicht nachweisbaren PPIase-Aktivität und FK506-Bindung besteht eine große Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz nicht nur innerhalb der Protein-Protein-Interaktionen vermittelnden TPR-Domäne, sondern auch innerhalb der putativen PPIase-Domänen zwischen den verschiedenen Vertretern der Vertebraten (Abbildung 1-1). Zwischen allen in der Abbildung 1-1 aufgeführten Vertretern der Säugetiere beträgt die Sequenzhomologie 89 %.

Auf einen möglichen Grund für die Konservierung und damit die Bedeutung von FKBP37.7 weisen die Effekte hin, welche beim Verlust des Proteins zu beobachten sind. So wurden bei der Generierung von FKBP37.7-*Knock out*-Mäusen (*Ara9*$^{-/-}$) keine lebensfähigen Organismen erhalten

[Lin *et al.*, 2007]. Bei genauerer Untersuchung der Embryonen zeigte sich, dass die Tiere schwerwiegende Entwicklungsdefekte am Herzen sowie einen verringerten Blutfluss durch Kopf und Extremitäten aufwiesen. Diese Entwicklungsdefekte scheinen allerdings unabhängig vom AhR zu sein, der als der Hauptinteraktionspartner von FKBP37.7 diskutiert wird. AhR-defiziente Mäuse (*Ahr*$^{-/-}$) sind lebensfähig und zeigen lediglich eine Reduktion der Hepatozytengröße, der Fruchtbarkeit und des Körpergewichtes [Lahvis *et al.*, 2000].

```
H. sapiens     MADIIARLREDGIQKRVIQEGRGELPDFQDGTKATFHYRTLHSDDEGTVLDDSRARGKPMELIIGKKFKL 70
C. aethiops    MADIIARLREDGIQKRVIQEGRGELPDFQDGTKATFHYRTLHSDNEGTVLDDSRVRGKPMELIIGKKFKL 70
M. musculus    MADLIARLREDGIQKRVIQEGRGELPDFQDGTKATFHFRTLHSDNEGSVIDDSRTRGKPMELIVGKKFKL 70
R. norvegicus  MADLIARLREDGIQKRVIQEGRGELPEFQDGTKATFHFRTLHSDPEGSVIDDSRARGKPMELIIGKKFKL 70
B. taurus      MADIIARLREDGIQKRVIQEGRGALPDFQDGTKATFHYRTLCSDEEGAVLDDSRVRGKPMELIIGKKFKL 70
               ***:******************** **:**********:*** ** **:*:****.********:******

H. sapiens     PVWETIVCTMREGEIAQFLCDIKHVVLYPLVAKSLRNIAVGKDPLEGQRHCCGVAQMREHSSLGHADLDA 140
C. aethiops    PVWETIVCTMREGEIAQFLCDIKHVVLYPLVAKSLGNIAVGKDPLEGQRHCCGVAQMHEHSSLGHADLDA 140
M. musculus    PVWETIVCTMREGEIAQFLCDIKHVVLYPLVAKSLRNIAEGKDPLEGQRHCCGIAQMHEHSSLGHADLDA 140
R. norvegicus  PVWETIVRTMREGETAQFLCDVKHTVLYPLVAKSLRNIAEGKDPLEGQRHCCGIAQMHEHSSLGHADLDA 140
B. taurus      PVWETIVRTMREGEIAQFCCDXKHVVLYPLVAKSLRNIAAGKDPLEGQRHCCGIAQMHXHSSLGHADLDA 140
               ******* ****** *** ** **.********** *** *************:***: ***********

               putative PPIase-Domäne ←──→ TPR-Motive

H. sapiens     LQQNPQPLIFHMEMLKVESPGTYQQDPWAMTDEEKAKAVPLIHQEGNRLYREGHVKEAAAKYYDAIACLK 210
C. aethiops    LQQNPQPLVFHMEMLKVESPGTYQQDPWAMTDEEKAKAVPLIHQEGNRLYREGHVKEAAAKYYDAIACLK 210
M. musculus    LQQNPQPLIFHIEMLKVESPGTYQQDPWAMTDEEKAKAVPVIHQEGNRLYREGQVKEAAAKYYDAIACLK 210
R. norvegicus  LQQNPQPLIFHIEMLKVESPGTYQQDPWAMTDEEKAKAVPLIHQEGNRLYREGQVKEAAAKYYDAIACLK 210
B. taurus      LQQNPQPLIFDIEMLKVENPGTYQQDPWAMTDEEKAKAVPVIHQEGNRLYREGHVKEAAAKYYDAIACLK 210
               ********:*.:******.********************:************:****************

H. sapiens     NLQMKEQPGSPEWIQLDQQITPLLLNYCQCKLVVEEYYEVLDHCSSILNKYDDNVKAYFKRGKAHAAVWN 280
C. aethiops    NLQMKEQPGSPEWIQLDQQITPLLLNYCQCKLVAEEYYEVLDHCSSILNKYDDNVKAYFKRGKAHAAVWN 280
M. musculus    NLQMKEQPGSPDWIQLDLQITPLLLNYCQCKLVAQEYYEVLDHCSSILNKYDDNVKAYFKRGKAHAAVWN 280
R. norvegicus  NLQMKEQPGSPDWIQLDLQITPLLLNYCQCKLVAQEYYEVLDHCSSILNKYDDNVKAYFKRGKAHAAVWN 280
B. taurus      NLQMKEQPGSPDWIQLDQQITPLLLNYCQCKLVAEEYYEVLDHCSSILNKYDDNVKAYFKRGKAHAAVWN 280
               ***********:***** ***************.:***********************************

H. sapiens     AQEAQADFAKVLELDPALAPVVSRELQALEARIRQKDEEDKARFRGIFSH 330
C. aethiops    AQEAQADFAKVLELDPALAPVVSRELRALEARIRQKDEEDKARFRGIFSH 330
M. musculus    AQEAQADFAKVLELDPALAPVVSRELRALETRIRQKDEEDKARFRGIFSH 330
R. norvegicus  AQEAQADFAKVLELDPALAPVVSRELRALEARIRQKDEEDKARFRGIFSH 330
B. taurus      AQQAQDDFAKVLQLDPAMAPVVSRELRALEARIRQKDEEDKARFRGIFSH 330
               **:** ******:****:********:***:******************
```

Abbildung 1-1: Sequenzvergleich von FKBP37.7 verschiedener Säugetiere mit ClustalW2 (2007). Aminosäuren, welche im Vergleich zum humanen Protein verändert vorliegen sind rot markiert. Identische Aminosäuren sind mit (*), Reste starker Ähnlichkeit mit (:) und Reste schwacher Ähnlichkeit mit (.) gekennzeichnet. Grau hinterlegt sind Aminosäuren, welche das putativ aktive Zentrum bilden (Vergleich Abschnitt 3.1.). *H. sapiens (Homo sapiens); C. aethiops (Chlorocebus aethiops); M. musculus (Mus musculus); R. norvegicus (Rattus norvegicus); B. taurus (Bos taurus).*

Eine weitere essentielle Rolle wird FKBP37.7 bei der Ausbildung familiär isolierter Hypophysenadenome (FIPA) zugesprochen, bei denen im Gegensatz zu anderen Adenomausbildungen nur die Hirnanhangsdrüse betroffen ist [Chahal *et al.*, 2010; Vierimaa *et al.*, 2006]. Diese Tumore der Hypophyse rufen durch die Überproduktion von Wachstumshormonen Krankheitsbilder wie Akromegalie, die extreme Vergrößerung von Körpergliedern, oder Gigantismus hervor [Chanson & Salenave, 2008; Leontiou *et al.*, 2008]. Es konnten bei 30 % aller Fälle familiär isolierter Hypophysenadenome und darunter sogar 50 % aller Fälle von Akromegalie Mutationen im Gen für

FKBP37.7 festgestellt werden [Chahal *et al.*, 2010]. Bislang sind etwa 50 verschiedene Veränderungen des FKBP37.7-Gens bekannt, wobei Deletionen, Insertionen und Duplikationen von Segmenten, sowie *Missense*-Mutationen oder *Nonsense*-Mutationen auftreten können [Chahal *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2005]. Mutationen werden sowohl im Bereich der PPIase-Domäne sowie der TPR-Domäne beobachtet. Dreiviertel aller Veränderungen führen zu verkürzten Proteinvarianten oder zum Verlust der Funktionsfähigkeit des Proteins. FKBP37.7 wird somit als Tumorsuppressor-Gen diskutiert.

1.1.1. Interaktionspartner von FKBP37.7

Seit der Entdeckung von FKBP37.7 im Jahre 1996 konnte eine Vielzahl von Interaktionspartnern gefunden werden [Cai *et al.*, 2011; Trivellin & Korbonits, 2011]. Die Tabelle 1-1 bietet einen Überblick aller bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt bekannten Interaktionen.

Tabelle 1-1: Zusammenstellung aller bekannten Interaktionspartner von FKBP37.7. Mit * gekennzeichnete Interaktionen konnten bislang nicht bestätigt werden. Interaktionen, bei denen der Einfluss von FKBP37.7 bislang nicht geklärt ist bzw. widersprüchlich diskutiert wird, sind mit „Nicht bewertbar“ gekennzeichnet.

Interaktionspartner	Funktion des Interaktionspartners	Effekt von FKBP37.7 auf den Interaktionspartner
Nukleare Rezeptoren		
Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR)	Aktivierung der Transkription von Zielgenen nach Dioxinbindung	Einfluss auf die Transkriptionsaktivität, Schutz vor Ubiquitin-abhängigem Abbau
Östrogen-Rezeptor α (ERα)	Aktivierung der Transkription von Zielgenen nach Östrogenbindung	Inhibition der Transkriptionsaktivität unabhängig von der Ligandenbindung
Peroxisom Proliferator-aktivierter-Rezeptor α (PPARα)	Aktivierung der Transkription von Zielgenen des Lipidstoffwechsels nach Ligandenbindung	Inhibition der Transkriptionsaktivität
Thyroid-Hormon-Rezeptor ß1 (TRß1)	Aktivierung der Transkription von Thyroidhormon-Rezeptorgenen	Erhöhung der Transkriptionsaktivität
Transmembran-Rezeptoren		
Tyrosin-Kinase-Rezeptor RET	Involviert in Entwicklung, Reifung und Überleben von verschiedenen Zellen	Nicht bewertbar
Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)*	Involviert in Proliferation, Überleben, Adhäsion, Migration und Differenzierung von Zellen	Nicht bewertbar

Interaktionspartner	Funktion des Interaktions-partners	Effekt von FKBP37.7 auf den Interaktionspartner
Chaperone		
Heat shock protein 90 (Hsp90)	Proteinfaltung, Mitochondrialer Proteinimport	Nicht bewertbar
Heat shock cognate 70 (Hsc70)	Proteinfaltung, Mitochondrialer Proteinimport	Nicht bewertbar
Virale Proteine		
Hepatitis B Virus X-Protein (HBV X)	Aktivierung der Transkription verschiedener Gene nach Virusinfektion	Inhibition der Transkriptionsaktivität
Epstein-Barr nuclear antigen 3 (EBNA-3)	Immortalisierung und Transformation von B-Lymphozyten	Nicht bewertbar
Proteine des Cytoskeletts		
Aktin*	Komponente des Cytoskeletts	Nicht bewertbar
G-Proteine		
$G\alpha_{13}$	Signalübermittlung in Rezeptor-stimulierten Signalwegen	Nicht bewertbar
$G\alpha_q$	Signalübermittlung in Rezeptor-stimulierten Signalwegen	Nicht bewertbar
Phosphodiesterasen (PDE)		
Phosphodiesterase 2A3 (PDE2A3)	Inaktivierung von cAMP	Inhibition der katalytischen Aktivität
Phosphodiesterase 4A5 (PDE4A5)	Inaktivierung von cAMP und cGMP	Nicht bewertbar
Koaktivatoren Nuklearer Rezeptoren		
Transcriptional mediators/ intermediary factor 2 (TIF-2)	Koaktivator des Östrogen-Rezeptor α (ERα)	Inhibition der Transkriptionsaktivität des Östrogen-Rezeptor α
Mitochondriale Proteine		
Translocase of outer mitochondrial membrane 20 (TOM20)	Involviert in den Import von mitochondrialen Präproteinen	Nicht bewertbar
Inhibitor der Apoptose		
Survivin	Unterdrückung der Apoptose	Schutz von Survivin vor proteosomalem Abbau
Kinasen		
Cardiac Troponin I-interacting kinase (TNNI3K)*	Beteiligung an der Kardiomyogense, Erhöht die Herzleistung.	Nicht bewertbar

Neben den aufgeführten Interaktionen, wurde auch eine Interaktion zwischen FKBP37.7 und dem Glucocorticoid-Rezeptor (GR) diskutiert. Eine direkte Interaktion beider Proteine konnte jedoch nicht beobachtet werden [Carver *et al.*, 1998]. Allerdings zeigte eine Studie die Inhibition der transkriptionellen Glucocorticoid-Rezeptoraktivität durch die Überexpression von FKBP37.7 in Abhängigkeit von Hsp90 [Carver *et al.*, 1998; Laenger *et al.*, 2009]. Dies kommt möglicherweise durch die um Hsp90 konkurrierende Interaktion des Glucocorticoid-Rezeptors mit FKBP52 zustande. Eine Interaktion zwischen FKBP37.7 und Dynein, wie bei FKBP52, wurde ebenfalls vermutet [Kazlauskas *et al.*, 2001]. Diese konnte allerdings durch Co-Präzipitationsexperimente ebenfalls nicht bestätigt werden [Galigniana *et al.*, 2002].

1.1.2. Die Interaktion von FKBP37.7 mit Hsp90 in Rezeptorkomplexen

Eine Interaktion von Hsp90 und FKBP37.7 wurde erstmals im Arylhydrocarbon-Rezeptorkomplex beobachtet. Durch Dichtegradientenzentrifugation, chemische Vernetzungsexperimente und spezifische Antikörper konnte ein heterotetramerer Komplex aus dem AhR, einem Hsp90-Dimer und einem unbekannten Protein mit einer Masse von etwa 40 kDa nachgewiesen werden [Chen & Perdew, 1994; Prokipcak *et al.*, 1989]. Das unbekannte Protein konnte erst 1998 als FKBP37.7 identifiziert werden [Meyer *et al.*, 1998]. Später wurde auch die Interaktion von Hsp90 und FKBP37.7 in einem weiteren heterotetrameren Rezeptorkomplex mit PPARα, einem Liganden-induzierten Transkriptionsfaktor, gezeigt [Sumanasekera *et al.*, 2003]. Hierbei wurde zudem beobachtet, dass sich die Interaktion auf PPARα beschränkt. Eine Bindung der beiden anderen Subtypen, PPARβ und PPARγ, konnte ausgeschlossen werden.

Das Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) zählt zur Klasse der Hsp90-Proteine. Diese besitzen Homologe in Pro- sowie Eukaryoten und sind evolutionär hoch konserviert [Buchner, 1999]. Im Gegensatz zu den prokaryotischen sind die eukaryotischen Hsp90-Proteine essentiell für die Zelle [Bardwell & Craig, 1988; Voss *et al.*, 2000]. Mit 1-2 % Anteil am löslichen Gesamtzellprotein ist Hsp90, selbst unter stressfreien Bedingungen, eines der am häufigsten vorkommenden cytoplasmatischen Proteine bei Eukaryoten [Lai *et al.*, 1984; Welch & Feramisco, 1982]. Bei allen Vertebraten existieren zwei nahezu identische Isoformen des Hsp90, welche beim Menschen eine Sequenz-identität von 86 % aufweisen. Es handelt es sich dabei um das induzierbare Hsp90α und das konstitutiv exprimierte Hsp90β [Hansen *et al.*, 1991; Ripley *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999]. Als Mitglied der hoch konservierten Klasse der Hsp90-Proteine zählt Hsp90 zu den molekularen Chaperonen. Neben der generellen Fähigkeit nicht-native Proteine zu stabilisieren, indem deren Aggregationsreaktionen unterdrückt werden, sind diese molekularen Chaperone auch an der Reifung von Proteinen beteiligt [Buchner, 1996; Hahn, 2009; Kiefhaber *et al.*, 1991; Pratt, 1997;

Pratt & Toft, 1997]. Diese Proteine werden als Substratproteine bezeichnet und umfassen beispielsweise die Steroidhormon-Rezeptoren, den AhR, weitere Transkriptionsfaktoren oder auch Proteinkinasen [Buchner, 1999; Nair *et al.*, 1996; Pratt & Toft, 2003; Silverstein *et al.*, 1998; Smith, 2004]. Zur Bindung und Aktivierung der Hsp90-Substrate ist der Aufbau eines Multiproteinkomplexes und die ATPase-Aktivität von Hsp90 notwendig [Obermann *et al.*, 1998; Panaretou *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1992]. Für die Steroidhormon-Rezeptoren wurden beispielsweise die Faktoren in folgender Reihenfolge ermittelt [Kosano *et al.*, 1998; Krukenberg *et al.*, 2011; Pratt & Toft, 2003; Richter & Buchner, 2001; Wandinger *et al.*, 2008]: Die Bindung eines Hsp90-Dimers an einen Steroidhormon-Rezeptor erfordert die Beteiligung von Hsp70 und dessen Cofaktor Hsp40, wobei Hsp90 und Hsp70 durch das *Hsp70/Hsp90-organizing protein* (Hop) miteinander verbunden sind [Smith *et al.*, 1993]. Der Steroidhormon-Rezeptor wird anschließend in eine ligandenaffine Form überführt, man spricht von einem intermediären Rezeptorkomplex [Dittmar & Pratt, 1997]. Nun dissoziieren Hsp70, Hsp40 und Hop aus dem Steroidhormon-Rezeptorkomplex und die Co-Chaperone p23 sowie ein spezifisches, TPR-Motiv-enthaltendes Protein treten ein [Shiau *et al.*, 2006; Smith, 1993]. Dieser Komplex wird als reifer Rezeptorkomplex bezeichnet und ist in der Lage Liganden zu binden. Durch die Ligandenbindung kann der Rezeptorkomplex seine spezifische Funktion vermitteln indem er vom Cytoplasma in den Zellkern transloziert [Defranco *et al.*, 1995]. Es wird vermutet, dass die PPIase-Domäne der jeweiligen PPIase den Steroidhormon-Rezeptorkomplex über Protein-Protein-Interaktionen mit dem zellulären Transportsystem verbindet und so die Translokation zwischen Cytoplasma und Zellkern vermittelt [Galigniana *et al.*, 2001; Owens-Grillo *et al.*, 1996]. Im Falle von FKBP52 und Cyp40 konnten Interaktionen mit Mikrotubuli-assoziiertem Dynein nachgewiesen werden [Galigniana *et al.*, 2002]. Die bislang am besten untersuchte Interaktion von FKBP37.7 ist die im heterotetrameren Arylhydrocarbon-Rezeptorkomplex. Der AhR ist ein Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor der *helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim*-Superfamilie. Durch die Bindung von Liganden, wie die des Prototyps 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin oder anderer halogenierter, aromatischer Kohlenwasserstoffe transloziert der Rezeptorkomplex in den Zellkern. Dort dissoziiert der Rezeptor von Hsp90 und FKBP37.7 und dimerisiert anschließend mit dem AhR-nukleären-Translokator (ARNT), ebenfalls einem Mitglied der *helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim*-Superfamilie. Dieser dimere Komplex ist nun in der Lage ein so genanntes *Xenobiotic response element* der DNA zu binden und damit die Expression von Zielgenen wie Cytochrom P450 1A1 zu induzieren [Beischlag *et al.*, 2008; Carlson & Perdew, 2002; Denison & Nagy, 2003]. Es wurde gezeigt, dass diese Translokation des Rezeptorkomplexes in den Zellkern durch den spezifischen Hsp90-Inhibitor Geldanamycin verhindert werden kann [Kazlauskas *et al.*, 2000; Kazlauskas *et al.*, 2001]. Eine Interaktion von FKBP37.7 mit Hsp90 kann ebenfalls in Abwesenheit des AhR beobachtet werden, auch wenn diese schwächer ausgeprägt ist [Bell & Poland, 2000; Carver & Bradfield, 1997]. Vergleichbar mit anderen PPIasen interagiert FKBP37.7 über seine TPR-Domäne mit

Hsp90 [Bell & Poland, 2000; Carver *et al.*, 1998; Meyer & Perdew, 1999]. Zusätzlich scheint auch die N-terminale putative PPIase-Domäne von FKBP37.7 einen Einfluss auf die Interaktion mit Hsp90 und den AhR zu besitzen, da FKBP37.7-Varianten, denen Teile der putativen PPIase-Domäne entfernt wurden, eine deutlich schwächere Interaktion mit beiden Interaktionspartnern zeigten [Kazlauskas *et al.*, 2002].

1.2. Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen

FKBP37.7 wird zur Enzymklasse der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) (EC: 5.2.1.8) gezählt. Die Enzyme dieser Klasse gehören neben Chaperonen und Proteindisulfidisomerasen zu den Faltungshelferenzymen. PPIasen katalysieren die Isomerisierung zwischen dem *cis*- und dem *trans*-Konformationszustand von Peptidbindungen in Peptidketten zwischen Prolin und dessen N-terminal benachbarter Aminosäure [Fischer *et al.*, 1984b; Schmid, 1993].
Da Peptidbindungen einen partiellen Doppelbindungscharakter besitzen, können die flankierenden C_α-Atome in *cis*- (Diederwinkel ω= 0°) oder in *trans*-Stellung (Diederwinkel ω= 180°) zueinander vorliegen (Abbildung 1-2).

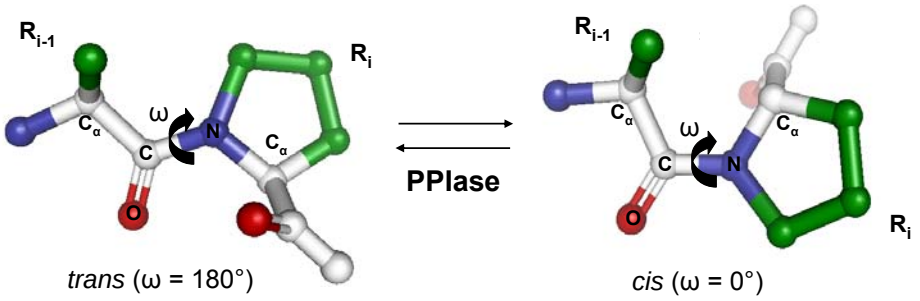


Abbildung 1-2: Stabile Konformationen der Peptidyl-Prolyl-Bindung. Die Abbildung wurde aus der Dissertation von A. Thiele übernommen [Thiele, 2010].

Allerdings ist die *trans*-Konformation die sterisch günstigere, so dass lediglich 0,03 % aller Peptidbindungen eine *cis*-Konformation aufweisen [Weiss *et al.*, 1998]. Einen Sonderfall stellt die Peptidbindung zwischen Prolin und dessen N-terminal benachbarter Aminosäure dar. Aufgrund der Ringstruktur der Iminosäure Prolin unterliegt auch die *trans*-Konformation einer sterischen Hinderung, wodurch in diesem Fall sogar 5 % der Peptidbindungen in der *cis*-Konformation vorliegen [Jabs *et al.*, 1999; Weiss *et al.*, 1998]. Ohne enzymatische Katalyse verläuft die Isomerisierung dieser Peptidbindungen nur sehr langsam, daher kann die *cis/trans*-Isomerisierung einen limitierenden Schritt der Protein-Faltung darstellen [Schmid *et al.*, 1993].
Die PPIasen werden in drei Familien unterteilt; die Cyclophiline (Cyp), die FK506-bindenden Proteine (FKBP) und die Parvuline (Par) [Fischer, 1994; Fischer *et al.*, 1989; Harding *et al.*, 1989;

Rahfeld *et al.*, 1994]. Diese drei Familien weisen untereinander teilweise strukturelle Ähnlichkeiten aber keine Sequenzhomologien auf [Ranganathan *et al.*, 1997; Sekerina *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2007]. Namensgebend für die FKBP ist die Bindung vieler Vertreter an das Peptidmakrolid FK506 (Tacrolimus) aus *Streptomyces tsukubaensis* [Tanaka *et al.*, 1987]. Dagegen erhielten die Cyclophiline ihren Namen durch die Bindung an das zyklische Undekapeptid Cyclosporin A (CsA). FK506 und CsA binden mit hoher Affinität an das aktive Zentrum der Enzyme und inhibieren deren PPIase-Aktivität. Zusätzlich vermitteln FK506 und CsA eine immunsupressive Wirkung über den Komplex aus Liganden und PPIase, indem die gemeinsame Oberfläche von FK506 und FKBP bzw. CsA und Cyp mit der Proteinphosphatase Calcineurin interagiert [Liu *et al.*, 1991b]. Aus diesem Grund werden PPIasen auch häufig als Immunophiline bezeichnet [Schreiber, 1991].

1.2.1. Struktur der FK506-bindenden Proteine

Wie auch andere PPIasen sind die FKBP ubiquitär verbreitet und evolutionär hoch konserviert, was in speziesübergreifenden Analysen der Genfamilie belegt wurde [Bell *et al.*, 2006; Galat, 2003; Luan, 1998; Maruyama *et al.*, 2004]. Anhand von zahlreichen Strukturvergleichen wurde ein genereller Aufbau für die PPIase-Domänen der FKBP-Familie festgestellt.

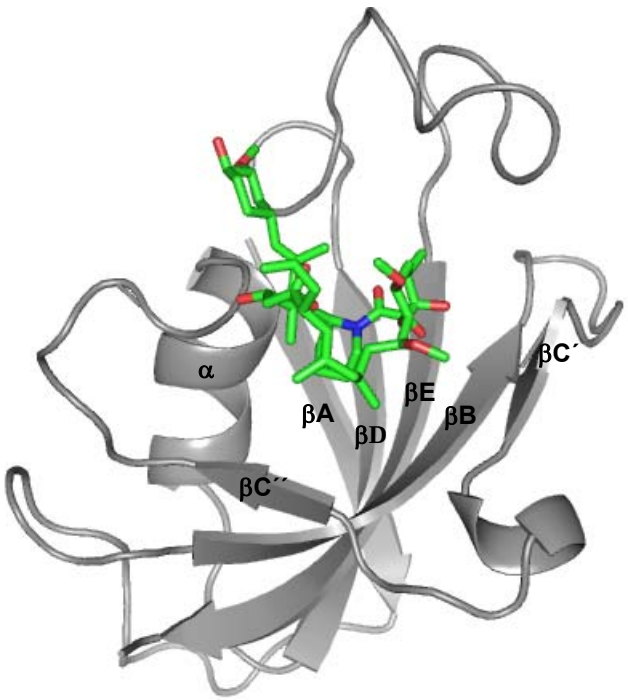


Abbildung 1-3: Struktur des humanen FKBP12 mit gebundenem FK506 (PDB: 1FKJ). Die Sekundärstrukturelemente sind nach der Reinfolge in der Polypeptidkette bezeichnet. FK506 ist in grün dargestellt.

Dabei handelt es sich um ein vier- bis sechssträngiges, antiparallel verlaufendes, rechthändiges β-Faltblatt, welches sich als ein halbes β-Fass um eine kurze amphipathische α-Helix windet [Craescu *et al.*, 1996; Liang *et al.*, 1996; Maestre-Martinez *et al.*, 2006; Michnick *et al.*, 1991; Sinars *et al.*, 2003; Szep *et al.*, 2009]. In dieser PPIase-Domäne bilden dabei vorwiegend hydrophobe Aminosäuren eine Tasche, in die FK506 durch hydrophobe Wechselwirkungen und über vier Wasserstoffbrücken gebunden wird [Fanghänel & Fischer, 2004; Lücke & Weiwad, 2011]. Innerhalb der FKBP-Familie stellt FKBP12 den prototypischen Vertreter dar und besteht lediglich aus einer PPIase-Domäne. Die Struktur im Komplex mit FK506 ist in Abbildung 1-3 dargestellt [Wilson *et al.*, 1995].

Die Zuordnung der verschiedenen Proteine zur FKBP-Familie erfolgte aufgrund von Sequenzhomologien. Derzeit sind 16 humane Vertreter dieser Familie bekannt (Abbildung 1-4).

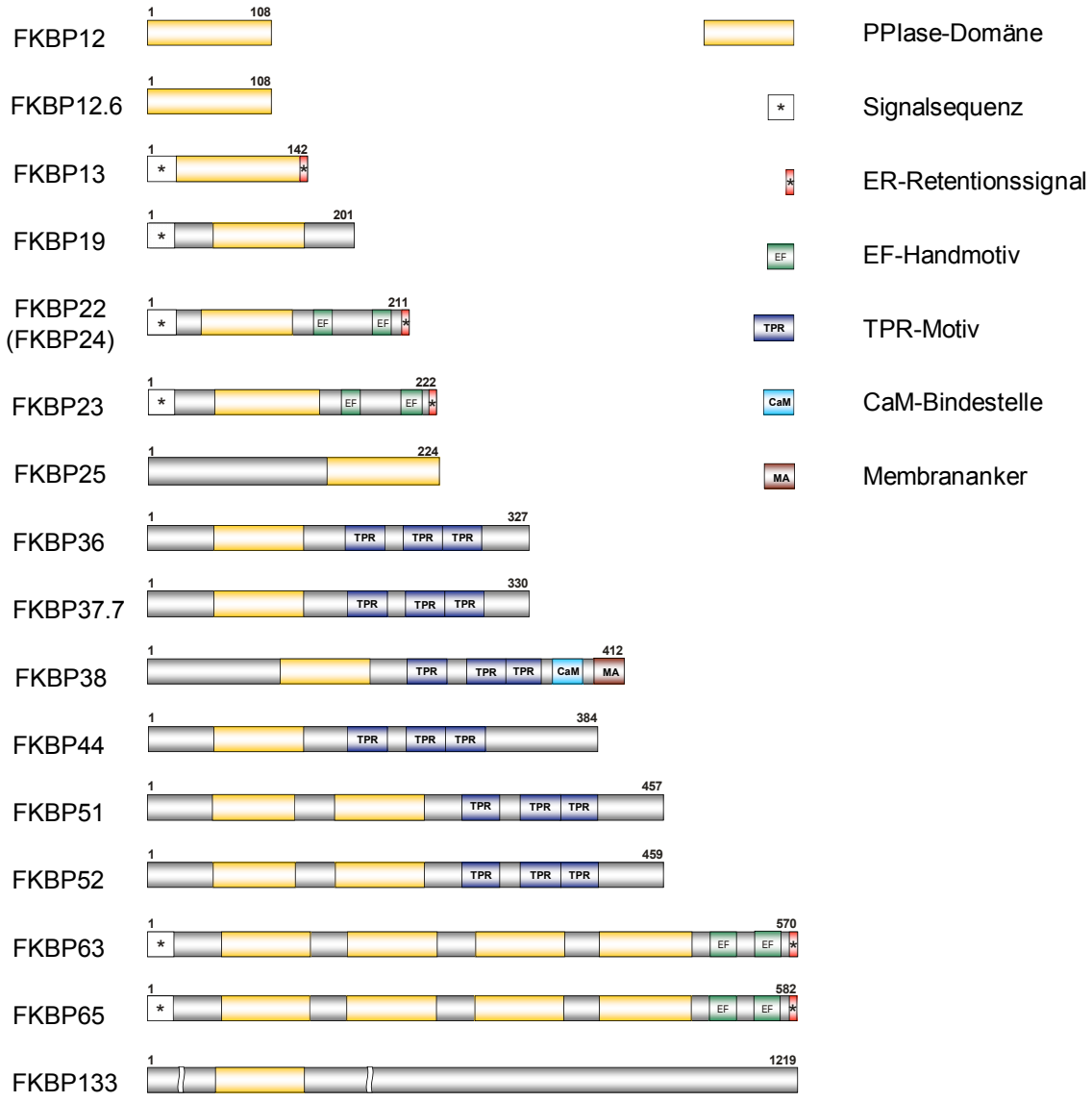


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung aller 16 humanen FKBP. Die zusätzlich zur PPIase-Domäne enthaltenen Domänen sind entsprechend gekennzeichnet.

Die meisten humanen FKBP enthalten neben der PPIase-Domäne noch weitere Domänen und werden daher auch als Multidomänen-FKBP bezeichnet. Einige Vertreter besitzen weitere, nicht identische PPIase-Domänen, wie beispielsweise FKBP52 oder FKBP65 [Callebaut *et al.*, 1992; Coss *et al.*, 1995]. Für diese Proteine wurde gezeigt, dass die katalytische Aktivität lediglich durch eine einzige PPIase-Domäne vermittelt wird [Pirkl *et al.*, 2001; Zeng *et al.*, 1998]. Weiterhin können die humanen FKBP Signal- und Transportsequenzen, sowie Retentionssignale für das endoplasmatische Retikulum, Transmembrandomänen oder EF-Handstrukturen zur Bindung von Calcium enthalten [Galat, 2003]. Neben den beschrieben Elementen enthalten humane FKBP noch Protein-Protein-Interaktionsstellen wie Calmodulinbindestellen oder TPR-Motive [Blatch & Lassle, 1999; Edlich *et al.*, 2005]. Dabei bilden drei TPR-Motive eine TPR-Domäne. FKBP37.7 weist ebenfalls eine solche eine TPR-Domäne auf.
Für nicht-humane FKBP sind darüber hinaus noch weitere Domänen bekannt. So besitzt beispielsweise das 21 kDa große, FKBP-ähnliche SlyD aus *E. coli*, sowie dessen Orthologe anderer Prokaryoten, eine so genannte *insert-in-flap*-Domäne (IF-Domäne) [Suzuki *et al.*, 2003; Weininger *et al.*, 2009]. Bei dieser IF-Domäne handelt es sich um eine 59-65 Aminosäuren umfassende Insertion zwischen den β-Faltblattsträngen D und E der PPIase-Domäne, für die eine Chaperon-Aktivität festgestellt werden konnte [Scholz *et al.*, 2006].

In der Familie der humane FKBP sind derzeit sechs Vertreter bekannt, welche TPR-Motive besitzen: FKBP36, FKBP37.7, FKBP38, FKBP44, FKBP51 und FKBP52, wobei bislang nur die TPR-Motive von FKBP51 und FKBP52 auf ihre Struktur hin untersucht werden konnten [Sinars *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004]. *Tetratricopeptide repeat*-Motive (TPR-Motive) sind Konsensus-sequenzen aus 34 degenerierten Aminosäuren [Blatch & Lassle, 1999; D'Andrea & Regan, 2003; Lamb *et al.*, 1995]. Durch Vergleiche vieler TPR-Motive konnten die folgenden acht Positionen: 4, 7, 8, 11, 20, 24, 27 und 32 innerhalb der 34 Aminosäuren bestimmt werden, welche das Motiv definieren [Sikorski *et al.*, 1990]. Diese Aminosäuren sind zwar ebenfalls nicht konserviert, allerdings deren Größe und Hydrophobizität. Für die übrigen Reste innerhalb der TPR-Motive wird vermutet, dass sie die funktionelle Spezifität definieren. Durch Sequenzvergleiche verschiedener TPR-Motive wurde festgestellt, dass TPR-Motive, welche eine Interaktion mit Hsp90 vermitteln, häufig eine Reihe kleiner, hydrophober und geladener Reste an jeweils der gleichen Position tragen [Blatch & Lassle, 1999].
Die Strukturanalyse verschiedener TPR-Motive zeigte, dass die 34 Aminosäuren zwei antiparallel verlaufende α-Helices (Helix A und B) bilden, welche über eine *loop*-Region miteinander verbunden sind [Das *et al.*, 1998; Gatto *et al.*, 2000; Scheufler *et al.*, 2000]. Die Anordnung der beiden Helices wird dabei durch hydrophobe Interaktionen zwischen den konservierten Aminosäuren bestimmt. Der Aufbau eines TPR-Motives ist exemplarisch für das erste TPR-Motiv der Protein-Phosphatase 5 (PP5) in Abbildung 1-5 dargestellt [Blatch & Lassle, 1999].

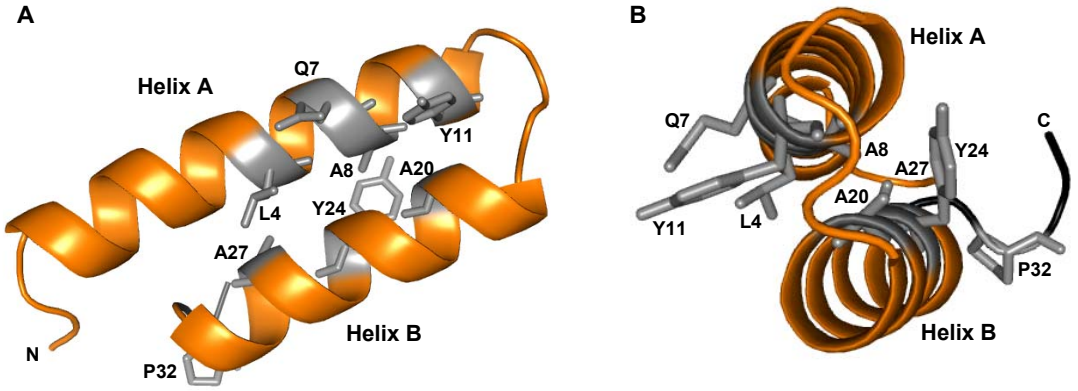


Abbildung 1-5: Aufbau eines TPR-Motives als Seitenansicht (A) und Rückansicht (B) der Helixachse. Exemplarisch dargestellt ist das erste TPR-Motiv der Protein-Phosphatase 5 (PP5) (PDB: 1A17). 34 Aminosäuren bilden zwei antiparallel verlaufende α-Helices, wobei die acht kennzeichneten Reste in Größe und Hydrophobizität konserviert sind. N- und C-Terminus sind mit N bzw. C gekennzeichnet.

Die meisten Proteine besitzen mehrere TPR-Motive. Bislang sind drei bis maximal 16 direkt aufeinander folgende oder durch kurze Einschübe getrennte Motive bekannt [Blatch & Lassle, 1999; Groves & Barford, 1999; Lamb *et al.*, 1995]. In Eukaryoten treten am häufigsten drei TPR-Motive in einer Domäne auf [D'Andrea & Regan, 2003]. Die TPR-Motive sind immer spezifisch organisiert. Jedes TPR-Motiv ist parallel zum nächsten angeordnet, so dass die Abfolge der einzelnen α-Helices immer antiparallel ist. Diese α-Helices sind jedoch alle in einem Winkel von 24 Grad gegeneinander verschoben, so dass eine rechtsgedrehte Superhelix entsteht. Diese bildet einen amphipathischen Kanal, dessen konkave Innenseite hauptsächlich durch die Seitenketten der Helix A gebildet wird [Blatch & Lassle, 1999; Das *et al.*, 1998]. Diese Innenseite der Superhelix bildet eine Tasche in die interagierende Proteine wie Hsp90 oder Hsp70 binden können. Diese Organisation kann für alle TPR-Motive beobachtet werden und ist in Abbildung 1-6 exemplarisch für die PP5 und für FKBP52 dargestellt.

TPR-Motive vermitteln Protein-Protein-Interaktionen in Multiproteinkomplexen mit einem oder mehreren Proteinen, wobei eine Beteiligung an den verschiedensten molekularen Prozessen wie Transkription, Zellzykluskontrolle, Proteintranslokation, Proteindegradation und Pathogenabwehr festgestellt wurde [Allan & Ratajczak, 2010]. Die bis heute wahrscheinlich am besten untersuchten Interaktionen von TPR-Motiv-enthaltenden Proteinen sind jene mit den molekularen Chaperonen Hsp70 und Hsp90 der Eukaryoten und deren Vorkommen in Steroidhormon-Rezeptorkomplexen [Buchner, 1999; Pratt *et al.*, 2004; Smith, 2004]. Der C-Terminus beider Chaperone beinhaltet die geladenen Aminosäuren EEVD, die mit den TPR-Domänen interagieren. Bislang konnten allerdings noch keine Strukturen von Hsp90 oder Hsp70 mit interagierenden Proteinen gelöst werden. Jedoch existieren Proteinstrukturen mit gebundenen Peptiden, welche die Aminosäuren EEVD enthalten [Cliff *et al.*, 2006; Scheufler *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2004]. Ein Beispiel ist in Abbildung 1-6, B für FKBP52 mit dem Pentapeptid MEEDV des Hsp90 dargestellt.

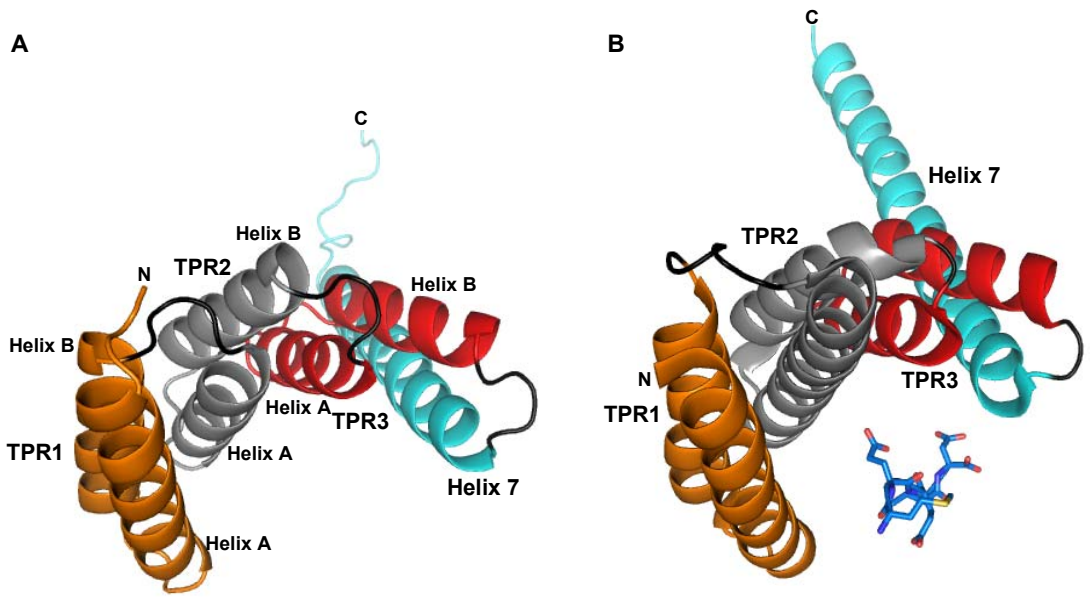


Abbildung 1-6: Aufbau der TPR-Domänen von PP5 (A) und FKBP52 (B). Jeweils drei TPR-Motive bilden eine rechtsgewundene Superhelix an deren Innenseite Peptide und Proteine binden können. FKBP52 ist mit dem Pentapeptid MEEDV (blau) dargestellt. In cyan ist jeweils die nicht mehr zu den TPR-Motiven gehörende Helix 7 hervorgehoben. N- und C-Terminus sind mit N bzw. C gekennzeichnet. Für die Darstellung der Strukturen wurden die PDB-Einträge 1A17 (PP5) und 1QZ2 (FKBP52) verwendet.

Durch verschiedene Experimente konnten die Aminosäurereste identifiziert werden, welche an der Bindung beteiligt sind [Brinker *et al.*, 2002; Russell *et al.*, 1999; Ward *et al.*, 2002]. Es handelt sich dabei um die Aminosäuren an den Positionen 5 und 9 im ersten TPR-Motiv, die Aminosäure an Position 6 im zweiten TPR-Motiv und die Aminosäuren an den Positionen 2 und 6 im dritten TPR-Motiv. Ein Austausch der zweiten Aminosäure des dritten TPR-Motives von FKBP37.7 führte zum teilweisen Verlust der Interaktion mit Hsp90 [Bell & Poland, 2000].
Weitere Bereiche außerhalb der TPR-Motive können ebenfalls an der Interaktion beteiligt sein und für die Spezifität der Bindung oder für eine stabile Interaktion notwendig sein [Barent *et al.*, 1998; Brinker *et al.*, 2002; Carrello *et al.*, 2004; Odunuga *et al.*, 2003; Ratajczak & Carrello, 1996; Scheufler *et al.*, 2000]. Im Falle von FKBP37.7 scheint die Interaktion ebenfalls über das dritte TPR-Motiv hinauszugehen, denn eine Deletion der 32 bzw. 19 C-terminalen Aminosäuren führten zum Verlust der Interaktion mit Hsp90 [Kazlauskas *et al.*, 2002; Meyer & Perdew, 1999].

Alle Vertreter der Hsp90-Familie bestehen aus drei Domänen und bildet unter physiologischen Bedingungen Homodimere, wobei die Dimerisierung essentiell für die Aktivität ist [Ali *et al.*, 2006; Immormino *et al.*, 2006; Itoh & Tashima, 1993; Nemoto *et al.*, 1997; Shiau *et al.*, 2006; Stebbins *et al.*, 1997; Wayne & Bolon, 2007]. Der Aufbau eines Dimers ist in Abbildung 1-7 zu sehen. Die N-terminale Domäne enthält eine tiefe Nukleotid-Bindetasche in welche ATP, aber auch ADP sowie die spezifischen Hsp90-Inhibitoren Geldanamycin oder Radicicol binden können und vermittelt die ATPase-Aktivität [Ali *et al.*, 2006; Prodromou *et al.*, 2000; Richter *et al.*, 2006; Roe

et al., 1999; Stebbins *et al.*, 1997]. Die Mitteldomäne ist ebenfalls direkt an der ATP-Hydrolyse beteiligt und spielt scheinbar eine entscheidende Rolle bei der Erkennung und Bindung von Substratproteinen [Fontana *et al.*, 2002; Hawle *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2004; Nemoto *et al.*, 1995].

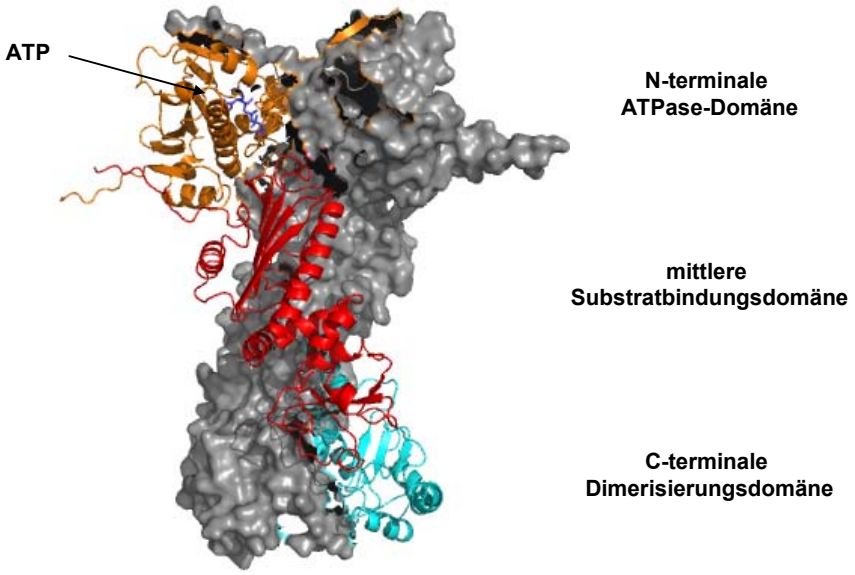


Abbildung 1-7: Darstellung des Hsp90 aus *Saccharomyces cerevisiae* (PDB: 2CG9). Von dem funktionellen Homodimer ist ein Monomer in der Oberflächendarstellung abgebildet (grau). Vom anderen Monomer sind die Sekundärstrukturelemente dargestellt, wobei die jeweiligen Domänen unterschiedlich gefärbt sind. Die N-terminale Domäne ist orange, die mittlere Domäne ist rot und die C-terminale Domäne ist in cyan hervorgehoben. Ebenfalls ist die Lage des ATP in der N-terminalen Domäne gezeigt (blau). Der geladene Linker zwischen N-terminaler und mittlerer Domäne ist nicht aufgelöst.

Die C-terminale Domäne von Hsp90 vermittelt die Dimerisierung der Monomere [Minami *et al.*, 1994; Nemoto *et al.*, 1995]. Die cytosolischen Hsp90-Varianten der Eukaryoten besitzen zudem eine Verlängerung der C-terminalen Domäne, welche das MEEVD-Motiv trägt [Wandinger *et al.*, 2008]. Somit sind nur die cytosolischen, eukaryotischen Hsp90-Proteine in der Lage mit TPR-Motiv-enthaltenden Proteinen zu interagieren. Von der Verlängerung der C-terminalen Domäne konnte bislang aber keine Struktur gelöst werden.

1.2.2. Funktionen der FK506-bindenden Proteine

Die Bedeutung der FKBP, insbesondere bei der Proteinfaltung, ist bislang kaum verstanden. Zwar sind die Proteine dieser Familie ubiquitär verbreitet und evolutionär hoch konserviert, dennoch konnte bislang nicht für alle Vertreter eine PPIase-Aktivität oder eine FK506-Bindung nachgewiesen werden [Jarczowski *et al.*, 2008; Linnert *et al.*, 2012b]. Dagegen konnten spezielle zelluläre Funktionen einzelner FKBP in höheren Eukaryoten bereits aufgeklärt werden. Die

Deletion von FKBP12 führt beispielsweise in Mäusen zu schweren Herzmuskeldefekten, was mit einer morphologischen Veränderung des mit FKBP12-assoziierten Calcium-Kanals RyR1 in Verbindung gebracht wird [Shou *et al.*, 1998]. Weiterhin führt die Deletion von FKBP36 bei männlichen Mäusen zu Infertilität, was auf einen Defekt bei der Spermatogenese zurückgeführt wird [Crackower *et al.*, 2003]. Es wird angenommen, dass das mit Hsp72 interagierende FKBP36 an der Meiose beteiligt ist [Dix *et al.*, 1997; Jarczowski *et al.*, 2008]. Nachgewiesene Mutationen im Gen für FKBP44 konnten mit einer Fehlentwicklung des Pigmentepithels der Netzhaut assoziiert werden, was zum Krankheitsbild der Leberschen kongenitalen Amaurose und damit meist zu Blindheit führt [Sohocki *et al.*, 2001]. Die genaue Funktion von FKBP44 bei der Entwicklung des Pigmentepithels konnte allerdings bislang noch nicht aufgeklärt werden. Für weibliche, FKBP52-defiziente Mäuse wurde festgestellt, dass diese unfruchtbar sind. Die Unfruchbarkeit wird auf eine gestörte Signaltransduktion durch den Progesteron-Rezeptor zurückgeführt, welcher mit FKBP52 assoziiert vorliegt [Tranguch *et al.*, 2005]. Trotz ihrer offensichtlich wichtigen, zellulären Funktionen konnte für FKBP36 und FKBP44 bislang aber keine PPIase-Aktivität nachgewiesen werden. Eine weitere interessante Beobachtung wurde mit der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gemacht. Dabei führte die Deletion aller vier vorkommenden FKBP dennoch zu lebensfähigen Zellen deren Phänotypen nur die Additionseffekte der Einzeldeletionen zeigten [Dolinski *et al.*, 1997].

Aufgrund dieser Beobachtungen scheint eine Beteiligung der FKBP an unterschiedlichen, individuellen Signaltransduktionsprozessen wahrscheinlicher als eine generelle, essentielle Beteiligung bei der Proteinfaltung [Gothel & Marahiel, 1999].

1.3. Zielstellung der Arbeit

Aufgrund fehlender Strukturdaten für FKBP37.7 wird das Protein bislang nur anhand von Sequenzvergleichen der FKBP-Familie der PPIasen zugeordnet. FKBP37.7 besteht aus einer N-terminal gelegenen putativen PPIase-Domäne vom FKBP-Typ und einer C-terminal gelegenen TPR-Domäne. Protein-Protein-Interaktionen konnten bislang nur für die TPR-Domäne nachgewiesen werden, wohingegen über die putative PPIase-Domäne kaum etwas bekannt ist.
In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Funktion der PPIase-Domäne näher charakterisiert werden. Dafür sollten unterschiedliche FKBP37.7-Varianten rekombinant hergestellt und auf PPIase-Aktivität, sowie deren Fähigkeit zur FK506-Bindung, untersucht werden. Gegebenenfalls sollte auch der Einfluss etwaiger eukaryotischer, posttranslationaler Modifikationen auf die PPIase-Aktivität und die FK506-Bindung geklärt werden, indem FKBP37.7 in humanen Zellen hergestellt und daraus gereinigt wird. Im Falle einer nicht nachweisbaren katalytischen Aktivität sollte durch die Aufklärung der Proteinstruktur der PPIase-Domäne untersucht werden, ob es sich bei dem vorliegenden Protein tatsächlich um eine PPIase-Domäne vom FKBP-Typ handelt. Mit den gewonnenen Erkenntnissen sollten dann weitere Untersuchungen zu möglichen Regulations-mechanismen der PPIase-Aktivität angestellt oder ein Grund für die fehlende Aktivität ermittelt werden. Außerdem sollte die putative PPIase-Domäne auf die Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen hin untersucht werden.

2. Material & Methoden

2.1. Material

Chemikalien/ Verbrauchsmaterialien	Hersteller/ Vertreiber
Anti-FLAG M2 *Affinity* Agarose	Sigma Aldrich
Antibiotika	AppliChem
^{15}N-Ammoniumchlorid	EURISO-TOP
APS	Merck
ATP	Sigma Aldrich
Benzonase	Novagen
CHAPS	Roth
Chromatographiematerial: Fractogel-EMD-DEAE-650(M)	Merck
Chromatographiematerial: Fractogel-EMD-Propyl-650(M)	Merck
Chromatographiematerial: GSH-Sepharose	GE Healthcare
Chromatographiematerial: Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Chromatographiematerial: Q-Sepharose	GE Healthcare
Chromatographiesäule: HiLoad Superdex 75 HR 16/60	GE Healthcare
Chromatographiesäule: HiLoad Superdex 200 HR 16/60	GE Healthcare
Coomassie R250, Coomassie G250	Serva
CsA	LC Laboratories
CsA-Derivat: [O-Carboxymethyl-D-Ser^{8}]-CsA	M. Theuerkorn
Dialysemembran: Servapor	Serva
dNTPs	Fermentas
DMSO	Merck
DryStrip Cover Fluid	GE Healthcare
DTT	AppliChem
EDTA	Roth
Ethylenglycol	Merck
FK506	LC Laboratories
FK506-Affinitätsmatrix und Kontrollmatix	M. Theuerkorn
FK506-Derivat MT-10	M. Theuerkorn
^{13}C-Glukose	EURISO-TOP
GSH	Sigma Aldrich
Hefeextrakt	Becton Dickinson
Imidazol	Roth

Chemikalien/ Verbrauchsmaterialien	Hersteller/ Vertreiber
IPTG	AppliChem
IPG-Streifen	GE Healthcare
Küvetten: Einweg aus Polystyrol	Roth
Küvetten: Quarzglasküvetten aus SUPRASIL	Hellma
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Nitrocellulosemembran	Pall Corporation
Nonidet P-40	AppliChem
Oligonukleotide: *Primer* für Klonierungen und Mutagenesen	MWG Eurofins
Oligonukleotid: Oligo$(dT)_{18}$	Fermentas
Peptid: Abz-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA	Bachem
Peptid: Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA	Bachem
Peptid: Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (FLAG-Peptid)	G. Jahreis
PonceauS-Lösung	Serva
Pharmalyte 3-10	GE Healthcare
Phosphataseinhibitoren: Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	Sigma Aldrich
PMSF	Sigma Aldrich
PVDF-Membran	Roth
Proteaseinhibitoren: Halt Protease Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific
Proteaseinhibitoren: Complete Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free	Roche
Rapamycin	LC Laboratories
Reswelling Tray	GE Healthcare
Rotiphorese Gel 30 (37,5: 1)	Roth
Silbernitrat	VWR
Strip Holder	GE Healthcare
SYBR Safe DNA gel stain	Invitrogen
TCEP-HCl	Thermo Scientific
TEMED	Roth
TFE	Fluka
Trizol	Invitrogen
Trypton	Fluka
Tween-20	Serva
VivaSpin-Konzentratoren	Sartorius

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem, Merck, Roth, Serva oder Sigma Aldrich bezogen mit dem Reinheitsgrad *pro analysis* bezogen.

Reagenzienzusammenstellungen (*Kits*)	**Hersteller /Vertreiber**
Plasmid Mini Kit	Qiagen
Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Chemiluminescence Detection Kit for Horseradish Peroxidase	Applichem

Molekulargewichtsstandards	**Hersteller /Vertreiber**
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas
PageRuler Unstained Protein Ladder	Fermentas
Proteom Marker	Serva

Antikörper (Bestellnummer)	**Hersteller/ Vertreiber**	**Ursprung**	**Titer**
Anti-Penta-Histidin (34660)	Qiagen	Maus	1:500-1:1000
Anti-FLAG M2 (F1804)	Sigma Aldrich	Maus	1:1000
Anti-FKBP37.7 (HPA004063)	Sigma Aldrich	Kaninchen	1:200-1:1000
Anti-Aktin (A2066)	Sigma Aldrich	Kaninchen	1:100
Anti-FKBP12 (PA1-026A)	Thermo Scientific	Kaninchen	1:500
Anti-FKBP51 (sc-13983)	Santa Cruz	Kaninchen	1:500
Anti-FKBP52 (SA-136)	Biomol	Kaninchen	1:500
Anti-FKBP36	pab Productions	Kaninchen	1:500
Anti-Hsp90 (SPA-835)	Stressgen	Ratte	1:1000
Anti-Tubulin (T9026)	Sigma Aldrich	Maus	1:1000
Anti-Dynein (MAB1618)	Millipore	Maus	1:500
Anti-Mouse (A5906)	Sigma Aldrich	Schaf	1:3000
Anti-Kaninchen IgG (A0545)	Sigma Aldrich	Ziege	1:4000
Anti-Rat (A9037)	Sigma Aldrich	Ziege	1:1000

Kulturmedien/ Verbrauchsmittel für humane Zellkultur	**Hersteller /Vertreiber**
Earle´s MEM	Biochrom
FCS	PAA
DMEM	PAA
Glutamin	PAA
G-418 (Geneticin)	Biochrom
Lipofectamine2000	Invitrogen

OPTIMEM (Serumfreies Medium)	Gibco
RPMI	PAA
Trypsin	PAA
Zellkulturflaschen- und Platten	TPP

Bakterienstamm	Genotyp	Bezugsquelle
DH5α	*supE*44 Δ*lac*U169 (ϕ80 *lacZ*ΔM15) *hsdR*17 *recA*1 *endA*1 *gyrA*96 *thi*-1 *rel*A1	Novagen
BL21 (DE3)	*hsd*S_B (r_B^- m_B^-) *gal dcm* (λcI*ts*857 *ind*1 *Sam*7 *nin*5 *lac*UV5-T7 gene*1*)	Stratagene
Rosetta (DE3)	F– *ompT hsdS*$_B$ (r_B^- m_B^-) *gal dcm* (DE3) pRARE^2 (Cam^R)	Novagen

Plasmide	Bezugsquelle
pCMV-Tag 2B	Stratagene
pGEX-5X-1	GE Healthcare
pET-30a(+)	Novagen
pET-28a(+)	Novagen

vorhandene Expressionsplasmide	Vektor	Restriktions-schnittstellen	Bezugsquelle
FKBP37.7$^{1-330}$	pET-30a(+)	*Nde*I, *Hin*dIII	A.-K. Paschke, MPF
His$_6$-FKBP37.7$^{1-330}$	pET-28a(+)	*Eco*RI, *Hin*dIII	A.-K. Paschke, MPF
GST-FKBP37.7$^{1-330}$	pGEX-5X-1	*Eco*RI, *Xho*I	A.-K. Paschke, MPF
FKBP37.7$^{1-170}$	pET-30a(+)	*Nde*I, *Hin*dIII	A.-K. Paschke, MPF
His$_6$-Hsp90α$^{628-732}$	pET-28a(+)	*Eco*RI, *Xho*I	F. Jarczowski, MPF
His$_6$-Hsp90β$^{620-724}$	pET-28a(+)	*Eco*RI, *Hin*dIII	A.-K. Paschke, MPF

Proteine und Enzyme	Hersteller/ Bezugsquelle
Benzonase	Novagen
BSA für die Molekularbiologie	New England Biolabs
BSA	Sigma Aldrich
α-Chymotrypsin	Sigma Aldrich
Citrat-Synthase (Schweineherz)	Sigma Aldrich
Cyp18	F. Erdmann, MPF
Deep Vent DNA Polymerase mit *ThermoPol reaction Buffer*	New England Biolabs
FKBP12	H. Ungar, MPF; S. Wetzel, MPF

FKBP51	H. Ungar, MPF
FKBP52	H. Ungar, MPF
GST	S. Pösel, MPF
Restriktionsendonukleasen mit Reaktionspuffern	New England Biolabs
RevertAid Reverse Transcriptase mit *RevertAid Reverse Transcriptase reaction buffer*	Fermentas
RCM-T1	S. Roß, MPF
T4 DNA Ligase mit *T4 DNA Ligase Reaction Buffer*	New England Biolabs

Bei allen im Verlauf dieser Arbeit verwendeten FKBP und Hsp90 handelt es sich, wenn nicht anders gekennzeichnet, um humane Proteine.

Kulturmedien für *E. coli*	**Zusammensetzung**
LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl pH 7,0
LB-Agar Platten	1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium
2YT-Medium	16 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl pH 7,0
SOC-Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM Glukose pH 7,0
M9-Minimalmedium	12,8 g/l Na_2HPO_4, 3 g/l KH_2PO_4, 1 g/l NH_4Cl, 0,5 g/l NaCl, 2 mM $MgSO_4$, 4 g/l Glukose, 0,1 mM $CaCl_2$

Puffer und Lösungen	**Zusammensetzung**
Zelllysispuffer 1	1xTBS, 1 mM EDTA, 0,1 % NP40, 2 % Glycerin, 1,5 mM $MgCl_2$, Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche), Benzonase, Phosphatase-inhibitor-Cocktail
Zelllysispuffer 2	MENG-Puffer, 10 mM Na_2MoO_4, 50 mM EDTA, 0,1 % Nonidet P40, 1,5 mM $MgCl_2$, Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche), Benzonase und Phosphataseinhibitor-Cocktail
MENG-Puffer	25 mM MOPS, 2 mM EDTA, 0,02 % Natriumazid, 10 % Glycerin pH 7,5
1 x TBS	50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl
Kanamycin	25 mg/ml Kanamycin in H_2O
Ampicillin	100 mg/ml Ampicilin in H_2O
Chloramphenicol	34 mg/ml Chloramphenicol in Ethanol
Tetracyclin	5 mg/ml Tetracyclin in Ethanol
G-418	50 mg/ml in H_2O
1 x PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na_2HPO_4, 1,47 mM KH_2PO_4 pH 7,4
Trenngelpuffer	1,8 M Tris pH 8,8

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Sammelgelpuffer	1,25 M Tris pH 6,8
1 x SDS-Probenpuffer	0,08 M Tris pH 6,8, 2 mM SDS, 2 % Glycerin (v/v), 0,25 % β–Mercaptoethanol (v/v), 0,05 mM Bromphenolblau
1 x SDS-Laufpuffer	25 mM Tris pH 8,8, 192 mM Glycin, 3,5 mM SDS
Coomassie-Färbelösung	0,2 % (w/v) Coomassie R250, 0,05 % (w/v) Coomassie G250, 10 % (v/v) Essigsäure, 30 %(v/v) Methanol, 17,5 % (v/v) Ethanol
Coomassie-Entfärbelösung	45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Rehydrierungspuffer	8 M Harnstoff, 2 % CHAPS, 0,5 % Pharmalyte 3-10, 0,002 % Bromphenolblau, 18 mM DTT
Equilibrierungspuffer	75 mM Tris pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30 % Glycerin, 6 % SDS, 0,002 % Bromphenolblau
1 x TBST	137 mM NaCl, 20 mM Tris, 0.1 % Tween-20 pH 7,6
1 x TAE-Puffer	40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure pH 8,0
Standard 7-Puffer	10 mM HEPES, 1,5 mM $MgCl_2$, 150 mM KCl pH 7,8

2.2. Methoden

2.2.1. Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1. Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung der *E. coli* erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in Kulturröhrchen mit 5 ml LB-Medium. Dazu wurden den Röhrchen entsprechende Mengen benötigter Antibiotika zugesetzt und über Nacht im Inkubationsschüttler bei 37 °C und 220 rpm inkubiert.

Für die präparative Anzucht von *E. coli* für die spätere Proteinreinigung wurden Vorkulturen mit drei mal 200 ml Medium und Antibiotikum aus einer Glycerinkultur oder einem Transformationsansatz angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden sechs mal 1 l Medium in 2,5 l-Schikane-Kolben mit je 100 ml Vorkultur angeimpft und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von OD_{600}= 0,6-0,8 bei 140 rpm kultiviert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,5 mM IPTG und eine weitere Kultivierung für 2,5 bis 4 h. Die Zellen wurden anschließend für 15 min bei 4 °C und 4900 x g in einer Sorvall RC-5B Plus Zentrifuge mit SLA-3000 Rotor sedimentiert. Die Lagerung erfolgte bis zur Weiterbearbeitung bei -80 °C.

2.2.1.2. Herstellung von Glycerinkulturen

Zur Langzeitlagerung von transfizierten *E. coli* wurden Glycerinkulturen angelegt. Dafür wurden 300 µl steriles Glycerin (87 % (v/v)) mit 700 µl einer entspechend gewachsenen Übernachtkultur gemischt und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.2.1.3. Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* des entsprechenden Bakterienstammes wurden 50 ml LB-Medium mit 5 ml einer entsprechenden Übernachtkultur angeimpft und bis zum Erreichen einer optischen Dicht von OD_{600}= 0,4-0,6 bei 37 °C kultiviert. Die Zellen wurden danach für 10 min bei 3500 x g und 4 °C sedimentiert, das dabei erhaltene Zellpelett in 20 ml 0,1 M $CaCl_2$ resuspendiert und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Wiederholung des Zentrifugationssschrittes wurde das Pelett in 5 ml 0,1 M $CaCl_2$ gelöst, mit 900 µl Glycerin (87% (v/v)) versetzt und in Aliquot mit jeweils 50 µl bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.2.1.4. Transformation von *E. coli*

Ein Aliquot der chemisch kompetenten Zellen wurde mit 1 µl eines Ligationsansatzes oder etwa 20 µg Plasmid-DNA gemischt und 1 h auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 45 s einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt und anschließend für 2 min auf Eis weiter inkubiert. Diesen Zellen wurden 400 µl SOC-Medium zugegeben und anschließend für weitere 45 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 200 µl dieser Bakteriensuspension auf einer Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

2.2.1.5. Kultivierung humaner Zellen

Die humane Zelllinie WI-38 wurden von ATCC bezogen. Alle anderen Zelllinien wurden von der DSZM in Braunschweig bezogen. Die Kultivierung aller Zellen erfolgt steril im angegeben Medium mit der jeweils benötigten Konzentration an CO_2 bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit. Zusätzlich enthielten allen Medien 10 % FCS und 2 mM Glutamin.

Tabelle 2-1: Beschreibung und Kulturbedingungen der verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Beschreibung	Kultivierung
Jurkat [Schneider *et al.*, 1977]	immortalisierte humane T-Zelllinie aus dem periphären Blut eines Jungen mit akuter lymphoblastischer Leukämie	- Suspensionszellen - RPMI, 5 % CO_2
HEK293 [Graham *et al.*, 1977; Knowles *et al.*, 1980]	Transformationsprodukt einer embryonalen, humanen Nierenzelle mit Teilen der DNA des Adenovirus 5	- adherente Zellen - DMEM, 5 % CO_2
HepG2 [Aden *et al.*, 1979]	immortalisierte Zelllinie aus dem Tumorgewebe eines Jungen mit Leberzellkarzinom	- adherente Zellen - RPMI, 5 % CO_2

Zelllinie	Beschreibung	Kultivierung
SH-SY5Y [Biedler *et al.*, 1973]	dreimal klonierte Subzelllinie der Neuroblastomzelllinie SK-N-SH, aus dem Knochenmark eines vierjährigen Mädchens mit metastasierendem Neuroblastom	- adherente Zellen - DMEM, 10 % CO_2
HeLa [Scherer *et al.*, 1953]	immortalisierte humane Zelllinie aus epithelialem Gebärmutterhalskrebs, hervorgerufen durch das Papillomavirus 18	- adherente Zellen - DMEM, 5 % CO_2
HT-29 [von Kleist *et al.*, 1975]	humane immortalisierte Epithelzelllinie aus einem Adenokarzinom Typ 1 des Dickdarm	- adherente Zellen - DMEM, 5 % CO_2
WI-38 [Hayflick & Moorhead, 1961]	human diploide Zelllinie aus normalem, embryonischem Lungengewebe	- adherente Zellen - Earle´s MEM, 5 % CO_2
MCF-7 [Soule *et al.*, 1973]	immortalisierte humane Brustkrebszelllinie eines metastasierenden Mammakarzinoms; cytoplasmatische Estrogen-Rezeptoren positiv	- adherente Zellen - RPMI, 5 % CO_2, 10 µg/ml Insulin

Das Medium der Zellen wurde alle zwei bis drei Tage erneuert. Bei adherent wachsenden Zellen wurde dafür das Medium abgesaugt, die Zellen mit auf 37 °C temperiertem 1 x PBS gewaschen und anschließend mit neuem, temperiertem Medium versetzt. Die Suspensionszellen wurden 5 min bei 1000 x g und RT zentrifugiert. Das Pelett wurde anschließend mit temperiertem 1 x PBS gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt in neuem, temperiertem Medium resuspendiert.

Zum Aufteileilen der adherent wachsenden Zellen wurden diese für etwa 5 min mit 0,5 mg Trypsin behandelt, anschließend in frischem, temperiertem Medium resuspendiert und 5 min bei 1000 x g und RT pelletiert. Das Pelett wurde erneut mit temperiertem 1 x PBS gewaschen und dann ein Teil der Zellen in neuem Medium weiter kultiviert. Das Aufteileilen der Suspensionszellen erfolgt analog zum Wechsel des Mediums, allerdings wurde dann nur ein Teil der Zellen weiter kultiviert.

2.2.1.6. Transfektion immortalisierter humaner Zellen

Zur Transfektion der humanen Zellen wurde in dieser Arbeit die Methode der Lipofektion mit *Lipofectamine 2000* gewählt. Dafür wurden 2 µg Plasmid-DNA und 5 µg *Lipofectamine 2000* mit 500 µl Serumfreiem Medium (OPTIMEM) gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde dieses Gemisch auf die Zellen gegeben, welche sich in 2 ml serumfreiem Medium befanden. Nach 24 h wurde das Trasfektionsmedium entfernt und durch frisches, der Zelllinie entsprechendes Medium ersetzt. Zur Erzeugung stabiler Zelllinien wurde dem Medium zusätzlich ein entsprechendes Antibiotikum beigefügt.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1. Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation geringer Mengen Plasmid-DNA wurde diese aus einer 5 ml Übernachtkultur mit dem *QIAGEN Plasmid Mini Kit* nach den Angaben des Herstellers isoliert. Die Elution erfolgte mit 50 µl H_2O.

Zur Präpation größerer Mengen Plasmid-DNA von Vektoren für die Klonierung oder für die Transfektion von humanen Zellen wurden 150 ml einer Übernachtkultur verwendet und mit dem *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* nach den Angaben des Herstellers isoliert. Die Elution erfolgte mit 10 mM Tris pH 7,5. Wenn nötig, wurde das Volumen der Elution im Stickstoffstrom verringert.

2.2.2.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der expotentiellen Vervielfältigung eines definierten DNA-Bereiches. Dieser Bereich wird am 3´- und am 5´-Ende jeweils durch die gewählten Sequenzen der dem *Template* komplementären Oligonukleotide (*Primer*) festgelegt. Angrenzend an diese Sequenzen können zusätzlich Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen eingefügt werden [Mullis & Faloona, 1987]. Alle Reaktionen wurden in sterilen 0,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Dabei enthielt ein PCR-Ansatz 10-100 ng Template-DNA oder 3 µl cDNA, jeweils 10 nmol dNTPs, jeweils 50 pmol Olignukleotide zur Bindung an das 5´-Ende und das 3´-Ende, und 1 Unit *Deep Vent DNA Polymerase* in 30 µl *ThermoPol reaction Buffer*. Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte dabei im einem *Thermo Cycler* standardmäßig nach folgendem Programm:

Tabelle 2-2: Programm für die Polymerasekettenreaktion.

Schritt	Syntheseschritt	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung der Template-DNA	96 °C	5 min
2	Denaturierung der Template-DNA	96 °C	1,5 min
3	Anlagerung der Oligonukleotide (*Annealing*)	65-70 °C	1,5 min
4	Synthese der DNA (*Elongation*)	76 °C	1-2,5 min
5	Vollständiges Beenden der Synthese	76 °C	5 min
6	Lagerung bis zur weiteren Vewendung	4 °C	unbegrenzt

Die Schritte zwei bis vier wurden in 32 Zyklen durchlaufen. Die Dauer der Elongation richtete sich nach der Größe der zu bildenden Fragmente. Die Synthese von 1000 bp wurde dabei mit einer Dauer von 1 min veranschlagt. Die gebildeten PCR-Fragmente wurden anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt und deren Größe anhand eines mitgeführten Größenstandards überprüft. Die PCR-Fragemente wurden danach mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* laut den Angaben des Herstellers aus dem Gel isoliert.

2.2.2.3. Restriktionsverdau

Durch die Verwendung von Restriktionsendonukleasen wurden Plasmid-DNA (Vektor) und PCR-Produkte (Insert) geschnitten, und somit geeignete Enden der DNA für die folgende Ligation erzeugt. Die Bedingungen der Reaktionen richteten sich nach den Empfehlungen des Herstellers für die jeweiligen Enzyme. Ein typischer Reaktionsansatz mit einem Volumen von 20 µl enthielt etwa 1,8 µg Plasmid-DNA oder 15 µl PCR-Produkt, jeweils 15 Units der beiden Restriktionsenzyme, und entsprechend der geforderten Bedingungen 0,2 µg BSA im angegebenen Puffer. Der Verdau erfolgte meist für 2 h bei 37 °C. Danach wurde die verdaute Plasmid-DNA im Agarosegel aufgetrennt und anschließend mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* wieder daraus isoliert. Verdaute PCR-Produkt wurden mit Hilfe des *High Pure PCR Product Purification Kit* aufgereinigt.

2.2.2.4. Ligation von DNA-Fragmenten

Hierbei wurde das geschnittene PCR-Produkt in den jeweiligen, geschnittenen Vektor enzymatisch eingefügt. Ein typischer Ligationsansatz mit einem Volumen von 20 µl enthielt circa 50-150 ng Vektor-DNA, den dreifachen molekularen Überschuss an Insert-DNA und 160 Units T4-DNA-Ligase in *T4 DNA Ligase Reaction Buffer*. Die Reaktion erfolgte für 1 h bei 22 °C oder über Nacht bei 16 °C. Anschließend wurde die Reaktion für 13 min bei 65 °C abgestoppt.

2.2.2.5. Ortsgerichtete Mutagenese

Durch diese Methode wurden einzelne oder mehrere Basen in der bereits fertig klonierten Plasmid-DNA ausgetauscht. Die Reaktionen wurden nach den Angaben des Herstellers mit Hilfe des *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* durchgeführt. Der vollständige Reaktionsansatz wurde anschließend für die Transformation in *E. coli* verwendet. Bei einigen Mutagenesen wurde die DNA vor der Transformation mit Hilfe des *High Pure PCR Product Purification Kit* gereinigt.

2.2.2.6. Kolonie-PCR

Nach der abgeschlossenen Klonierung und der erfolgreichen Transformation in *E. coli* wurden Einzelkolonien ausgewählt und auf das Vorhandensein der insertierten DNA überprüft. Dazu wurden die Einzelkolonien über Nacht in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum kultiviert. An nächsten Tag wurden 10 µl der Kultur steril entnommen, mit 40 µl H_2O versetzt und 5 min bei 96 °C gekocht. Diese Lösung diente nun als Template für die nachfolgende PCR, welche, wie in Abschnitt 2.2.2.2. beschrieben, durchgeführt wurde. Dabei enthielt ein Ansatz der Kolonie-PCR 5 µl Template-DNA-Lösung, jeweils 8,4 nmol dNTPs, jeweils 25 pmol Olignukleotide und 0,5 Units *Deep Vent DNA Polymerase* in 25 µl *ThermoPol reaction Buffer*. Anschließend wurden alle Proben im Agarosegel analysiert. Nach der erfolgreichen Kolonie-PCR wurde die Plasmid-

DNA aus der verbleibenden Bakteriensuspension präpariert (Abschnitt 2.2.2.1.) und durch die Firma MWG Operon, München sequenziert.

2.2.2.7. Isolation der Gesamt-RNA aus Zellen und Synthese von cDNA

Zur Isolation der RNA wurden circa 5 x 10^6 Zellen in 0,5 ml Trizol resuspendiert und anschließend mit 100 µl Chloroform versetzt. Die Lösungen wurden durch mehrfaches Invertieren gemischt, 3 min bei RT inkubiert und 15 min bei 4 °C und 13.600 x g zentrifugiert. Dabei konnte die obere, wässrige Phase von der unteren, organischen Phase getrennt werden. Die obere, Nukleinsäuren-enthaltende Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 250 µl Isopropanol versetzt. Nach dem Invertieren wurde erneut für 10 min bei RT inkubiert und anschließend 15 min bei 4 °C und 13600 x g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pelett mit 500 µl 75 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das vollständig getrocknete Pellet wurde in 25 µl DEPC-behandeltem H_2O für 10 min in einem Thermoschüttler bei 900 rpm gelöst. Zur Synthese der cDNA enthielt ein Reaktionsansatz mit einem Volumen von 25 µl, 1,2 µg isolierte RNA, jeweils 12,5 nmol dNTPs, 0,5 µg Oligo$(dT)_{18}$, und 60 Units *RevertAid Reverse Transcriptase* in *RevertAid Reverse Transcriptase buffer*. Die Synthese erfolgte für 60 min bei 42 °C und abschließend für 10 min bei 72 °C.

2.2.2.8. Hergestellte Überexpressionsplasmide

Tabelle 2-3: Durch Klonierung hergestellte Expressionsplasmide. [1)] Dieses Konstrukt wurde durch die Mutation des Tripletts der Aminosäure 167 zu einem Stopcodon hergestellt. [2)] Dieses Konstrukt wurde durch eine Kombination von zwei Mutageneseschritten und einem Klonierungsschritt hergestellt. Eine ausführliche Erläuterung folgt im Anschluss an die Tabellen.

hergestelltes Konstrukt	Vektor/ Plasmid	Template-DNA für die PCR	verwendete Primer (Nr.)
FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$	pCMV-Tag 2B	FKBP37.7$^{1-330}$ in pET-30a(+)	1/ 8
GST-FKBP37.7$^{11-158}$	pGEX-5X-1	FKBP37.7$^{1-330}$ in pET-30a(+)	2/ 6
FKBP37.7$^{170-330}$	pET-30a(+)	FKBP37.7$^{1-330}$ in pET-30a(+)	4/ 9
GST-FKBP37.7$^{170-330}$	pGEX-5X-1	FKBP37.7$^{1-330}$ in pET-30a(+)	5/ 9
His_6-Hsp90β$^{1-724}$	pET-28a(+)	cDNA aus HEK 293-Zellen	10/ 11
[1)]FKBP37.7$^{1-166}$	FKBP37.7$^{1-170}$ in pET-30a(+)	-	12/ 13
[2)]FKBP37.7$^{1-166\Delta 100-144}$ (FKBP37.7$^{1-99-GDG-145-166}$)	FKBP37.7$^{1-166}$ in pET-30a(+)	FKBP37.7$^{1-166}$ in pET-30a(+)	14/ 15/ 3/ 7/ 16/ 17

Tabelle 2-4: Verwendete Oligonukleotide für Klonierungen und Mutagenesen.

Nr.	Primername	Sequenz in 5´-3´-Orientierung
1	37.7_1-_EcoR1_f	CGTCTCGAATTCATGGCGGATATCATC
2	37.7_11-_EcoRI_f	GATCGAGAATTCGACGGGATCCAAAAA
3	37.7_+G_145-_NheI_f	GTGCTAGCTAGCGGCCCCCAGCCCCTCATC
4	37.7_170-_NdeI_f	GATCGACATATGACAGACGAAGAGAAG
5	37.7_170-_EcoRI_f	GATCGAGAATTCATGACAGACGAAGAG
6	37.7_-158_XhoI_r	GATCGACTCGAGTCACTCCACCTTCAGCAT
7	37.7_-166_HindIII_r	GATCAGAAGCTTTCAGTCCTGCTGGTACGT
8	37.7_-330_HindIII_r	GATCAGAAGCTTTCAATGGGAGAAGAT
9	37.7_-330_XhoI_r	GTAGCACTCGAGTCAATGGGAGAAGATCCC
10	HSP90_1-_NdeI_f	GATCGACATATGCCTGAGGAAGTGCAC
11	HSP90_-724_Not_r	GTCAGAGCGGCCGCCTAATCGACTTCTTC
12	Mu37.7_P167Stop_f	CACGTACCAGCAGGACTAATGGGCCATGTGAG ACG
13	Mu37.7_P167Stop_r	CGTCTCACATGGCCCATTAGTCCTGCTGGTACG TG
14	Mu37.7_LV100/101NheI_f	GCATGTGGTCCTGTACCCGGCTAGCGCCAAGAG TCTCCGC
15	Mu37.7_LV100/101NheI_r	GCGGAGACTCTTGGCGCTAGCCGGGTACAGGA CCACATGC
16	Mu37.7_NheI100/101GD_f	CCTGTACCCGGGTGACGGCCCCCAGCCCC
17	Mu37.7_NheI100/101GD_r	GGGGCTGGGGGCCGTCACCCGGGTACAGG

Für die Herstellung von FKBP37.7$^{1-166\Delta100-144}$ wurde vom Expressionsplasmid für FKBP37.7$^{1-166}$ ausgegangen. Zuerst wurden die Tripletts der Aminosäuren 100 und 101 durch eine ortsgerichtete Mutagenese, unter Verwendung der Primer 14 und 15 (Tabelle 2-4), in eine Restriktionsschnittstelle für *Nhe*I überführt (mutiertes Plasmid). Durch Verwendung der Primer 3 und 7 wurde das Teilstück für die Aminosäuren 145 bis 166, mit der zusätzlichen Sequenz für ein Gly in 5´-Position zum Triplett der AS 145, vom Expressionsplasmid für FKBP37.7$^{1-166}$ amplifiziert (PCR-Produkt). Nach dem Restriktionsverdau des mutierten Plasmides und des PCR-Produktes mit *Nhe*I und *Hin*dIII erfolgte die Ligation beider Teilstücke. Abschließend wurde die eingeführte *Nhe*I-Schnittstelle durch eine ortsgerichtete Mutagenese mit den Primern 16 und 17 zur kodierenden Sequenz für die Aminosäuren Gly und Asp mutiert. Die erfolgreiche Klonierung konnte durch vollständige Sequenzierung sichergestellt werden.

2.2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1. Überexpressionstest

Zum Test der Überexpression von Proteinen wurden Kulturröhrchen, welche 5 ml gewähltes Medium und entsprechende Antibiotika enthielten, mit den zu überprüfenden Zellen einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden 500 µl der gewachsenen Kultur in 5 ml frisches Medium mit Antibiotikum und gegebenenfalls mit zu testenden Zusätzen überführt und für 2 h bei der zu überprüfenden Temperatur kultiviert. Danach wurde die Proteinüberexpression durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach circa 3 h wurden die Zellen für 5 min bei 4900 x g sedimentiert und in 200 µl zur Reinigung geeignetem Puffer resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch Ultraschall mit drei Pulsen für je 5 s. Anschließend wurde lösliches Protein von Zelltrümmern durch eine erneute Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 10000 x g getrennt. Alle Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

2.2.3.2. Zellaufschluss von *E. coli*-Zellen für die Proteinreinigung

Die sedimentierten Zellen der präparativen Zellanzucht (Abschnitt 2.2.1.1.) wurden in 50 ml Puffer des ersten Reinigungsschrittes, mit enthaltenem Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche), resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit 2500 bar am Hochdruckzellaufschlussgerät TS 0.75 (Constant Systems) mittels Hochdruckentspannung durch zweimaliges Passieren. Die lösliche Fraktion wurde anschließend von den Zelltrümmern durch eine Zentrifugation für 45 min bei 100000 x g und 4 °C getrennt. Der Überstand konnte nun für die weitere Reinigung verwendet werden.

2.2.3.3. Herstellung von Lysaten aus humanen Zellen

Die Zellen aus einer konfluent bewachsenen 150 cm^2 Zellkulturflasche wurden mit 1 x PBS gewaschen, anschließend in 300 µl H_2O resuspendiert und für 0,5 h auf Eis inkubiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch Ultraschall mit drei Pulsen von je 3 s. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration durch einen Bradfordtest wurden die Lysate mit H_2O und SDS-Probenpuffer auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt [Bradford, 1976].

Zur Herstellung der Zelllysate für die Präparation von FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ wurden circa 15 x 10^7 Zellen in 25 ml Zelllysispuffer 2 resuspendiert, 15 min bei 4 °C inkubiert und durch Ultraschall aufgeschlossen. Nach weiteren 15 min bei 4 °C wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation in 15 min bei 13.000 x g und 4 °C sedimentiert. Die löslichen Zellbestandteile wurden für die Reinigung eingesetzt. Zelllysate für Experimente mittels FK506-Affinitätsmatrix wurden mit der entsprechenden Anzahl Zellen nach der gleichen Vorgehensweise unter Nutzung von Zelllysispuffer 1 hergestellt und Zelllysate für die GST-Präzipitationsexperimente mit Zell-lysispuffer 2.

2.2.3.4. Prinzipien der Proteinreinigung

Zur Reinigung von rekombinant hergestellten Proteinen aus den löslichen Fraktionen des Zellaufschlusses (Abschnitt 2.2.3.2.) wurde eine Kombination verschiedener Chromatographieprinzipien angewendet. Bei der **Ionenaustauschchromatographie** wird die Wechselwirkung von geladenen Proteinseitenketten mit den Gegenionen des Chromatographiematerials genutzt. Für die Proteinreinigung wurden Fractogel EMD-DEAE-650(M) (DEAE-Sepharose) und Q-Sepharose eingesetzt. Die Elution erfolgte mit steigenden NaCl-Konzentrationen und gegebenenfalls einem pH-Gradienten. Bei der **hydrophoben Interaktionschromatographie** wird die Wechselwirkung hydrophober Proteinbereiche mit dem hydrophoben Chromatographiematerial genutzt. Für die Proteinreinigung wurde Fractogel EMD-Propyl-650(M) (Propyl-Sepharose) genutzt. Die Elution erfolgte mit einem reversen $(NH_4)_2SO_4$-Gradienten. Die **Affinitätschromatographie** nutzt die spezifische Bindung von Proteinen an kovalent fixierten Liganden. Hierbei wurden die Metallchelatchromatographie (Ni-NTA-Agarose) und die Substrat-Affinitätschromatographie (GSH-Sepharose) eingesetzt. Die Elution von Ni-NTA-Agarose erfolgte mit steigenden Imidazolkonzentrationen. Die Elution von der GSH-Sepharose erfolgte mit reduziertem Glutathion. Bei der **Größenausschlusschromatographie** werden die Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen hydrodynamischen Radien getrennt. Eingesetzt wurden hierbei eine HiLoad Superdex 75 HR 16/60 und eine HiLoad Superdex 200 HR 16/60. Die Proteinlösungen wurden jeweils auf 2 ml eingeengt und in Standard 7-Puffer getrennt.

2.2.3.5. Reinigung der verwendeten Proteine

Für die Isolierung des **FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$** wurden überexprimierende Zellen, wie in Abschnitt 2.2.3.3. beschrieben, aufgearbeitet und mit Anti-FLAG M2 *Affinity* Agarose (SV= 0,5 ml) inkubiert. Parallel wurde die gesamte Prozedur mit pCMV-Tag 2B transfizierten Zellen druchgeführt. Gebundenes Protein wurde nach Waschen mit 3 x 5 ml 1 x TBS durch kompetitve Elution mit 3 x 1ml 100 µg/ml und anschließend 2 x 1 ml 200 µg/ml FLAG-Peptid in 1 x TBS von der FLAG M2 *Affinity* Agarose eluiert. Anschließend erfolgte eine letzte Elution mit 1 ml 0,1 M Glycin pH 3,5.

Die Reinigung von **FKBP37.7$^{1-330}$** erfolgte durch Bindung an DEAE-Sepharose (SV= 30 ml) in 25 mM Tris pH 8,0 und durch anschließende Elution mit einem NaCl-Gradienten über 200 ml von 0-0,5 M NaCl. Der Durchlauf und Fraktionen mit gereinigtem Protein wurden mit 30 % $(NH_4)_2SO_4$ gefällt und für 30 min bei 28000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Pelett wurde in 25 mM Tris pH 7,5 resuspendiert und die Lösung anschließend gegen 25 mM Tris pH 8,0 dialysiert. Nach der Dialyse wurde das Protein auf eine Q-Sepharose (SV= 50 ml) aufgetragen und mit einem Gradienten von 0-0,5 M NaCl und pH 8,0-7,2 in 100 ml eluiert, gefolgt von einer Stufe von 1 M NaCl in 50 ml 25 mM Tris pH 7,2. Im letzten Schritt erfolgte die Reinigung durch Größenausschlusschromatographie mittels HiLoad Superdex 75 HR 16/60.

Die Reinigung von **His_6-FKBP37.7$^{1-330}$** erfolgte durch Bindung an Ni-NTA-Agarose (SV= 5 ml) in 25 mM Tris pH 8,0. Ungebundenes Protein wurde durch Waschen mit 5 mM Imidazol entfernt und gebundenes Protein anschließend mit einem Gradienten von 10-250 mM Imidazol in 80 ml eluiert. Protein-enthaltende Fraktionen wurden gegen 25 mM Tris pH 7,5 dialysiert, auf eine DEAE-Sepharose (SV= 30 ml) aufgetragen und mit 0-0,5 M NaCl in 80 ml eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden anschließend auf ein Volumen von 2 ml eingeengt und im letzten Schritt mittels HiLoad Superdex 200 HR 16/60 gereinigt.

Die Reinigung von **GST-FKBP37.7$^{1-330}$** erfolgte im ersten Schritt durch Bindung an GSH-Sepharose (SV= 5 ml) und die Elution erfolgte mit 10 mM reduziertem Glutathion in 50 ml 25 mM Tris pH 8,0. Die Protein-enthaltenden Fraktionen wurden vereint und noch einmal mit Protease-inhibitor-Cocktail (Roche) versetzt. Anschließend wurde die Proteinlösung auf eine DEAE-Sepharose (SV= 5 ml) aufgetragen und durch anschließende Elution mit einem 50 ml-Gradienten von 0-0,5 M NaCl und 25 ml 1 M NaCl in 25 mM Tris pH 7,5 eluiert. Das Protein wurde abschließend auf 2 ml eingeengt und mittels HiLoad Superdex 200 HR 16/60 gereinigt.

Die Reinigung von **FKBP37.7$^{1-166}$** erfolgte durch Bindung an DEAE-Sepharose (SV= 30 ml) in 25 mM Tris pH 8,0 und durch anschließende Elution mit 0-0,5 M NaCl in 100 ml 25 mM Tris pH 8,0 und abschließend mit 75 ml 1 M NaCl in 25 mM Tris pH 8,0. Der Durchlauf und FKBP37.7$^{1-166}$-enthaltende Fraktionen wurden vereint, mit 5 mM PMSF und 1 mM EDTA versetzt und auf eine Q-Sepharose (SV= 50 ml) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 0-1 M NaCl in 100 ml. Anschließend wurden Durchlauf und FKBP37.7$^{1-166}$-enthaltende Fraktionen vereint, erneut mit 5 mM PMSF und 1 mM EDTA versetzt und eingeengt. Im letzten Schritt erfolgte die Reinigung mittels HiLoad Superdex 75 HR 16/60. Gereinigte Fraktionen wurden vereint, eingeengt und mit Proteaseinhibitor (5 mM EDTA, 1 x Proteaseinhibitor-Cocktail (Fischer Scientific), 0,05 M Natriumazid, 1 mM PMSF) über Nacht behandelt.

Die Reinigung von **GST-FKBP37.7$^{11-158}$** erfolgte durch Bindung an GSH-Sepharose und die Elution mit 10 mM reduziertem Glutathion in 80 ml 20 mM Tris pH 8,0. Die Protein-enthaltenden Fraktionen wurden vereint, eingeengt und mittels HiLoad Superdex 200 HR 16/60 gereinigt.

Die Reinigung von **FKBP37.7$^{170-330}$** erfolgte im ersten Schritt durch eine Fällung mit 45 % $(NH_4)_2SO_4$. Die dabei erhaltene Suspension wurde 30 min bei 28.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde verworfen und das Pelett in 25 mM BisTris pH 7,0 mit 25 % $(NH_4)_2SO_4$ resuspendiert und anschließend auf eine Propyl-Sepharose (SV= 30 ml) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem Gradianten aus 30 ml 25 % $(NH_4)_2SO_4$ in 25 mM Tris pH 7,2 und 30 ml 30 % Ethylenglycol in 25 mM Tris pH 8,0. Die Protein-enthaltenden Fraktionen wurden gegen 25 mM Tris pH 8,0 dialysiert, auf eine DEAE-Sepharose (SV= 30 ml) aufgetragen und mit 0-0,4 M NaCl und pH 8,0-7,2 in 150 ml 25 mM Tris eluiert. Die Protein-enthaltenden Fraktionen wurden abschließend eingeengt und mittels HiLoad Superdex 75 HR 16/60 gereinigt.

Die Proteinexpression von **His_6-Hsp90β$^{1-724}$** erfolgte in Rosetta (DE3)-Zellen, 2YT-Medium ohne Zusätze bei 37 °C für 3 h nach Induktion mit 0,5 mM IPTG. Die Reinigung erfolgte anschließend durch Bindung an Ni-NTA-Agarose (SV= 5 ml) in 20 mM Tris pH 7,5. Ungebundenes Protein wurde durch Waschen mit 5 mM Imidazol in Puffer entfernt und gebundenes Protein wurde mit einem Gradienten von 2-250 mM Imidazol in 100 ml 20 mM Tris pH 8,0 eluiert. Die Protein-enthaltenden Fraktionen wurden vereint, auf eine DEAE-Sepharose (SV= 5 ml) aufgetragen und mit 0-0,4 M NaCl in 60 ml 20 mM Tris pH 8,0 eluiert. Die Fraktionen mit aufgereinigtem Protein wurden abschließend eingeengt und mittels HiLoad Superdex 200 HR 16/60 gereinigt.
Die Reinigung von **His_6-Hsp90α$^{628-732}$** und **His_6-Hsp90β$^{620-724}$** erfolgte nach dem gleichen Prinzip. Die Proteinlösungen wurden auf eine Ni-NTA-Agarose (SV= 5 ml) aufgetragen, ungebundenes Protein durch Waschen mit 10 mM Imidazol entfernt und gebundenes Protein mit einem Gradienten von 10-250 mM Imidazol in 20 mM Tris pH 7,5 eluiert. Anschließend wurde der pH-Wert der Proteinlösung auf pH 6,8 abgesenkt. Die Lösung wurde auf eine DEAE-Sepharose (SV= 5 ml) aufgetragen und gebundenes Protein mit einem Gradienten von 0-1 M NaCl in 60 ml 20 mM BisTris pH 6,8 eluiert. Die Protein-enthaltenden Fraktionen wurden abschließend eingeengt und mittels HiLoad Superdex 200 HR 16/60 gereinigt.

2.2.3.6. Dialyse und Proteinkonzentrierung

Zum Wechsel der Puffer wurden Proteinlösungen dialysiert. Für große Probevolumina wurde Dialyseschläuche verwendet und für kleine Volumina 0,1-2 ml Dialysezellen. Dabei wurde im ersten Schritt für 3 h gegen 3 l des Zielpuffers und im zweiten Schritt über Nacht gegen 3 l des Zielpuffers dialysiert.
Die Proteinkonzentrierung in Lösungen wurde durch eine Volumenverringerung in VivaSpin-Konzentratoren mit einem Ausschlussvolumen von 6 kDa durch Zentrifugation bei 6000 x g und 4 °C erreicht. Mit diesen Konzentratoren wurden ebenfalls Wechsel der Puffer durch abwechselndes Konzentrieren und Verdünnen im Zielpuffer bis zu einer Verdünnung um den Faktor 1000 durchgeführt.

2.2.4. Analytische Methoden

2.2.4.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte nach der Methode von Laemmli im diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel [Laemmli, 1970]. Alle Proben wurden zuvor mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 96 °C denaturiert. Nach dem Gellauf bei 15-30 mA wurden die Gele mit Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend mit Coomassie-Entfärbelösung behandelt. Alternativ dazu erfolgte die Färbung mit Silbernitratlösung nach einem modifizierten Protokoll von Blum *et al.*, bei dem lediglich der Entwickler Formaldehyd enthielt [Blum *et al.*, 1987].

2.2.4.2. Zweidimensionale-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte zuerst durch eine isoelektrische Fokussierung in 7 cm IPG-Streifen mit immobilisiertem pH-Gradienten von pH 3-10. Die zuvor mit Aceton gefällten Proteine wurden in 125 µl Rehydrierungspuffer resuspendiert und über Nacht bei RT im *Reswelling Tray* mit den IPG-Streifen inkubiert. Anschließend wurden die Streifen in *Strip Holder* überführt, mit *DryStrip Cover Fluid* überschichtet und nach dem Programm aus Tabelle 2-5 und 50 µA je Streifen im IPGphor 2 (GE Healthcare) fokussiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Streifen anschließend bei -80 °C gelagert.

Tabelle 2-5: Programm zur isoelektrischen Fokussierung

Schritt	Art des Erreichens der Spannung	Spannung	Dauer
1	Stufe	300 V	240 min
2	Gradient	1000 V	30 min
3	Gradient	5000 V	80 min
4	Stufe	5000 V	6 min

Für die Auftrennung in der zweiten Dimension wurden die IPG-Streifen zuerst 15 min in Equilibrierungspuffer mit 100 mg/ml DTT inkubiert, um die aufgetrennten Proteine zu reduzieren und mit SDS zu versetzen. Anschließend wurden die IPG-Streifen erneut 15 min in Equilibrierungspuffer mit 250 mg/ml Iodacetamid inkubiert, um die Thiolgruppen zu alkylieren und somit deren Oxidation zu verhindern. Anschließend wurden die Streifen auf einem SDS-Polyacrylamidgel ohne Trenngel mit 0,5 % Agarose, 0,002 % Bromphenolblau in 1 x SDS-Laufpuffer fixiert. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 15 mA.

2.2.4.3. Western-Blot und Proteindetektion durch Antikörper

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden im *Semi-Dry-Blot*-Verfahren nach Kyhse-Andersen auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen [Kyhse-Andersen, 1984]. Der Transfer erfolgte im Biometra Power Pack P25 für 90 min mit 1,7 mA/cm^2 [Towbin *et al.*, 1979]. Auf Nitrocellulosemembranen wurden die übertragenen Proteine mit PonceauS-Lösung angefärbt. Die Membranen wurden anschließend für 2 h mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in 1 x TBST bei RT blockiert und über Nacht mit primärem Antikörper in Blockierlösung bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen von je 5 min mit 1 x TBST erfolgte die Inkubation mit sekundärem Antikörper in Blockierlösung für 1 h bei RT. Nach erneutem dreimaligem Waschen von je 10 min mit 1 x TBST erfolgte die Detektion mit dem *Chemiluminescent Detection Kit for Horseradish Peroxidase* an der ChemiSmart 5000-Kamera (Peqlab).

2.2.4.4. Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA erfolgte in 0,5-2 %igen Agarosegelen (w/v) in 1 x TAE-Puffer bei einer Spannung von 5-10 V/cm^2. Die Proben wurden zuvor mit DNA-Probenpuffer versetzt. Zur Detektion enthielten die Gele 5 µl *SYBR Safe*, einen in die DNA interkalierenden Farbstoff, welcher nach der Auftrennung bei 312 nm sichtbar gemacht werden kann.

2.2.4.5. Konzentrationsbestimmung

Sowohl die Absorption von Proteinen als auch jene von Nukleinsäuren wurde spektroskopisch am NanoDrop2000 (Peqlab) bestimmt und um den Leerwert korrigiert. Die Konzentration von DNA wurde mit der Annahme ermittelt, dass eine Absorption bei 260 nm von eins einer Konzentration von 50 µg/ml entspricht. Die Konzentration von homogenen Proteinlösungen wurde nach dem Lambert-Beer'sche-Gesetz berechnet. Dazu wurde die Absorption bei 280 nm, abzüglich der bei 310 nm verwendet und der Extinktionskoeffizient zuvor berechnet [Gill & von Hippel, 1989].

2.2.4.6. CD-Spektroskopie

Zur Beurteilung des Sekundärstrukturgehaltes von Proteinen wurde die CD-Spektroskopie verwendet. Dabei werden die links- und rechtsdrehenden Anteile von linear polarisiertem Licht an asymmetrischen Kohlenstoffatomen unterschiedlich stark absorbiert, was zu unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten führt. Die Differenz der Extinktionskoeffizienten kann als molare Elliptizität ausgedrückt werden. Die Bestimmung der Drehwinkel erfolgte an einem temperierbaren Jasco J-710 CD-Spektrometer von 190-300 nm mit 15-30 Akkumulationen. Die Messungen wurden in Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 0,1 cm, mit 5-10 µM Protein in 10 mM Na_2HPO_4 durchgeführt. Bei der thermischen Denaturierung erfolgte die Erhöhung der Temperatur mit 1 °C je min, eine Stagnation bei 80 °C von 10 min und ein Abkühlen von 1 °C je 3 min. Nach der Pufferkorrektur der Spektren wurden die gemessenen Drehwinkel nach folgender Formel auf die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure bezogen.

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta \cdot M_W}{10 \cdot c \cdot d \cdot N_A}$$

Abbildung 2-1: Formel zur Berechnung der mittleren molaren Elliptizität pro Aminosäure. $[\Theta]_{MRW}$= mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure (deg · cm^2 · dmol^{-1}); Θ= Drehwinkel (mdeg); M_W= Molekülmasse (g/mol); c= Proteinkonzentration (mg/ml); d= Schichtdicke der Küvette (cm); N_A= Anzahl der Aminosäuren.

2.2.4.7. PPIase-Aktivitätstest

Die Bestimmung der PPIase-Aktivität von Proteinen erfolgte sowohl im Protease-gekoppelten als auch im Protease-freien PPIase-Test.

Der Protease-gekoppelte PPIase-Test wurde in Anlehnung an den bei Fischer *et al.* beschrieben durchgeführt [Fischer *et al.*, 1984b]. Hierbei diente α-Chymotrypsin als Hilfs-Protease [Fischer *et al.*, 1984a]. Das jeweils verwendete Substrat des Types Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA wurde allerdings nicht in DMSO, sondern in 0,47 mM LiCl-TFE gelöst, um den *cis*-Gehalt zu erhöhen [Kofron *et al.*, 1991]. Nach einer Temperierung des Messansatzes in Quarzglasküvetten mit einer Schichdicke von 1 cm für 6 min bei 10 °C erfolgte der Start der Reaktion durch die Zugabe von Substrat und Protease. Die Messung erfolgte dann am UV/Vis-Diodenarray-Spektrophotometer HP8453 (Hewlett Packard) bei 390 nm und 10 °C über einen Zeitraum von 360 s. Die Referenz wurde bei 510 nm gemessen. Ein Messansatz von 1 ml enthielt die entsprechende PPIase, 0,8 mg α-Chymotrypsin und 40 µM Substrat in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 0,5 µM BSA.

Der Protease-freie PPIase-Test mit 40 µM Substrat des Types Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA erfolgte wie beschrieben [Janowski *et al.*, 1997]. Die Messungen wurden ebenfalls am UV/Vis-Diodenarray-Spektrophotometer HP8453 bei 330 nm mit der Referenzwellenlänge 510 nm und 10 °C durchgeführt. Um die Sensitivität zu erhöhen und das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern, wurde der Protease-freie PPIase-Test alternativ mit dem Substrat Abz-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA durchgeführt [Zoldak *et al.*, 2009]. Nach 10 min Temperierung bei 10 °C erfolgte der Start der Reaktion durch die Zugabe des Substrates. Die Messung erfolgte an einem Fluoreszenz-Spektrophotometer F-3010 (Hitachi) für 600 s, ebenfalls unter Verwendung einer Quarzglasküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm. Dabei betrug die Anregungswellenlänge 320 nm und die Emissionwellenlänge 420 nm. Ein Messansatz von 1 ml enthielt die entsprechende PPIase und 0,25 µM Substrat in 35 mM HEPES pH 7,8 mit 0,5 µM BSA. Anhand der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten wurde mit den folgenden Gleichungen die katalytische Effizienz der PPIasen berechnet.

$$k_{enz} = k_{beobachtet} - k_{nenz} \qquad k_{kat}/K_M = k_{enz}/[E]$$

Abbildung 2-2: Gleichungen zur Berechnung der katalytischen Effizienz der PPIasen. k_{enz}= Geschwindigkeitskonstante der katalysierten Reaktion, $k_{beobachtet}$= beobachtete Geschwindigkeitskonstante, k_{nenz}= Geschwindigkeitskonstante der nicht katalysierten Reaktion, k_{kat}/K_M= katalytische Effizienz des Enzyms, [E]= Enzymkonzentration in M.

2.2.4.8. Chaperon-Aktivitätstest

Zur Bestimmung der Chaperon-Aktivität von Proteinen erfolgte die Messung der Lichtstreuung während der Aggregation von Citrat-Synthase bei 43 °C wie bei Buchner *et. al* beschrieben [Buchner *et al.*, 1998]. Vor Beginn der Messungen wurde Citrat-Synthase gegen 40 mM HEPES pH 7,5 dialysiert. Nach der Temperierung des Messansatzes im Spektrometer für 2 min bei 43 °C erfolgte der Start der Reaktion durch die Zugabe von Citrat-Synthase. Die Messungen erfolgten an einem Fluoreszenz-Spektrophotometer F-3010 (Hitachi) für 20 min bei einer Anregungs- und Emissionswellenlänge von 360 nm in Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Ein

Messansatz von 1 ml enthielt 0,15 µM Citrat-Synthase und entsprechende Mengen des zu testenden Proteins in 40 mM HEPES pH 7,5.

2.2.4.9. Rückfaltung der S-carboxymethylierter RNase T1

Die Messung der Rückfaltungskinetik von S-carboxymethylierter S54G/P55N-Rnase T1 (RCM-T1) erfolgte in Anlehnung an die beschriebene Durchführung [Mucke & Schmid, 1994]. Zu Beginn der Messungen lag die RCM-T1 entfaltet in 100 mM Tris pH 8,0 vor. Die Rückfaltung der RCM-T1 wurde durch die 50fache Verdünnung in 100 mM Tris pH 8,0 und 2 M NaCl gestartet. Nach der Temperierung für 6 min erfolgten die Messungen an einem Fluoreszenz-Spektrophotometer F-3010 (Hitachi) für 45 min in Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm bei 10 °C. Die Wellenlänge der Anregung betrug 268 nm und die der Emission 320 nm. Ein Messansatz von 1 ml enthielt 3,4 µM RCM-T1 und die zu testende PPIase in 100 mM Tris, 2 M NaCl pH 8,0. Mit den ermittelten Geschwindigkeitskonstanten konnten die katalytischen Effizienzen der PPIasen, wie in Abschnitt 2.2.4.7. beschrieben, bestimmt werden.

2.2.4.10. Massenspektrometrische Analyse

Die massenspektrometrischen Analysen von rekombinat hergestellten Proteinen nach der Isolation aus Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen mittels MALDI-MS unter Nutzung von 2,5-Dihydroxybenzoesäure und Methanol, sowie deren Auswertungen erfolgten durch Dr. A. Schierhorn. Die Analysen der Eluate aus der Präparation von FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ mittels Nano-LC-ESI-MS/MS, sowie die Auswertung mit dem Program Scaffold erfolgten durch Dr. Christian Scharf (EMAU Greifswald).

2.2.4.11. Interaktionsexperimente mittels FK506-Affinitätsmatrix

Jeweils 10 µl der in 50 % (v/v) Ethanol gelagerten Matrices (FK506-Affinitätsmatrix und mit Tris blockierte Kontrollmatrix) für die Experimente mit rekombinat hergestelltem Protein bzw. 50 µl für die Experimente mit Zelllysat, wurden mit je 1 ml 20 mM Tris, 100 mM NaCl pH 7,5 in 10 ml-Zentrifugenröhrchen aus Glas gewaschen. Anschließend wurde das Material mit je 10 µg rekombinat hergestelltem Protein in 30 µl bzw. je 12,5 mg Protein aus Zelllysat in 2,5 ml, welches wie in Abschnitt 2.2.3.3. beschrieben hergestellt wurde, für 1 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Nach der erfolgten Bindung wurden nicht-gebundene Proteine vollständig abgenommen. Für die spätere Analyse wurden 100 µl vom abgenommenen Zelllysat mit 100 µl SDS-Probenpuffer versetzt bzw. der gesamte Überstand der rekombinant hergestellten Proteine wurde im Stickstoffstrom vollständig eingetrocknet und in 40 µl SDS-Probenpuffer gelöst. Die Matrices wurden in neue Reaktionsgefäße überführt, sechsmal mit je 1 ml 20 mM Tris, 100 mM NaCl pH 7,5 gewaschen und anschließend mit unterschiedlichen Mengen SDS-Probenpuffer eluiert. Die

Matrices der Experimente mit Zelllysat wurden dafür mit je 100 µl und die Matrices der Experimente mit rekombinant hergestelltem Protein mit je 40 µl SDS-Probenpuffer versetzt.

2.2.4.12. Interaktionsexperimente mittels GSH-Sepharose

Für die Bindung von rekombinant hergestellten Proteinen wurden 50 µl GSH-Sepharose einmal mit 1 x PBS gewaschen und anschließend für 1 h mit je 40 µg der GST-fusionierten Proteine bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 1 x PBS wurden jeweils 10 µg der potentiellen Interktionspartner in 50 µl Standard 7 mit den an GSH-Sepharose gebundenen Proteinen für 1 h bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde die GSH-Sepharose mit jeweils 1 ml 1 x PBS, 1 x PBS mit 0,1 % NP-40 und 1 x PBS mit 200 mM NaCl gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit 30 µl 10 mM reduziertem Glutathion in 25 mM Tris pH 7,5 für 10 min unter Schütteln bei RT.

Für die Bindung von Proteinen aus humanem Zelllysat wurden 50 µl GSH-Sepharose einmal mit 1 x PBS gewaschen und anschließend für 2 h mit jeweils 80 µg der GST-fusionierten Proteine bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Nach dem Absetzen der GSH-Sepharose wurde nicht gebundenes Protein entfernt und das Material zweimal mit MENG-Puffer und 10 mM Na_2MoO_4 gewaschen. Das Zelllysat wurde währenddessen mit einer Konzentration von 2,5 mg/ml wie in Abschnitt 2.2.3.3. beschrieben in Zelllysispuffer 2 hergestellt und über eine Säule mit GSH-Sepharose vorgereinigt. Jeweils 1 ml vom Durchlauf dieser Säule wurde nun mit den an der GSH-Sepharose immobilisierten Proteinen über Nacht bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 300 µl MENG-Puffer und 10 mM Na_2MoO_4 erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit 10 mM reduziertem Glutathion in 25 mM Tris pH 7,5 für 10 min unter Schütteln bei RT.

2.2.5. NMR-Spektroskopische Untersuchungen von FKBP37.7$^{1-166}$

2.2.5.1. Anzucht von *E. coli* im M9-Minimalmedium

Zur Herstellung von isotopen-markiertem FKBP37.7$^{1-166}$ erfolgte die Proteinüberexpression in M9-Minimalmedium. Für die Anzucht wurden Vorkulturen, wie in Abschnitt 2.2.1.1. beschrieben, angefertigt. Die Zellen wurden am nächsten Morgen für 15 min bei 4 °C und 4900 x g sedimentiert und anschließend in M9-Minimalmedium resuspendiert. Die weitere Kultivierung erfolgte dann ebenfalls wie in Abschnitt 2.2.1.1. beschrieben.

2.2.5.2. Sequentielle Zuordnung

Alle chemischen Verschiebungen wurden auf die Referenz 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat (DSS) bezogen. Durch die Nutzung der Kernsorten ^{1}H, ^{13}C und ^{15}N ist es möglich, Pulssequenzen zu konzipieren, welche die sequentielle Verknüpfung der Aminosäurespinsysteme eines Proteins

ermöglichen [Ikura *et al.*, 1990; Kay *et al.*, 1990]. Für die sequentielle Zuordnung von FKBP37.7$^{1-166}$ wurden homonukleare und heteronukleare zwei- sowie dreidimensionale NMR-Spektren aufgenommen, darunter auch Tripel-Resonanzexperimente. Alle für die Zuordnung verwendeten NMR-Spektren sind in Tabelle 2-6 aufgeführt. Die Datenaufnahme erfolgte wie angegeben durch PD Dr. C. Lücke und Dr. K. Haupt [Linnert *et al.*, 2012]. Die Analyse der Spektren erfolgte anschließend mit dem Programm Felix 2000 (Accelrys). Aus den erhaltenen Informationen konnte die Zuordnung der Resonanzen durch die sequentielle Verknüpfung der einzelnen Aminosäurespinsysteme durchgeführt werden. Begonnen wurde mit den Tripel-Resonanzexperimenten. Die Abbildungen zu den Tripel-Resonanzexperimenten wurden mit dem Program Aurelia 2.5.9 (Bruker) erstellt.

Tabelle 2-6: Zusammenstellung der durchgeführten NMR-Experimente für die sequentielle Zuordnung. Alle Spektren wurden an den Geräten Bruker DRX (500 MHz) und Bruker Avance 800 mit Kryokopf (800 MHz) aufgenommen. Als Spinsystem ist die durchgehende Kette aller Heteroatome definiert, die jeweils mindestens ein Proton tragen.

Spektrum	erhaltene Informationen	Geräte (MHz)
$^{1}H/^{1}H$-TOCSY	Korreliert die skalare Kopplung zweier Protonen über zwei und drei Bindungen (^{2}J-, ^{3}J-Kopplungen). Bei längerer „Spinlock-Feld“-Dauer können auch weiter entfernte Kopplungen beobachtet werden.	500/ 800
$^{1}H/^{15}N$-HSQC	Zeigt die direkte skalare Kopplung zwischen einem Proton und einem ^{15}N-Kern (^{1}J-Kopplung). Detektiert werden Kopplungspaare des Peptidrückgrates und der Seitenketten.	500/ 800
$^{1}H/^{15}N$-TROSY	Weiterentwicklung des HSQC-Experimentes, welche sich durch höhere Empfindlichkeit und schmalere Linienbreiten auszeichnet.	500/ 800
$^{1}H/^{13}C$-HSQC	Zeigt die direkte skalare Kopplung zwischen einem Proton und einem ^{13}C-Kern (^{1}J-Kopplung). Detektiert werden Kopplungspaare des Peptidrückgrates und der Seitenketten.	500/ 800
$^{1}H/^{15}N/^{1}H$-HSQC-TOCSY	Verbindet die Informationen des $^{1}H/^{15}N$-HSQC (direkte, skalare Kopplung der Amidgruppen) mit den Informationen eines $^{1}H/^{1}H$-TOCSY (skalare Kopplungen zwischen Protonen über mehrere Bindungen eines Aminosäurespinsystems weitergeleitet)	500/ 800
Tripel-Resonanzexperimente zur Zuordnung der Resonanzen des Proteinrückgrates		
HNCA	Übertragung der Magnetisierung von NH_i auf $C\alpha_i$/ $C\alpha_{i-1}$. Detektiert wird $C\alpha$ der gleichen Aminosäure und $C\alpha$ der N-terminal benachbarten Aminosäure.	800
HNCACB	Übertragung der Magnetisierung von NH_i auf $C\alpha_i$/ $C\beta_i$/ $C\alpha_{i-1}$/ $C\beta_{i-1}$. Detektiert wird $C\alpha$ und $C\beta$ der gleichen Aminosäure und $C\alpha$ und $C\beta$ der N-terminal benachbarten Aminosäure.	500
Tripel-Resonanzexperimente zur Zuordnung der Carbonylresonanzen		
HNCO	Übertragung der Magnetisierung von NH_i auf CO_{i-1}. Detektiert wird CO der N-terminal benachbarten Aminosäure.	500/ 800

Spektrum	erhaltene Informationen	Geräte (MHz)
HN(CA) CO	Übertragung der Magnetisierung von NH_i auf CO_i und CO_{i-1}. Detektiert wird CO der gleichen und der N-terminal benachbarten Aminosäure. Der Magnetisierungstransfer verläuft über $C\alpha_i$, welches aber nicht detektiert wird.	500
Tripel-Resonanzexperimente zur Zuordnung der Seitenkettenresonanzen		
(H)CC(CO) NH	Übertragung der Magnetisierung von $CH\varepsilon_{i-1}$ auf $C\delta_{i-1}$/ $C\gamma_{i-1}$/ $C\beta_{i-1}$/ $C\alpha_{i-1}$/ NH_{i-1}. Detektiert wird Cα, Cβ, Cγ, Cδ, und Cε der N-terminal benachbarten Aminosäure. Der Magnetisierungstransfer verläuft über CO, welches aber nicht detektiert wird.	500
H(CC)(CO)NH	Übertragung der Magnetisierung von $H\varepsilon_{i-1}$ auf $H\delta_{i-1}$/ $H\gamma_{i-1}$/ $H\beta_{i-1}$/ $H\alpha_{i-1}$/ NH_i. Detektiert wird Hα, Hβ, Hγ, Hδ, und Hε der N-terminal benachbarten Aminosäure. Der Magnetisierungstransfer verläuft über CC und CO, welche aber nicht detektiert werden.	500
H(C)CH-TOCSY	Verknüpft Protonen und aliphatische Kohlenstoffatome innerhalb eines Aminosäurespinsystems mittels skalarer Kopplungen. Korreliert eine CH-Gruppe mit einem weiteren Proton.	500
(H)CCH-TOCSY	Verknüpft Protonen und aliphatische Kohlenstoffatome innerhalb eines Aminosäurespinsystems mittels skalarer Kopplungen. Korreliert eine CH-Gruppe mit weiteren Kohlenstoffatomen.	500

2.2.5.3. Strukturrechnung

Die Resonanzzuordnung ermöglichte es, über Protonenabstände, räumliche Informationen zu erhalten (Tabelle 2-7), die in einer Strukturrechnung eingesetzt werden konnten. Dies erfolgte mit den Programmen CYANA 3.0 und DYANA 1.5 durch PD Dr. C. Lücke und Dr. Yi-Jan Lin.

Tabelle 2-7: Zusammenstellung der durchgeführten NMR-Experimente für die Strukturrechnung. Alle Spektren wurden am Bruker Avance 800 mit Kryokopf (800 MHz) aufgenommen.

Spektrum	erhaltene Informationen	Geräte (MHz)
$^1H/^1H$-NOESY	Dipolare Kopplungen zwischen Protonenkernen, welche einen Abstand von weniger als 5 Å aufweisen.	800
$^1H/^{15}N/^1H$-HSQC-NOESY	Verbindet die Informationen eines $^1H/^{15}N$-HSQC (direkte, skalare Kopplung der Amidgruppen) mit denen des $^1H/^1H$-NOESY (dipolare Kopplungen zwischen Protonen mit einem Abstand kleiner 5 Å). In einer NH-Resonanzlinie kann man alle NOE-Signale für diese Amidgruppe ablesen.	800
$^1H/^{13}C/^1H$-HSQC-NOESY	Verbindet die Informationen eines $^1H/^{13}C$-HSQC (direkte, skalare Kopplung innerhalb einer CH-Gruppe) mit den Informationen des $^1H/^1H$-NOESY (dipolare Kopplungen zwischen Protonen mit einem Abstand kleiner 5 Å). In einer CH-Resonanzlinie kann man alle NOE-Signale für diese Gruppe ablesen.	800

3. Ergebnisse

3.1. Bestimmung der Domänengrenzen von FKBP37.7

Zu Beginn der proteinbiochemischen Arbeiten wurden die Grenzen der funktionellen Domänen von FKBP37.7 durch Sequenzvergleiche mit anderen Vertretern der FKBP-Familie bestimmt. Diese Eingrenzung war notwenig, um die funktionellen Domänen separat als Proteine herstellen und somit deren Funktionen getrennt voneinander betrachten zu können. Eine Betrachtung der Struktur und Einteilung von FKBP37.7 kam hierfür nicht in Frage, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Raumstruktur des Proteins vorhanden war. Für die Eingrenzung der PPIase-Domäne wurde der Vergleich mit FKBP12, dem prototypischen Vertreter der FK506-bindenden Proteine welcher lediglich aus einer PPIase-Domäne besteht, sowie mit der PPIase-aktiven Domäne I und der PPIase-inaktiven Domäne II von FKBP51 durchgeführt [Barent *et al.*, 1998; Chambraud *et al.*, 1993]. Der Sequenzvergleich ist in Abbildung 3-1, A dargestellt. Die vier verglichenen PPIase-Domänen weisen nur eine geringe Sequenzidentität von 10 % miteinander auf, wobei FKBP12 und die beiden Domänen von FKBP51 die gleiche typische Faltung eines vier- bis sechssträngigen, antiparallelen β-Faltblattes gewunden um eine kurze, zentrale α-Helix besitzen. Die größte Homologie besitzt FKBP37.7 zu FKBP12 mit einer Sequenzidentität von 28 % und einer Ähnlichkeit von 52 %. Die Identitäten mit FKBP51 I und II liegen etwas niedriger, umfassen allerdings auch andere Sequenzbereiche als bei FKBP12. Die größte Abweichung der Sequenz von FKBP37.7 zu den anderen drei PPIase-Domänen ist ein mindestens 34 Aminosäuren umfassender Einschub in der PPIase-Domäne, dessen Struktur, Lage und Funktion bisher noch unbekannt sind.
Die Aminosäuren des fünften Faltblattstranges (βE) von FKBP12, welche das letzte Sekundärstrukturelement der PPIase-Domäne bilden, weisen mit einer Identität von 50 % und einer Ähnlichkeit von 90 % zu FKBP37.7 starke Parallelen auf. Auch bei FKBP51 I und II sind mit Identitäten von 36 % und 27 % in diesem letzten Faltblattstrang noch deutliche Ähnlichkeiten zu FKBP37.7 zu erkennen. Somit scheint auch bei FKBP37.7 dieses charakteristische C-terminale Sekundärstrukturelement vorhanden zu sein und damit das Ende der PPIase-Domäne bei Glu158 zu liegen. Die PPIase-Domäne wurde maximal für die Aminosäurereste 1-170, mindestens jedoch für die Aminosäurereste 11-158 festgelegt. Zu Beginn dieser Arbeit wurden mit einer FKBP37.7-Proteinvariante der Aminosäuren 1-170 ^{1}H-NMR-Spektren aufgenommen, wobei sich herausstellte, dass große, hydrophobe Aminosäuren am C-terminalen Ende des Proteins sehr starke Signale zeigten und somit vermutlich unstrukturiert vorlagen. Da diese Reste damit nicht mehr zur potentiellen PPIase-Domäne gehören, wurde für alle weiteren Arbeiten eine neue Variante mit den Aminosäuren 1-166 generiert und verwendet.

A

```
                                                    βA                    βB
FKBP12          ------------------------------MGVQVETISPGDGRTFPKR-GQTCVVHYTG 29
FKBP51 1-144    MTTDEGAKNNEESPTATVAEQGEDITSKKDRGVLKIVKRVGNGEETPMI-GDKVYVHYKG 59
FKBP51 145-260  ------------------------------DGGIIRRTKRKGEGYSNPNE-GATVEIHLEG 174
FKBP37.7 1-170  --------------------MADIIARLREDGIQKRVIQEGRGELPDFQDGTKATFHYRT 40
                                                *:   .   * *       * .  .*

                         βC´  αI      βC´´            αII          βD
FKBP12          MLED--GKKFDSSRDRNKPFKFMLGK-QEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISP------- 79
FKBP51 1-144    KLSN--GKKFDSSHDRNEPFVFSLGK-GQVIKAWDIGVATMKKGEICHLLCKP------- 109
FKBP51 145-260  RCG---GRMFDC---RDVAFTVGEGEDHDIPIGIDKALEKMQREEQCILYLGP------- 221
FKBP37.7 1-170  LHSDDEGTVLDDSRARGKPMELIIGK-KFKLPVWETIVCTMREGEIAQFLCDIKHVVLYP 99
                      *  :*    *. .: .  *:        :  :  *   : . :

                                                                    βE
FKBP12          ------------------------------DYAYGATGHPGI-IPPHATLVFDVELLKLE- 108
FKBP51 1-144    ------------------------------EYAYGSAGSLPK-IPSNATLFFEIELLDFKG 139
FKBP51 145-260  ------------------------------RYGFGEAGKPKFGIEPNAELIYEVTLKSFEK 252
FKBP37.7 1-170  LVAKSLRNIAVGKDPLEGQRHCCGVAQMREHSSLGHADLDALQQNPQPLIFHMEMLKVES 159
                                                :.    .           *.:.: : ..:


FKBP12          ----------- 108
FKBP51 1-144    EDLFE------ 144
FKBP51 145-260  AKESWEMD--- 260
FKBP37.7 1-170  PGTYQQDPWAM 170
```

B

```
                          TPR 1
                          αI                  αII
FKBP51 259-423  MDTKEKLEQAAIVKEKGTVYFKGGKYMQAVIQYGKIVSWLE---MEYGLSEKESKASESF 315
FKBP52 261-425  MNSEEKLEQSTIVKERGTVYFKEGKYKQALLQYKKIVSWLE---YESSFSNEEAQKAQAL 317
FKBP37.7 170-330 MTDEEKAKAVPLIHQEGNRLYREGHVKEAAAKYYDAIACLKNLQMKEQPGSPEWIQLDKQ 229
                 *  :** :  .:::::.*.  :: *:  :*  :* . :: *:    :   .. *    :

                          TPR 2                    TPR 3
                   αIII                 αIV                 αV                 αVI
FKBP51 259-423  LLAAFLNLAMCYLKLREYTKAVECCDKALGLDSANEKGLYRRGEAQLLMNEFESAKGDFE 375
FKBP52 261-425  RLASHLNLAMCHLKLQAFSAAIESCNKALELDSNNEKGLFRRGEAHLAVNDFELARADFQ 377
FKBP37.7 170-330 ITPLLLNYCQCKLVVEEYYEVLDHCSSILNKYDDNVKAYFKRGKAHAAVWNAQEAQADFA 289
                   .  ** . * * :. :  .:: *.. *   . * *. ::**:*:  : : : *:.**


                 ____
FKBP51 259-423  KVLEVNPQNK-AARLQISMCQKKAKEHNERDRRIYANMFKKFAEQDAKE 423
FKBP52 261-425  KVLQLYPNNK-AAKTQLAVCQQRIRRQLAREKKLYANMFERLAEEENKA 425
FKBP37.7 170-330 KVLELDPALAPVVSRELRALEARIRQKDEEDKARFRGIFSH-------- 330
                 ***:: *    ..  ::   : : :.:  .::  : .:*.:
```

Abbildung 3-1: Sequenzvergleich zur Eingrenzung der PPIase- und TPR-Domäne von FKBP37.7. A) Zur Bestimmung der PPIase-Domäne wurden FKBP12 (Volllänge), die PPIase-Domänen I und II von FKBP51 und die 170 N-terminalen Aminosäuren von FKBP37.7 verglichen. Anhand der Röntgenkristallstrukturen von FKBP12 (PDB: 1FKJ) und FKBP51 (PDB: 1KT0) wurden β-Faltblattstrukturelemente rot und α-helikale Bereiche grün gekennzeichnet. Die Bezeichnung der jeweiligen Elemente ist für FKBP12 vorgenommen. Für die hellgrau markierten Aminosäuren in FKBP51 I konnte die Struktur nicht aufgelöst werden. Dunkelgrau unterlegt sind die Aminosäuren, welche nach Fanghänel und Fischer das aktive Zentrum der PPIasen bilden [Fanghänel & Fischer, 2004]. **B)** Zur Bestimmung der TPR-Domänengrenze wurden die TPR-Domänen von FKBP51 (PDB: 1KT0) und FKBP52 (PDB: 1P5Q) mit den 161 C-terminalen Aminosäuren von FKBP37.7 verglichen. Anhand der Röntgenkristallstrukturen wurden auch hier die α-helikalen Bereiche grün gekennzeichnet. Die dargestellten Sequenzvergleiche wurden mit ClustalW2 (2007) durchgeführt. Identische Aminosäuren sind mit (*), Reste mit starker Ähnlichkeit mit (:) und Reste mit schwacher Ähnlichkeit mit (.) gekennzeichnet.

Zur Eingrenzung der TPR-Domäne wurde ein Sequenzvergleich mit zwei TPR-Motiv-enthaltenden Vertretern der FKBP-Familie, FKBP51 und FKBP52, durchgeführt. Die TPR-Domänen von FKBP51 und FKBP52 wurden dabei aus den vorliegenden Kristallstrukturen über deren TPR-Motiv-bildende α-Helices ausgewählt und zum Vergleich eingesetzt [Sinars *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004]. Für FKBP37.7 wurde die gesamte C-terminal zur PPIase-Domäne gelegene Aminosäure-sequenz mit den Resten 170-330 eingesetzt (Abbildung 3-1, B). Anhand dieser Analyse wird ersichtlich, dass alle drei Proteine eine Sequenzidentität von 16 % und eine Ähnlichkeit von 42 % miteinander besitzen. Werden die Proteine einzeln verglichen, so besitzt FKBP37.7 eine Identität mit FKBP51 von 21 % und mit FKBP52 von 25 %. Alle drei TPR-Motive sind laut diesem Sequenzvergleich durch die 161 C-teminalen Aminosäuren von FKBP37.7 abgedeckt, da die erste α-Helix erst mit Aminosäure 172 von FKBP37.7 beginnt. Somit wurde für alle weiteren Untersuchungen die TPR-Domäne von FKBP37.7 auf die Aminosäuren 170-330 festgelegt, um die Vollständigkeit der ersten α-Helix zu garantieren. Eine schematische Darstellung der Domänen von FKBP37.7 ist in Abbildung 3-2 gezeigt. Die ersten und letzten Aminosäuren der verschiedenen Motive sind jeweils gekennzeichnet.

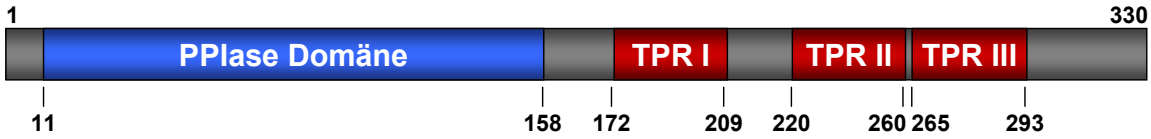


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von FKBP37.7. Die Abbildung umfasst das vollständige Protein mit den Aminosäuren 1-330. Die Zahlen unter der Abbildung bezeichnen jeweils die ersten und die letzten Aminosäuren der PPIase-Domäne (blau) und der jeweiligen TPR-Motive (rot).

3.2. Klonierung, Überexpression, Reinigung von FKBP37.7 und verkürzten FKBP37.7-Varianten aus *E. coli*

Die Nukleotidsequenz des jeweiligen FKBP37.7-Konstruktes wurde über zwei Restriktions-endonukleaseschnittstellen in die *multiple cloning site* des jeweiligen Expressionsvektors eingeführt. Die erfolgreiche Klonierung konnte jeweils durch PCR und eine anschließende vollständige Sequenzierung der eingefügten Nukleotidsequenz sichergestellt werden. Mittels Überexpressionstest von verschiedenen *E. coli*-Zellen, bei verschiedenen Temperaturen und unter Verwendung variierender Zusätze konnten die Bedingungen der Proteinüberexpression für jedes Protein opimiert werden. So wurden zur Expression der GST-fusionierten Proteinvarianten dem Medium jeweils 5 % Glycerin zur Verbesserung der Proteinlöslichkeit zugesetzt. Eine Zusammenfassung der Klonierungen, der Überexpressionsbedingungen während der präparativen Proteinanzucht und der notwenigen Reinigungsschritte für die verwendeten FKBP37.7-Varianten

ist in Tabelle 3-1 dargestellt. Die ausführlichen Reinigungsbedingungen der einzelnen Proteine sind in Abschnitt 2.2.3.5. näher erläutert. Allen Proteinen wurde jedoch zum Zellaufschluss Protease-inhibitor-Cocktail (Roche) zugesetzt um Abbau während der Reinigung zu verhindern.

Tabelle 3-1: Klonierung, Überexpression und Reinigung der rekombinant in *E. coli* hergestellten FKBP37.7-Proteinvarianten. Im Bereich des jeweiligen Konstruktes ist schematisch das vollständige FKBP37.7 dargestellt. Hervorgehoben ist dabei der exprimierte Teil der jeweiligen Proteinvariante. Blau markiert ist die PPIase-Domäne, rot sind die TPR-Motive markiert und in dunkelgrau die nicht strukturierten Bereiche. In den Namen der Proteine sind die jeweiligen Aminosäuren hochgestellt und die enthaltenen Fusionen mit aufgeführt.

Variante Restriktionsschnittstellen, Expressionsvektor	**Überexpression** Zellen, Medium, Zusatz, Temperatur, Expressions-dauer	**Reinigungsschritte** nach Reihenfolge der Ausführung
FKBP37.7$^{1-330}$	PPIase-Domäne TPR TPR TPR	
*Nde*I und *Hin*dIII, pET-30a(+)	BL21 (DE3), 2YT-Medium, o. Zusatz, 30 °C, 4 h	- DEAE-Sepharose - Ammoniumsulfat-Fällung - Dialyse - Q-Sepharose - Gelfiltration Sephadex G-75
His$_6$-FKBP37.7$^{1-330}$	His$_6$- PPIase-Domäne TPR TPR TPR	
*Eco*RI und *Hin*dIII, pET-28a(+)	BL21 (DE3), 2YT-Medium, o. Zusatz, 37 °C, 4 h	- Ni-NTA-Agarose - Dialyse - DEAE-Sepharose - Gelfiltration Sephadex G-200
GST-FKBP37.7$^{1-330}$	GST- PPIase-Domäne TPR TPR TPR	
*Eco*RI und *Xho*I, pGEX-5X-1	Rosetta (DE3), 2YT-Medium, 5 % Glycerin, 30 °C, 4 h	- GSH-Sepharose - DEAE-Sepharose - Gelfiltration Sephadex G-200
FKBP37.7$^{1-166}$	PPIase-Domäne TPR TPR TPR	
*Nde*I und *Hin*dIII, pET-30a(+)	BL21 (DE3), 2YT-Medium, o. Zusatz, 37 °C, 3 h	- DEAE-Sepharose - Q-Sepharose - Gelfiltration Sephadex G-75
GST-FKBP37.7$^{11-158}$	GST- PPIase-Domäne TPR TPR TPR	
*Eco*RI und *Xho*I, pGEX-5X-1	DH5α, 2YT-Medium, 5 % Glycerin, 30 °C, 4 h	- GSH-Sepharose - Gelfiltration Sephadex G-200
FKBP37.7$^{170-330}$	PPIase-Domäne TPR TPR TPR	
*Nde*I und *Xho*I, pET-30a(+)	BL21 (DE3), 2YT-Medium, o. Zusatz, 30 °C, 3 h	- Ammoniumsulfat-Fällung - Propyl-Sepharose - Dialyse - DEAE-Sepharose - Gelfiltration Sephadex G-75

Variante Restriktionsschnittstellen, Expressionsvektor	**Überexpression** Zellen, Medium, Zusatz, Temperatur, Expressions-dauer	**Reinigungsschritte** nach Reihenfolge der Ausführung
GST-FKBP37.7$^{170-330}$	PPIase-Domäne GST- TPR TPR TPR	
*Eco*RI und *Xho*I, pGEX-5X-1	DH5α, 2YT-Medium, 5 % Glycerin, 30 °C, 4 h	- GSH-Sepharose - Gelfiltration Sephadex G-200

Alle in Tabelle 3-1 dargestellten Proteine konnten annähernd bis zur Homogenität gereinigt werden. In SDS-Polyacrylamidgelen migrierten sie bis zu den errechneten Laufweiten (Abbildung 3-3). Zusätzlich wurden die Identitäten aller Proteine durch massenspektrometrische Analysen überprüft (Anhang 1).

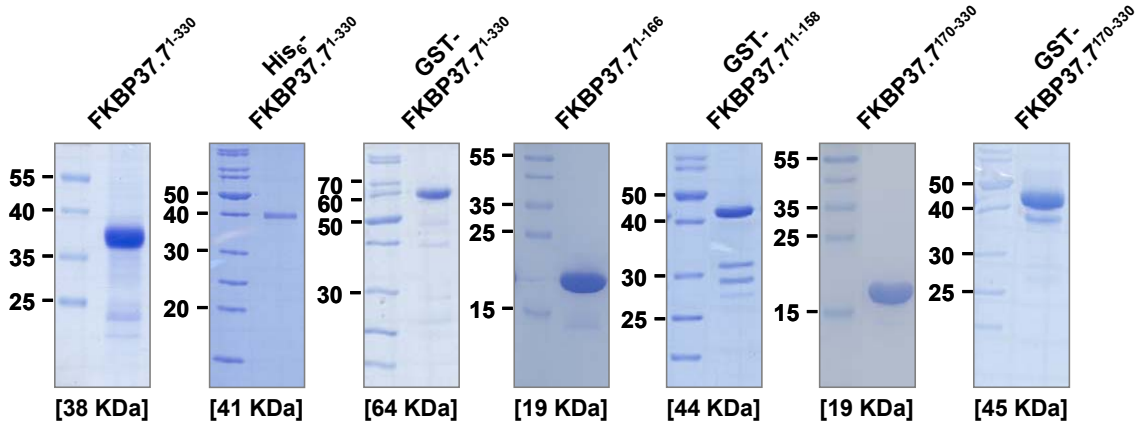


Abbildung 3-3: Aus *E. coli* gereinigte FKBP37.7-Proteinvarianten. Nach dem letzten Reinigungsschritt wurden Proben der präparierten Proteine in 10-17,5 %igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mit Coomassielösung gefärbt. Jeweils links sind die mitgeführten Größenstandards in kDa beschriftet. Unter den jeweiligen Abbildungen ist das berechnete Molekulargewicht der jeweiligen Proteinvariante angegeben.

Da die Detektion in Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen und die korrekte Identifizierung mittels Massenspektrometrie jedoch keine Aussage über vorhandene Sekundärstrukturelemente und somit kein Indiz für eine korrekte Faltung und Funktionalität der hergestellten Proteine lieferten, wurden für alle hergestellten Proteinvarianten zusätzlich CD-Spektren aufgenommen. Diese sind in Abbildung 3-4 dargestellt. Im Fern-UV CD-Spektrum zeigen die Sekundärstrukturelemente im Bereich von 180-250 nm charakteristische Elliptizitäten bei verschiedenen Wellenlängen [Brahms & Brahms, 1980; Hennessey & Johnson, 1981; Johnson, 1988]. Für keines der hier untersuchten Proteine konnte in den CD-Spektren ein Minimum bei 195-200 nm festgestellt werden, was anzeigt, dass nur wenige oder keine unstrukturierte *Random-Coil*-Moleküle vorliegen. Das CD-Spektrum von FKBP37.7$^{1-166}$ ähnelte im Spektrenverlauf und der niedrigen mittleren molaren Elliptizität pro Aminosäure denen von FKBP12 und der PPIase-

Domäne von *Arabidopsis thaliana* FKBP42 [Kamphausen *et al.*, 2002; Pirkl & Buchner, 2001]. Bei dem aus einem fünfsträngigen antiparallenen β-Faltblatt und einer zentralen α-Helix aufgebauten FKBP12 ist das absolute Minimum bei 212 nm mit circa -5000 deg*cm^2*dmol^{-1} zu beobachten, was typisch für ein solches, vorwiegend β-Faltblatt-strukturiertes Protein ist [Michnick *et al.*, 1991]. Die Verschiebung des absoluten Minimums von 212 auf 210 nm und das sich andeutende Minimum bei 222 nm könnte im Falle von FKBP37.7$^{1-166}$ auf einen erhöhten α-helikalen Strukturanteil hinweisen.

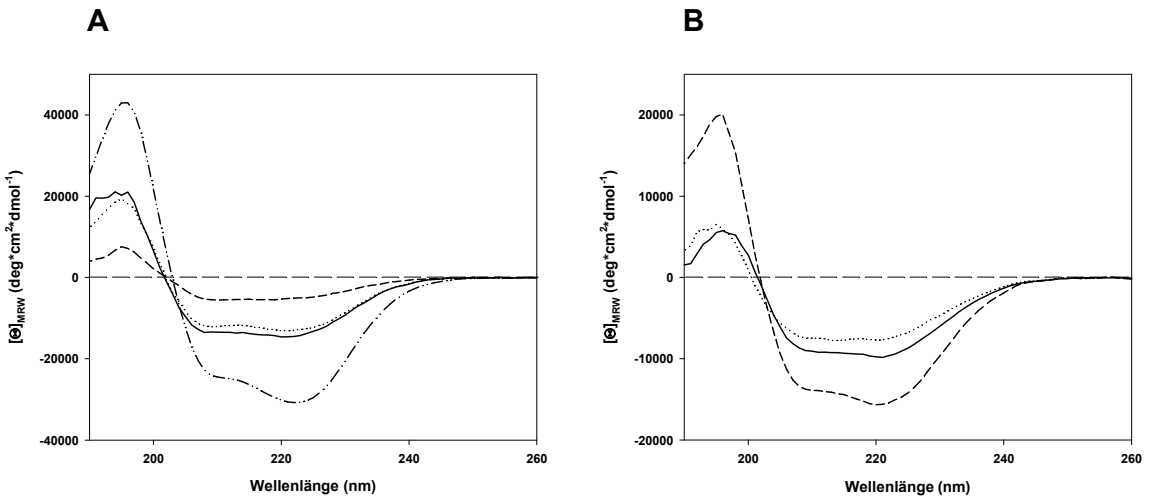


Abbildung 3-4: CD-Spektren der in *E. coli* überexprimierten und gereinigten FKBP37.7-Varianten. A) Fern-UV CD-Spektrum von 5 µM FKBP37.7$^{1-330}$ (——), 5 µM His$_6$-FKBP37.7$^{1-330}$ (·····), 10 µM FKBP37.7$^{1-166}$ (– – –) in 10 mM Na_2HPO_4 pH 8,0 und 5 µM FKBP37.7$^{170-330}$ (·—·) in 10 mM Na_2HPO_4 pH 8,0; 0,018 mM DTT gemessen bei 10 °C. **B)** Fern-UV CD-Spektrum von 5 µM GST-FKBP37.7$^{1-330}$ (——), 5 µM GST-FKBP37.7$^{11-158}$ (·····) und 5 µM GST-FKBP37.7$^{170-330}$ (– – –) in 10 mM Na_2HPO_4 pH 8,0 gemessen bei 10 °C.

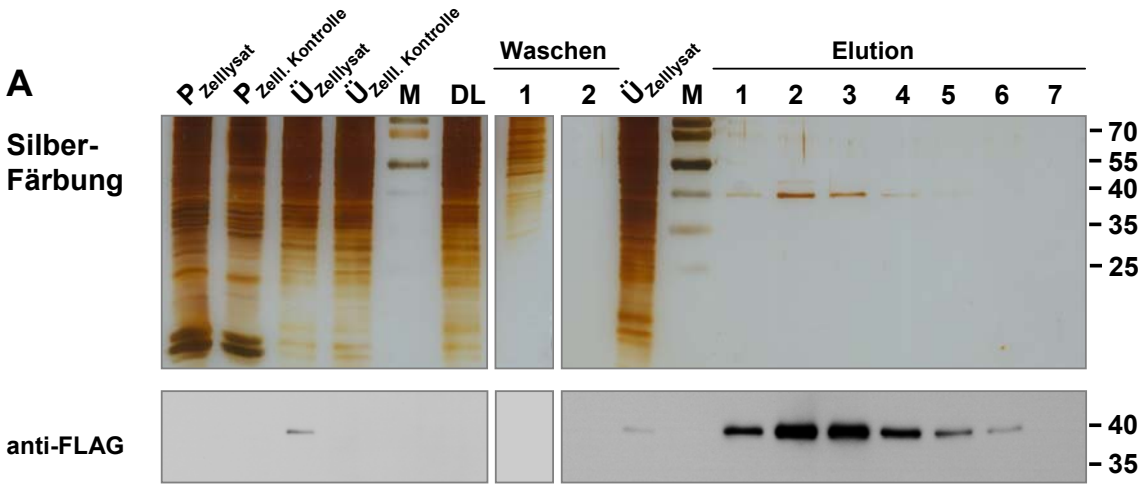
Die beiden vollständigen FKBP37.7-Varianten FKBP37.7$^{1-330}$ und His$_6$-FKBP37.7$^{1-330}$ zeigten einen ähnlichen Spektrenverlauf, sowie eine ähnliche Intensität wie die TPR-enthaltenden PPIasen FKBP51, FKBP52, Cyp40 und *Arabidopsis thaliana* FKBP42 [Kamphausen *et al.*, 2002; Pirkl & Buchner, 2001]. Das Vorhandensein von zwei Minima bei 209 und 222 nm und die höhere Signalintensität mit -12000 bis -15000 deg*cm^2*dmol^{-1} implizierten einen höheren Anteil α–helikaler Strukturen im Vergleich zu FKBP12, was auf das Vorhandensein der TPR-Domäne zurückzuführen ist. Gut waren die Sekundärstrukturelemente der isolierten TPR-Domäne FKBP37.7$^{170-330}$ zu beurteilen. Ein stark ausgeprägtes Minimum bei 222 nm und eines bei 208 nm deutete auf das überwiegende Vorhandensein von helikalen Strukturelementen hin. Da TPR-Motive immer aus zwei α–Helices aufgebaut sind [Das *et al.*, 1998; Lamb *et al.*, 1995] und der Sequenzvergleich mit FKBP51 und FKBP52 (Abschnitt 3-1) auf das Vorhandensein von drei TPR-Motiven hindeutete, kann dies als das Spektrum der TPR-Motive von FKBP37.7 interpretiert werden. Die Beurteilung der Faltung von GST-fusionierten Proteinen ist generell schwieriger, da hier die Signale der Sekundärstrukturelemente von GST zusätzlich detektiert werden. Das GST,

welches zu über 40 % aus α–helikalen Strukturelementen aufgebaut ist, zeigt dabei die typischen Minima bei 208 und 222 nm [Cardoso *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2002]. Dennoch wurden für GST-FKBP37.7$^{11-158}$, GST-FKBP37.7$^{1-330}$ und GST-FKBP37.7$^{170-330}$ ähnliche Spektren erhalten, wie für die nicht GST-fusionierten Proteinvarianten. Lediglich GST-FKBP37.7$^{11-158}$ und GST-FKBP37.7$^{1-330}$ zeigten das Vorhandensein eines höheren helikalen Strukturanteils, was vermutlich auf die GST-Fusion zurückzuführen war. Die CD-Spektren aller hergestellten FKBP37.7-Varianten entsprachen den Erwartungen. Die Proteine wurden somit für alle folgenden Experimente als korrekt gefaltet angesehen und verwendet.

3.3. Klonierung, Überexpression und Reinigung von FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ aus humanen HEK293-Zellen

Neben dem aus *E. coli* gereinigten FKBP37.7 wurde das Protein auch aus überexprimierenden humanen HEK293-Zellen gewonnen. Zwar können humane Proteine aus *E. coli*-Zellen gewonnen werden, aber mögliche posttranslationale Modifikationen können dabei fehlen. Mit Hilfe der aus eukaryotischen Zellen gewonnenen Proteine sollte daher der mögliche Einfluss dieser posttranslationalen Modifikationen auf die PPIase-Aktivität und die FK506-Bindung untersucht werden.
Dafür wurde die kodierende Nukleotidsequenz für FKBP37.7$^{1-330}$ in den Expressionsvektor pCMV-Tag 2B eingeführt (Abschnitt 2.2.2.8.). Die Korrektheit dieser Klonierung wurde durch die vollständige Sequenzierung der inserierten DNA sichergestellt. Zur Herstellung des rekombinanten FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ wurde anschließend eine stabile Zelllinie generiert, wofür HEK293-Zellen mit dem hergestellten Plasmid transfiziert und über sechs Wochen mit steigenden Konzentrationen von 50-300 µg/ml Geneticin (G-418) selektiert wurden. Aufgrund dieser Selektion konnten Zellen erhalten werden, welche die Resistenz gegen das Antibiotikum und somit gleichfalls die DNA für FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ enthielten. Die erfolgreiche Proteinüberexpression konnte durch Western Blot-Experimente mittels anti-FLAG M2- und anti-FKBP37.7-Antikörper sichergestellt werden. Für die Isolierung des FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ wurden Zellen, wie in Abschnitt 2.2.3.3. beschrieben, aufgearbeitet und das Protein daraus gereinigt (Abschnitt 2.2.3.5.). Die Überprüfung der Reinigungsschritte erfolgte in SDS-Polyacrylamidgelen und ist für eine Präparation exemplarisch in Abbildung 3-5 dargestellt. Das im Zelllysat enthaltene FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ konnte unter den gewählten Bedingungen im Zentrifugationsüberstand erhalten und auch vollständig an die Anti-FLAG M2 *Affinity* Agarose gebunden werden (Abbildung 3-5, A; $Ü_{Zelllysat}$ und DL). Durch die Waschschritte war es möglich, einen Großteil der nicht bindenden Proteine zu entfernen und lediglich FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ angereichert an der Anti-FLAG M2 *Affinity* Agarose zu erhalten. Die Kompetition mit FLAG-Peptid ermöglichte anschließend eine vollständige Elution, so dass auch unter sauren Bedingungen mit 0,1 M Glycin pH 3,5 keine weitere Elution eventuell noch

gebundener Proteine stattfand. In nachfolgenden Experimenten konnte mit dieser Anti-FLAG M2 *Affinity* Agarose die gleiche Anreicherung und Reinigungswirkung erzielt werden. Dies wurde abgeschätzt anhand von Western Blots und von SDS-Polyacrylamidgelen.



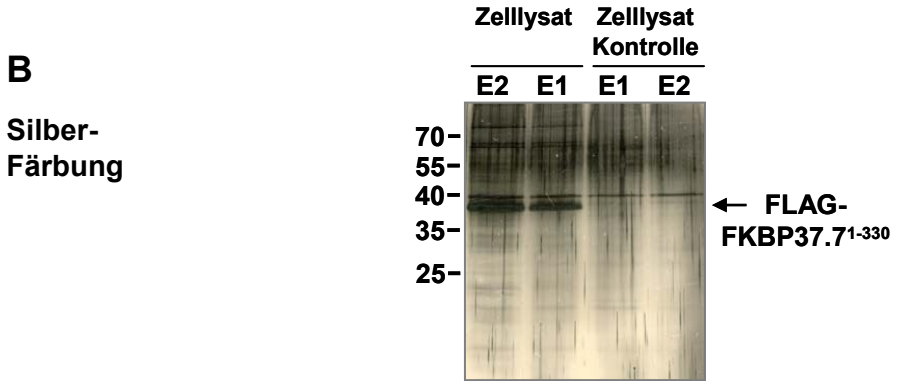


Abbildung 3-5: Isolierung von FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ aus überexprimierenden HEK293-Zellen. Die FLAG-FKBP37$^{1-330}$-überexprimierenden Zellen wurden lysiert und das Protein [40 kDa] durch Bindung an die Anti-FLAG M2 *Affinity* Agarose aus dem Zelllysat isoliert. Mit dem Leervektor pCMV-Tag 2B transfizierte Zellen wurden identisch behandelt (Kontrolle). Die Proteinproben der Reinigung von FLAG-FKBP37$^{1-330}$ wurden anschließend in 15 %igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. **A)** Die Proteine wurden anschließend auf Nitrocellulosemembran überführt und spezifisch mit anti-FLAG M2-Antikörper detektiert. Auf den SDS-Polyacrylamidgelen verbliebenes Protein wurde mit Silbernitatlösung angefärbt. P, Sediment des Zelllysats nach Zentrifugation; Ü, zur Isolierung verwendeter Überstand des Zelllysats nach Zentrifugation; M, Marker; DL, Durchlauf. Die Elution 1-4 erfolgte mit 100 µg/ml FLAG-Peptid, Elution 5-6 mit 200 µg/ml FLAG-Peptid und Elution 7 mit 0,1 M Glycin pH 3,5. **B)** Die Elutionsfraktionen 1 und 2 von FLAG-FKBP37$^{1-330}$ und und des Kontrollexperiments wurden zum Vergleich noch einmal in einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend mit Silbernitratlösung angefärbt.

In Abbildung 3-5, B ist bereits zu erkennen, dass deutlich mehr Proteinbanden in den Elutionsfraktionen von FLAG-FKBP37$^{1-330}$-überexprimierenden Zellen akkumulierten, als in denen von nicht FLAG-FKBP37$^{1-330}$-überexprimierenden Zellen, was auf die Co-Reinigung möglicher Bindepartner hinweisen könnte. Mit FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ war es möglich FKBP37.7 aus humanen Zellen anzureichern, zu isolieren und damit für nachfolgende Untersuchungen zum Einfluss eukaryotischer Modifikationen und des daraus resultierenden Bindungsverhaltens bereitzustellen.

3.4. Untersuchung der FK506-Bindung von FKBP37.7

FKBP37.7 wird der Proteinfamilie der FK506-bindenden Proteine zugerechnet. Allerdings erfolgte die Einteilung nicht, wie der Name vermuten lässt, aufgrund der Bindung des Makrolides FK506 (Tacrolimus), sondern aufgrund der Sequenzhomologie der PPIase-Domäne von FKBP37.7 mit FKBP12. Zur Überprüfung der FK506-Bindung wurde von Martin Theuerkorn (MPF) eine FK506-Affinitätsmatrix synthetisiert, durch die ein direkter, nicht-radioaktiver Nachweis der FK506-Bindung erbracht werden kann.

Diese FK506-Affinitätsmatrix wurde zunächst mit rekombinant hergestelltem Protein auf ihre Funktionstüchtigkeit und Spezifität hin untersucht. Hierfür wurden FKBP12, FKBP51 und FKBP52 als FK506-bindende Proteine und BSA als nicht-FK506-bindendes Protein eingesetzt (Abbildung 3-6, A).

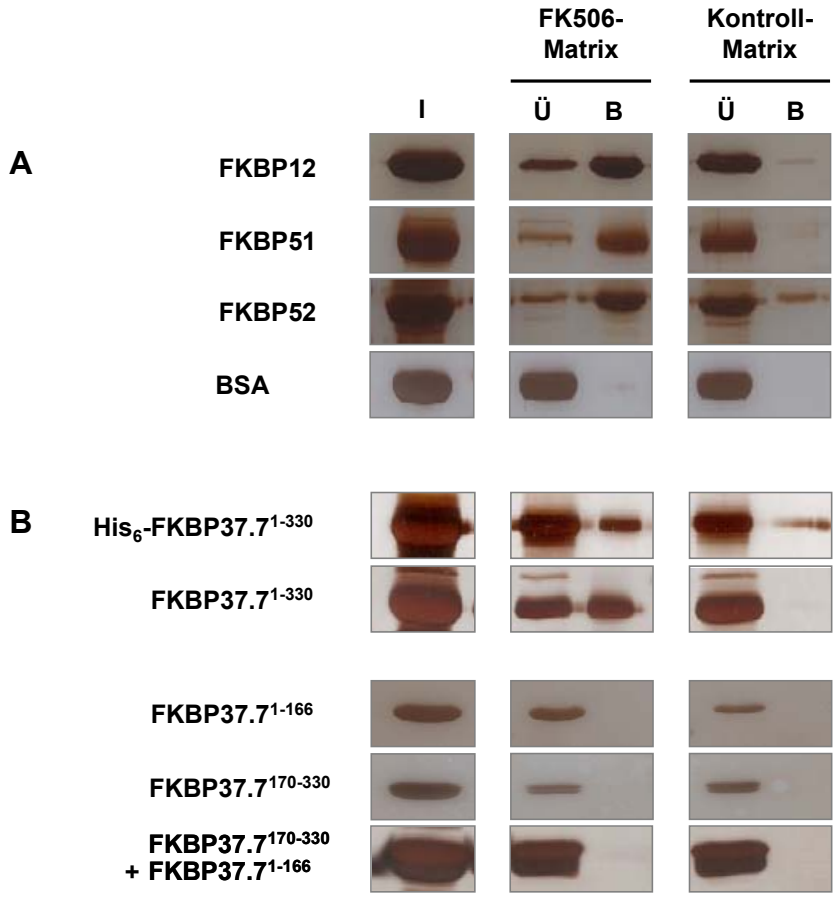


Abbildung 3-6: Bindung der rekombinant hergestellten Proteine an die FK506-Affinitätsmatrix. Die FK506-Affinitätsmatrix bzw. die Kontrollmatrix wurden 1 h mit je 20 µg rekombinant hergestelltem Protein inkubiert. Anschließend wurden die Überstände mit nicht-gebundenem Protein von den Matrices abgenommen. Nach sechsmaligem Waschen der Matrices wurden alle Proben in 15-17,5 %igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. I, eingesetztes Protein; Ü, nicht an die Matrix gebundenes Protein; B, an der Matrix gebundenes Protein. **A)** zeigt das Kontroll-experiment zur Sicherstellung der Funktionstüchtigkeit der Matrix. **B)** zeigt das Bindungsexperiment mit FKBP37.7-Varianten.

Die eingesetzten FKBP zeigten das aus der Literatur bekannte FK506-Bindungsverhalten; zudem zeigte BSA keinerlei Bindung [Vanduyne *et al.*, 1991; Weiwad *et al.*, 2006; Yem *et al.*, 1992]. Eine unspezifische Wechselwirkung mit dem Trägermaterial konnte ausgeschlossen werden, da keines der Proteine an die Kontrollmatrix gebunden hat. Die FK506-Affinitätsmatrix wurde damit als funktionsfähig eingestuft und für die nachfolgenden Experimente eingesetzt. Vor Verwendung jeder neuen FK506-Affinitätsmatrixcharge wurde diese, wie hier beschrieben, getestet. Nach der Sicherstellung der Funktionstüchtigkeit wurde FKBP37.7 auf seine Fähigkeit der FK506-Bindung untersucht (Abbildung 3-6, B). Hierfür wurden die in Abschnitt 3.2. beschriebenen, rekombinant hergestellten Volllängenprotein-Varianten His_6-FKBP37.7$^{1-330}$ und FKBP37.7$^{1-330}$, die isolierte PPIase-Domäne FKBP37.7$^{1-166}$, sowie die PPIase-Domäne in Anwesenheit der TPR-Domäne FKBP37.7$^{170-330}$ eingesetzt. Mit His_6-FKBP37.7$^{1-330}$ und FKBP37.7$^{1-330}$ konnte eine Bindung an die FK506-Affinitätsmatrix beobachtet werden. Allerdings konnte mehr als die Hälfte des jeweils eingesetzten Proteins nicht gebunden werden. Die isolierte PPIase-Domäne zeigte dagegen keine Bindung an die FK506-Affinitätsmatrix. Auch bei gemeinsamer Verwendung der PPIase-Domäne und der TPR-Domäne konnte keinerlei Bindung beobachtet werden.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Bindung der beiden Volllängenproteine um eine spezifische Interaktion mit FK506 handelt, wurde ein Kompetitionsexperiment durchgeführt (Abbildung 3-7).

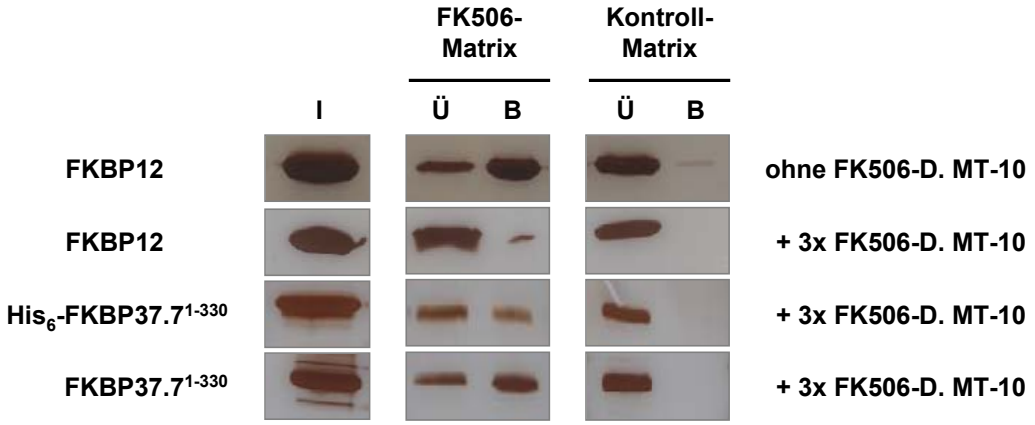


Abbildung 3-7: Kompetition der Bindung von rekombinant hergestellten Proteinen an die FK506-Affinitätsmatrix. Die rekombinant hergestellten Proteine wurden mit einem dreifachen molekularen Überschuss des FK506-Derivates MT-10 für 5 min vorinkubiert und dann mit der FK506-Affinitätsmatrix bzw. Kontrollmatrix 1 h inkubiert. Zur Bindungskontrolle erfolgte zusätzlich die Inkubation der Matrices mit FKBP12 ohne vorherige Inkubation mit dem FK506-Derivat MT-10. Anschließend wurden die Überstände mit nicht-gebundenem Protein von den Matrices abgenommen. Nach sechsmaligem Waschen der Matrices wurden alle Proben in 15-17,5 %igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. I, eingesetztes Protein; Ü, nicht an die Matrix gebundenes Protein; B, an der Matrix gebundenes Protein. Eingesetzte Proteinmengen, 20 µg; FKBP12, 1,67 nmol; His_6-FKBP37.7$^{1-330}$, 0,48 nmol; FKBP37.7$^{1-330}$, 0,53 nmol.

Dabei wurden FKBP12, His_6-FKBP37.7$^{1-330}$ und FKBP37.7$^{1-330}$ jeweils mit einem dreifachen molekularen Überschuss des FK506-Derivates MT-10 vorinkubiert und danach den Matrices zugegeben. Dieses Derivates wurde anstelle von FK506 aufgrund seiner besseren Löslichkeit im wässrigen Puffer, bei vergleichbaren Inhibitonseigenschaften, verwendet. Die Bindung von

FKBP12 an die FK506-Affinitätsmatrix konnte durch die Kompetition fast vollständig unterdrückt werden, während eine Verringerung der Bindung für keine der beiden FKBP37.7-Varianten zu beobachten war. Da keine Kompetition mit dem FK506-Derivat MT-10 stattfand, lag der Verdacht nahe, dass es sich hierbei nicht um eine spezifische Bindung von FKBP37.7 an FK506 handelte, sondern um eine Präzipitationserscheinung auf der hydrophoben Oberfläche der FK506-Affinitätsmatrix. Gestützt wurde diese Vermutung auch dadurch, dass die isolierte PPIase-Domäne keine Bindung zeigte.

Mit rekombinant in *E. coli* hergestelltem Protein gelang es somit nicht, die Frage der FK506-Bindung durch FKBP37.7 vollständig zu klären. Daher wurde auch authentisches Protein aus humanen Zellen untersucht. Hierfür mussten zunächst humane Zellen gefunden werden, welche FKBP37.7 authentisch exprimieren und somit für diesen Test eingesetzt werden konnten. Zu diesem Zweck wurden die Zelllinien unterschiedlicher Abstammung Jurkat, HEK293, HepG2, SH-SY5Y, HeLa, HT-29, WI-38 und MCF-7 getestet. Der Nachweis des authentischen FKBP37.7 erfolgte durch einen spezifischen Antikörper gegen das Protein. Zur Abschätzung der Expressionstärke erfolgte eine densitometrische Auswertung und ein Vergleich mit der Expression von β-Aktin (Abbildung 3-8).

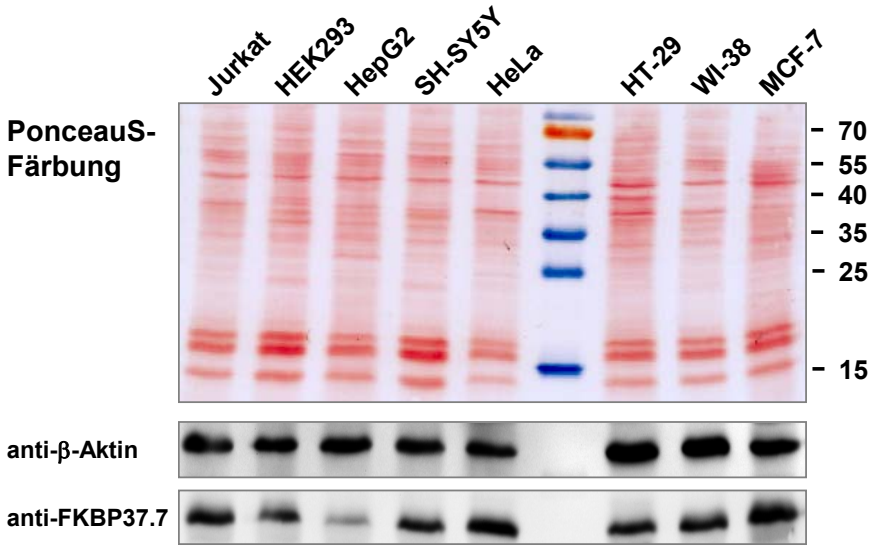


Abbildung 3-8: Expression von authentischem FKBP37.7 in immortalisierten humanen Zelllinien. Jeweils 40 µg Gesamtzellprotein der angegebenen Zelllinien wurde in einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Anfärbung aller Proteine durch PonceauS (oben). FKBP37.7 wurde durch einen anti-FKBP37.7-Antikörper detektiert und zur Abschätzung der Expressionsverhältnisse wurde ebenfalls β-Aktin detektiert.

Es wurde festgestellt, dass die T-Zelllymphom-Zelllinie Jurkat, die Cervixkarzinom-Zelllinie HeLa und die Brustkrebszelllinie MCF-7 das FKBP37.7 vergleichsweise am stärksten exprimierten. HEK293-, SH-SY5Y-, HT-29-, und WI-38-Zellen zeigten eine moderate Expression, während in den Leberkarzinomzellen HepG2 nur eine schwache Expression zu beobachten war.

Zur Untersuchung der FK506-Bindung von authentischem FKBP37.7 mittels der FK506-Affinitätsmatrix musste deren Funktionstüchtigkeit vorher mit Lysaten von humanen Zellen sichergestellt werden. Hierfür wurde die stark FKBP37.7-exprimierende Jurkat-Zelllinie ausgewählt. Das Bindungsexperiment wurde wie in Abschnitt 2.2.4.11. beschrieben durchgeführt und die Proben anschließend in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Durch die Detektion mittels spezifischer Antikörper konnte für authentisches FKBP12, FKBP51 und FKBP52 eine Bindung an die FK506-Affinitätsmatrix festgestellt werden (Abbildung 3-9).

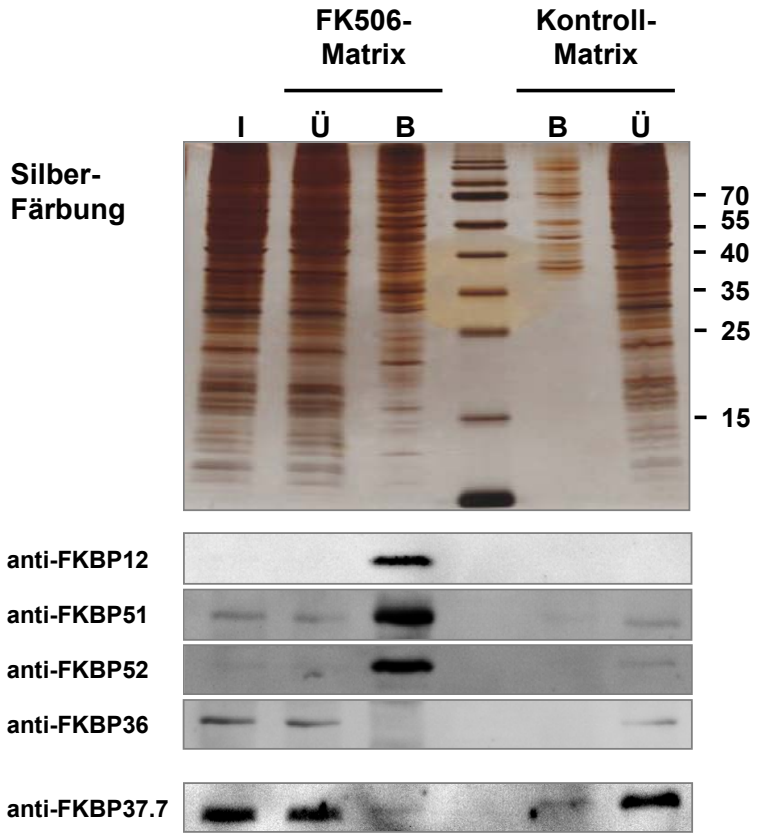


Abbildung 3-9: Bindung von authentischem FKBP aus Jurkat-Zelllysat an die FK506-Affinitätsmatrix. Zelllysat aus Jurkatzellen wurde mit der jeweiligen Matrix 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Überstände mit nicht-gebundenem Protein von den Matrices abgenommen. Nach sechsmaligem Waschen der Matrices wurden alle Proben in 15 %igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Gesamtprotein wurde mit Silbernitratlösung angefärbt. Nach Western Blot wurden die einzelnen Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert. I, eingesetztes Zelllysat; Ü, nicht an die Matrix gebundenes Protein; B, an der Matrix gebundenes Protein.

Für FKBP36, welches als nicht nicht-FK506-bindend beschrieben wurde, konnte dagegen keine Bindung detektiert werden [Jarczowski *et al.*, 2008]. Die Ergebnisse des Experimentes entsprachen den Erwartungen; die FK506-Affinitätsmatrix konnte somit auch für Experimente mit humanen Zelllysaten als funktionsfähig eingeschätzt werden. Authentisches FKBP37.7 aus Jurkat-Zellen zeigte, wie auch schon die isolierte PPIase-Domäne in Abbildung 3-6, keine Bindung an die FK506- Affinitätsmatrix. FKBP37.7 bindet demnach kein FK506. Anschließend wurde noch einmal überprüft, ob sich das Fehlen einer FK506-Bindung auch in anderen Zelllinien bestätigen

lässt, um ein Zelltyp-spezifisches Phänomen von Jurkat-Zellen auszuschließen (Abbildung 3-10). Dafür wurden einige der schon auf ihre Expression von authentischem FKBP37.7 untersuchten Zelllinien verwendet.

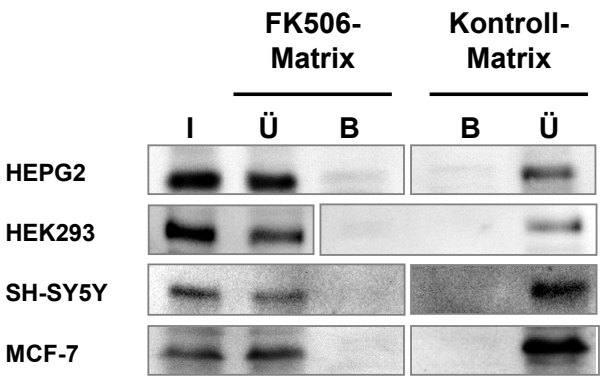


Abbildung 3-10: Bindung von authentischem FKBP37.7 aus verschiedenen Zelllinien an die FK506-Affinitätsmatrix. Zelllysat aus den verschiedenen Zellen wurde mit der jeweiligen Matrix 1 h inkubiert. Die Überstände mit nicht-gebundenem Protein wurden von den Matrices abgenommen. Nach sechsmaligem Waschen der Matrices wurden alle Proben in 15 %igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Nach Western Blot wurden die Proteine mit spezifischem anti-FKBP37.7-Antikörper detektiert. I, eingesetztes Zelllysat; Ü, nicht an die Matrix gebundenes Protein; B, an der Matrix gebundenes Protein. Das Experiment mit SH-SY5Y-Zellen wurde im Rahmen der Diplomarbeit von S. Wetzel durchgeführt [Wetzel, 2011].

Auch in den Zelllinien HepG2, HEK293, SH-SY5Y, und MCF-7 konnte keine Bindung von FKBP37.7 an die FK506-Affinitätsmatrix nachgewiesen werden. Insgesamt bindet das vollständige FKBP37.7 in keiner der hier untersuchten Zelllinien an FK506. Zusammen mit den Daten der Bindungsstudien mit rekombinant hergestelltem Protein aus *E. coli* kann geschlussfolgert werden, dass FKBP37.7 nicht in der Lage ist, FK506 zu binden, und die nicht-kompetitierbare Bindung mit dem rekombinant in *E. coli* hergestellten Volllängenprotein auf eine Präzipitationserscheinung auf der Matrix zurückzuführen ist.

3.5. Untersuchungen zur PPIase-Aktivität von FKBP37.7

Als Mitglied der Enzymklasse der PPIasen sollte FKBP37.7 auch auf das Vorhandensein einer enzymatischen Aktivität näher untersucht werden. Laut dem Sequenzvergleich aus Abbildung 3-1, A, sind im Vergleich zu FKBP12, dem prototypischen Vertreter der FKBP-Familie, acht der 13 Aminosäuren im putativ aktiven Zentrum von FKBP37.7 ausgetauscht. Derartige Austausche sind allerdings auch bei vielen anderen aktiven Vertretern dieser Proteinfamilie festzustellen [Fanghänel & Fischer, 2004].

Eine Messung der PPIase-Aktivität von FKBP37.7 mit dem Peptidsubstrat Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA wurde bereits einmal durchgeführt und dabei wurde postuliert, dass es sich bei FKBP37.7 um

ein inaktives Protein handelt [Laenger *et al.*, 2009]. Die PPIase-Aktivitätsmessungen wurden allerdings mit einem rekombinant hergestellten Protein durchgeführt, welches lediglich die Aminosäuren 1-121 umfasste. Aufgrund des zu Beginn dieser Arbeit durchgeführten Sequenzvergleiches aus Abschnitt 3.1. ist eine Proteinvariante mit den Aminosäuren 1-121 aber möglicherweise zu kurz, um die vollständige PPIase-Domäne abzudecken. In Anlehnung an diesen Vergleich fehlen Teile der Insertion, sowie homologe Strukturelemente zum sechsten β-Faltblattstrang des FKBP12 und somit auch drei dem aktiven Zentrum zugehörige Reste, welche Tyr82, His87 und Phe99 in FKBP12 entsprechen [Fanghänel & Fischer, 2004]. In Rahmen dieser Arbeit wurde daher die PPIase-Aktivität von FKBP37.7 mit den längeren Proteinvarianten erneut bestimmt.

In Abbildung 3-11 sind die katalytischen Effizienzen der untersuchten FKBP37.7-Varianten sowie von FKBP12 gezeigt. Dabei lagen die k_{kat}/K_M-Werte aller untersuchten FKBP37.7-Varianten im Bereich von 0,9-6*10^3 $M^{-1}*s^{-1}$ und sind damit circa 1000-mal geringer als die von FKBP12. Zudem lagen diese Werte unter 10^4 $M^{-1}*s^{-1}$ und damit selbst unterhalb von denen, welche für schwach aktive humane PPIasen beschrieben wurden.

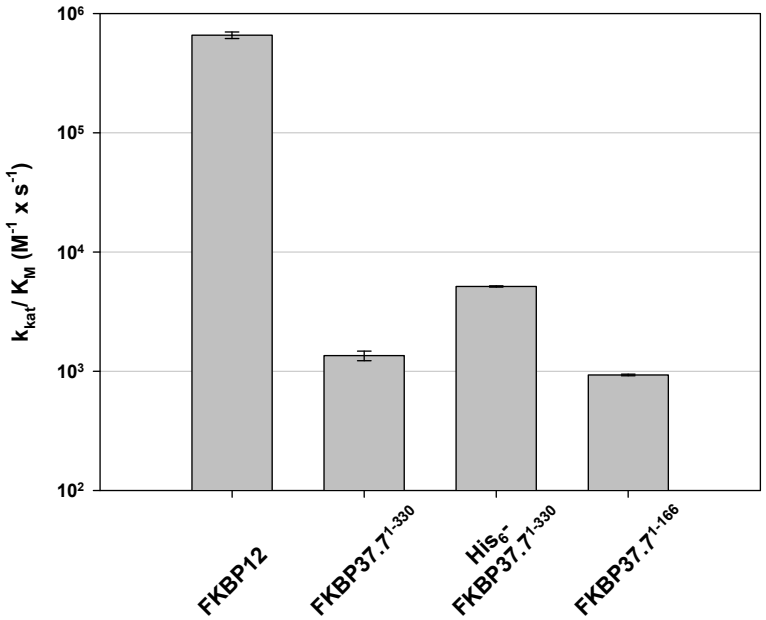


Abbildung 3-11: PPIase-Aktivität verschiedener FKBP37.7-Proteinvarianten. Die Aktivitätsmessung erfolgte im Protease-gekoppelten PPIase-Test mit Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA als Substrat bei pH 7,8 und 10 °C. Dabei wurden 25 nM FKBP12, 5 µM FKBP37.7$^{1-330}$, 5 µM His$_6$-FKBP37.7$^{1-330}$ und 10 µM FKBP37.7$^{1-166}$ zur Messung eingesetzt.

Für His$_6$-FKBP37.7$^{1-330}$ konnte eine circa sechsfach höhere PPIase-Aktivität bestimmt werden als für die beiden anderen Proteinvarianten. Um diese Differenz zu erklären und mögliche nach der Reinigung noch vorhandene Verunreinigungen als mögliche Ursache dieser Aktivität auszuschließen, wurde nun die Aktivität durch den Einsatz verschiedener Substrate und Inhibitoren näher untersucht (Abbildung 3-12). Für die Messungen wurden Peptidsubstrate des Types Suc-Ala-

Xaa-Pro-Phe-pNA eingesetzt, wobei Xaa für unterschiedliche Aminosäuren steht. Bei der Messung mit dem Substrat Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA konnte im Gegensatz zum Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA die höchste PPIase-Aktivität beobachtet werden, was auf eine PPIase der FKBP-Familie hindeutet (Abbildung 3-12, A) [Albers *et al.*, 1990; Park *et al.*, 1992]. Diese Vermutung wird auch dadurch gestützt, dass keine Inhibition der Aktivität mit CsA erreicht werden konnte, so dass eine Verunreinigung durch ein Cyp ausgeschlossen wurde. Allerdings konnte die vorhandene Aktivität auch durch FK506 oder Rapamycin nicht deutlich reduziert werden, jedoch durch die Zugabe von Ni^{2+}-Ionen (Abbildung 3-12, B und C). Ein nicht durch FK506, aber durch Ni^{2+}-Ionen inhibierbares FKBP ist das 21 kDa große SlyD aus *E. coli* [Hottenrott *et al.*, 1997]. Die erhöhte Aktivität des His_6-FKBP37.7$^{1-330}$ gegenüber den anderen Varianten kam somit vermutlich durch Co-gereinigtes und im Coomassiegel nicht sichtbares SlyD zu Stande. Nach der Inhibition mit 10 µM $NiCl_2$ betrug die katalytische Effizienz von FKBP37.7 maximal $1{,}5*10^3$ $M^{-1}*s^{-1}$.

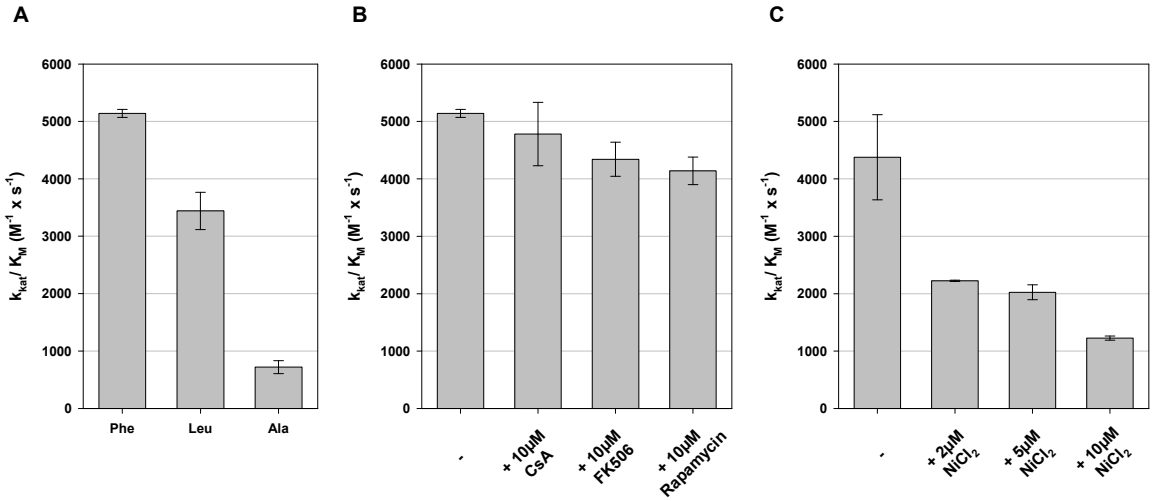


Abbildung 3-12: Spezifität und Inhibition der PPIase-Aktivität von His_6-FKBP37.7$^{1-330}$. Alle Aktivitätsmessungen erfolgten im Protease-gekoppelten PPIase-Test mit 5 µM His_6-FKBP37.7$^{1-330}$ bei pH 7,8 und 10 °C. **A)** Die Messungen erfolgten mit den Peptidsubstraten Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA, wobei Xaa für die Aminosäuren Phe, Leu oder Ala steht. **B, C)** Die Messungen erfolgten mit dem Peptidsubstrat Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA nach Vorinkubation mit den angegebenen Inhibitoren.

Die Aktivität wurde in allen bisher beschriebenen Experimenten im Chymotrypsin-gekoppelten PPIase-Test bestimmt. Da FKBP37.7 aber mehr als 20 potentielle Schnittstellen für Chymotrypsin besitzt, wurde überprüft, ob die eingesetzten Proteinvarianten unter den Messbedingungen die gesamte Zeit stabil sind. Die Experimente im Chymotrypsin-gekoppelten PPIase-Test wurden dafür erneut durchgeführt. Nach der Reaktionszeit von 6 min wurden Proben entnommen, mit SDS-Probenpuffer gemischt und anschließend im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Ergebnis für FKBP37.7$^{1-166}$ ist in Abbildung 3-13 dargestellt.

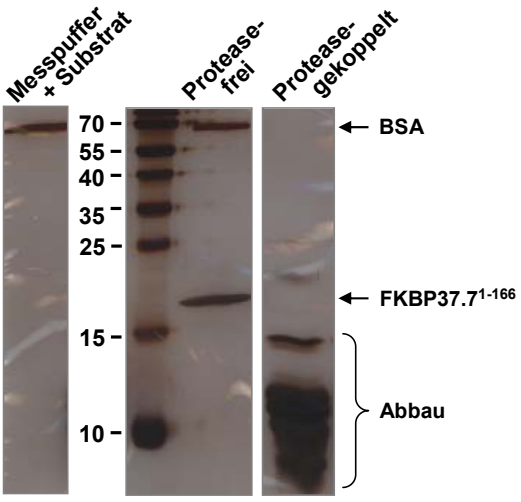


Abbildung 3-13: Stabilität von FKBP37.7$^{1-166}$ im PPIase-Aktivitätstest. Die PPIase-Aktivitätsmessungen wurden im Protease-gekoppelten und im Protease-freien Test durchgeführt. Nach 6 min Vorinkubation von 1,66 µM FKBP37.7$^{1-166}$ in Messpuffer erfolgte die Zugabe des Substrates und im Protease-gekoppelten Test zusätzlich des Chymotrypsins. Nach weiteren 6 min wurden die Messansätze mit SDS-Probenpuffer gemischt. Die Analyse erfolgt durch Auftrennung im 17,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel und anschließender Färbung mit Silbernitatlösung. Die Spur vor dem Marker zeigt einen Messansatz ohne Zugabe von FKBP37.7$^{1-166}$ oder Chymotrypsin.

Durch dieses Experiment wurde festgestellt, dass bereits FKBP37.7$^{1-166}$ als kürzeste eingesetzte Proteinvariante mehrfach gespalten wurde. Daher wurden die PPIase-Messungen mit allen Proteinvarianten im Protease-freien PPIase-Aktivitätstest wiederholt. Obwohl die Stabilität der eingesetzten Proteine in diesem Aktivitätstest ohne Protease über den gesamten Zeitraum der Messung gewährleistet war, konnten auch hierbei nur k_{kat}/K_M-Werte im Bereich von 0,9-6*10^3 M^{-1}*s^{-1} für die untersuchten FKBP37.7-Varianten ermittelt werden (Abbildung 3-14, A).
Eine Inhibition der FKBP37.7$^{1-330}$-Aktivität (5,9*10^3 M^{-1}*s^{-1}) durch FK506 konnte nicht beobachtet werden. Auch His$_6$-FKBP37.7$^{1-330}$, welches hier aus einer anderen Präparation eingesetzt wurde als bei der Messung im Chymotrypsin-gekoppelten PPIase-Test, zeigte lediglich noch eine Aktivität von 0,9*10^3 M^{-1}*s^{-1}. Demnach handelt es sich bei diesen Messungen wahrscheinlich nicht um eine durch FKBP37.7 hervorgerufene Aktivität. Wie schon im Protease-gekoppelten Aktivitätstest festgestellt wurde, kommen diese schwach messbaren Aktivitäten wahrscheinlich durch Verunreinigungen der entsprechenden Proteinpräparationen mit anderen, authentischen PPIasen aus *E. coli* zustande.
Neben der Untersuchung der PPIase-Aktivität mit Peptidsubstraten erfolgte die Bestimmung auch mit dem Proteinsubstrat RCM-T1 (Abbildung 3-14, B). Dabei wurde die Rückfaltung des entfalteten Proteins betrachtet. Die Geschwindigkeit dieser Rückfaltung wird dabei durch die *trans* nach *cis* Isomerisierung der Tyr38-Pro39-Bindung bestimmt [Kiefhaber *et al.*, 1990; Mucke & Schmid, 1994]. Die PPIasen Cyp18 und FKBP12 beschleunigten die Reaktion mit 80,7*10^3 M^{-1}*s^{-1} und 10,4*10^3 M^{-1}*s^{-1}. Dies entspricht etwa den aus der Literatur bekannten Beschleunigungsraten [Knappe *et al.*, 2007; Scholz *et al.*, 1997]. Die beiden eingesetzten FKBP37.7-Varianten bewirkten

dagegen keine Beschleunigung der Rückfaltungsreaktion. Die Geschwindigkeiten der Reaktionen lagen alle im Bereich der unkatalysierten Reaktion. Die berechneten katalytischen Effizienzen betrugen somit lediglich 7,1 $M^{-1}*s^{-1}$ für His_6-FKBP37.7$^{1-330}$ und 34 $M^{-1}*s^{-1}$ für FKBP37.7$^{1-166}$.

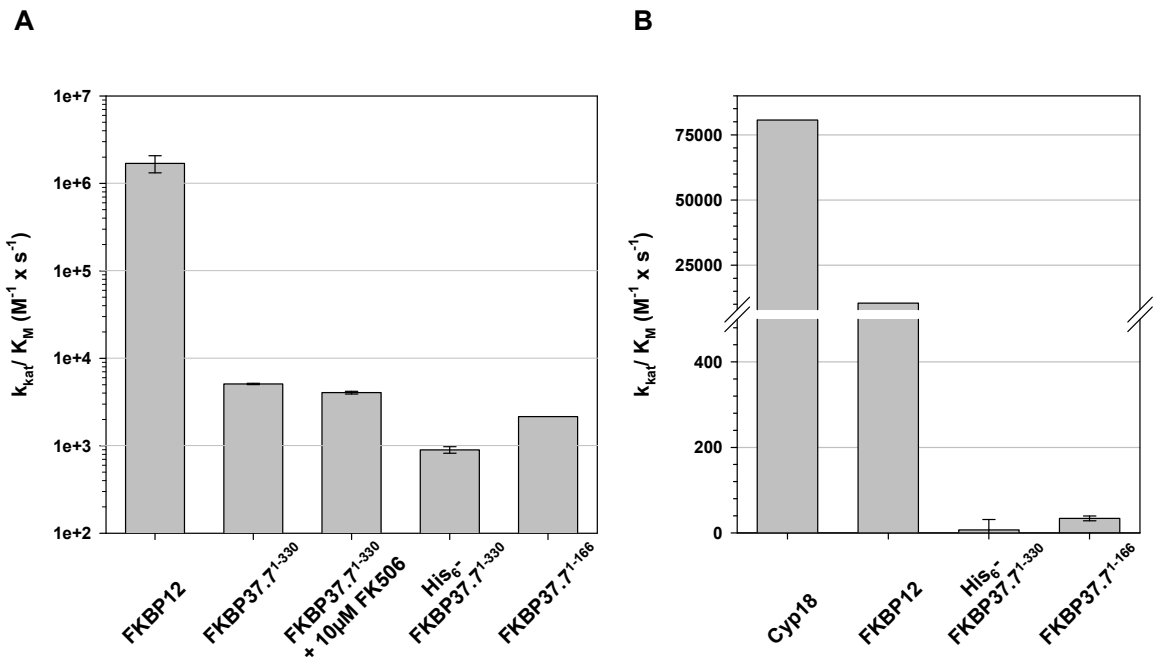


Abbildung 3-14: PPIase-Aktivitätsmessung von FKBP37.7 im Protease-freien PPIase-Test und bei der Rückfaltung der RCM-T1. (A) Die Aktivitätsmessungen im Protease-freien PPIase-Test erfolgten mit Abz-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA als Substrat bei pH 7,8 und 10 °C. Dabei wurden 10 nM FKBP12, 4 µM FKBP37.7$^{1-330}$, 4 µM His_6-FKBP37.7$^{1-330}$ und 2,5 µM FKBP37.7$^{1-166}$ zur Messung eingesetzt. Die Inhibition der Aktivität erfolgte mit 10 µM FK506. **(B)** Die Bestimmung der Rückfaltung von RCM-T1 erfolgte in 100 mM Tris, 2 M NaCl pH 8,0 bei 10 °C. Zur Beschleunigung der Reaktion wurden 100 nM Cyp18, 500 nM FKBP12, 7 µM His_6-FKBP37.7$^{1-330}$ oder 5 µM FKBP37.7$^{1-166}$ eingesetzt.

In der Literatur existieren Hinweise, dass Hsp90 neben der TPR-Domäne möglicherweise eine zweite Interaktion mit der PPIase-Domäne von FKBP37.7 eingeht [Kazlauskas *et al.*, 2002]. Daher wurde die Möglichkeit überprüft, ob Hsp90 aufgrund dieser möglichen Interaktion in der Lage ist die PPIase-Aktivität von FKBP37.7 zu beeinflussen. Vor Beginn der Messungen musste hierfür Hsp90 rekombinant hergestellt werden.

Die Klonierung, sowie die Proteinpräparation von His_6-Hsp90β$^{1-724}$ erfolgten wie in den Abschnitten 2.2.2.8. und 2.2.3.5. beschrieben. Vor den weiteren Messungen wurde die Faltung des hergestellten Proteins mittels CD-Spektroskopie untersucht (Abbildung 3-15, A). Das CD-Spektrum entspricht dem eines vorwiegend α–helikal organisierten Proteins. His_6-Hsp90β$^{1-724}$ wurde als korrekt gefaltet angenommen und für die weiteren Messungen eingesetzt.

Die Messung der PPIase-Aktivität wurde im Protease-freien PPIase-Test in Anwesenheit von His_6-Hsp90β$^{1-724}$ erneut durchgeführt (Abbildung 3-15, B). Dargestellt sind die Geschwindigkeits-konstanten der jeweiligen Reaktionen. Bei der Messung mit 1 µM His_6-FKBP37.7$^{1-330}$ wurde

lediglich eine geringe Aktivität beobachtet, während die Messung mit 1 µM His_6-Hsp90β^{1-724} das Vorhandensein einer höheren Fremdaktivität zeigte. Wurden beide Proteine in der gleichen Reaktion kombiniert eingesetzt, kam es zu keiner Erhöhung der Aktivität. Auch durch Zugabe von ATP/$MgCl_2$ konnte keine Zunahme der PPIase-Aktivität festgestellt werden. Eine Aktivierung von FKBP37.7 durch Hsp90 findet unter den gewählten Bedingungen demnach nicht statt.

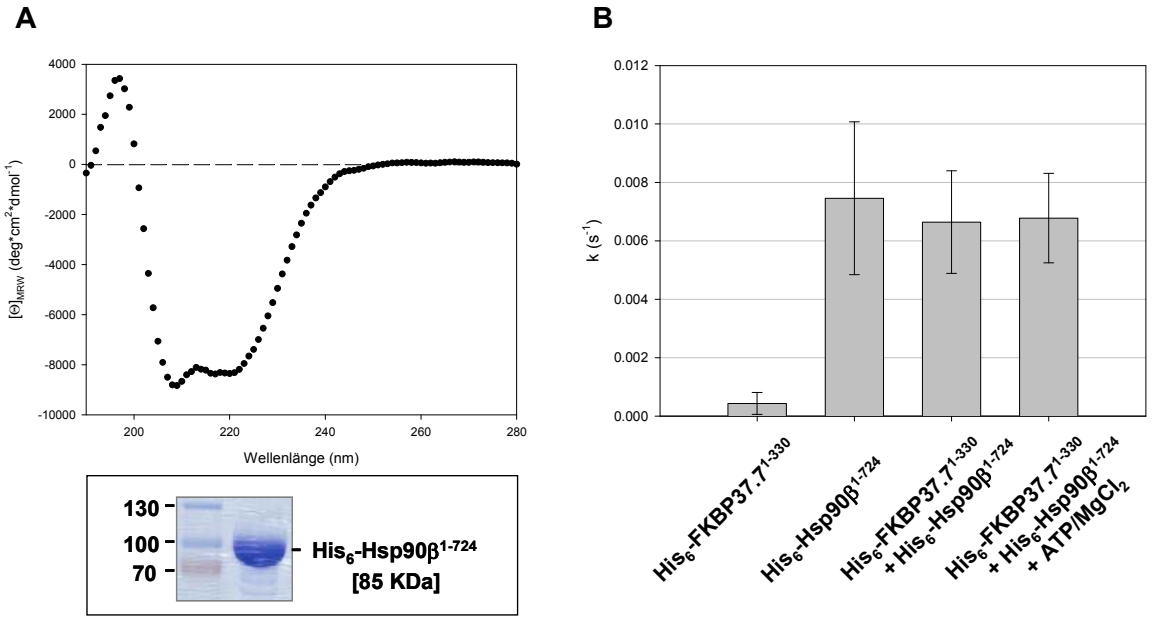


Abbildung 3-15: Der Einfluß von Hsp90 auf die PPIase-Aktivität von FKBP37.7. A) His_6-Hsp90β^{1-724} wurde rekombinant in *E. coli* hergestellt. Dargestellt ist das mit Coomassielösung gefärbte 10 %ige SDS-Polyacrylamidgel und das CD-Spektrum, welches mit 5 µM Protein in 10 mM Na_2HPO_4 pH 8,0 bei 10 °C aufgenommen wurde. **B)** Die Aktivitätsmessungen erfolgten im Protease-freien PPIase-Test mit Abz-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA als Substrat bei pH 7,8 und 10 °C. In den Messungen wurde 1 µM His_6-FKBP37.7$^{1-330}$, 1 µM His_6-Hsp90β^{1-724} bzw. 1 mM ATP/2 mM $MgCl_2$ eingesetzt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Aktiviäten von Enzymen durch das Vorhandensein von posttranslationellen Modifikationen wie zum Beispiel Phosphorylierungen reguliert werden können [Johnson & O'Reilly, 1996]. Da die bisher im PPIase-Aktivitätstest eingesetzten FKBP37.7-Varianten alle in *E. coli* überexprimiert und die Proteine aus den Lysaten gereinigt wurden, können solche möglicherweise wichtigen posttranslationellen Modifikationen bei diesen Proteinen fehlen. Um auszuschließen, dass das Fehlen einer PPIase-Aktivität im Test auf das Fehlen solcher eukaryotischer Modifikationen zurückzuführen ist, wurde die PPIase-Aktivitätsmessung mit FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ wiederholt, welches in humanen Zellen überexprimiert und anschließend über eine IgG-Affinitätsmatrix daraus gereinigt wurde.

Die Abschätzung der Menge an eingesetztem FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ in den PPIase-Aktivitätsmessungen erfolgte durch ein SDS-Polyacrylamidgel, da eine Bestimmung mit spektroskopischen Methoden durch noch vorhandenes FLAG-Peptid in den Elutionsfraktionen nicht möglich war. Hierbei wurden definierte Mengen des aus *E. coli* aufgereinigten FKBP37.7$^{1-330}$ (Abschnitt 3.2.)

und jeweils 40 µl der Elutionsfraktion 2 (Abbildung 3-5) mit FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ bzw. der FLAG-Kontrollzellen aufgetrennt (Abbildung 3-16, A). Die densitometrische Auswertung des Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgels ergab eine eingesetzte Menge von etwa 1 µg FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$, was einer Konzentration von 25 nM in den Aktivitätsmessungen entsprach. Alle PPIase-Aktivitätsmessungen wurden mit 25 nM FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ durchgeführt (Abbildung 3-5). Zur Kontrolle wurde die PPIase-Aktivität ebenfalls mit jeweils 40 µl der Elutionsfraktion 2 aus Leervektor-überexprimierenden HEK293-Zellen bestimmt, deren Präparation identisch durchgeführt wurde (FLAG-Kontrolle). Das Ergebnis dieser Messungen ist in Abbildung 3-16, B dargestellt. Auch bei der Untersuchung mit FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ konnte keine PPIase-Aktivität festgestellt werden. Die in einer Vierfachbestimmung gemessenen Aktivitäten der katalysierten Reaktion mit FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ lagen im Durchschnitt (k_{obs}= 6,5*10^{-3} s^{-1}) im Bereich der unkatalysierten Reaktionen (k_{obs}= 6,7*10^{-3} s^{-1}) bzw. etwas niedriger, was sich in der Abbildung 3-16, B als negativer Balken widerspiegelt. Parallel zu diesen Messungen wurden als Kontrolle auch die Geschwindigkeitskonstanten mit 3,33 nM FKBP12 bestimmt (k_{obs}= 1,2*10^{-2} s^{-1}), was einer katalytischen Effizienz von 1,6*10^{6} M^{-1}*s^{-1} entspricht.

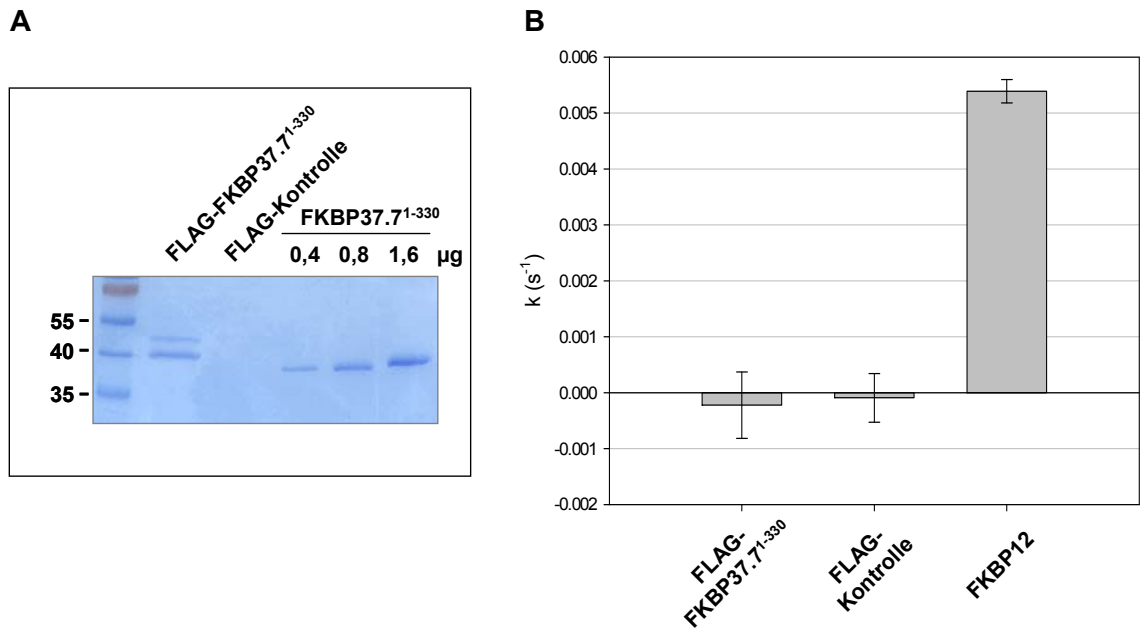


Abbildung 3-16: PPIase-Aktivität von FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ aus HEK293-Zellen. A) Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den PPIase-Messungen wurden 40 µl der Elutionsfraktion 2 von FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$, 40 µl der Elutionsfraktion 2 aus Kontrollzellen, sowie definierte Mengen des in *E. coli* hergestellten und gereinigten FKBP37.7$^{1-330}$ im 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend mit Coomassielösung gefärbt. Die Auswertung erfolgte danach densitometrisch. **B)** Die Aktivitätsmessungen erfolgten im Protease-freien PPIase-Test mit Abz-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA als Substrat bei pH 7,8 und 10 °C. In den Messungen wurden je 40 µl der Fraktion E2 von FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ und der Kontrollzellen, sowie 3,33 nM FKBP12 eingesetzt.

Um auszuschließen, dass die PPIase-Aktivität von FKBP37.7 bei Verwendung eines Peptidsubstrates nicht nachweisbar ist, wurde die Bestimmung der Aktivität auch mit dem Proteinsubstrat RCM-T1 durchgeführt (Abbildung 3-17). Dabei wurden deutlich größere Mengen

FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ eingesetzt um auch eine sehr kleine katalytische Effizienz detektieren zu können. Durch das Vereinigen der Elutionsfraktionen 2 und 3 (Abbildung 3-5) mehrerer Protein-präparationen und der anschließenden Dialyse gegen den Rückfaltungspuffer war es möglich jeweils 1 ml des Eluates für die Messungen einzusetzen, was einer Endkonzentration von 0,5 µM FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ im Reaktionsansatz entsprach. Auch in diesem Experiment konnte FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ die Rückfaltung der RCM-T1 nicht beschleunigen (Abbildung 3-17). Die gemessenen Aktivitäten mit FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ und mit der FLAG-Kontrolle lagen auch hier im Bereich der unkatalysierten Reaktion, während FKBP12 die aus der Literatur bekannte Aktivität zeigte.

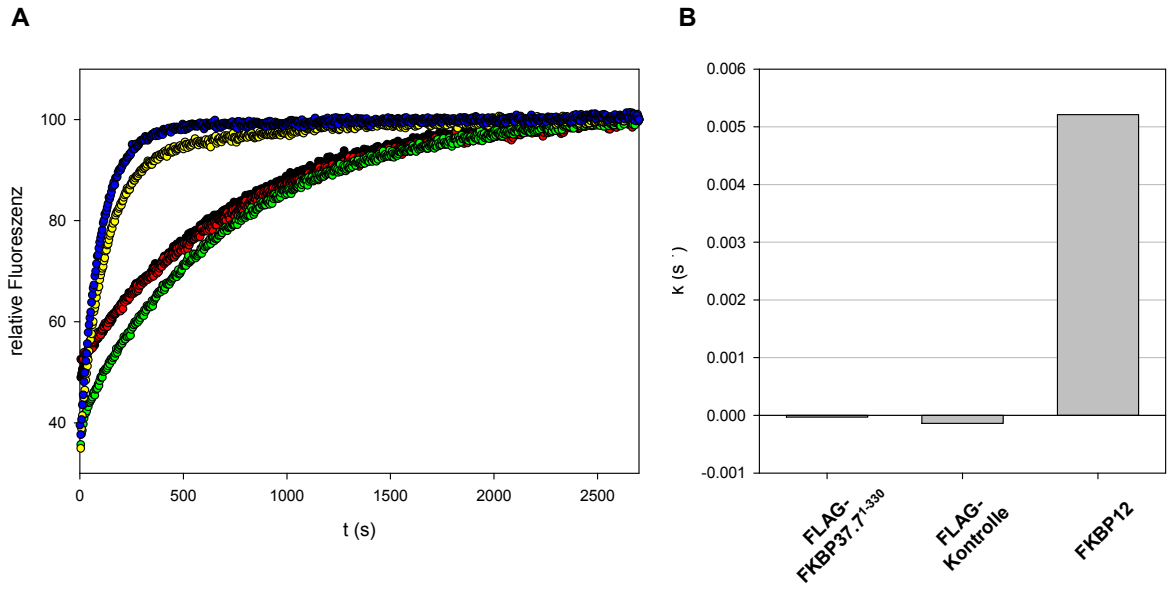


Abbildung 3-17: Beschleunigung der Rückfaltung der RCM-T1 durch FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$. Die Bestimmung der Rückfaltung von RCM-T1 erfolgte in 100 mM Tris, 2 M NaCl pH 8,0 bei 10 °C (●). Zur Beschleunigung der Reaktion wurden 100 nM Cyp18 (●), 500 nM FKBP12 (●), 500 nM FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ (1ml) (●) und FLAG-Kontrolle (1ml) (●) eingesetzt. **A)** Rückfaltung der RCM-T1 über 45 min. **B)** Geschwindigkeitskonstanten der katalysierten Reaktionen.

Um eine Erklärung für das Fehlen der Aktivität zu finden, wurde ein Vergleich mit dem katalytisch aktiven Zentrum von FKBP12 angestellt, allerdings vorerst nur durch den Vergleich der Aminosäureabfolge, da noch keine strukturellen Daten von FKBP37.7 vorhanden waren. Ein solcher Vergleich wurde bereits im Abschnitt 3.1. dargestellt. Dieser Sequenzvergleich zeigte, dass fünf der 13 Reste des katalytischen Zentrums von FKBP12 in FKBP37.7 identisch sind. Allerdings zeigte es auch, dass FKBP37.7 eine Insertion innerhalb der PPIase-Domäne trägt. Da über die genaue Position, Struktur oder Funktion dieser Insertion bislang nichts bekannt ist, fällt es schwer einen eindeutigen Vergleich zwischen den beiden PPIase-Domänen zu ziehen und die Frage der fehlenden Aktivität zu beantworten. Dies ist nur möglich, wenn zusätzlich Strukturdaten von FKBP37.7 vorliegen und somit die räumliche Anordnung der Aminosäuren im aktiven Zentrum

betrachtet werden kann. Daher sollte an dieser Stelle der Arbeit begonnen werden, die Struktur der PPIase-Domäne von FKBP37.7 zu klären.

3.6. Strukturaufklärung der PPIase-Domäne von FKBP37.7 mittels NMR-Spektroskopie

Für die Aufklärung der dreidimensionalen Proteinstruktur von FKBP37.7$^{1-166}$ mittels NMR-Spektroskopie war es zuerst notwendig die ^{1}H-, ^{13}C- und ^{15}N-Resonanzen der einzelnen Aminosäurereste des Proteins zuzuordnen. Dies erfolgte durch eine sequentielle Resonanz-Zuordnung anhand von durchgeführten Tripel-Resonanzexperimente [Ikura *et al.*, 1990; Kay *et al.*, 1990]. Hierbei wurden die Kopplungen zwischen den drei verschiedenen Kernsorten ^{1}H, ^{13}C und ^{15}N genutzt. Als Vorraussetzung für die Tripel-Resonanzexperimente musste isotopenmarkiertes Protein hergestellt werden, da die natürliche Häufigkeit von ^{13}C bei 1 % und von ^{15}N bei 0,4 % liegt [Bohlke *et al.*, 2003]. Bei ^{15}N-markiertem FKBP37.7$^{1-166}$ wurden bis zu 98 % ^{15}N-Stickstoffatome eingebaut und bei zweifach markiertem ^{13}C/^{15}N-FKBP37.7$^{1-166}$ zusätzlich bis zu 99 % ^{13}C-Kohlenstoffatome eingebaut. Für diesen Einbau wurden die FKBP37.7$^{1-166}$-überexprimierenden *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen in M9-Minimalmedium kultiviert, welches ^{15}N-NH_4Cl als einzige Stickstoffquelle und gegebenenfalls ^{13}C-Glukose als einzige Kohlenstoffquelle enthielt. Die geeigneten Bedingungen für die Kultivierung wurden zuvor in nicht isotopenangereichertem M9-Minimalmedium ausgetestet. Die Proteinüberexpression erfolgte dabei für 3 h nach Induktion mit 0,5 mM IPTG bei 37 °C. Die Reinigung wurde wie in Abschnitt 2.2.3.5. für FKBP37.7$^{1-166}$ beschrieben durchgeführt. Aus sechs Litern M9-Minimalmedium konnten dabei 280 mg bis zur Homogenität gereinigtes FKBP37.7$^{1-166}$ gewonnen werden, welches bis zu einer Konzentration von 5,2 mM löslich erhalten werden konnte. Alle NMR-spektroskopischen Messungen erfolgten durch Dr. Katja Haupt und PD Dr. Christian Lücke.

3.6.1. Verbesserung der Proteinstabilität und der Messbedingungen für die Strukturaufklärung

Vor Beginn der ersten NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurde die strukturelle und die proteolytische Stabilität von FKBP37.7$^{1-166}$ mittels CD-Spektroskopie und im SDS-Polyacrylamid-gel über mehrere Tage bei verschiedenen Temperaturen betrachtet. Dies war notwendig, da das Protein für die NMR-spektroskopischen Messungen über mehrere Tage stabil sein musste. Für die Stabilitätsuntersuchung wurden Proteinproben für mindestens 4 Tage bei 4, 10, 15, 23 und 37 °C inkubiert und zwischenzeitlich Proben für SDS-Polyacrylamidgele sowie CD-Spektren

entnommen. In Abbildung 3-18 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung für 4 °C und 23 °C auszugsweise dargestellt.

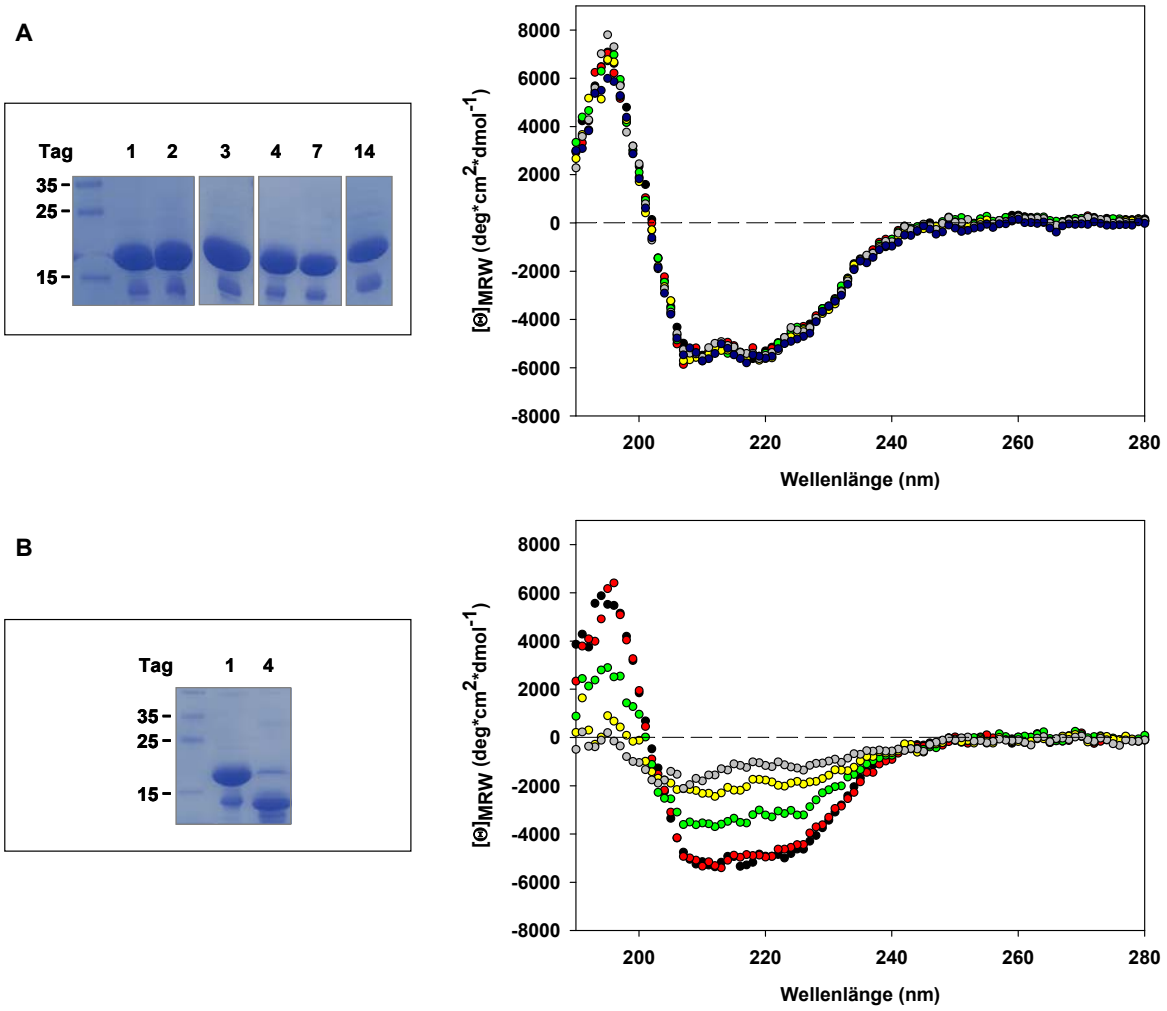


Abbildung 3-18: Stabilität von FKBP37.7$^{1-166}$ bei 4 °C (A) und 23 °C (B). Proteinlösungen mit FKBP37.7$^{1-166}$ wurde bei 4 °C und 23 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten ((●) Tag 0; (●) Tag 1; (●)Tag 2; (●) Tag 3; (●) Tag 4; (●) Tag 7) wurden Proben für Fern-UV CD-Spektren und SDS-Polyacrylamidgele entnommen. Alle CD-spektroskopischen Messungen wurden mit 5 µM FKBP37.7$^{1-166}$ in 10 mM Na_2HPO_4 pH 8,0 durchgeführt. Im 17,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel wurden jeweils 2 nmol FKBP37.7$^{1-166}$ aufgetrennt und anschließend mit Coomassielösung gefärbt.

Über einen Zeitraum von sieben Tagen sind bei 4 °C keine Änderungen der Signale und somit keine Veränderung der Proteinkonzentration im CD Spektrum zu erkennen. Auch im SDS-Polyacrylamidgel war kein gesteigerter Abbau über den betrachteten Zeitraum von 14 Tagen zu beobachten. Bei 23 °C hingegen war bereits nach zwei Tagen eine deutliche Abnahme der Signale und damit der Proteinkonzentration im CD Spektrum erkennbar. Nach vier Tagen ließ sich im CD-Spektum kaum noch ein Signal detektieren und auch im SDS-Polyacrylamidgel war nur noch eine Restbande des Proteins vorhanden, da das Protein nach dieser Zeit bereits nahezu vollständig

abgebaut war. Generell konnte festgestellt werden: Je höher die Temperatur war, desto schneller wurde das Protein abgebaut. Vollständig stabil war das Protein über vier Tage jedoch nur bei 4 °C. Zu Beginn der NMR-spektroskopischen Messungen wurden ^{1}H-NMR-Spektren von unmarkiertem FKBP37.7$^{1-166}$ in 10 mM Na_2HPO_4 pH 8,0 bei verschiedenen Temperaturen und Proteinkonzentrationen aufgenommen, um geeignete Bedingungen für die weiteren Experimente zu bestimmen. Dabei wurde versucht eine möglichst geringe Linienbreite und somit schmale Signale im Bereich der Amid-Protonen (6,5-10,5 ppm) und der Cα-Protonen (4-6 ppm) zu erhalten, was immer von der Beschaffenheit der jeweiligen Proteinprobe abhängt. In Abbildung 3-19 ist ein Vergleich zwischen zwei Spektren bei 4 °C (4 mM Protein) und bei 30 °C (1 mM Protein) dargestellt. Hierbei ist zu erkennen, dass mit 1 mM FKBP37.7$^{1-166}$ bei 30 °C Signale mit deutlich schmaleren Linienbreiten erhalten wurden.

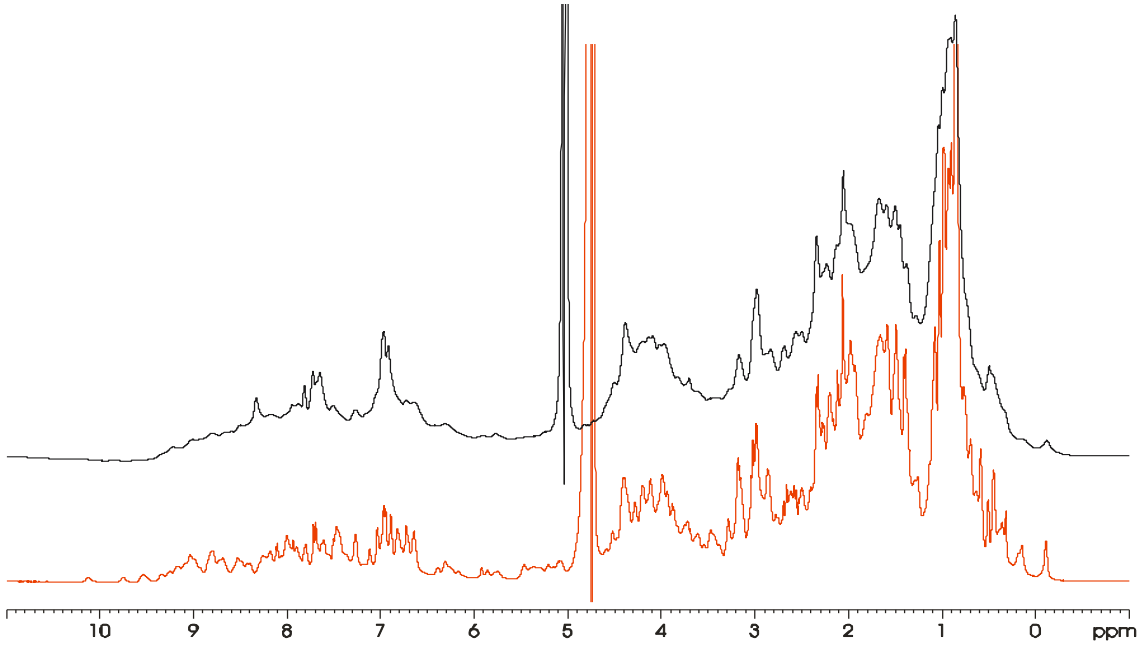


Abbildung 3-19: Überlagerung von ^{1}H-NMR-Spektren. Dargestellt sind die ^{1}H-NMR-Spektren von 4 mM FKBP37.7$^{1-166}$ bei 4 °C (—) und 1 mM FKBP37.7$^{1-166}$ bei 30 °C (—). Beide Spektren wurden in 10 mM Na_2HPO_4 pH 8,0 über 5 min am Bruker DRX 500-Spektrometer aufgenommen.

Bei der Durchführung von ^{1}H,^{1}H-TOCSY- und ^{1}H,^{1}H-NOESY-Experimenten mit 2 mM Protein über 15 h bei 4 °C wurden qualitativ schlechte Spektren mit schwachen Signalen der β-Faltblattbereiche erhalten, was auf eine Oligomerbildung bzw. Aggregation hindeutet. Weitere NMR-spektroskopische Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen (4, 15, 20, 25 und 35 °C) und Proteinkonzentrationen (1 mM bzw. 4 mM) zeigten die qualitativ besten Spektren wiederrum mit 1 mM FKBP37.7$^{1-166}$ bei 35 °C. Aufgrund der Tatsache, dass bei allen Messungen bei 4 °C keine ausreichend aufgelösten Spektren für die Strukturaufklärung erhalten werden konnten, aber das Protein bei höheren Temperaturen nicht langzeitstabil war, wurde versucht bessere Spektren bei

niedrigen Temperaturen zu erhalten, alternativ die Stabilität des Proteins während der Messungen zu verbessern und gleichzeitig die Ursache der Oligomerbildung bzw. Aggregation aufzuklären.

Um eine mögliche Oligomerisierung bzw. Aggregation zu untersuchen, wurde zuerst der isoelektrischen Punkt von FKBP37.7$^{1-166}$ durch eine zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese experimentell bestimmt (Abbildung 3-20). Aggregationen können möglicherweise auftreten, wenn bei pH-Werten in der Nähe des isoelektrischen Punktes eines Proteins gearbeitet wird, da hier die Löslichkeit eines Proteins am geringsten ist. Für FKBP37.7$^{1-166}$ ist bisher lediglich ein berechneter pI-Wert von 6,0 bekannt. Dieser kann sich jedoch vom tatsächlichen pI-Wert unterscheiden, da er nicht allein von der Aminosäurezusammensetzung abhängig ist, sondern auch von der Faltung des Proteins und somit von der Oberflächenverteilung geladener Aminosäuren.

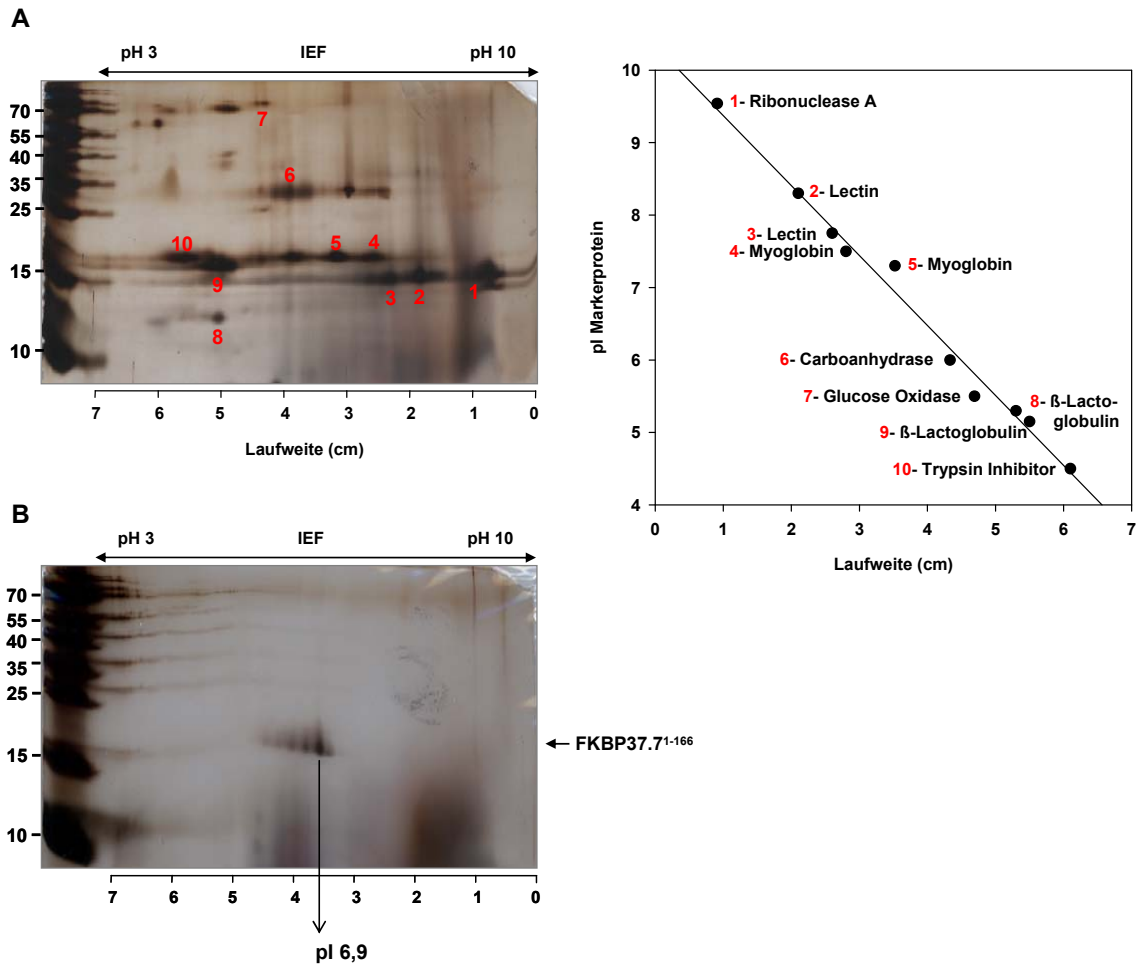


Abbildung 3-20: Bestimmung des isoelektrischen Punktes von FKBP37.7$^{1-166}$. In der ersten Dimension wurden 20 µg Proteom-Marker **(A)**, sowie 2 µg FKBP37.7$^{1-166}$ **(B)** durch isoelektrische Fokussierung in je einem IEF-Streifen pH 3-10, 7 cm aufgetrennt. In der zweiten Dimension erfolgte die Auftrennung nach Molekulargewicht im 17,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel. Anschließend wurden die Gele mit Silbernitatlösung gefärbt. Durch Ausmessen wurden die Laufweiten den bekannten pI-Werten der Proteine im Proteom Marker zugeordnet und daraus konnte dann der pI von FKBP37.7$^{1-166}$ berechnet werden.

Die Separation der Proteine erfolgte dabei in der ersten Dimension durch isoelektrische Fokussierung in einem Polyacrylamidgelstreifen mit immobilisiertem, linearem pH-Gradienten des Bereiches 3-10, gefolgt von einer zweiten Auftrennung nach dem Molekulargewicht im 17,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel. Diese Trennung wurde parallel für ein Proteingemisch mit bekannten pI-Werten der entsprechenen Proteine und für FKBP37.7$^{1-166}$ durchgeführt. Die einzelnen Proteine des Gemisches wurden nun anhand ihrer Molekulargewichte identifiziert und deren Proteinspots den bekannten pI-Werten zugeordnet. Durch Ausmessen der Wanderung in der ersten Dimension und einer anschließenden linearen Regression konnte ein isoelektrischer Punkt für FKBP37.7$^{1-166}$ berechnet werden, der sich bei pH 6,9 befindet. Dieser Wert unterscheidet sich zwar vom berechneten pI, kann aber für die mögliche Aggregation nicht die Ursache sein, da alle bisherigen NMR-Messungen bei pH 8,0 erfolgten.

Zusätzlich zum isoelektrischen Punkt wurde auch die thermische Stabilität von FKBP37.7$^{1-166}$ untersucht. Die NMR-spektroskopischen Testmessungen zeigten eine optimale Messtemperatur von 35 °C. Daher musste überprüft werden, ob das Protein bei dieser Temperatur noch stabil ist, oder ob bereits eine thermische Entfaltung stattfindet. Zur Überprüfung der thermischen Stabilität von FKBP37.7$^{1-166}$ wurde die Temperatur der Proteinlösung von 20 °C auf 80 °C erhöht und die Entfaltung dabei mittels CD-Spektroskopie verfolgt.

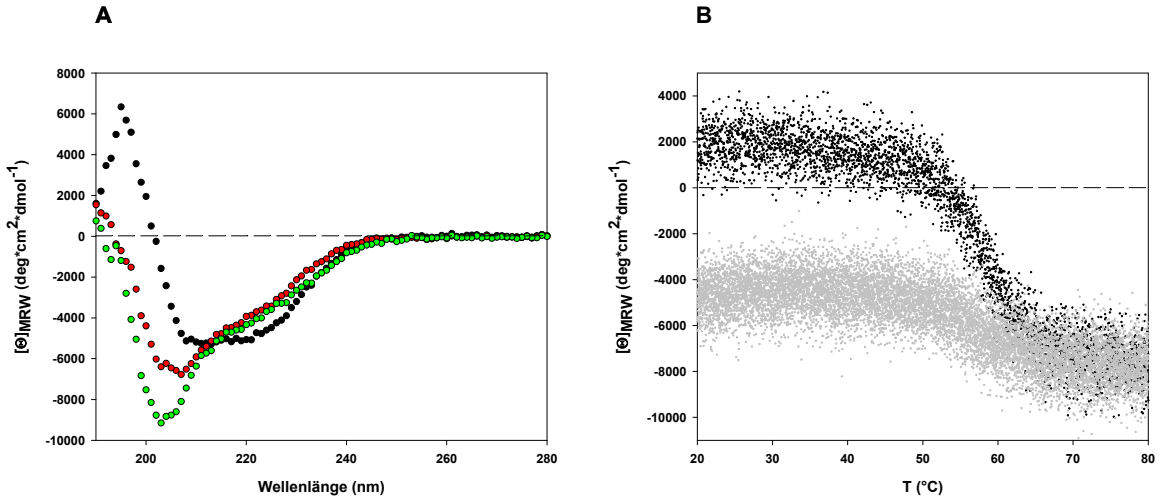


Abbildung 3-21: CD-spektroskopische Untersuchung der thermischen Denaturierung von FKBP37.7$^{1-166}$. A) Fern-UV CD-Spektren von FKBP37.7$^{1-166}$ vor der Denaturierung bei 20 °C (●), nach der Denaturierung bei 80 °C (●) und nach der Abkühlung auf 20 °C (●). **B)** Beobachtung der thermischen Denaturierung über 60 min (●) und der Renaturierung über 180 min (●) bei 200 nm von 20 °C bis 80 °C. Alle Messungen wurden in 10 mM Na_2HPO_4 pH 8,0 mit 10 µM FKBP37.7$^{1-166}$ durchgeführt.

Zu Beginn dieser Messungen wurden Fern-UV CD-Spektren von nicht denaturiertem FKBP37.7$^{1-166}$ bei 20 °C und denaturiertem FKBP37.7$^{1-166}$ bei 80 °C aufgenommen (Abbildung 3-21, A). Dabei sind die Veränderungen der Signalintensität bei 222 nm und die Ausprägung eines neuen Minimums bei circa 200 nm deutlich zu beobachten. Da bei 200 nm die größte Differenz

zwischen den beiden Spektren zu erkennen ist, wurde für die Beobachtung der Denaturierung über den gesamten Temperaturbereich diese Wellenlänge gewählt (Abbildung 3-21, B). Die Denaturierung beginnt bei circa 45 °C, ist bei circa 70 °C abgeschlossen und hat einen Übergangsmittelpunkt bei 58 °C. Auch die Renaturierung wurde bei Abkühlung über 180 min beobachtet; dabei konnte die Start-Signalintensität bei 200 nm allerdings nicht mehr erreicht werden. Auch das vollständige Fern-UV CD-Spektrum nach der Abkühlung zeigt, dass dieses Protein seine native Struktur nicht wieder annimmt und somit die Denaturierung irreversibel verläuft. Für die weiteren NMR-Experimente mit FKBP37.7$^{1-166}$ können demnach Temperaturen bis maximal 45 °C und pH-Werte ober- oder unterhalb von pH 6,9 in Betracht gezogen werden.

Wie bereits beschrieben, ergaben die vorangegangenen NMR-spektroskopischen Messungen die qualitativ besten Spektren bei 35 °C. Allerdings sind Messungen bei dieser Temperatur über einen längeren Zeitraum nicht möglich, da das Protein bereits bei 23 °C nach drei Tagen vollständig abgebaut wurde (Abbildung 3-18). Das circa 14 kDa große Abbaufragment von FKBP37.7$^{1-166}$ aus dem SDS-Polyacrylamidgel in Abbildung 3-18, B wurde massenspektrometrisch untersucht (Anhang 1). Dabei ließ sich ein Abbau am C-Terminus bestätigen, was eine proteolytische Spaltung vermuten lässt. Es wurde nun versucht, durch Absenken des pH-Wertes die Bedingungen so zu verbessern, dass für FKBP37.7$^{1-166}$ auch bei niedrigen Temperaturen gut aufgelöste und schmale Signale in den NMR-Spektren beobachtet werden können. Dabei sollte der Abbau unterdrückt und die mögliche Aggregatbildung zurückgedrängt werden. Da die Löslichkeit eines Proteins im Bereich seines pI-Wertes am geringsten ist, aber für das Absenken des pH-Wertes der Proteinlösung der pI durchschritten werden musste, wurde die Konzentration von FKBP37.7$^{1-166}$ deutlich verringert, indem eine kleine Menge des konzentrierten Proteins in ein großes Volumen 25 mM NaH_2PO_4 pH 5,4 verdünnt wurde. Bei diesem Vorgehen präzipitierte allerdings sämtliches Protein und ließ sich weder im Zielpuffer von 25 mM NaH_2PO_4 pH 5,4 noch im ursprünglichen Puffer von 10 mM Na_2HPO_4 pH 8,0 resuspendieren. Die Denaturierung war somit irreversibel.

Um für eine Resonanz-Zuordnung noch ausreichend aufgelöste NMR-Spektren zu erhalten, wurde nun versucht die Proteinstabilität bei höheren Temperaturen zu verbessern. Dafür wurde den Proteinproben 0,05 mM Natriumazid zugesetzt, um das mikrobielle Wachstum und somit die Bildung von Proteasen in der Lösung zu unterbinden. Die Stabilität des Proteins konnte dadurch bei Temperaturen über 4 °C aber nicht wesentlich erhöht werden. Das fertig gereinigte Protein wurde daraufhin zusätzlich über einen Zeitraum von 12 h mit einem Proteaseinhibitor-Cocktail behandelt und dieser anschließend wieder durch Dialyse entfernt. Erneut wurde die Stabilität der behandelten Proteinprobe bei den Temperaturen 4, 23, 30 und 37 °C über acht Tage durch CD-Spektroskopie und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese beobachtet (Abbildung 3-22). Es zeigte sich, dass FKBP37.7$^{1-166}$ nun sowohl bei 4 °C, als auch 23 °C über acht Tage vollständig stabil war, während sich bei 37 °C bereits nach einem Tag leichte Veränderungen im CD-Spektrum beobachten ließen. Bei einer Temperatur von 30 °C ließen sich über fünf Tage kein gesteigerter

Abbau im SDS-Polyacrylamidgel und lediglich kleine Veränderungen im CD-Spektrum beobachten.

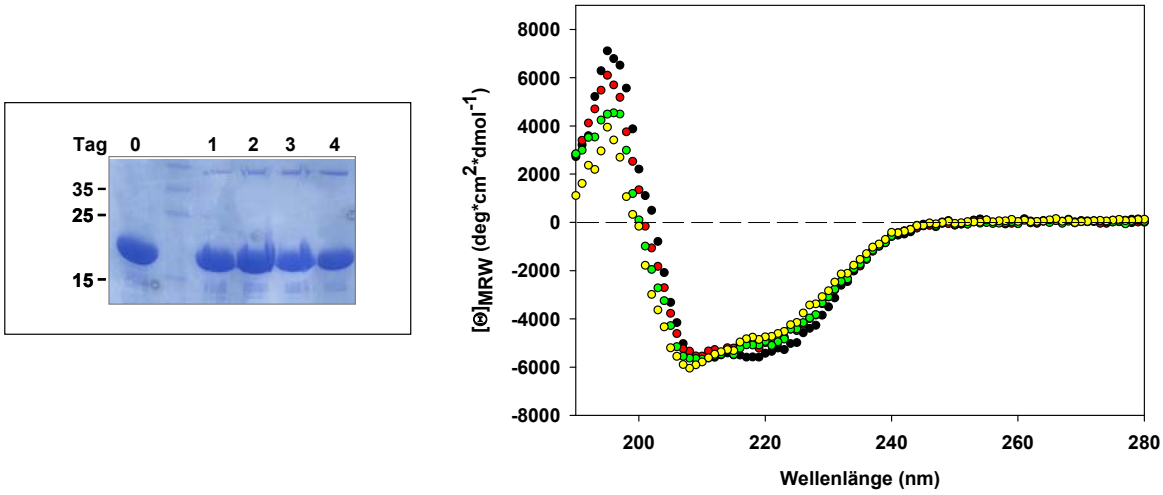


Abbildung 3-22: Stabilität des mit Proteaseinhibitor behandelten FKBP37.7$^{1-166}$ bei 30 °C. Die Proteinlösung mit FKBP37.7$^{1-166}$ wurde bei 30 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten ((•) Tag 0; (•) Tag 1; (•)Tag 2; (•) Tag 5) wurden Proben für Fern-UV CD-Spektren und das SDS-Polyacrylamidgel entnommen. Alle CD-spektroskopischen Messungen wurden mit 5 µM FKBP37.7$^{1-166}$ in 10 mM Na_2HPO_4 pH 8,0 durchgeführt. Im 17,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel wurden jeweils 2 nmol FKBP37.7$^{1-166}$ aufgetrennt und anschließend mit Coomassielösung gefärbt.

Diese Zeitdauer erwies sich als ausreichend für die Durchführung der benötigten NMR-spektroskopischen Messungen.

3.6.2. Die sequentielle Zuordnung der Resonanzen von FKBP37.7$^{1-166}$

Nach erfolgreicher Stabilisierung der Proteinprobe des unmarkierten FKBP37.7$^{1-166}$ wurden auch Proben mit ^{15}N- und ^{13}C/^{15}N-markiertem FKBP37.7$^{1-166}$ nach der gleichen Prozedur hergestellt. Anschließend erfolgte die Aufnahme aller für die sequentielle Zuordnung und die Strukturrechnung benötigten Spektren mit 2 mM Protein bei 30 °C in 10 mM Na_2HPO_4-Puffer pH 8,0. Eine Aufstellung der aufgenommen Spektren und deren Informationsgehalt ist in Tabelle 2-6 dargestellt. Im ^{1}H/^{15}N-TROSY-Spektrum konnten die Amidresonanzen des Peptidrückgrates beobachtet werden (Abbildung 3-26). Diese mussten nun den einzelnen Aminosäuren zugeordnet werden. Bei der sequentiellen Zuordnung wurden mittels verschiedener Tripel-Resonanzexperimente die Kohlenstoffverschiebungen der einzelnen Aminosäurereste bestimmt. Jedes Kohlenstoffatom einer Aminosäure besitzt dabei eine typische chemische Verschiebung. Mittels des durchgeführten NHCA-Experimentes konnten die ^{1}H- und ^{15}N-Resonanzen der Amidgruppe einer Aminosäure (i) und die chemischen Verschiebungswerte des eigenen Cα-Atoms (i) sowie des Cα-Atoms der dazu

N-terminal benachbarten Aminosäure (i-1) detektiert werden. Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 3-23, A dargestellt.

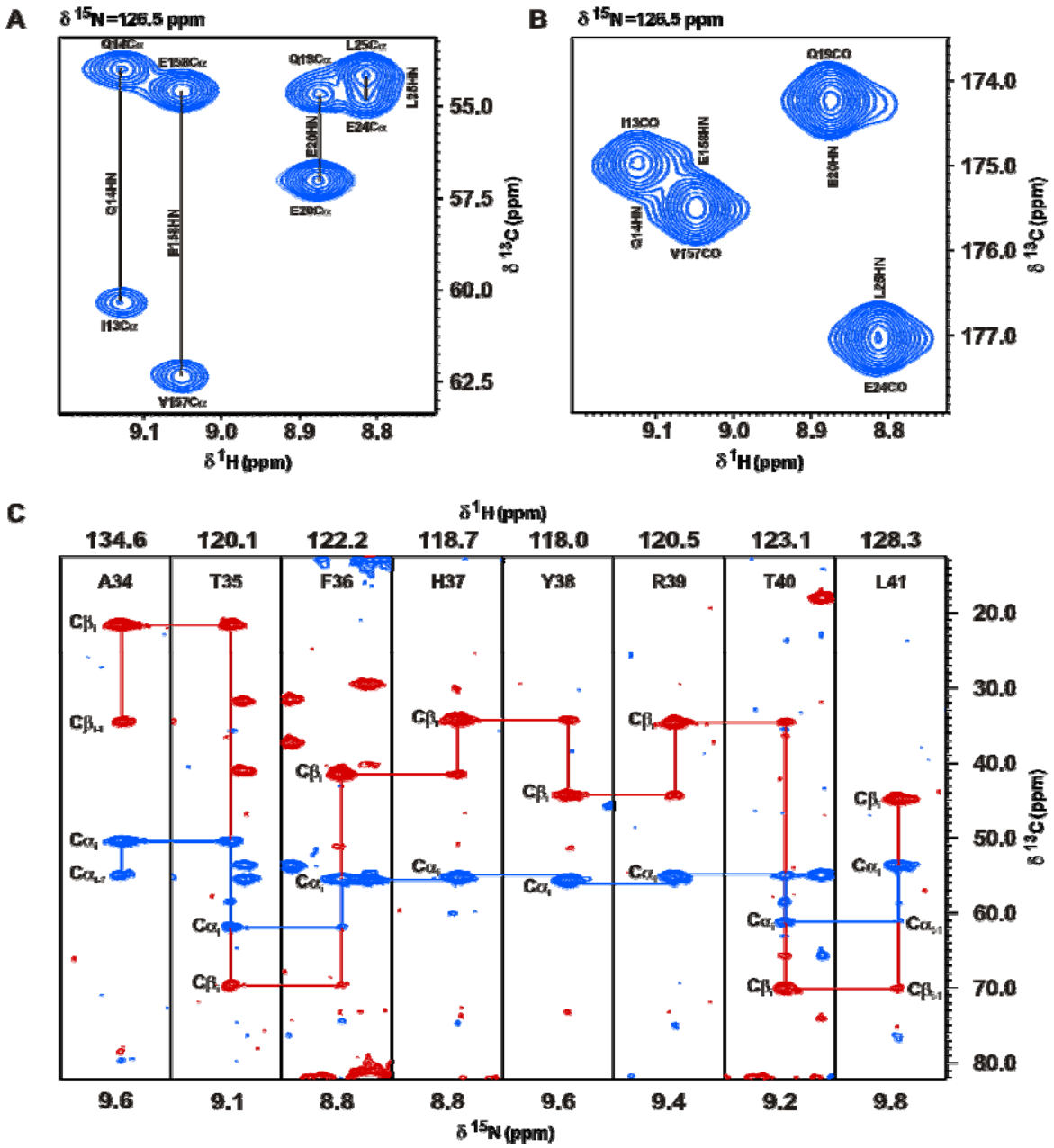


Abbildung 3-23: Tripelresonanzexperimente zur sequentiellen Zuordnung der Kohlenstoff-Resonanzen von FKBP37.7$^{1-166}$. A) Im NHCA-Experiment konnte die Korrelation der ^{1}H- und ^{15}N-Kerne der Proteinrückgrat-Amidgruppe mit dem eigenen Cα-Atom sowie dem Cα–Atom der N-terminal benachbarten Aminosäure detektiert werden. **B)** Im HNCO-Experiment konnte die Korrelation der ^{1}H- und ^{15}N-Kerne der Proteinrückgrat-Amidgruppe mit dem CO-Atom der N-terminal benachbarten Aminosäure detektiert werden. Dargestellt sind die Signale der gleichen Aminosäuren wie beim HNCA-Experiment. **C)** „*Sequential Walk*" im NHCACB-Experiment für die Aminosäuren Ala34-Leu41. Dabei konnte die Korrelation der ^{1}H- und ^{15}N-Kerne der Proteinrückgrat-Amidgruppe mit dem eigenen Cα- und Cβ-Atom (i), sowie dem Cα- und Cβ-Atom der N-terminal benachbarten Aminosäure (i-1) detektiert werden.

Durch das HNCACB-Experiment konnten die chemischen Verschiebungswerte der $C\alpha_i$, $C\beta_i$, $C\alpha_{i-1}$, $C\beta_{i-1}$-Atome, sowie durch das CC(CO)NH-Experiment nahezu aller aliphatischen Kohlenstoff-

atome der N-terminal benachbarten Aminosäure ($C\alpha_{i-1}$, $C\beta_{i-1}$, $C\gamma_{i-1}$, …) zugeordnet werden. Auf diese Weise ließ sich der Typ der jeweils N-terminal benachbarten Aminosäure zuordnen. Mit diesen Informationen konnten dann Sequenzstücke zweifelsfrei identifiziert werden. Ein Beispiel für die Zuordnung eines Sequenzstückes („*Sequential Walk*“) im HNCACB-Experiment ist für die Aminosäuren Ala34 bis Leu41 in Abbildung 3-23, C dargestellt. Fehlende Informationen wurden anderen Spektren entnommen, wie zum Beispiel dem HNCO-Experiment. Darin konnten die ^{1}H- und ^{15}N-Resonanzen der Amidgruppe und die chemischen Verschiebungswerte des CO-Atoms der dazu N-terminal benachbarten Aminosäure (i-1) detektiert werden. Ein Ausschnitt einer Scheibe des HNCO-Spektrums ist in Abbildung 3-23, B dargestellt. Neben den Kohlenstoffresonanzen mussten für die anschließende Strukturrechnung auch die Resonanzen aller Protonen ermittelt werden. Dies erfolgte beispielsweise durch das H(C)CH-TOCSY-Experiment: Als Beispiel sind hier die Spinnsysteme der Aminosäuren Ile64 und Ile5 in Abbildung 3-24 dargestellt. Zu erkennen ist die Korrelation zwischen $C\delta H_3$ und allen Kohlenstoff-gebundenen Protonen des jeweiligen Isoleucins.

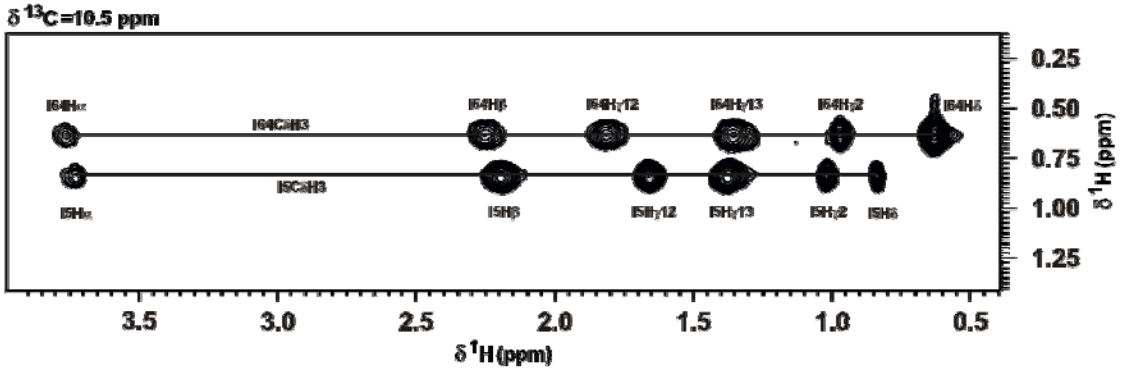


Abbildung 3-24: Tripelresonanzexperiment zur sequentiellen Zuordnung der Protonen-Resonanzen von FKBP37.7$^{1-166}$. Im H(C)CH-TOCSY-Experiment konnten Korrelationen zwischen aliphatischen ^{1}H- und ^{13}C-Kernen beobachtet werden. Dargestellt ist am Beispiel der Aminosäuren Ile64 und Ile5, jeweils die Korrelation der vom Proteinrückgrat am weitesten entfernten Gruppe (CδH3) und allen Kohlenstoff-gebundenen Protonen innerhalb des Aminosäurerestes.

Alle chemischen Verschiebungswerte wurden den NMR-Spektren mittels automatischem *Peak picking* mit dem Progamm FELIX 2000 (Accelrys Inc., San Diego, CA, U.S.A.) entnommen.

Anhand der aufgeführten Strategie konnten 59 % aller Aminosäurereste, das heißt 97 Spinsysteme des Peptidrückgrats, den beobachteten Signalen des $^{1}H/^{15}N$-HSQC-Spektrums zugeordnet werden. Dies ist allerdings nicht ausreichend für eine Strukturrechnung, somit musste die Qualität der Proben noch einmal gesteigert werden. Im Polyacrylamidgel aus Abbildung 3-22 kann man die Zunahme einer Bande bei circa 38 kDa beobachten, was auf eine Dimerbildung hindeuten könnte und somit die Vermutung der Oligomerisierung aus den vorangegangenen NMR-spektroskopischen Messungen stützt. Da unter anderem Signale in der unmittelbaren Umgebung der Cysteine 131 und 132 nicht zugeordnet werden konnten, wurde die Möglichkeit der Bildung intermolekularer

Disulfidbrücken und damit eine Dimerisierung in Betracht gezogen. Zum Ausschluss dieser Modifizierung wurde eine Probe mit ^{15}N-markiertem FKBP37.7$^{1-166}$ nach der Behandlung mit Proteaseinhibitor-Cocktail für weitere 15 min mit 2,8 mM TCEP behandelt, da diese Verbindung Disulfidbrücken vollständiger reduziert als DTT [Getz *et al.*, 1999]. Da TCEP aber in Phosphatpuffer nicht lange stabil ist, wurde zusätzlich gegen 5 mM DTT in 10 mM Na_2HPO_4 pH 7,5 dialysiert. Die anschließende Auftrennung einer Proteinprobe im SDS-Polyacrylamidgel unter nicht reduzierenden Bedingungen zeigte keine Bande bei 38 kDa (Abbildung 3-25).

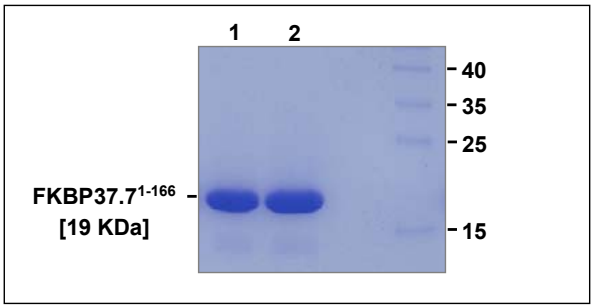


Abbildung 2-25: Behandlung von ^{15}N-FKBP37.7$^{1-166}$ mit TCEP und DTT. Eine Probe wurde für 15 min mit 2,8 mM TCEP behandelt (1) und anschließend gegen 5 mM DTT in 10 mM Na_2HPO_4 pH 7,5 dialysiert (2). Dabei entnommene Proben wurden im nicht-reduzierenden 17,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend mit Coomassielösung gefärbt. Bei diesem Experiment wurde dem Probenpuffer kein β-Mercaptoethanol zugesetzt und die Proben wurden nicht bei 96 °C denaturiert.

Zur weiteren Verbesserung der NMR-Spektren wurde der pH-Wert der Proteinlösung noch einmal stufenweise erniedrigt, um Signale mit geringeren Linienbreiten zu erhalten. Bei einem pH-Wert von 7,5 wies das Protein eine identische thermische Stabilität wie bei pH 8,0 auf, während es bei pH 7,0 wie erwartet zur irreversiblen Aggregation kam. Durch die Verbesserung der Qualität der Proben für die NMR-spektroskopischen Messungen war es nun sogar möglich alle Messungen bei 25 °C durchzuführen. Sowohl die Wiederholung der Aufnahme aller bisher gemessenen NMR-Spektren als auch alle weiteren Interaktionsexperimente wurden ab diesem Zeitpunkt mit 2 mM Protein bei 25 °C in 10 mM Na_2HPO_4-Puffer pH 7,5 und 5 mM DTT durchgeführt. Mit den neu aufgenommenen Spektren konnte die Zuordnung auf 145 Spinsysteme des Peptidrückgrates und damit 90 % gesteigert werden, was für die Strukturrechnung ausreichend war.

Für die Region um die Cysteine 131 und 132 war es beispielsweise noch immer nicht möglich die Signale zu detektieren, vermutlich aufgrund einer starken Linienverbreiterung. Es ist möglich geringere Linienbreiten durch die Erhöhung der Temperatur oder das Absenken des pH-Wertes zu erhalten. Beides war für FKBP37.7$^{1-166}$ allerdings nicht möglich, da das Protein dann nicht mehr stabil vorlag. Eine Tabelle aller zugeordneten chemischen Verschiebungen des Peptidrückgrates und der Seitenketten ist in Anhang 2 beigefügt. Zudem wurde die Zuordnung in der BioMagResBank Datenbank unter der Zugangsnummer 18001 abgelegt [Linnert *et al.*, 2012]. Im

zweidimensionalen $^{1}H/^{15}N$-TROSY-Spektrum (Abbildung 3-26) sind die zugeordneten NH-Kopplungen aller Aminosäurereste markiert.

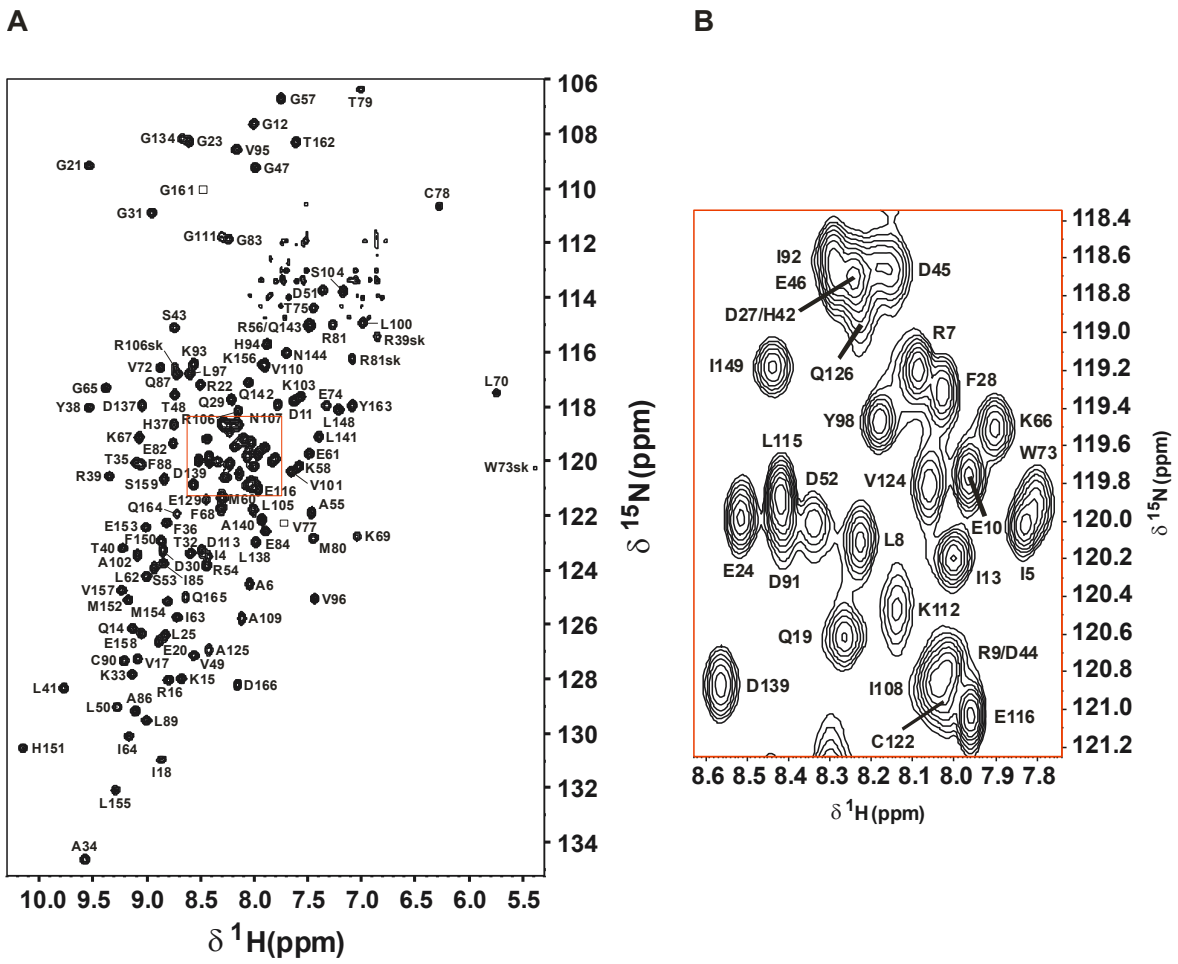


Abbildung 3-26: $^{1}H/^{15}N$-TROSY-Spektrum von FKBP37.7$^{1-166}$. A) Vollständiges Spektrum aller zugeordneten NH-Kopplungen. Die Signale sind mit Aminosäurename und -Position in der Polypeptidkette angegeben. Eine zusätzliche Beschriftung mit sk bezeichnet die Amidgruppen der Seitenketten. Die Signalintensitäten der Aminosäuren, die als Rechtecke gekennzeichnet sind, befinden sich unterhalb des Darstellungsniveaus. **B)** Vergrößerung des zentralen, markierten Bereiches.

Um einen ersten Hinweis auf vorhandene Sekundärstrukturelemente zu bekommen, wurde mit den zugeordneten ^{13}C- und ^{1}H-Resonanzen eine *Chemical Shift Index*-Analyse durchgeführt [Wishart & Sykes, 1994]. Hierbei wurden die Resonanzfrequenzen der Cα, Cβ, CO und Hα-Kerne jedes Aminosäurerestes betrachtet, da diese vom Rückgrat-Diederwinkel abhängig sind. So sind beispielsweise die Frequenzen der Cα und CO-Kerne bei α-Helices größer bzw. bei β-Faltblättern kleiner als in ungeordneten Polypeptidketten. Hochfeldverschiebungen von mehr als 0,1 ppm werden dabei mit -1, Tieffeldverschiebungen mit +1 und nicht wesentlich verschobene Signale mit 0 gekennzeichnet. Bei vier aufeinanderfolgenden, mit -1 gekennzeichneten Aminosäureresten, welche nicht durch +1 unterbrochenen sind, handelt es sich dann um eine α-Helix. Analog dazu, bilden drei aufeinanderfolgende, mit +1 gekennzeichnete Aminosäurereste, welche nicht durch -1

unterbrochenen sind, einen β-Faltblattstrang. Die *Chemical Shift Index*-Analyse von FKBP37$^{1-166}$ ist als Konsensus in Abbildung 3-27 dargestellt. Im oberen Teil der Abbildung sind zusätzlich die Sekundärstrukturelemente von FKBP12 an den entsprechenden Positionen aufgeführt. Die Bestimmung der Positionen erfolgte durch einen Sequenzvergleich von FKBP12 und KBP37.7$^{1-166}$ mit dem Program ClustalW2 (2007).

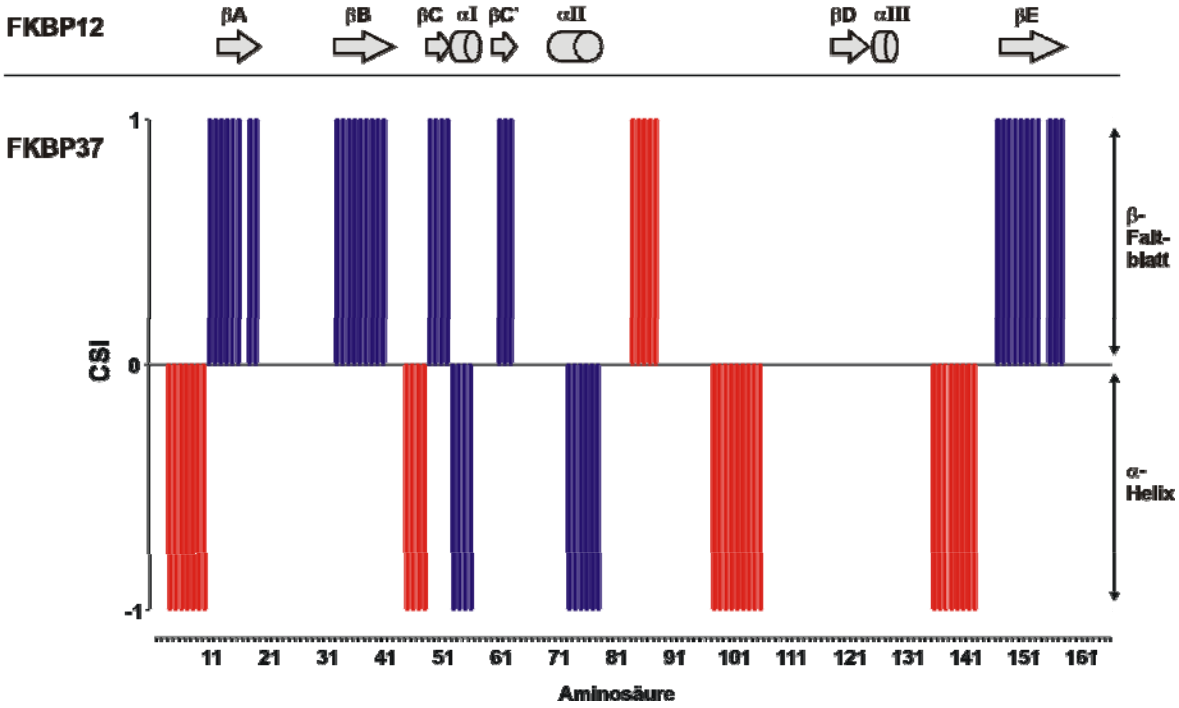


Abbildung 3-27: Vergleich der *Chemical Shift Index*-Analyse von FKBP37$^{1-166}$ mit der Sekundärstruktur von FKBP12. Im oberen Teil der Abbildung ist die Sekundärstruktur von FKBP12 (PDB: 2PPN) graphisch dargestellt. Pfeile symbolisieren dabei β-Faltblättstränge und Zylinder α-Helices. Die Positionen der Aminosäurereste von FKBP12 in Relation zu FKBP37.7 wurden durch einen Sequenzvergleich (ClustalW2 (2007)) ermittelt. Im unteren Teil der Abbildung ist die *Chemical Shift Index*-Analyse von FKBP37$^{1-166}$ dargestellt. Ein Index von -1 bedeutet dabei die Einbindung der jeweiligen Aminosäure in eine α-Helix und ein Index von +1 bedeutet die Einbindung in einen β-Faltblattstrang. Übereinstimmende Strukturelemente in FKBP12 und FKBP37.7 sind in blau dargestellt, abweichende in rot.

Die β-Faltblättstränge A, B, C, C´ und E, sowie die α-Helices I und II befinden sich bei FKBP37, mit maximal zwei Aminosäureresten Unterschied, an gleicher Position wie bei FKBP12. Der β-Faltblattstrang D und die α-Helix III scheinen dagegen an den Positionen Arg119-Val124 und Gln126-Glu129 nicht korrekt positioniert zu sein. An diesen Stellen konnten in FKBP37.7 keine entsprechenden Sekundärstrukturelemente ermittelt werden. In FKBP37.7 wurden in diesem Bereich an anderer Position allerdings ein β–Faltblattelement (Glu84-Phe88) und zwei α-helikale Strukturen (Tyr98-Arg106 und Ala136-Gln143) gefunden. Es ist möglich, dass der β-Faltblatt-strang D aus FKBP12 mit dem gefundenem β-Faltblattelement (Glu84-Phe88) in FKBP37.7 übereinstimmt. Die beiden α-helikalen Strukturen in FKBP37.7 sind jedoch deutlich länger als die α-Helix III in FKBP12 und damit auch deutlich länger als in einer typischen PPIase-Domäne.

Zusätzlich konnten in FKBP37.7 noch zwei weitere, in FKBP12 nicht existente, α-helikale Strukturen ermittelt werden (Ile4-Glu10 und Asp45-Thr48). Aufgrund dieser beobachteten Unterschiede kann nur eine Untersuchung der räumlichen Anordnung dieser Sekundärstrukturelemente in Form einer Strukturrechnung endgültig klären, ob es sich bei FKBP37.7 tatsächlich um eine PPIase-Domäne handelt. Die *Chemical Shift Index*-Analyse kann allerdings dazu verwendet werden, das Ergebnis der Strukturrechnung zu überprüfen.
Anhand der aufgenommen NOESY-Spektren ($^{1}H/^{1}H$-NOESY, $^{1}H/^{15}N/^{1}H$-HSQC-NOESY, $^{1}H/^{13}C/^{1}H$-HSQC-NOESY) und den darin enthaltenen Informationen über die räumliche Anordnung der Protonen konnte mit Hilfe der zuvor durchgeführten Zuordnung nun die Strukturrechnung begonnen werden. Diese erfolgte mit den Programmen CYANA 3.0 und DYANA 1.5 durch Dr. Yi-Jan Lin von der *Kaohsiung Medical University* in Taiwan und durch PD Dr. Christian Lücke.

3.6.3. Die Proteinstruktur der PPIase-Domäne von FKBP37.7

Die Koordinaten der gerechneten Strukturen wurden in der RCSB Datenbank unter der Nummer 2LKN abgelegt. Die vollständige Strukturstatistik der 20 finalen, energieminimierten Strukturen von $FKBP37^{1-166}$ ist in Anhang 3 dargestellt. In Abbildung 3-28, A ist die Peptidrückgrat-Darstellung dieser 20 Strukturen zu sehen. In den weiteren Teilen der Abbildung ist zum Vergleich die Struktur von FKBP12 (B) und die Struktur von FKBP37.7 mit den Bezeichnungen der jeweiligen Sekundärstrukturelemente dargestellt (C).
Die aufgeklärte Struktur von FKBP37.7 zeigt die typische Faltung einer PPIase-Domäne mit einem fünfsträngigen, antiparalell verlaufenden β-Faltblatt, das um eine zentrale α-Helix gewunden ist (Abbildung 3-28, C). Das β-Faltblatt bilden die Stränge βA (Ile13-Glu20), βB (Thr32-His42), βC (Thr48-Ile64), βD (Glu84-Asp91) und βE (Asn144-Pro160). Die zentrale Helix αII umfasst die Aminosäuren Pro71-Thr79. Als Besonderheiten in dieser Struktur weisen die Stränge βA, βC und βE Irregularitäten in Form von *β-bulges* an den Resten Ile18, Leu50 und Leu155 auf; weiterhin ist der Strang βC durch die kurze Helix αI (Ser53-Arg56) in die zwei Teilstücke βC´ (Thr48-Asp52) und βC´´ (Lys58-Ile64) getrennt. Neben diesen typischen Elementen einer PPIase-Domäne enthält jene von FKBP37.7 noch drei weitere untypische α-helikale Strukturelemente. Die α-Helix N (Ile4-Asp11) befindet sich N-terminal zum ersten β-Faltblattstrang und ist einzigartig in der gesamten FKBP-Familie. Die beiden anderen α-helikalen Strukturen sind αIII (Ile92-Val110) and αIV (A136-Gln143) und befinden sich als eine ungewöhnlich lange Erweiterung zwischen den β-Faltblattsträngen D und E. Alle bisher bekannten humanen PPIase-Domänen enthalten an dieser Stelle ein etwa 20 Aminosäuren langes Verbindungsstück, welches wie bei FKBP12 meist mit

einer kurzen α-Helix beginnt. Bei FKBP37.7 umfasst dieses Verbindungsstück hingegen 52 Aminosäurereste. Es beginnt mit einer sehr langen, 19 Aminosäuren umfassenden α-Helix (III), geht anschließend in einen größtenteils unstrukturierten Bereich (Gly111-His135) über und endet schließlich in einer PPIase-untypischen α-Helix (IV).

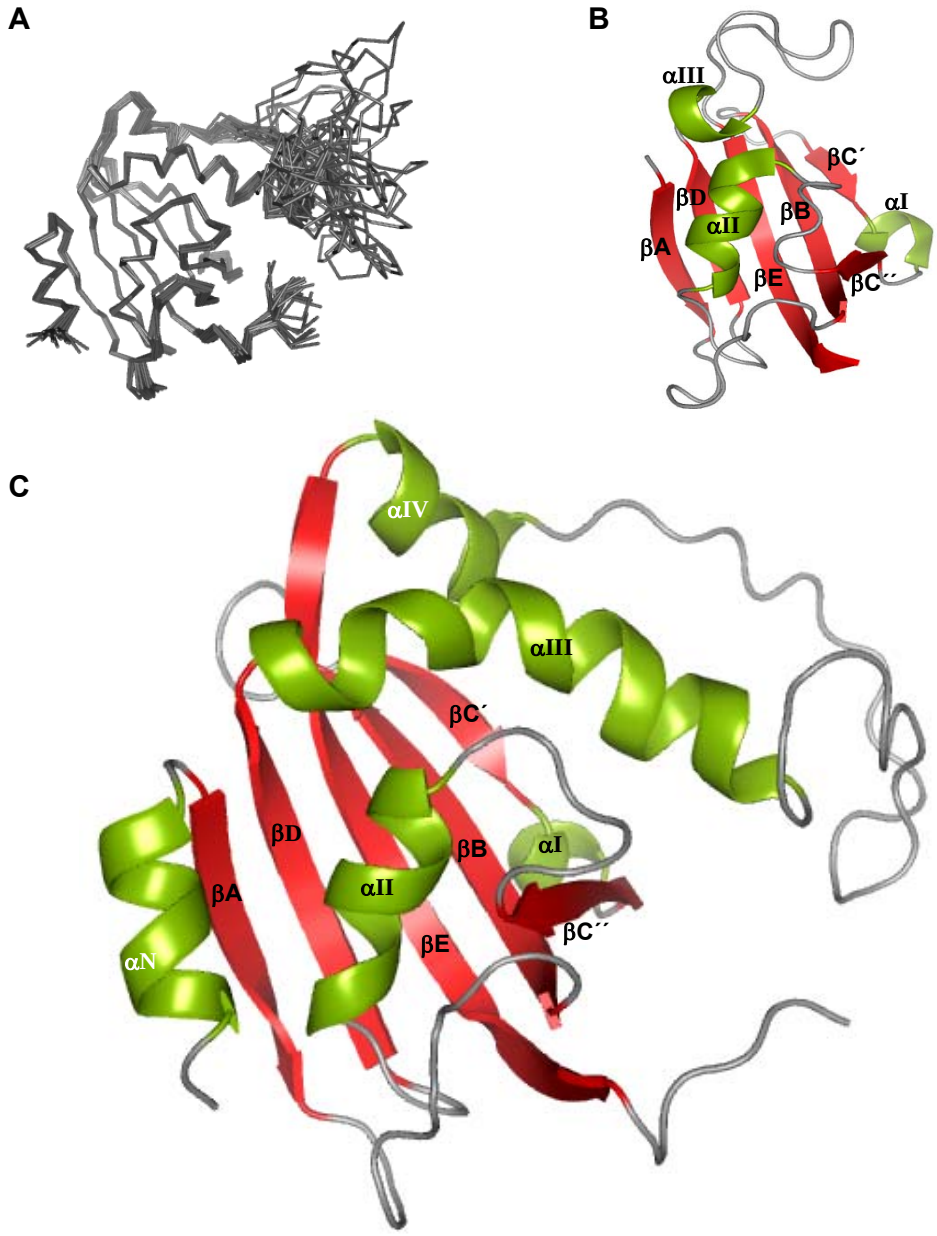
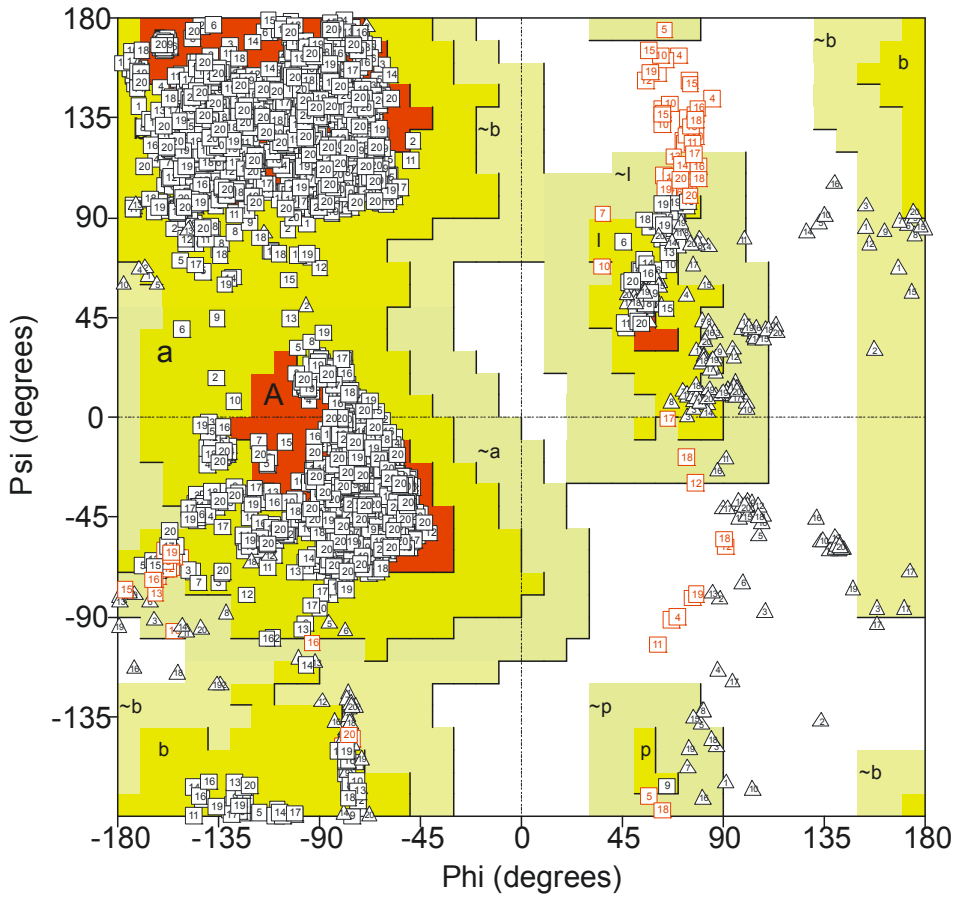


Abbildung 3-28: Darstellung der Strukturen von FKBP37$^{1-166}$ und FKBP12. A) Peptidrückgratdarstellung von 20 energieminimierten Konformeren des FKBP37$^{1-166}$. **B)** Darstellung der Sekundärstrukturelemente von FKBP12 (PDB: 2PPN). Die β-Faltblätter sind in rot dargestellt, α-Helices in grün und ungeordnete Bereiche in grau. **C)** Darstellung der Sekundärstrukturelemente einer der 20 Strukturen von FKBP37.7. Nicht in FKBP12 vorkommende Sekundärstukturelemente sind weiß beschriftet.

Im unstrukturierten Teil dieser Erweiterung konnten bei der Zuordnung zudem nur wenige Signale zwischen Arg119-Ser132 gefunden werden (Anhang 2), was auf ein ungewöhnlich dynamisches

Verhalten dieses Bereiches oder das Vorhandensein mehrerer Konformationszustände hinweist. Durch das Fehlen dieser Resonanzen wurde bei der Strukturrechnung für diesen Bereich keine definierte Konformation ermittelt, was sich auch in Abbildung 3-28, A bei der Darstellung der 20 finalen, energieminimierten Strukturen von FKBP37$^{1-166}$ widerspiegelt.

Die Analyse der Diederwinkel ϕ und ψ des Pepdidrückgrates dieser 20 Strukturen im Ramachandran-Diagramm (Abbildung 3-29) zeigte, dass 98,8 % aller Winkel von Nicht-Glycin- und Nicht-Prolin-Resten im erlaubten Bereich liegen.



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	2213	77.4%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	571	20.0%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	43	1.5%
Residues in disallowed regions	33	1.2%
	---	------
Number of non-glycine and non-proline residues	2860	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	40	
Number of glycine residues (shown as triangles)	260	
Number of proline residues	160	

Total number of residues	3320	

Abbildung 3-29: Ramachandran-Diagramm der 20 finalen berechneten, energieminimierten Strukturen von FKBP37.7$^{1-166}$. Die Analyse wurde mit PROCHECK-NMR durchgeführt. Rote Kästchen kennzeichnen Aminosäurereste in nicht erlaubten oder kritischen Bereichen.

Wird die βD-βE-Erweiterung nicht in die Analyse mit einbezogen, und nur für die Reste 2-110 sowie 136-166 durchgeführt, so befinden sich sogar 99,8 % aller Diederwinkel der Nicht-Glycin- und Nicht-Prolin-Reste im erlaubten Bereich. Die meisten der nicht erlaubten Winkel befinden sich also in der Erweiterung und kommen wahrscheinlich durch die nicht exakt bestimmbare Position der Aminosäuren zu Stande. Für die gesamte Struktur deutet dies auf eine gute Qualität und eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit für die Richtigkeit der Rechnungen hin.

Vergleicht man die Lage des mutmaßlich aktiven Zentrums von FKBP12 mit dem von FKBP37, so lässt sich erkennen, dass dieses verlängerte Verbindungsstück das vermutete aktive Zentrum von FKBP37.7 vollständig bedeckt (Abbildung 3-30). Aufgrund der Besonderheit dieser βD-βE-Erweiterung sollten hierzu weitere Untersuchungen vorgenommen werden. So sollte geklärt werden, ob die verringerte Zugänglichkeit des mutmaßlich aktiven Zentrums von FKBP37.7 die Ursache für die nicht vorhandene PPIase-Aktivität ist, und ob gegebenenfalls ein Regulationsmechanismus durch eine mögliche Beweglichkeit dieser Erweiterung existiert. Außerdem sollte geklärt werden, ob diese Erweiterung eigenständige Aufgaben übernehmen kann, wie es beispielsweise für das *E. coli* FKBP SlyD bekannt ist.

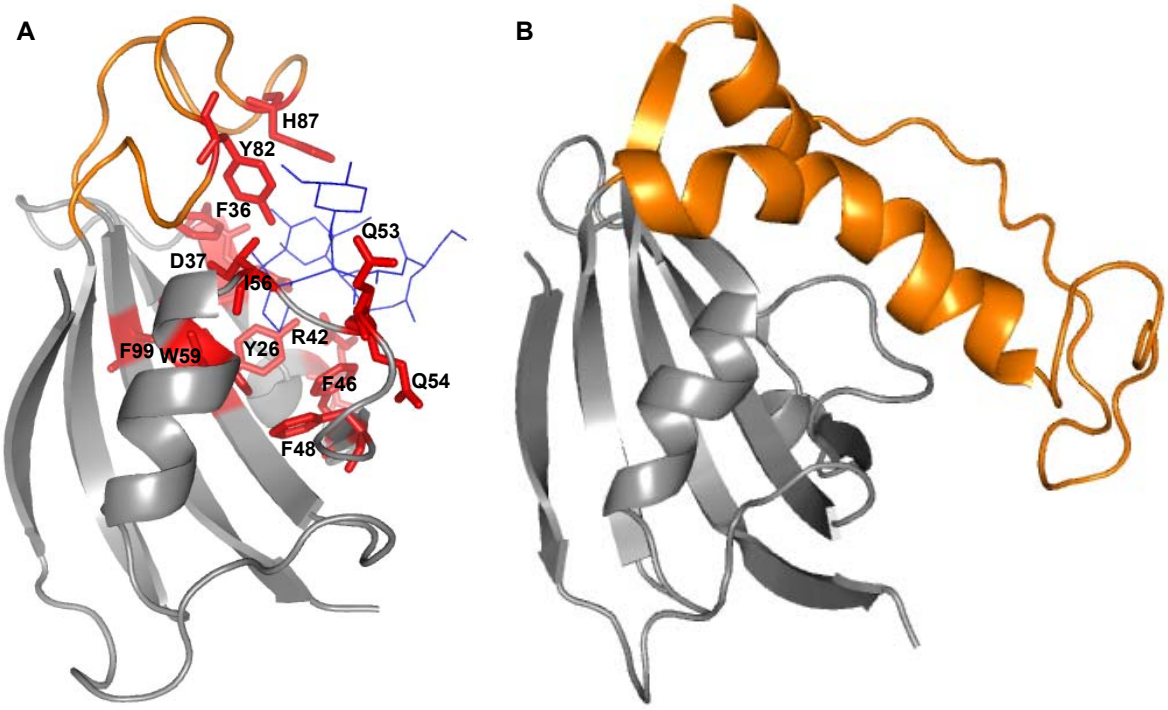


Abbildung 3-30: Darstellung des aktiven Zentrums von FKBP12 im Vergleich zu FKBP37. A) Bei FKBP12 sind die Aminosäurereste (rot), welche im mutmaßlichen aktiven Zentrum in direktem Kontakt mit FK506 (blau) stehen als Stabmodelle hervorgehoben (PDB: 1FKJ). **B)** Dargestellt sind die Aminosäuren 12-161 der aufgeklärten Struktur von FKBP37.7. Das Verbindungsstück zwischen den Faltblattstrukturen βD und βE ist in Orange hervorgehoben.

3.7. Untersuchung der PPIase-Domäne von FKBP37.7 ohne βD-βE-Erweiterung

Um zu untersuchen ob FKBP37.7 ohne diese Erweiterung, welche das mutmaßlich aktive Zentrum bedeckt, eine PPIase-Aktivität besitzt oder in der Lage ist FK506 zu binden wurde beides noch einmal in Abwesenheit der βD-βE-Erweiterung untersucht. Dafür musste zuerst die PPIase-Domäne von FKBP37.7 ohne diese Erweiterung hergestellt werden. Durch einen Vergleich mit FKBP12 wurden alle potentiell für die Enzymkatalyse sowie die FK506-Bindung wichtigen Aminosäuren bestimmt. In FKBP12 befinden sich die folgenden 13 Aminosäuren im aktiven Zentrum und stehen in direktem Kontakt mit FK506: Tyr26, Phe36, Asp37, Arg42, Phe46, Phe48, Gln53, Glu54, Ile56, Trp59, Tyr82, His87, Phe99 [Albers *et al.*, 1990; Fanghänel & Fischer, 2004; Van Duyne *et al.*, 1993]. Von Diesen befinden sich lediglich Tyr82 und His87 als Tyr98 und Leu138 in der βD-βE-Erweiterung von FKBP37.7 (Abbildung 3-30), wobei Leu138 nicht essentiell für die PPIase-Aktivität und die FK506-Bindung zu sein scheint [Fanghänel & Fischer, 2004]. Ein Austausch dieser Aminosäure konnte in anderen aktiven und FK506-bindenden FKBP nachgewiesen werden. Basierend auf diesem Vergleich wurden aus der Erweiterung die Aminosäuren Leu100 bis Asn144 durch eine dreistufige Klonierung (Abschnitt 2.2.2.8.) entfernt und nach der Bestimmung einer räumlichen Distanz von etwa 10 Å zwischen Pro99 und Pro145, durch einen Gly-Asp-Gly-Linker ersetzt (Abbildung 3-31, B).

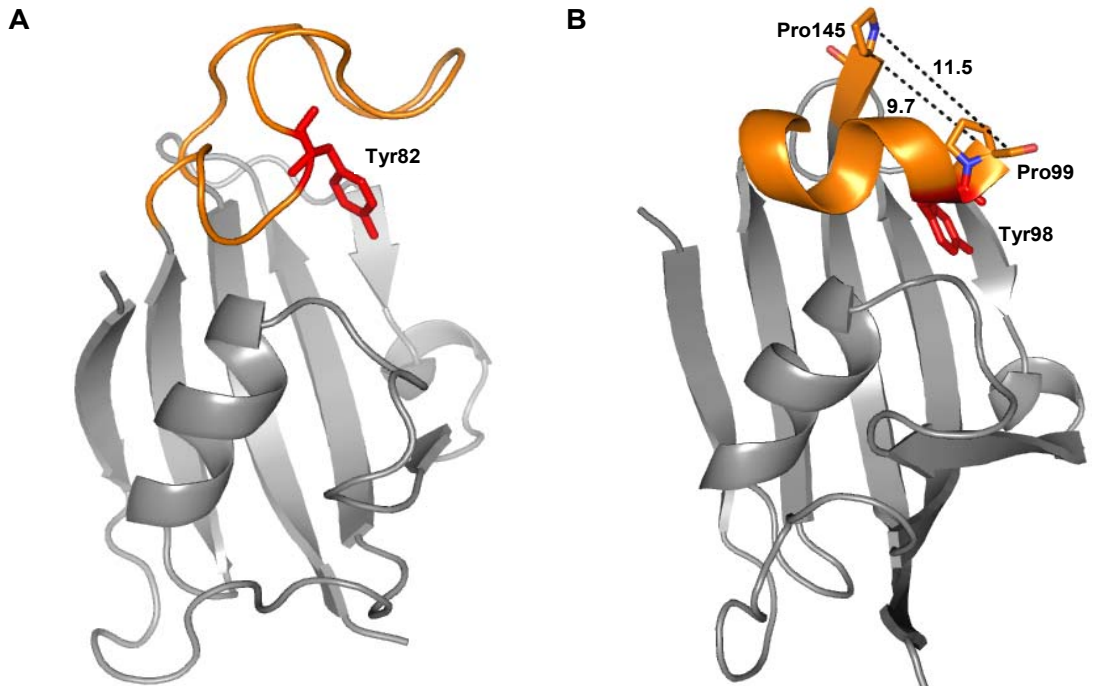


Abbildung 3-31: FKBP12 im Vergleich zur PPIase-Domäne von FKBP37.7 nach der theoretischen Entfernung der βD-βE-Erweiterung. A) Bei FKBP12 ist Tyr82 (rot) als für die FK506-Bindung potentiell wichtiger Aminosäurerest in der βD βE-Erweiterung (orange) hervorgehoben (PDB: 1FKJ). **B)** In FKBP37.7 entspricht Tyr98 (rot) dem Tyr82 von FKBP12; daher wurde die Erweiterung erst ab Aminosäure Leu100 bis Asn144 entfernt. Die Distanz zwischen Pro99 und Pro145 wurde zwischen Cα-Cα mit 9,7 Å und zwischen CO-N mit 11,5 Å gemessen. Dargestellt sind die Aminosäuren 12-161 von FKBP37.7.

Der Linker Gly-Asp-Gly wurde gewählt um eine hohe Flexibilität zu gewährleiten und die Löslichkeit des Proteins nicht negativ zu beeinträchtigen. Die Proteinreinigung sowie die Bestimmung der Faltung der PPIase-Domänen-Variante erfolgten im Rahmen der Diplomarbeit von Annika Manns [Manns, 2012]. Anders als das CD-Spektrum von FKBP37.7$^{1-166}$ (Abbildung 3-4, A) zeigte das CD-Spektrum der PPIase-Domäne ohne die βD-βE-Erweiterung nur noch ein absolutes Minimum bei 217 nm, welches repräsentativ für eine β–Faltblattstruktur ist. Der Spektrenverlauf und die niedrige mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure ähnelten stark dem von FKBP12 [Pirkl & Buchner, 2001]. Zur Überprüfung der Struktur mittels NMR-Spektroskopie erfolgte ein Vergleich der ^{1}H/^{15}N-HSQC-Spektren von FKBP37.7$^{1-166}$ und der PPIase-Domäne ohne die βD-βE-Erweiterung. In diesen Spektren konnten die Signale vieler Aminosäuren aus den β-Faltblattbereichen des FKBP37.7$^{1-166}$ an gleicher oder an leicht verschobener Position beobachtet werden. Die Signale der Aminosäurereste aus der entfernten βD-βE-Erweiterung konnten hingegen nicht mehr detektiert werden. Die Daten der CD-Spektroskopie und der ^{1}H/^{15}N-HSQC-Experimente deuteten somit darauf hin, dass die überwiegend α–helikal organisierte Erweiterung entfernt wurde, und dass die PPIase-Domäne hingegen intakt vorlag. Die PPIase-Domäne ohne die βD-βE-Erweiterung wird im Folgenden als FKBP37.7$^{1-166\Delta100-144}$ bezeichnet.

Die Untersuchung der FK506-Bindung von FKBP37.7 nach Entfernung der βD-βE-Erweiterung erfolgte, wie für die anderen Proteinvarianten bereits in Abschnitt 3.4. beschrieben, mit der FK506-Affinitätsmatrix. Dabei wurden 20 µg rekombinat hergestelltes FKBP37.7$^{1-166\Delta100-144}$ mit der FK506-Affinitätsmatrix bzw. mit der Kontrollmatrix für 1 h inkubiert und anschließend ungebundenes bzw. an die Matrices gebundenes Protein im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abbildung 3-32). Hierbei konnte auch mit FKBP37.7$^{1-166\Delta100-144}$ keine Bindung an die FK506-Affinitätsmatrix festgestellt werden.

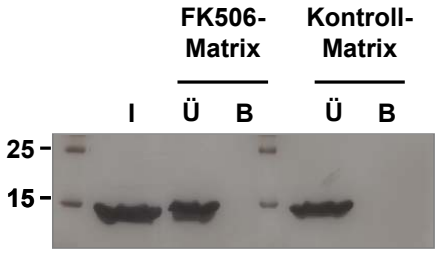


Abbildung 3-32: FK506-Bindung von FKBP37.7$^{1-166\Delta100-144}$. Es wurden 20 µg FKBP37.7$^{1-166\Delta100-144}$ mit der FK506-Affinitätsmatrix bzw. Kontrollmatrix 1 h inkubiert. Nach der Entfernung von nicht gebundenem Protein durch Waschen wurden die Proben im 17,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Silbernitatlösung gefärbt. I, eingesetztes Protein; Ü, nicht an die Matrix gebundenes Protein; B, an die Matrix gebundenes Protein.

In nächsten Schritt wurde auch die PPIase-Aktivität von FKBP37.7$^{1-166\Delta100-144}$ untersucht. Da bereits FKBP37.7$^{1-166}$ im Chymotrypsin-gekoppelten PPIase-Test über den Zeitraum der Messung von 6 min gegen proteolytischen Abbau nicht stabil war (Abbildung 3-13), erfolgte die Messung

auch für FKBP37.7$^{1-166\Delta100-144}$ im Protease-freien PPIase-Test (Abbildung 3-33, A). Es konnte dabei eine katalytische Effizienz von 5,4*10^4 M^{-1}*s^{-1} bestimmt werden; eine Inhibition der Aktivität durch FK506 konnte allerdings nicht festgestellt werden (k_{kat}/K_M= 5,3*10^4 M^{-1}*s^{-1}).

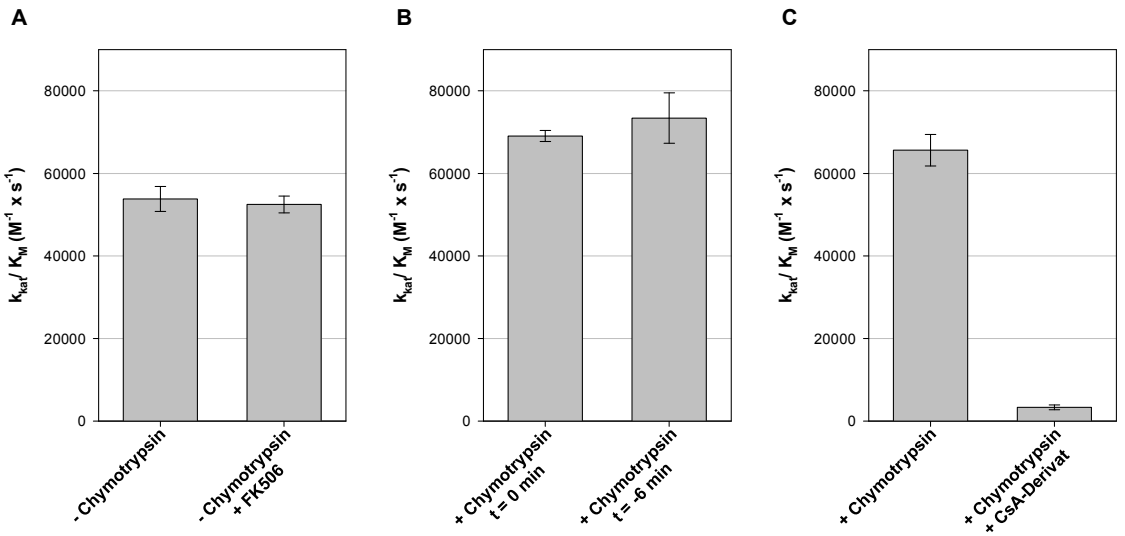


Abbildung 3-33: PPIase-Aktivität von FKBP37.7$^{1-166\Delta100-144}$. A) Die Messung der PPIase-Aktivität erfolgte im Protease-freien PPIase-Test sowohl in An- als auch in Abwesenheit von 1 µM FK506. **B)** Die Bestimmung der PPIase-Aktivität erfolgte im Protease-gekoppelten PPIase-Test. Chymotrypsin wurde zu Beginn der Messung oder 6 min vor Beginn der Messung zugegeben. **C)** Die Bestimmung der PPIase-Aktivität erfolgte im Protease-gekoppelten PPIase-Test sowohl in An- als auch in Abwesenheit von 100 µM [O-Carboxymethyl-D-Ser^8]-CsA. Alle Messungen wurden mit 0,15 µM FKBP37.7$^{1-166\Delta100-144}$ und 40 µM Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA als Substrat bei pH 7,8 und 10 °C durchgeführt.

Um zu überprüfen, ob diese Aktivität tatsächlich von FKBP37.7$^{1-166\Delta100-144}$ stammt, wurden weitere Experimente im Chymotrypsin-gekoppelten PPIase-Test durchgeführt. Dabei wurde zuerst die Aktivität von FKBP37.7$^{1-166\Delta100-144}$ bestimmt, als Chymotrypsin zeitgleich mit dem Substrat zum Start der Reaktion zugegeben wurde (k_{kat}/K_M= 6,9*10^4 M^{-1}*s^{-1}) (Abbildung 3-33, B). In einem zweiten Experiment wurde Chymotrypsin bereits zu Beginn der Temperierung, das heißt 6 min vor dem eigentlichen Start der Reaktion, zugegeben. Hierbei wurde jedoch nahezu die gleiche Aktivität beobachtet (k_{kat}/K_M= 7,3*10^4 M^{-1}*s^{-1}). Da FKBP37.7$^{1-166\Delta100-144}$ nach 6 min, das heißt zum Start der Reaktion allerdings schon vollständig abgebaut war, kann diese PPIase-Aktivität nicht durch FKBP37.7$^{1-166\Delta100-144}$ hervorgerufen worden sein. In einem abschließenden Experiment konnte die Ursache dieser PPIase-Aktivität auf ein bei der Proteinreinigung mitgeschlepptes *E. coli* Cyp zurückgeführt werden, da die Aktivität in Anwesenheit hoher Konzentrationen des CsA-Derivates [O-Carboxymethyl-D-Ser^8]-CsA fast vollständig inhibiert werden konnte (Abbildung 3-33, C). Dieses CsA-Derivat wurde gewählt, da sich die Aktivität von *E. coli* Cyclophilinen nur bei hohen Konzentration CsA inhibieren lässt [Liu *et al.*, 1991a]. Anders als CsA, ist dieses CsA-Derivat auch in wässrigem Messpuffer auch bei einer Konzentration von 100 µM gut löslich und somit in der Lage *E. coli* Cyclophiline zu inhibieren.

Für FKBP37.7$^{1\text{-}166\Delta100\text{-}144}$ erfolgte die Bestimmung der PPIase-Aktiviät ebenfalls mit dem Proteinsubstrat RCM-T1 (Abbildung 3-34). Wie auch bei den Untersuchungen mit dem Peptidsubstrat Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA konnte eine geringe PPIase-Aktivität bei Verwendung von RCM-T1 festgestellt werden. Da sich diese Aktivität aber auch in diesem Test vollständig mit 50 µM [O-Carboxymethyl-D-Ser^{8}]-CsA inhibieren ließ, wurde sie ebenfalls nicht durch FKBP37.7$^{1\text{-}166\Delta100\text{-}144}$ hervorgerufen.

Eine PPIase-Aktivität von FKBP37.7 konnte auch nach Entfernung der βD-βE-Erweiterung und somit besserer Zugänglichkeit des mutmaßlich katalytischen Zentrums nicht nachgewiesen werden.

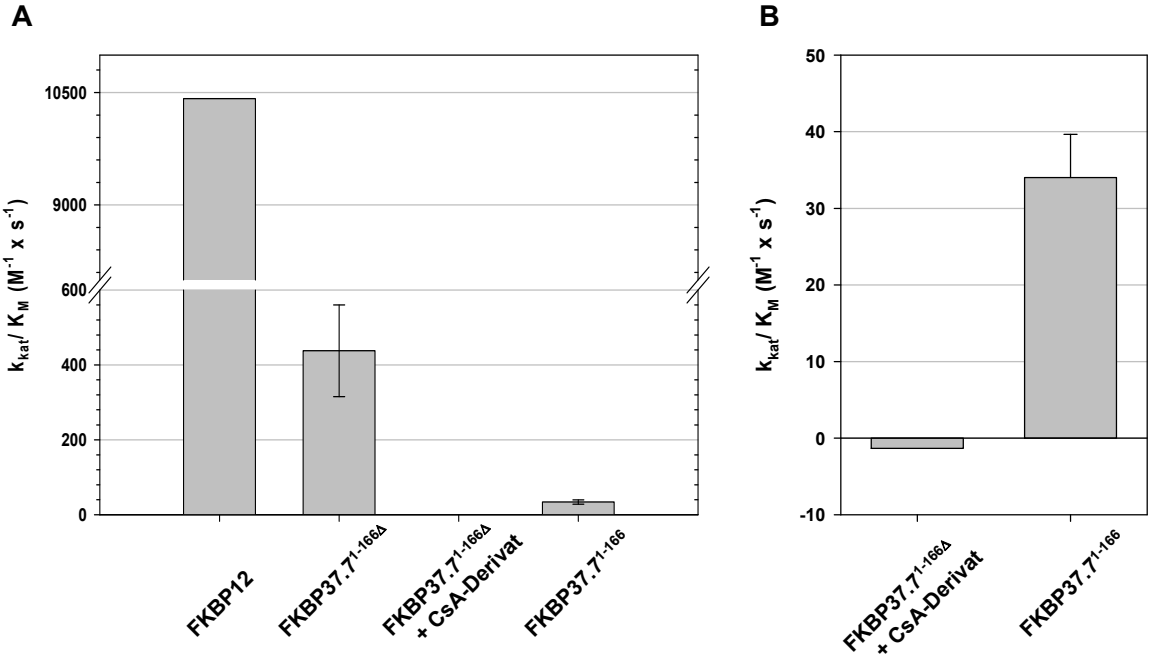


Abbildung 3-34: Beschleunigung der Rückfaltung der RCM-T1 durch FKBP37.7$^{1\text{-}166\Delta100\text{-}144}$ (FKBP37.7$^{1\text{-}166\Delta}$). Die Bestimmung der Rückfaltung von RCM-T1 erfolgte in 100 mM Tris, 2 M NaCl pH 8,0 bei 10 °C. **A)** Zur Beschleunigung der Reaktion wurden 500 nM FKBP12, 5 µM FKBP37.7$^{1\text{-}166\Delta100\text{-}144}$, 5 µM FKBP37.7$^{1\text{-}166\Delta100\text{-}144}$ in Abwesenheit von 50 µM [O-Carboxymethyl-D-Ser^{8}]-CsA (CsA-Derivat) und 5 µM FKBP37.7$^{1\text{-}166}$ eingesetzt. **B)** Vergrößerter Ausschnitt der Messungen mit 5 µM FKBP37.7$^{1\text{-}166\Delta100\text{-}144}$ in Anwesenheit von 50 µM [O-Carboxymethyl-D-Ser^{8}]-CsA (CsA-Derivat) und 5 µM FKBP37.7$^{1\text{-}166}$.

3.8. Untersuchungen zur Chaperon-Aktivität der PPIase-Domäne von FKBP37.7

Einige andere Vertreter der FKBP-Familie weisen ebenfalls eine verlängerte Erweiterung zwischen den Faltblattsträngen βD und βE auf. So enthalten beispielsweise SlyD aus *E. coli* und FKBP17 aus *Methanococcus thermolithotrophicus* zusätzlich eine sogenannte IF-Domäne [Suzuki *et al.*, 2003]. Die Faltung dieser IF-Domänen ist mit vier β-Faltblattelementen und einer kurzen α-Helix anders als bei der vorwiegend α-helikal organisierten Erweiterung von FKBP37.7. Jedoch sind sie

Erweiterungen mit 62 bzw. 64 Aminosäureresten ähnlich groß wie die von FKBP37.7 mit 52 Aminosäureresten. Für die IF-Domänen beider prokaryotischer Proteine konnte bereits eine Chaperon-Aktivität nachgewiesen werden [Furutani *et al.*, 2000; Knappe *et al.*, 2007; Scholz *et al.*, 2006; Weininger *et al.*, 2009]. Trotz der unterschiedlichen Faltung aber aufgrund der gleichen Position der Erweiterung sollte FKBP37.7 dennoch auf eine Chaperon-Aktivität hin untersucht werden. Für FKBP37.7 als Volllängenprotein konnte in früheren Untersuchungen bereits eine Aktivität gegenüber den Modellsubstraten Rhodanese und Citrat-Synthase nachgewiesen werden [Yano *et al.*, 2003]. Hier sollte nun der Bereich identifiziert werden, der dafür verantwortlich ist.

Die Bestimmung der Chaperon-Aktivität von FKBP37.7 erfolgte im Citrat-Synthase-Experiment [Buchner *et al.*, 1998; Jakob *et al.*, 1995]. Hierfür wurden Streulichtmessungen über einen Zeitraum von 20 min bei 43 °C durchgeführt. Als Substrat diente thermisch destabilisierte, und somit zur Aggregation neigende Citrat-Synthase (Abbildung 3-35). Zur Einschätzung der Chaperon-Aktivität von FKBP37.7 wurden weitere Proteine parallel untersucht. So wurde FKBP12 als Protein ohne bekannte Chaperon-Aktivität und das zuvor gereinigte Hsp90 als Protein mit bekannter Chaperon-Aktivität eingesetzt [Jakob *et al.*, 1995; Knappe *et al.*, 2007; Scheibel *et al.*, 1998; Young *et al.*, 1997]. FKBP12 zeigte in diesem Experiment, wie erwartet, keine Chaperon-Aktivität (Abbildung 3-35, A). Als FKBP12 mit der Citrat-Synthase gemeinsam eingesetzt wurde, kam es zu einer Verstärkung der Streulichtintensität um etwa 20 %, was vermutlich darauf zurück zuführen war, dass einige FKBP12-Moleküle gemeinsam mit der Citrat-Synthase aggregierten. Das hergestellte und gereinigte His_6-Hsp90β^{1-724} (Abschnitt 2.2.3.5.) war in der Lage im zweifachen molekularen Überschuss die Aggregation der Citat-Synthase fast vollständig zu unterdrücken und zeigte damit die aus der Literatur bekannte Chaperon-Aktivität (Abbildung 3-35, B). Durch die Zugabe von FKBP37.7$^{1-330}$ konnte eine konzentrationsabhängige Verzögerung der Citrat-Synthase-Aggregation beobachtet werden, jedoch keine Unterdrückung (Abbildung 3-35, C). Dies entspricht den Beobachtungen aus der Literatur [Yano *et al.*, 2003]. Bei der Messung mit der isolierten TPR-Domäne FKBP37.7$^{170-330}$ kam es nicht nur zu einer Verzögerung, sondern auch zur Unterdrückung der Aggregation der Citrat-Synthase (Abbildung 3-35, D). Mit FKBP37.7$^{1-166}$ oder FKBP37.7$^{1-166\Delta100-144}$ kam es wie bei FKBP12 zu keiner Unterdrückung der Aggregation (Abbildung 3-35, E und F). Es war ebenfalls nur eine Verstärkung der Aggregation zu beobachten.

Durch dieses Experiment konnte somit gezeigt werden, dass FKBP37.7 zwar eine Chaperon-Aktivität besitzt, diese allerdings, wie auch bei FKBP52, von der TPR-Domäne und nicht durch die PPIase-Domäne vermittelt wird [Pirkl *et al.*, 2001]. Die Hypothese, dass die Chaperon-Aktivität durch die βD-βE-Erweiterung hervorgerufen wird, konnte somit nicht bestätigt werden.

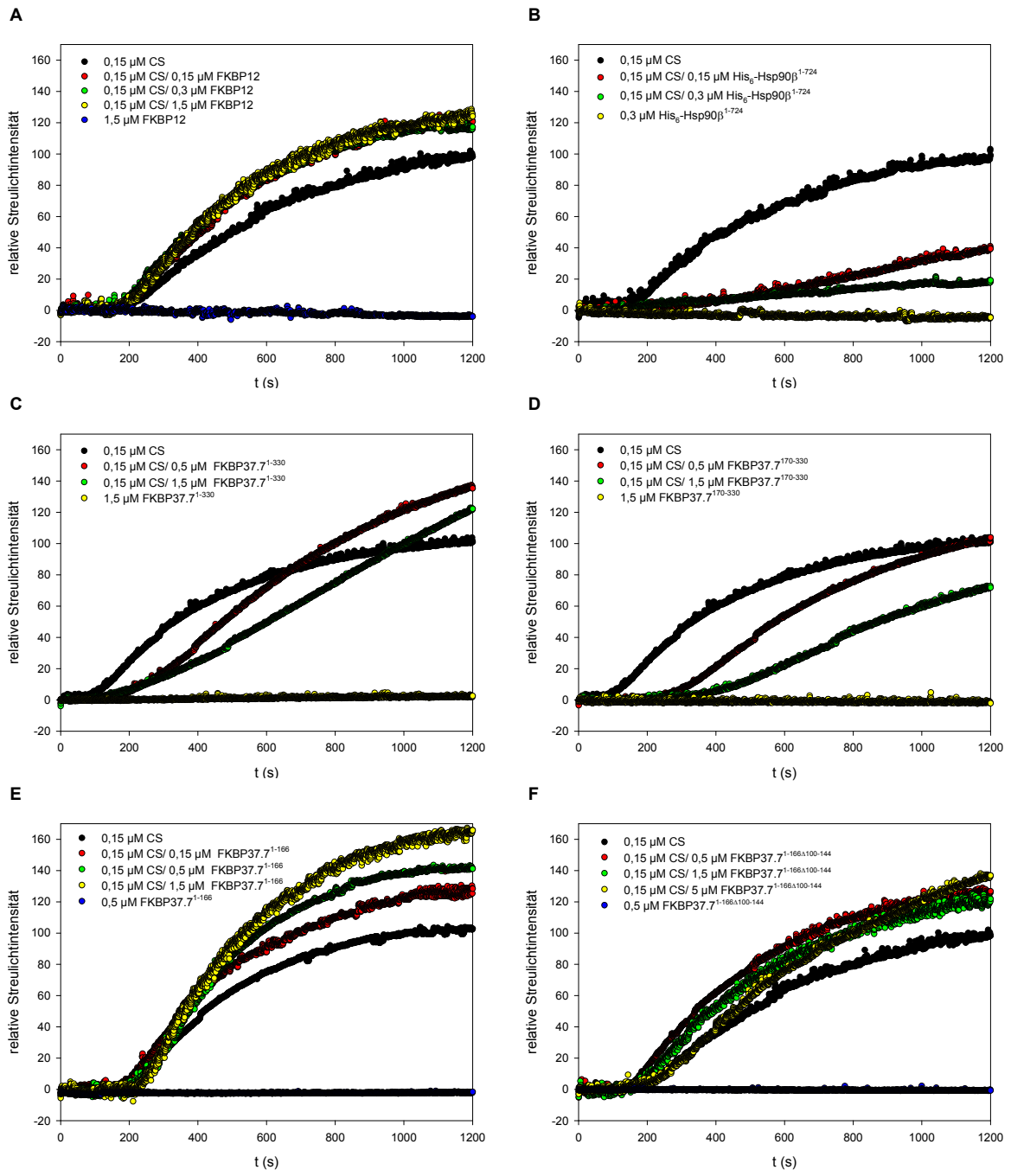


Abbildung 3-35: Chaperon-Aktivität von FKBP37.7 während der Aggregation von Citrat-Synthase. Gemessen wurde die Zunahme von Streulicht bei 360 nm während der Aggregation von Citrat-Synthase (CS) bei 43 °C über einen Zeitraum von 20 min. **A), B)** FKBP12 verzögerte die Aggregation nicht, während sie mit Hsp90 fast vollständig unterdrückt werden konnte. **C), D)** FKBP37.7-Volllänge und die TPR-Domäne verzögerten die Aggregation. **E), F)** Die PPIase-Domäne von FKBP37.7 mit bzw. ohne βD-βE-Erweiterung verzögerte die Aggregation nicht.

3.9. Untersuchungen zu Protein-Protein-Interaktionen der PPIase-Domäne von FKBP37.7

Nachdem für FKBP37.7 sowohl eine PPIase-Aktivität als auch eine Chaperon-Aktivität der PPIase-Domäne ausgeschlossen werden konnte, wurde untersucht ob diese Domäne möglicherweise Protein-Protein-Interaktionen vermittelt.

3.9.1. Identifizierung neuer Bindepartner der FKBP37.7-PPIase-Domäne

Bei der Reinigung von FLAG-FKBP37$^{1-330}$ konnte eine Anreicherung weiterer Proteine im Vergleich zum Kontrollzelllysat beobachtet werden, was auf die Co-Reinigung von Bindepartnern hindeutete (Abbildung 3-5). Zur Bestimmung der Identitäten dieser Proteine wurden Proben der Elutionsfraktionen einer Präparation (Fraktionen E1-E5 der Reinigung von FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ und der identisch behandelten Kontrollpräparation) mit Trypsin verdaut und massenspektrometrisch mittels Nano-LC-ESI-MS/MS von Dr. Christian Scharf (EMAU Greifswald) analysiert. Anschließend erfolgte die Auswertung der identifizierten Peptide durch das Programm Scaffold sowie ein Vergleich mit humanen Proteinen der Swiss-Prot-Datenbank (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: Co-gereinigte Proteine von FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$. Dargestellt ist das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse. Die Anzahl der identifizierten Peptide ist die Summe aller gefundenen Peptide des jeweiligen Proteins in sämtlichen Fraktionen (E1-E5) bei doppelter Analyse. FLAG-Kontrolle bezeichnet die gefundenen Peptide in den Proben der identisch durchgeführten Kontrollpräparation. Die Proteine des Cytoskeletts wurden rot markiert.

Protein	Swiss-Prot-Nummer	Anzahl der identifizierten Peptide	
		FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$	FLAG-Kontrolle
FKBP37.7	O00170	270	1
β-Aktin	P60709	250	176
Hsp90β	P08238	95	11
Hsc70	P11142	63	23
Hsp70-1	P08107	47	22
Filamin-A	P21333	59	0
Hsp90α	P07900	51	0
Fascin	Q16658	45	0
α-Actinin-4	O43707	34	8
Tubulinα	P68363	10	2
Tubulinβ	P07437	4	0
Cdc37	Q16543	3	0

In Tabelle 3-2 sind nur sicher identifizierte Interaktionen aufgeführt. Die vollständige Auswertung ist als Anhang 5 beigefügt. Die identifizierten Proteine, welche mit FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ co-gereinigt wurden, können in zwei Gruppen eingeteilt werden: in Hitzeschockproteine bzw. Co-Chaperone und in Proteine des Cytoskeletts. Eine Interaktion von FKBP37.7 mit Proteinen des Cytoskeletts wurde bislang nicht eindeutig gezeigt, während Hsp90 und Hsc70 bekannte Interaktionspartner sind.

Anhand von GST-Präzipitationsexperimenten mit humanem Zelllysat sollte nun untersucht werden ob die PPIase-Domäne an den identifizierten Interaktionen beteiligt ist und ob die βD-βE-Erweiterung einen Einfluß darauf hat. Dafür mussten die jeweiligen GST-Fusionsproteine zunächst rekombinant hergestellt werden. Die PPIase-Domäne GST-FKBP37.7$^{1-166}$ und die entsprechende Variante ohne βD-βE-Erweiterung, GST-FKBP37.7$^{1-166\Delta 100-144}$ wurden kloniert, exprimiert und anschließend aus *E. coli*-Zelllysat gereinigt [Manns, 2012]. Im folgenden GST-Präzipitations-experiment wurden dann GST zur Kontrolle, die beiden hergestellten PPIase-Domänen und das GST-fusionierte Volllängenprotein an GSH-Sepharose immobilisiert und anschließend mit HEK293-Zelllysat inkubiert. Nach der Entfernung nicht gebundener Proteine erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit 10 mM reduziertem Glutathion. Die eluierten Proteine wurden anschließend im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und die Bindung ausgewählter Proteine mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen (Abbildung 3-36). Zuerst wurde die Interaktion zwischen FKBP37.7 und HSP90 mit Hilfe eines anti-Hsp90-Antikörpers untersucht. Eine direkte Interaktion der PPIase-Domäne von FKBP37.7 mit HSP90 konnte bislang nicht gezeigt werden, allerdings wurde eine Destabilisierung der FKBP37.7-Hsp90 Interaktion beobachtet, nachdem Teile der PPIase-Domäne entfernt wurden [Kazlauskas *et al.*, 2002]. Im hier durchgeführten Experiment wurde Hsp90 deutlich im Zelllysat nachgewiesen. Auch konnte eine Hsp90-Bindung an die GST-fusionierten FKBP37.7-Varianten detektiert werden. Allerdings waren diese Bindungen so schwach, dass das Signal in diesem Bereich verstärkt dargestellt werden musste. Eine Interaktion wurde sowohl mit der PPIase-Domäne als auch dem Volllängen-FKBP37.7 beobachtet. Dagegen konnte keine bzw. nur eine sehr schwache Bindung an die PPIase-Domäne ohne βD-βE-Erweiterung nachgewiesen werden. Diese Interaktion ist ähnlich schwach wie die unspezifische Interaktion mit dem immobilisierten GST. Eine Bindung von Hsp90 an die PPIase-Domäne von FKBP37.7 scheint demnach stattzufinden, wobei auch die βD-βE-Erweiterung eine Rolle zu spielen scheint.

In dem GST-Präzipitationsexperiment wurden neben HSP90 auch verschiedene Proteine des Cytoskeletts auf ihre Interaktion mit FKBP37.7 untersucht. Eine Interaktion mit Tubulin, welches mittels Massenspektrometrie als Interaktionspartner von FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ identifiziert wurde, konnte auch im GST-Präzipitationsexperiment gezeigt werden. Hierbei konnte eine Bindung von Tubulin an GST-FKBP37.7$^{1-166}$ und an GST-FKBP37.7$^{1-330}$ beobachtet werden, jedoch nicht an die

PPIase-Domäne ohne βD-βE-Erweiterung. Demnach scheint auch bei der Interaktion von FKBP37.7 mit Tubulin die βD-βE-Erweiterung der PPIase-Domäne eine Rolle zu spielen.

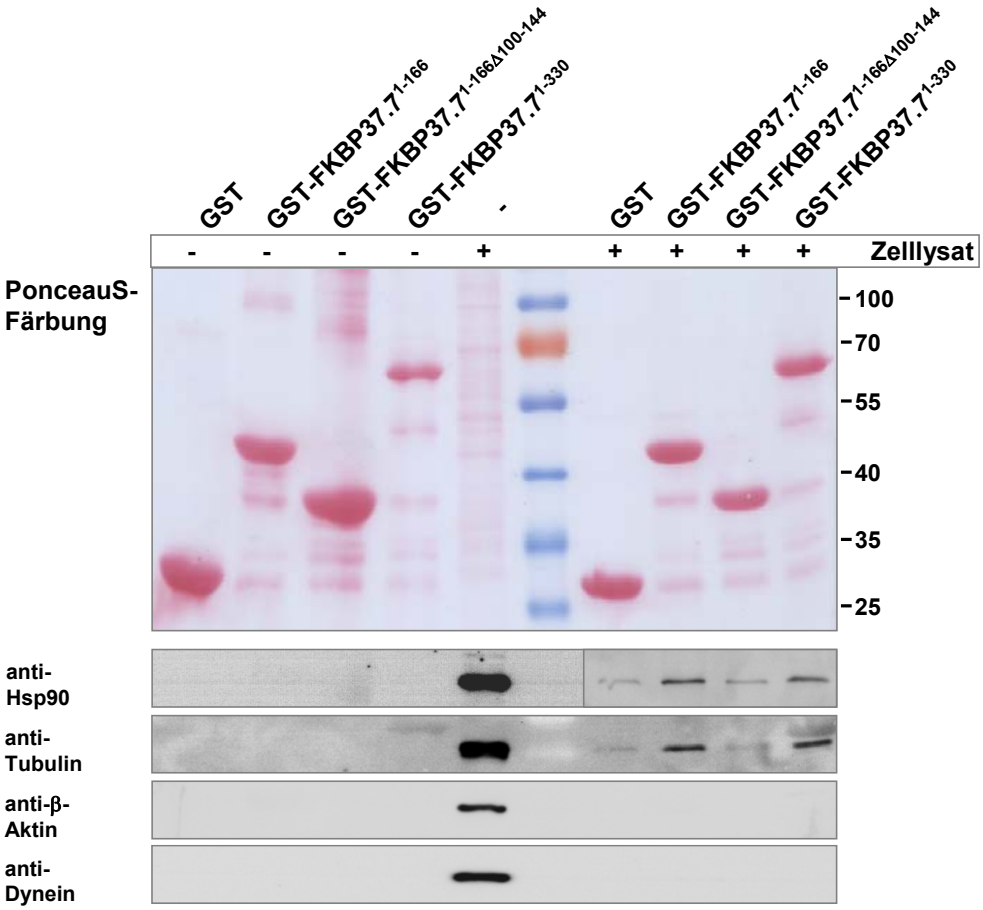


Abbildung 3-36: GST-Präzipitationsexperiment von FKBP37.7-Varianten mit HEK293-Zelllysat. Je 80 µg GST-Fusionsprotein bzw. GST wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und anschließend mit 1 ml Zelllysat einer Konzentration von 2,5 mg/ml über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Entfernung ungebundener Protein durch mehrmaliges Waschen erfolgte die Elution mit 10 mM reduziertem Glutathion. Zur Analyse wurden die gebundenen Proteine in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Zum Nachweis von Dynein erfolgte der Transfer auf eine PVDF-Membran.

Bei der massenspektrometrischen Analyse wurde β-Aktin ebenfalls als Interaktionspartner von FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ identifiziert. Diese Interaktion konnte aber nicht zweifelsfrei bestätigt werden, da eine große Anzahl von Peptiden auch in den Kontrollfraktionen gefunden wurden. In der Vergangenheit wurde β-Aktin durch Co-Präzipitationsexperimente bereits als Interaktionspartner von FKBP37.7 identifiziert [Berg & Pongratz, 2002], dies wurde durch eine andere Arbeitsgruppe allerdings widerlegt [Petrulis *et al.*, 2003]. Im hier durchgeführten GST-Präzipitationsexperiment konnte eine spezifische Interaktion von FKBP37.7 mit β-Aktin ausgeschlossen werden.

Als weitere Komponente des Cytoskeletts wurde auch Dynein hinsichtlich einer Interaktion mit FKBP37.7 untersucht. Bei der massenspektrometrischen Analyse wurde Dynein allerdings nicht als

spezifischer Interaktionspartner von FKBP37.7 identifiziert. Für die PPIase-Domäne von FKBP52 wurde aber bereits eine Interaktion mit Dynein nachgewiesen [Galigniana *et al.*, 2002; Pratt *et al.*, 2004]. Im hier druchgeführten GST-Präzipitationsexperimente konnte keine Interaktion der PPIase-Domäne von FKBP37.7 oder dem Volllängenprotein mit Dynein nachgewiesen werden. Dies bestätigt das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse, dass Dynein kein spezifischer Interaktionspartner der PPIase-Domäne von FKBP37.7 ist (Abbildung 3-36).
Die weitere Charakterisierung der Interaktionen, mit den in dieser Arbeit identifzierten neuen Bindepartnern, in weiterführenden Studien sollte neue Einblicke in die Funktion des FKBP37.7 liefern.

3.9.2. Die Interaktion der PPIase-Domäne von FKBP37.7 mit rekombinant hergestelltem Hsp90

Die beobachtete Interaktion zwischen der PPIase-Domäne von FKBP37.7 und Hsp90 im GST-Präzipitationsexperiment mit humanem Zelllysat sollte nun mit rekombinant hergestelltem Hsp90 genauer untersucht werden. Für die Untersuchungen wurde zunächst die C-terminale Domäne von Hsp90, welche für die Interaktion mit FKBP37.7 über dessen TPR-Domäne bereits bekannt ist, untersucht. Die DNA-Sequenzen für die C-terminalen Domänen von Hsp90α und Hsp90β lagen jeweils im Expressionsvektor pET-28a(+) vor. Hiermit wurden die Proteine für die nun folgenden Experimente rekombinant in *E. coli* hergestellt und anschließend gereinigt (Abschnitt 2.2.3.5.). Zur Überprüfung der Protein-Protein-Interaktion wurden die GST-fusionierte PPIase-Domäne, die GST-fusionierte TPR-Domäne und das GST-fusionierte Volllängenkonstrukt des FKBP37.7 an GSH-Sepharose immobilisiert und anschließend mit den Hsp90-Varianten inkubiert (Abbildung 3-37). Beide unabhängig voneinander präparierten Hsp90-Varianten zeigten in diesem Versuch das gleiche Bindungsverhalten. Eine Bindung an GST wurde in beiden Fällen nicht beobachtet, womit eine unspezifische Interaktion über die GST-Fusion ausgeschlossen werden konnte. Für GST-FKBP37.7$^{170-330}$ wurde mit beiden Hsp90-Varianten eine starke Bindung festgestellt. Dies entsprach den Erwartungen, da bereits zuvor eine Interaktion über die TPR-Domäne beschrieben wurde [Bell & Poland, 2000; Carver *et al.*, 1998; Meyer & Perdew, 1999]. Das Volllängenprotein GST-FKBP37.7$^{1-330}$ zeigte hingegen eine schwächere Bindung an Hsp90. Diese Interaktion sollte allerdings etwa so stark wie mit der isolierten TPR-Domäne sein, da der Hauptinteraktionsbereich vorhanden sein sollte. Mit der isolierten PPIase-Domäne GST-FKBP37.7$^{11-158}$ konnte in diesem Experiment ebenfalls eine Interaktion mit Hsp90 detektiert werden, welche etwa zehn Mal schwächer war als jene mit der TPR-Domäne.

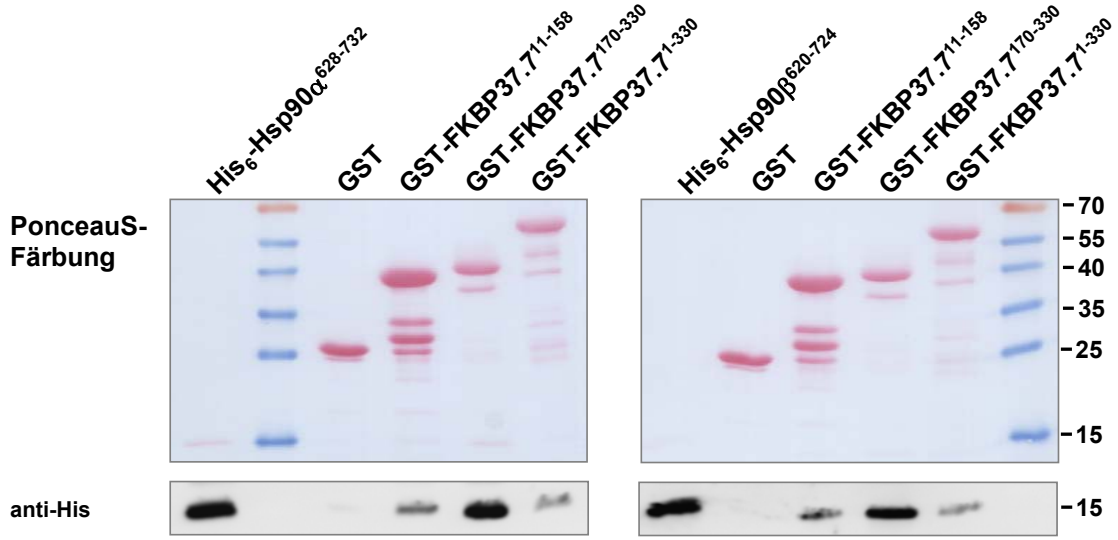


Abbildung 3-37: GST-Präzipitationsexperiment von FKBP37.7-Varianten mit der C-terminalen Domäne von Hsp90. Je 40 µg GST-Fusionsprotein bzw. GST wurden an GSH-Sepharose immobilisiert und anschließend mit 10 µg His_6-Hsp90$\alpha^{628-732}$ bzw. His_6-Hsp90$\beta^{620-724}$ für 1 h inkubiert. Nach Entfernung von ungebundenem Protein durch mehrmaliges Waschen erfolgte die Elution mit 10 mM reduziertem Glutathion. Zur Analyse wurden die Proteine in 17,5 %igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membran transferiert und gebundene Proteine mit anti-His-Antikörper detektiert. Die Detektionskontrollen von His_6-Hsp90$\alpha^{628-732}$ und His_6-Hsp90$\beta^{620-724}$ entsprechen jeweils 30 pmol (10 % des eingesetzten Proteins).

Um die Interaktion zwischen der PPIase-Domäne von FKBP37.7 und Hsp90 nun genauer untersuchen und gegebenenfalls auch den Bereich der Interaktion innerhalb der PPIase-Domäne identifizieren zu können, wurden an einem Bruker Avance 800 NMR-Spektrometer mit Kryokopf $^1H/^{15}N$-HSQC-Experimente mit 0,6 mM ^{15}N-FKBP37.7$^{1-166}$ in 10 mM Na_2HPO_4-Puffer pH 7,5 und 5 mM DTT bei 25 °C durchgeführt. Neben einer Referenzprobe wurde eine Probe mit 1,52 mM His_6-Hsp90$\beta^{620-724}$ und eine weitere mit 1,02 mM His_6-Hsp90β^{1-724} gemessen. Die hierbei erhaltenen Spektren (Anhang 4) zeigten nur geringfügige Verschiebungen einiger Signale um bis zu 0,015 ppm der konjugierten ^1H- und ^{15}N-Resonanzen. Die Bestimmung der Differenzen erfolgten durch den Ausdruck $[(\Delta\delta_{1HN})^2 + (\Delta\delta_{15N}/6.5)^2]^{1/2}$ nach Mulder *et al.* [Mulder *et al.*, 1999].

Eine Interaktion zwischen Hsp90 und der PPIase-Domäne von FKBP37.7 konnte somit nicht zweifelsfrei bestimmt werden. Allerdings deuten zwei unterschiedliche Beobachtungen dennoch auf eine Interaktion hin. Die erste Beobachtung ist, dass es in Gegenwart von His_6-Hsp90β^{1-724} zu einer deutlichen Linienverbreiterung im Spektrum kam (Abbildung 3-38). Zusätzlich nahm die Intensität der einzelnen Signale ab und die Überlappung der Signale verstärkte sich.

Ein solches Verhalten kann in NMR-Spektren beobachtet werden, wenn Verbindungen mit sehr hohem Molekulargewicht untersucht werden, da es aufgrund eines langsameren *Tumbling* zu einer schnelleren Relaxation der Magnetisierung (T_2) kommt. Durch die Interaktion von FKBP37.7$^{1-166}$ und His_6-Hsp90β^{1-724} würde ein Komplex mit einem deutlich höherem Molekulargewicht von 104 kDa gebildet, was diese beobachtete Linienverbreiterung zu Folge hätte. Ein vergleichbarer

Effekt konnte bei der Messung mit His_6-Hsp90β$^{620–724}$ nicht beobachtet werden, da der in diesem Fall gebildete Komplex mit insgesamt 34 kDa deutlich kleiner wäre.

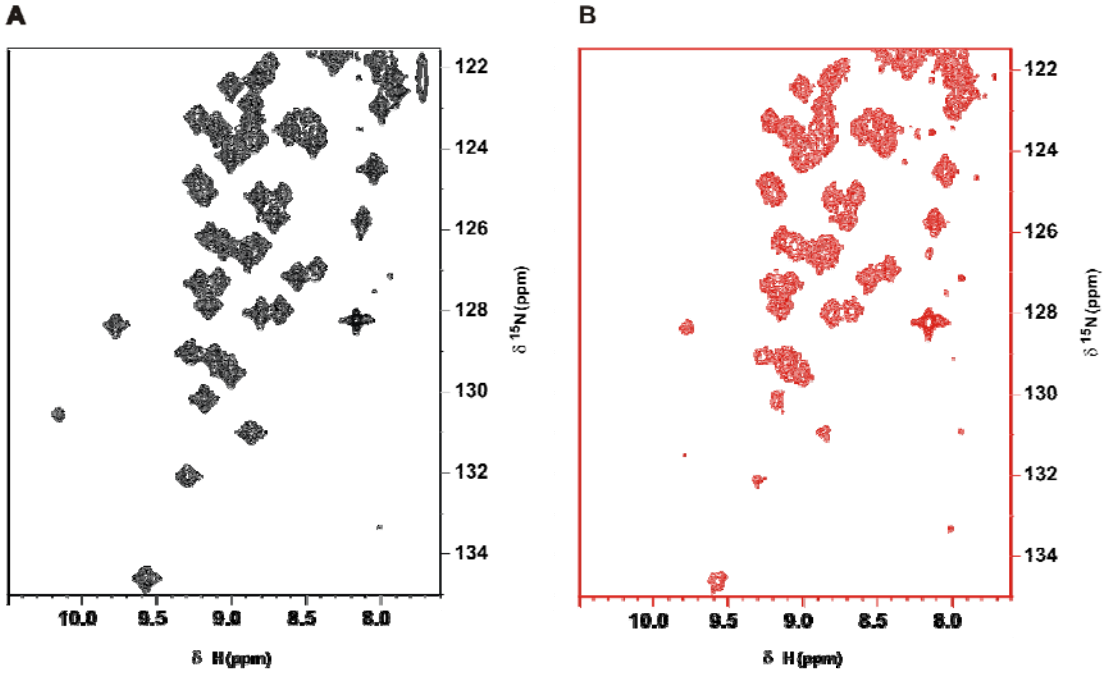


Abbildung 3-38: Ausschnitte der ^{1}H/^{15}N-HSQC-Spektren von FKBP37.7$^{1-166}$ in Ab- (A) und in Anwesenheit (B) von His_6-Hsp90β$^{1-724}$. Die Messungen wurden mit 0,6 mM ^{15}N-FKBP37.7$^{1-166}$ und mit bzw. ohne 1,02 mM His_6-Hsp90β$^{1–724}$ in 10 mM Na_2HPO_4-Puffer pH 7,5 und 5 mM DTT bei 25 °C am Bruker Avance 800-Spektrometer mit Kryokopf durchgeführt.

In Abbildung 3-39 sind die Aminosäuren in FKBP37.7$^{1-166}$ rot markiert, welche in Anwesenheit von His_6-Hsp90β$^{620-724}$ bzw. His_6-Hsp90β$^{1-724}$ eine Signalverschiebung im ^{1}H/^{15}N-HSQC-Spektum zeigten. Aufgrund der schwachen Signalintensitäten sowie einiger nicht zugeordneter Aminosäurereste, und auch aufgrund der stark verbreiterten Signale bei der Messung mit His_6-Hsp90β$^{1-724}$, konnten nur wenige Reste in FKBP37.7$^{1-166}$ für eine mögliche Interaktion identifiziert werden. Allerdings zeigten die Interaktionsexperimente mit His_6-Hsp90β$^{620-724}$ und His_6-Hsp90β$^{1-724}$ ein vergleichbares Ergebnis. So werden signifikant verschobene Signale hauptsächlich am unstrukturierten C-Terminus der PPIase-Domäne sowie in der βD-βE-Erweiterung beobachtet. Diese Signale gehören vermutlich zu den an der Interaktion beteiligten Resten. Die Tatsache, dass mit beiden Hsp90-Varianten die nahezu gleichen Bereiche für die Interaktion bestimmt wurden, deutet eher auf eine spezifische als eine unspezifische Protein-Protein-Interaktion hin. Allerdings scheint es sich hierbei um keine besonders starke Interaktion zu handeln, da die nicht zugeordneten Reste der βD-βE-Erweiterung noch immer keine detektierbaren Signale aufwiesen, was für eine weiterhin vorhandene hohe Flexibilität in dieser Erweiterung spricht.

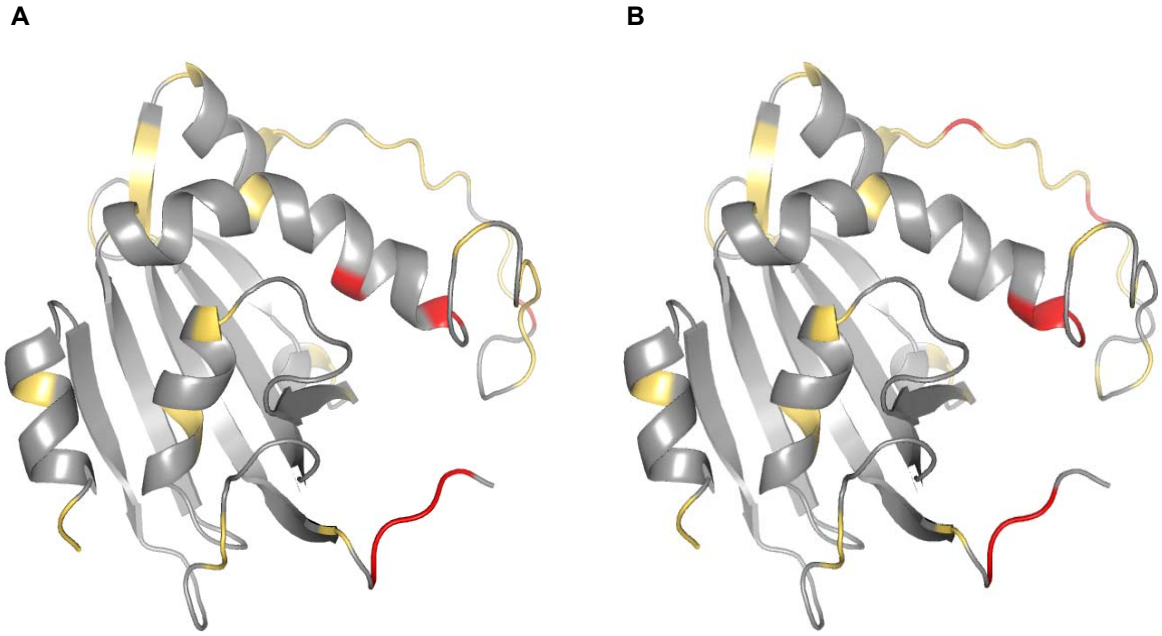


Abbildung 3-39: Interaktion von FKBP37.7$^{1-166}$ mit His$_6$-Hsp90β$^{620-724}$ (A) bzw. His$_6$-Hsp90β$^{1-724}$ (B) in ^{1}H/^{15}N-HSQC-Experimenten. Signifikant verschobene Aminosäurereste wurden in der Proteinstruktur von FKBP37.7$^{1-166}$ rot markiert. Nicht zugeordnete oder in den Spektren nicht identifizierte Aminosäurereste wurden gelb markiert.

4. Diskussion

4.1. FKBP37.7 zeigt keine PPIase-Aktivität und keine Bindung an FK506

Das humane FKBP37.7 besteht aus einer N-terminal lokalisierten putativen PPIase-Domäne und einer C-terminal lokalisierten TPR-Domäne. Für die PPIase-Domäne von FKBP37.7 konnte bislang weder eine PPIase-Aktivität, noch eine FK506-Bindung nachgewiesen werden. Der hohe Grad an Konserviertheit lässt aber dennoch auf wichtige Funktionen, wie beispielsweise die Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen, schließen. Ziel dieser Arbeit war es den Grund für die fehlende PPIase-Aktivität oder gegebenenfalls einen möglichen Aktivierungsmechanismus zu finden und somit Hinweise auf die Funktion der PPIase-Domäne zu erhalten. Hierfür musste zunächst FKBP37.7, sowie Proteinvarianten der Einzeldomänen rekombinant hergestellt werden. Durch einen Sequenzvergleich mit FKBP12 und den beiden PPIase-Domänen von FKBP51 wurden die Domänengrenzen von FKBP37.7 anhand der Lage der Sekundärstrukturelemente von FKBP12 und FKBP51 bestimmt (Abbildung 3-1). Dabei zeigte sich ein gravierender Unterschied zwischen der PPIase-Domäne von FKBP37.7 im Vergleich zu denen von FKBP12 und FKBP51. Laut dem Sequenzvergleiche enthält FKBP37.7 einen mindestens 34 Aminosäuren umfassenden Einschub zwischen den β-Faltblattsträngen D und E.

Die PPIase-Domäne von FKBP37.7 umfasst aufgrund der durchgeführten Auswertung mindestens die Aminosäuren 11-158. In der Literatur wurde bisher eine Bestimmung der PPIase-Aktivität von einer FKBP37.7-Proteinvariante beschrieben, welche die Aminosäuren 1-121 umfasste [Laenger *et al.*, 2009]. Diese Variante ist jedoch zu kurz um den β-Faltblattstrang E und Teile der Erweiterung ebenfalls zu erfassen. Daher ist es möglich, dass die nicht festgestellte katalytische Aktivität durch eine zu kurze Proteinvariante zu Stande kam.

Für die weiteren Untersuchungen konnten folgende Proteinvarianten erfolgreich in Expressionsvektoren kloniert, anschließend in *E. coli* überexprimiert und aus den Zellen aufgereinigt werden (Abbildung 3-3): FKBP37.7$^{1-166}$, FKBP37.7$^{1-330}$, His$_6$-FKBP37.7$^{1-330}$, FKBP37.7$^{170-330}$, GST-FKBP37.7$^{11-158}$, GST-FKBP37.7$^{1-330}$ und GST-FKBP37.7$^{170-330}$. Für alle hergestellten Proteinvarianten wurden CD-Spektren aufgenommen, um eine Aussage über die Ausprägung von Sekundärstrukturelementen treffen zu können (Abbildung 3-4). Keines der Proteine besaß ein Minimum zwischen 195-200 nm, was für das Vorhandensein von *Random-Coil*-Strukturen spricht. Der Spektrenverlauf und die Signalintensität von FKBP37.7$^{1-166}$ ähnelten stark denen von FKBP12 und der PPIase-Domäne von *Arabidopsis thaliana* FKBP42, was auf eine typische Faltung für eine FKBP-Domäne hinweist [Kamphausen *et al.*, 2002; Pirkl & Buchner, 2001]. Allerdings zeigte das Spektrum von FKBP37.7$^{1-166}$, verglichen mit den beiden anderen PPIase-Domänen, eine Verschiebung des absoluten Minimums auf 210 nm und zusätzlich die

beginnende Ausprägung eines zweiten Minimums. Dies deutet auf ein zusätzliches Vorhandensein α–helikaler Strukturen hin. Die CD-Spektren der beiden FKBP37.7-Volllängenvarianten FKBP37.7$^{1-330}$ und His$_6$-FKBP37.7$^{1-330}$ waren in Verlauf und Intensität vergleichbar mit denen der großen TPR-Motiv-enthaltenden FKBP FKBP51, FKBP52, und *Arabidopsis thaliana* FKBP42 [Kamphausen *et al.*, 2002; Pirkl & Buchner, 2001]. Auch das CD-Spektrum von FKBP37.7$^{170-330}$ zeigte einen ähnlichen Verlauf und ähnliche Intensitäten wie die der TPR-Domänen TPR2A von Hop und die TPR-Domäne von PP5, und damit das überwiegende Vorhandensein α-helikaler Sekundärstrukturelemente [Cortajarena & Regan, 2006].

Um die PPIase-Domäne zu charakterisieren wurde zuerst die PPIase-Aktivität untersucht. Im Chymotrypsin-gekoppelten PPIase-Test konnten mit den getesteten FKBP37.7-Varianten FKBP37.7$^{1-166}$, His$_6$-FKBP37.7$^{1-330}$, FKBP37.7$^{1-330}$ allerdings nur geringe Aktivitäten festgestellt werden. Während FKBP die Umwandlung normalerweise mit k_{kat}/K_M-Werten zwischen 10^4 und 10^7 $M^{-1}*s^{-1}$ beschleunigen, konnten für FKBP37.7 lediglich Werte von 0,9-6*10^3 $M^{-1}*s^{-1}$ ermittelt werden [Fanghänel & Fischer, 2004]. Die mit His$_6$-FKBP37.7$^{1-330}$ bestimmte Aktivität von 6*10^3 $M^{-1}*s^{-1}$ wurde auf ihre Inhibierbarkeit und Substratspezifität untersucht. Die beobachtete PPIase-Aktivität konnte nicht durch FK506 inhibiert werden, was somit nicht auf ein humanes FKBP hindeutet. Im Gegenzug ließ sie sich jedoch durch $NiCl_2$ inhibieren. Eine solche Inhibierbarkeit wurde für das aus *E. coli* stammende FKBP SlyD beschrieben [Hottenrott *et al.*, 1997]. Auch die Präferenz für das Peptidsubstrat mit einem Phe-Rest N-terminal zur katalysierenden Bindung unterstützt diese Beobachtung [Albers *et al.*, 1990; Compton *et al.*, 1992; Harrison & Stein, 1990; Hottenrott *et al.*, 1997; Rahfeld *et al.*, 1994]. In *E. coli* existieren jedoch mehrere PPIasen, welche nicht durch FK506 inhibierbar sind und die ebenfalls eine Spezifität für Substrate mit einem Phe-Rest N-terminal zur katalysierenden Bindung aufweisen, wie beispielsweise Trigger Faktor und Par10 [Rahfeld *et al.*, 1994; Stoller *et al.*, 1995].

Bei der Untersuchung der proteolytischen Stabilität von FKBP37.7 gegenüber der verwendeten Protease Chymotrypsin zeigte sich, dass das FKBP während der Messungen proteolytisch gespalten wurde. Aus diesem Grund wurden alle Aktivitätsmessungen in einem Protease-freien PPIase-Test wiederholt. Obwohl die Protein-Varianten unter diesen Bedingungen die gesamte Zeit der Messung stabil vorlagen, konnten auch hierbei keine stärkeren Beschleunigungen der *cis/trans*-Isomerisierung durch FKBP37.7 festgestellt werden. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die PPIase-Aktivität nur mit einem Proteinsubstrat zu messen ist, wurde die Bestimmung der PPIase-Aktivität unter Verwendung des Proteinsubstrates RCM-T1 durchgeführt. Allerdings konnte auch mit diesem Substrat keine PPIase-Aktivität beobachtet werden.

Da Hsp90 möglicherweise in der PPIase-Domäne von FKBP37.7 eine zweite Bindungsstelle besitzt, wurde auch der mögliche Einfluss einer solchen Bindung auf die PPIase-Aktivität untersucht [Kazlauskas *et al.*, 2002]. Im durchgeführten Aktivitätstest konnte allerdings keine Beeinflussung der PPIase-Aktivität durch Hsp90 festgestellt werden. Es ist jedoch möglich, dass

nur ein Multiproteinkomplex in der Lage ist eine korrekte Substrat- und FKBP37.7-Bindung zu ermöglichen. Die Notwendigkeit eines solchen Komplexes wurde bereits für die Bindung und Aktivierung der Hsp90-Substrate nachgewiesen [Kosano *et al.*, 1998; Richter & Buchner, 2001; Wandinger *et al.*, 2008].

Um auch den möglichen Einfluss von Interaktionspartnern, Cofaktoren oder posttranslationalen Modifikationen, die nur im eukaryotischen System eingeführt werden können, auf die PPIase-Aktivität zu testen, wurde FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ in humanen Zellen überexprimiert. Anschließend wurde das Protein mit Bindepartnern aus diesen Zellen gereinigt. Nahezu alle eukaryotischen Proteine werden posttranslational modifiziert, wobei bislang etwa 200 verschiedene Modifizierungen bekannt sind [Hunter, 2007; Jensen, 2006]. Solche Modifizierungen sind in der Lage die katalytische Aktivität von Proteinen zu beeinflussen. So kommt es beispielsweise durch die Phosphorylierung im N-Terminus der Glycogen-Phosphorylase zu einer Änderung der Proteinstruktur und damit zur Aktivierung des Enzyms [Johnson & O'Reilly, 1996]. Für FKBP37.7 ist bekannt, dass es mehrfach phosphoryliert wird und dadurch seine Lokalisation verändert werden kann. Der Austausch der Phosphorylierungsstelle Ser53 gegen Ala führte dazu, dass das Protein nicht mehr in der Lage ist in den Zellkern zu translozieren [Dull *et al.*, 2002].

Bei der erfolgten Bestimmung der PPIase-Aktivität von FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ konnte allerdings weder mit den Peptidsubstraten noch mit dem Proteinsubstrat RCM-T1 eine Aktivität festgestellt werden. Somit scheint eine Beeinflussung der FKBP37.7-PPIase-Aktivität durch posttranslationale Modifizierungen oder durch Bindungspartner und Cofaktoren unwahrscheinlich zu sein.

Ein weiteres Merkmal der FKBP ist die Interaktion mit FK506. Zur Untersuchung der FK506-Bindung wurde von Martin Theuerkorn (MPF) eine neuartige FK506-Affinitätsmatrix synthetisiert. Dabei wurde FK506 über einen Ethylenglycollinker an Cyanbromid-aktivierte Sepharose gebunden und die verbliebenen Bindestellen mit Tris gekoppelt. Parallel dazu wurde eine Kontrollmatrix hergestellt, bei der alle Bindestellen mit Tris gekoppelt wurden. Durch die Wahl der Sepharose, des hydrophilen Linkers und der Absättigung der freien Bindestellen mit dem ebenfalls hydrophilen Tris konnte die Hydrophobizität der FK506-Affinitätsmatrix drastisch reduziert werden. In Gegensatz zu früher verwendeten Matrices konnte weder mit der FK506-Affinitätsmatrix noch mit der Kontrollmatrix eine unspezifische Interaktion von BSA beobachtet werden [Fretz *et al.*, 1991]. Die als FK506-bindend beschrieben Proteine FKBP12, FKBP51 und FKBP52 konnten dagegen spezifisch an die FK506-Affinitätsmatrix angereichert werden, wohingegen keine Bindung an die Kontrollmatrix erfolgte [Weiwad *et al.*, 2006].

Bei der Untersuchung der FK506-Bindung von FKBP37.7 zeigte die isolierte PPIase-Domäne FKBP37.7$^{1-166}$ keine Bindung an die FK506-Affinitätsmatix. Auch bei additiver Verwendung der PPIase-Domäne und der TPR-Domäne konnte keinerlei Bindung detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigten die beiden eingesetzten Volllängenproteine His$_6$-FKBP37.7$^{1-330}$ und FKBP37.7$^{1-330}$

eine schwache Anreicherung an der FK506-Affinitätsmatrix. Diese Interaktionen ließen sich, im Gegensatz zur Bindung von FKBP12, nicht durch einen dreifachen molekularen Überschuss des FK506-Derivates MT-10 inhibieren. Eine solche geringfügige Interaktion mit der FK506-Affinitätsmatrix zeigten jedoch auch die rekombinant hergestellten Volllängenproteine der ebenfalls TPR-Domänen-enthaltenden FKBP, FKBP36 und FKBP44. Für authentisches FKBP36 und FKBP44 aus humanen Zellen konnte eine Bindung an die FK506-Affinitätsmatrix allerdings nicht detektiert werden (Abbildung, 3-9) [Linnert *et al.*, 2012b]. Vermutlich handelt es sich demnach um Präzipitationserscheinungen auf der hydrophoben Oberfläche der FK506-Affinitätsmatrix und somit nicht um eine spezifische Interaktion. Bei der Inkubation der FK506-Affinitätsmatrix mit Jurkat-Zelllysat konnte eine Bindung von FKBP12, FKBP51 und FKBP52 beobachtet werden. Dagegen konnte keine Bindung von authentischem FKBP37.7 an die FK506-Affinitätsmatrix detektiert werden. Auch bei der Untersuchung der Zelllinien HepG2, HEK293, SH-SY5Y und MCF-7 konnte keine Bindung von FKBP37.7 an die FK506-Affinitätsmatrix nachgewiesen werden. Es konnte somit ausgeschlossen werden, dass nur FKBP37.7 aus Jurkat-Zellen nicht in der Lage ist FK506 zu binden. Der Vergleich des Bindungsverhaltens von authentischem FKBP37.7 und rekombinant hergestelltem FKBP37.7 zeigte keine Unterschiede. Dies lässt vermuten, dass Cofaktoren, posttranslationale Modifikationen oder Interaktionspartner bei der Bindung von FK506 keine Rolle spielen.

Eine Bindung von FKBP37.7 an FK506 konnte nicht nachgewiesen werden, allerdings schließt dies das Vorhandensein einer PPIase-Aktivität nicht aus. SlyD und Tiggerfaktor besitzen beispielsweise eine PPIase-Aktivität, sind aber nicht in der Lage FK506 zu binden [Hottenrott *et al.*, 1997; Stoller *et al.*, 1995]. Im Falle von SlyD wird vermutet, dass die Seitenkette von Tyr68 in die hydrophobe Bindetasche des aktiven Zentrums ragt und somit der Grund für die fehlende FK506-Bindung und die geringe PPIase-Aktivität ist [Weininger *et al.*, 2009]. Bei den humanen FKBP ist allerding noch kein Vertreter bekannt, der ein solches Verhalten zeigt. Zudem konnte für alle humanen FKBP die eine Bindung an die FK506-Affinitätsmatrix zeigten auch eine PPIase-Aktivität gegenüber Peptidsubstraten festgestellt werden [Linnert *et al.*, 2012b]. Da FKBP37.7 weder in der Lage ist FK506 zu binden, noch eine PPIase-Aktivität aufweist, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um ein inaktives FKBP handelt, zumindest im nicht-heterooligomeren Zustand.

4.2. FKBP37.7 besitzt eine PPIase-Domäne mit einzigartiger Erweiterung

Anhand der dreidimensionalen Proteinstrukturstruktur sollte geklärt werden, ob FKBP37.7 tatsächlich eine PPIase-Domäne besitzt. Zudem sollte geklärt werden, ob diese putative PPIase-Domäne, wie durch den Sequenzvergleich vermutet, eine innerhalb der FKBP-Familie einzigartige Erweiterung trägt. Die Aufklärung der Struktur von FKBP37.7$^{1-166}$ sollte mittels NMR-

Spektroskopie und einer anschließenden Strukturrechnung nach der sequentiellen Zuordnung der ^{1}H, ^{13}C und ^{15}N-Resonanzen aus Tripel-Resonanzexperimenten erfolgen [Ikura *et al.*, 1990; Kay *et al.*, 1990]. Dafür musste isotopenmarkiertes Protein hergestellt werden, was durch die erfolgreiche Überexpression in isotopenangereichertem M9-Minimalmedium gelang [Kay *et al.*, 1990].

Bei der Überprüfung der strukturellen und proteolytischen Stabilität bei verschiedenen Temperaturen über mehrere Tage zeigte sich, dass dieses Protein lediglich bei 4 °C stabil vorlag. Die NMR-spektroskopischen Testmessungen ergaben jedoch, dass bei 4 °C nur ungenügend aufgelöste Spektren für die Strukturaufklärung erhalten werden konnten und dass es zu einer möglichen Aggregation bzw. Oligomerbildung kam. Aus der Beobachtung, dass sich der proteolytische Abbau von FKBP37.7$^{1-166}$ durch die Behandlung mit Natriumazid nicht reduzieren ließ wurde geschlussfolgert, dass nach der Reinigung noch Proteasen in der Proteinlösung vorlagen. Die nachfolgende Behandlung der gereinigten Proteine mit einem Mix aus verschiedenen Proteaseinhibitoren konnte die Stabilität des Proteins deutlich erhöhen. Durch diese Behandlung war es möglich das Protein für fünf Tage bei 30 °C stabil zu erhalten, was ausreichend für die NMR-spektroskopischen Messungen war. Mit diesen Proben konnten allerdings lediglich 97 der theoretisch 158 möglichen Amidresonanzen des Peptidrückgrates zugeordnet werden. Um den möglichen Grund für die Aggregation bzw. Oligomerbildung zu finden wurde der isoelektrische Punkt von FKBP37.7$^{1-166}$ experimentell bestimmt, da dieser aufgrund der Oberflächenbeschaffenheit eines Proteins deutlich vom berechneten abweichen kann. Es konnte ein Unterschied zwischen dem berechneten pI von 6,0 und dem experimentell ermittelten pI von 6,9 festgestellt werden. Alle bisherigen NMR-spektroskopischen Messungen wurden bei pH 8,0 durchgeführt. Daher konnte eine Aggregation des Proteins aufgrund zu geringer Löslichkeit ausgeschlossen werden. Auch eine zu geringe thermische Stabilität konnte als Ursache für eine Aggregation wiederlegt werden. Der Beginn der thermischen Denaturierung wurde experimentell bei 45 °C festgestellt, alle NMR-spektroskopischen Messungen wurden aber bei maximal 37 °C durchgeführt. Als eine weitere Ursache für eine Oligomerisierung wurde die Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken vermutet, da sich die Cysteine 131 und 132 sowie deren benachbarte Aminosäuren nicht zuordnen ließen und eine zusätzliche Bande im SDS-Polyacrylamidgel bei circa 38 kDa detektiert werden konnte. Zur Reduzierung dieser möglichen Disulfidbrücken wurden die Proteinlösungen zuerst mit TCEP behandelt und anschließend gegen einen Puffer mit DTT dialysiert. TCEP bietet gegenüber DTT den Vorteil, dass TCEP irreversibel oxidiert wird und damit die Disulfidbrücken vollständiger reduzieren kann [Burns, 1991; Getz *et al.*, 1999; Han & Han, 1994]. Allerdings ist TCEP in dem gewählten Phosphatpuffer nicht stabil, weshalb zusätzlich noch DTT eingesetzt werden musste. Nach dieser Behandlung konnte keine zusätzliche Bande im SDS-Polyacrylamidgel mehr detektiert werden. Zur Verbesserung der Signalschärfe in den NMR-Spektren wurde der pH-Wert der Proteinlösung noch einmal gesenkt, wobei das Protein bei pH 7,5 eine identische Stabilität aufwies wie bei pH 8,0.

Anhand aller durchgeführten Experimente wurden die optimalen Bedingungen für die NMR-spektroskopischen Messungen mit 2 mM Protein, bei 25 °C in 10 mM Na_2HPO_4-Puffer pH 7,5 und 5 mM DTT ermittelt. Nach der wiederholten Aufnahme der Spektren und dem Abschluss der sequentiellen Zuordnung konnten 90 % aller Amidgruppen des Peptidrückgrates zugeordnet werden. Lediglich die Amidgruppen der Aminosäuren Ala2, Asp3, Arg119, His120, Cys121, Met127, Arg128, His130, Ser131, Ser132 und Ala136 konnten nicht zugeordnet werden.

Durch die Strukturaufklärung der putativen PPIase-Domäne von FKBP37.7 bestätigte sich die typische Tertiärstruktur einer PPIase-Domäne vom FKBP-Typ. Alle PPIase-Domänen humaner FKBP, die bislang strukturell gelöst werden konnten, sind zum Vergleich in Abbildung 4-1 dargestellt. Ebenfalls mit angegben ist, ob es sich dabei um eine PPIase-akive oder –inaktive Domäne handelt [Barent *et al.*, 1998; Edlich *et al.*, 2005; Fanghänel & Fischer, 2004; Jarczowski *et al.*, 2008; Thiele, 2006]. Die PPIase-Domäne von FKBP37.7 bildet ein halbes β-Fass, dass sich aus den fünf antiparallel verlaufenden Faltblattsträngen βA (Ile13-Glu20), βB (Thr32-His42), βC (Thr48-Ile64), βD (Glu84-Asp91) und βE (Asn144-Pro160) zusammensetzt, und sich um die zentrale α Helix II (Pro71-Thr79) windet. Der β-Faltblattstrang C wird dabei durch die kurze α-Helix I (Ser53-Arg56) in die beiden Teilsegmente βC´ (Thr48-Asp52) und βC´´ (Lys58-Ile64) unterteilt. Dies kann ebenfalls bei FKBP12, FKBP12.6, FKBP22, FKBP25 und den jeweils ersten PPIase-Domänen von FKBP51 und FKBP52 beobachtet werden, jedoch nicht bei FKBP38 und den jeweils zweiten PPIase-Domänen von FKBP51 und FKBP52 [Deivanayagam *et al.*, 2000; Gopalakrishnan *et al.*, 2012; Lücke & Weiwad, 2011; Maestre-Martinez *et al.*, 2011; Sinars *et al.*, 2003; Szep *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2004]. Für die nicht aufgeführten humanen PPIase-Domänen sind entweder keine strukturellen Daten verfügbar oder der entsprechende Bereich ist nicht aufgelöst.

Zusätzlich zu den typischen Elementen enthält FKBP37.7 noch drei ungewöhnliche α-helikale Sekundärstrukturelemente. Die N-terminale Helix αN (Ile4-Asp11), welche sich direkt vor dem ersten β-Faltblattstrang befindet, ist einzigartig in der gesamten FKBP-Familie. Ein zusätzlicher β-Strang, welcher das antiparallele β-Faltblatt N-terminal verlängert, ist für katalytisch aktive (z. B. die jeweils erste PPIase-Domäne von FKBP51 und FKBP52) als auch für katalytisch inaktive FKBP (z. B. FKBP36, FKBP38 und die jeweils zweite PPIase-Domäne von FKBP51 und FKBP52) bekannt. FKBP36 und die erste PPIase-Domäne von FKBP51 besitzen N-terminal zu der beschriebenen β-Faltblattstrang-Erweiterung noch eine kurze α-Helix. Allerdings verlaufen diese auf der Außenseite des β-Fasses orthogonal dazu. Eine α-Helix als direkte Erweiterung des antiparallelen β-Faltblattes ist einzigartig unter allen bekannten FKBP-Strukturen.

Die beiden anderen Helices αIII (Ile92-Val110) und αIV (A136-Gln143) bilden den Beginn und das Ende einer ungewöhnlich langen Verbindung zwischen den β-Faltblattsträngen D und E. Alle

bekannten FKBP-Domänen besitzen eine Verbindung von etwa 20 Aminosäuren, die ebenfalls mit einer kurzen α-Helix beginnen. FKBP37.7 besitzt dagegen eine Verbindung aus 52 Aminosäuren, welche mit einer 19 Aminosäuren umfassenden α-Helix (III) beginnt, gefolgt von einem unstrukturierten Bereich und die mit einer FKBP-atypischen α-Helix (IV) endet. Sequenzvergleiche mit FKBP44 (AIPL1), deuten ebenfalls auf das Vorhandensein einer solchen Erweiterung hin, allerdings fehlen dazu bislang strukturelle Daten.

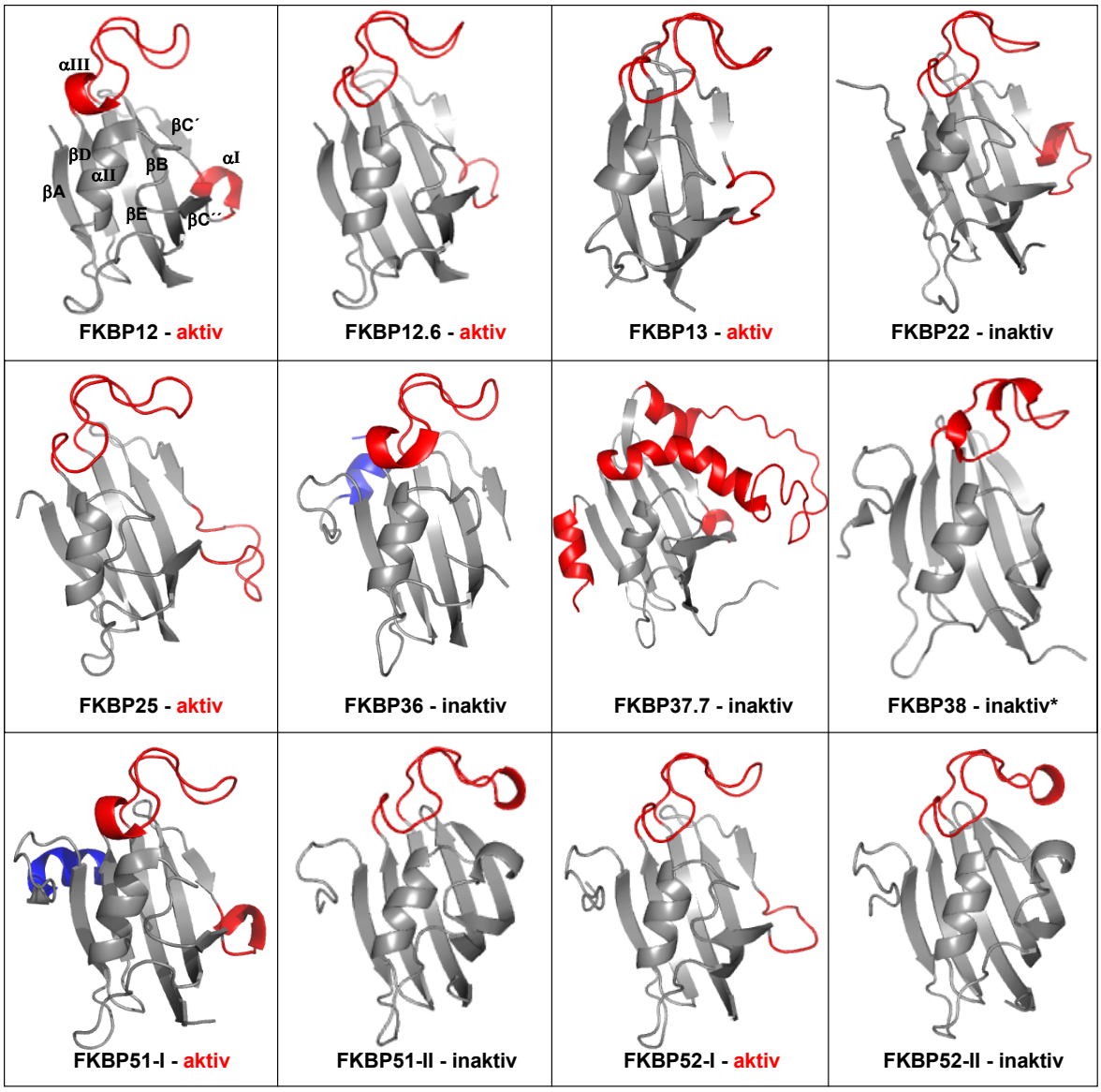


Abbildung 4-1: PPIase-Domänen der humanen FKBP. Exemplarisch beschriftet ist die Struktur von FKBP12. Rot hervorgehoben ist jeweils der Bereich zwischen βC´ und βC´´ im Falle eines geteilten Faltblattstranges, die Verbindung zwischen den Faltblattsträngen βD und βE, sowie die außergewöhnliche N-terminale α-Helix bei FKBP37.7. Blau hervorgehoben sind die orthogonal auf der Außenseite des β-Fasses verlaufenden N-terminalen α-Helices von FKBP36 und FKBP51. Dargestellt sind: FKBP12$^{1-108}$ (PDB: 2PPN), FKBP12.6$^{1-107}$ (PDB: 1C9H), FKBP13$^{45-137}$ (PDB: 2PBC), FKBP22$^{23-136}$ (PDB: 2DIP), FKBP25$^{109-224}$ (PDB: 1PBK), FKBP36$^{33-153}$ (PDB: 3B7X), FKBP37.7$^{1-166}$, FKBP38$^{90-207}$ (PDB: 3EY6), FKBP51$^{13-140}$ (PDB: 4DRQ), FKBP51$^{140-253}$ (PDB: 1KT0), FKBP52$^{21-140}$ (PDB: 1Q1C), FKBP52$^{140-257}$ (PDB: 1Q1C). * inaktiv im nicht-heterooligomeren Komplex.

Diese ungewöhnlich lange Verbindung von FKBP37.7 bedeckt dabei vollständig das putative aktive Zentrum der PPIase-Domäne (Abbildung 3-30, B). Der unstrukturierte Bereich der Erweiterung (Gly111-His135) wird zudem aus dem Segment Arg119-Ser132 gebildet, welches die meisten nicht zugeordneten Resonanzen enthält. Zum einen kann eine genaue Position dieses Segments durch die fehlenden räumlichen Informationen nicht bestimmt werden, was sich in der Diversität der 20 vorgestellten energieminimierten FKBP37$^{1-166}$ Konformere wiederspiegelt (Abbildung 3-28, A). Zum anderen lässt das aber auch vermuten, dass dieser Bereich ein ungewöhnlich hohes dynamisches Verhalten oder eine konformationelle Variabilität besitzt.
Ein Vergleich der durchgeführten *Chemical Shift Index*-Analyse mit den Ergebnissen der Strukturaufklärung zeigt das Vorhandensein der gleichen Sekundärstrukturelemente (Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1: Vergleich der Lage der Sekundärstrukturelemente von FKBP37.7$^{1-166}$ bei der *Chemical Shift Index*-Analyse und in der aufgeklärten Proteinstruktur. Rot markiert sind die FKBP-untypischen Sekundärstrukturelemente.

Chemical Shift Index-Analyse	aufgeklärte Proteinstruktur	Sekundärstrukturelement
Ile4-Glu10	Ile4-Asp11	αN
Asp11-Gln19	Ile13-Glu20	βA
Lys33-Leu41	Thr32-His42	βB
Asp45-Thr48	-	-
Val49-Asp52	Thr48-Asp52	βC´
Ser53-Arg56	Ser53-Arg56	αI
Glu61-Ile63	Lys58-Ile64	βC´´
Trp73-Cys78	Pro71-Thr79	αII
Glu84-Phe88	Glu84-Asp91	βD
Tyr98-Arg106	Ile92-Val110	αIII
A136-Gln143	A136-Gln143	αIV
Pro147-Glu158	Asn144-Pro160	βE

Dabei unterscheidet sich die Strukturvorhersage von der gelösten Struktur nur um wenige Aminosäuren. Lediglich das Vorhandensein einer kurzen α–Helix zwischen den Faltblattsträngen βB und βC´ konnte nicht bestätigt werden.

4.3. Mögliche Ursachen für die fehlende Aktivität

Mit der Aufklärung der Proteinstruktur der PPIase-Domäne von FKBP37.7 wurde eine unter den FKBP einzigartige Erweiterung zwischen den Faltblattsträngen βD und βE festgestellt. Diese

Erweiterung befindet sich direkt über der FK506-Bindetasche. Anhand einer Proteinstruktur von *Thermus thermophilus* SlyD im Komplex mit dem Peptidsubstrat Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA konnte gezeigt werden, dass die Substratbindung ebenfalls im Bereich der FK506-Bindetasche erfolgt [Low *et al.*, 2010]. Durch die βD-βE-Erweiterung scheint eine Zugänglichkeit für Substrate und Inhibitoren nicht mehr möglich zu sein. Es wurde daher vermutet, dass dies die Ursache für die bisher nicht nachgewiesene Bindung von FK506 und die fehlende PPIase-Aktivität ist. Es besteht die Möglichkeit, dass durch noch nicht nachgewiesene Interaktionen, dieses Segment das aktive Zentrum freigeben kann und es somit zur Aktivierung des Enzyms kommt. Dies ist zum Beispiel möglich durch die Bindung von Interaktionspartnern oder Liganden und einer daraus resultierenden Lageveränderung der Erweiterung. Für eine solche Vermutung könnte auch die starke Flexibilität des Beiches zwischen den Helices αIII und αIV sprechen.

Um die Möglichkeit einer nicht vorhandenen Zugänglichkeit zu überprüfen wurde eine FKBP37.7-Proteinvariante hergestellt, welcher diese Erweiterung fehlt. Nach einem Vergleich der Aminosäuren von FKBP37.7 mit den Aminosäuren im aktiven Zentrum von FKBP12 wurde entschieden den Bereich Leu100-Asn144 zu deletieren, so dass das Tyr98 noch erhalten bleibt. Das Tyr98 entspricht dem Tyr82 von FKBP12, welches eine wichtige Rolle bei der Bindung von FK506 spielt, da es eine von vier Wasserstoffbrückenbindungen zum FK506 ausbildet [Fanghänel & Fischer, 2004; Lücke & Weiwad, 2011]. Nach der Bestimmung der räumlichen Distanz zwischen den Aminosäuren Pro99 und Pro145 wurde eine neue Verbindung durch einen hydrophilen und flexiblen Linker aus Gly-Asp-Gly geschaffen.

FKBP37.7$^{1\text{-}166\Delta100\text{-}144}$ konnte erfolgreich kloniert, überexprimiert und gereinigt werden. Durch CD- und NMR-Spektroskopie wurde zudem die Faltung des Proteins untersucht [Manns, 2012]. Das CD-Spektrum von FKBP37.7$^{1\text{-}166\Delta100\text{-}144}$ zeigte einen geringeren Anteil an helikalen Strukturen als FKBP37.7$^{1\text{-}166}$ und ähnelte damit deutlich dem von FKBP12 [Pirkl & Buchner, 2001]. Die Überprüfung der räumlichen Struktur erfolgte durch den Vergleich der ^{1}H/^{15}N-HSQC-Spektren von ^{15}N-FKBP37.7$^{1\text{-}166}$ und ^{15}N-FKBP37.7$^{1\text{-}166\Delta100\text{-}144}$. Viele Signale aus dem β–Faltblatt konnten in beiden Spektren an identischen Positionen beobachtet werden, während Signale der Erweiterung im Spektrum von FKBP37.7$^{1\text{-}166\Delta100\text{-}144}$ nicht mehr detektiert werden konnten. Die Daten dieser Experimente lassen den Schluss zu, dass die Erweiterung erfolgreich entfernt werden konnte, ohne dass der generelle Aufbau der PPIase-Domäne verändert wurde. Aber auch für FKBP37.7$^{1\text{-}166\Delta100\text{-}144}$ konnte weder eine Bindung an die FK506-Affinitätsmatrix noch eine PPIase-Aktivität festgestellt werden.

Es ist möglich, dass der entfernte Teil nicht ausreichend groß war und das aktive Zentrum noch immer nicht zugänglich vorlag (Abbildung 3-31, B). Die noch verbliebenen Aminosäuren der βD-βE-Erweiterung könnten somit autoinhibitorisch wirken, indem sie in die FK506- und Substratbindetasche ragen. Eine solche Blockierung des aktiven Zentrums von FKBP12, allerdings

nicht autoinhibitorisch, konnte für Leu195 und Leu196 des TGFβ-Rezeptors im Komplex aus TGFβ–Rezeptor und FKBP12 beobachtet werden [Huse *et al.*, 1999]. Bei einer umfassenderen Deletion der βD-βE-Erweiterung, hätte aber auch Tyr98, als wichtige Aminosäure im putativ aktiven Zentrum, entfernt werden müssen. Eine Peptidyl-Prolyl-Bindung der βD-βE-Erweiterung, welche in die FK506- und Substratbindetasche hineinragt und dadurch als ein kompetitiver Inhibitor wirkt kann als genereller Grund für die fehlende Aktivität ausgeschlossen werden. Allerdings befindet sind nach der Entfernung der βD-βE-Erweiterung auch das Pro97 unter den direkt benachbarten Aminosäuren zum deletierten Bereich. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich durch die Entfernung der βD-βE-Erweiterung die Position einiger benachbarter Aminosäuren änderte und somit die Peptidyl-Prolyl-Bindung doch in die FK506- und Substratbindetasche hineinragt. Tyr98 befindet sich ebenfalls, als wichtige Aminosäure im putativ aktiven Zentrum, in unmittelbarer Nähe des deletierten Bereiches. Im Falle einer Positionsveränderung einzelner Aminosäuren in diesem Bereich könnte auch die Verschiebung von Tyr98 der Grund für die nicht nachweisbaren FK506-Bindung und PPIase-Aktivität sein. Wenn die βD-βE-Erweiterung durch die Bindung von Interaktionspartnern das aktive Zentrum freigeben kann und es somit zu einer Positionsveränderung der βD-βE-Erweiterung kommt, ist es aber auch denkbar, dass Tyr98 in dieser Position nicht vorliegen muss. Es ist ebenfalls denkbar, dass eine PPIase-Aktivität von FKBP37.7 nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus auftritt und dass nur in Komplexen mit bestimmten Substrat- oder Partnerproteinen eine Öffnung des aktiven Zentrums erfolgt. Durch die Präparation von FKBP37.7 aus nicht stimmulierten Zellen wäre die Konzentration solcher Komplexe zu gering und somit eine Aktivität nicht nachweisbar.
Nach Entfernung der βD-βE-Erweiterung zeigte auch SlyD aus *E. coli* keine höhere PPIase-Aktivität. Das Enzym war sogar nicht mehr in der Lage die Rückfaltung der RCM-T1 zu beschleunigen [Knappe *et al.*, 2007]. Ebenso zeigte FKBP12, dem die IF-Domäne des SlyD eingefügt wurde keine Veränderung der PPIase-Aktiviät gegenüber Peptidsubstraten, aber eine deutlich höhere katalytische Aktivität gegenüber dem Proteinsubstrat RCM-T1.

Anhand der aufgelösten Proteinstruktur der PPIase-Domänen war es nun möglich das putative aktive Zentrum von FKBP37.7 genauer zu betrachten. Das katalytische Zentrum der FKBP wird von einer hydrophoben Tasche gebildet, in die das stark hydrophobe FK506 binden kann. Dabei wurde vermutet, dass die Pipecolinyl-C8-Carbonyl-Bindung von FK506 die Peptidyl-Prolyl-bindung eines Substrates imitiert [Albers *et al.*, 1990]. Aus der gelösten Röntgenkristallstruktur von FKBP12 im Komplex mit FK506 konnten die Aminosäuren abgeleitet werden, welche in direktem Kontakt zum FK506 stehen [Van Duyne *et al.*, 1993; Vanduyne *et al.*, 1991]. Dabei wurden in verschiedenen Arbeiten jedoch einige unterschiedliche Reste angegeben [Fanghänel & Fischer, 2004; Kay, 1996; Lücke & Weiwad, 2011]. Zu den bisher in dieser Arbeit nach Fanghänel

et al. angegeben Resten sollten auch Val55 und Ile91 betrachtet werden [Kay, 1996; Lücke & Weiwad, 2011]. Alle als interagierend beschriebenen Aminosäurereste sind in Tabelle 4-2 dargestellt, sowie die entsprechenden Aminosäurereste von FKBP37.7.

Tabelle 4-2: Vergleich der Aminosäurereste von FKBP12 und FKBP37.7, welche laut der FKBP12-Struktur in direktem Kontakt zu FK506 stehen. Der Vergleich erfolgte anhand der gelösten Struktur von FKBP37.7$^{1-166}$. Die Aminosäurereste, welche bei FKBP12 Wasserstoffbrückenbindungen zum FK506 ausbilden und die, welche in direktem Kontakt zum Pipecolinylrest stehen sind mit + markiert. Grau hinterlegt sind die nicht identischen Reste bei FKBP37.7 im Vergleich zu FKBP12. Grau beschriftet sind die Reste, deren Interaktion nicht gesichert ist oder deren Charakter für eine Interaktion nicht entscheidend ist. H-Brücke bezeichnet die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zum FK506 und Pipe-Kontakt bezeichnet den Kontakt zum Pipecolinylrest.

FKBP 12	**Y 26**	**F 36**	**D 37**	**R 42**	**F 46**	**F 48**	**Q 53**	**E 54**	**V 55**	**I 56**	**W 59**	**Y 82**	**H 87**	**I 91**	**F 99**
FKBP 37.7	**Y 38**	**L 50**	**D 51**	**R 56**	**M 60**	**L 62**	**K 67**	**F 68**	**K 69**	**L 70**	**W 73**	**Y 98**	**L 138**	**L 141**	**F 150**
H-Brücke			+					+		+		+			
Pipe-Kontakt	+				+						+				+

Die grau beschrifteten Aminosäuren bilden dabei weniger wichtige oder weniger starke Interaktionen aus. Arg42 bildet eine Wasserstoffbrücke zu Asp37, welches selbst eine Wasserstoffbrücke zum Liganden ausbildet. Ein direkter Kontakt zum Liganden scheint dagegen eher unwahrscheinlich. Gln53 scheint ebenfalls nicht in direktem Kontakt zu FK506 zu stehen. Es wird lediglich vermutet, dass die Carbonylgruppe von Gln53 eine Wasserstoffbrücke über ein Wassermolekül zur Hydroxylgruppe des C24 von FK506 ausbildet [Vanduyne *et al.*, 1991]. Der Charakter der Aminosäure Glu54 ist für eine Interaktion nicht entscheidend, da die Wechselwirkung von der Carbonylgruppe des Peptidrückgrates und nicht von der Seitenkette ausgebildet wird. Die Seitenkette von His87 scheint zwar eine hydrophobe Interaktionen zum C12 der Pyranosemethylgruppe von FK506 auszubilden, liegt aber bei den katalytisch aktiven FKBP nur wenig konserviert vor [Fanghänel & Fischer, 2004]. In Abbildung 4-2, A ist eine Übereinanderlagerung der Strukturen von FKBP12 und von FKBP37.7 dargestellt. Die mit FK506 interagierenden Seitenketten der Aminosäuren sind darin hervor gehoben und bezeichnet.

Die vier Aminosäuren, welche in direktem Kontakt zum Pipecolinylrest stehen haben bei FKBP12 einen ausschließlich aromatischen Charakter. Tyr26 entspricht bei FKBP37.7 *Tyr38*, Phe46 *Met60*, Trp59 *Tpr70* und Phe99 *Phe155*. Bis auf *Met60* befinden sich die gleichen Aminosäuren an der entsprechenden Position bei FKBP37.7 im Vergleich zu FKBP12. Diese vier Aminosäuren von FKBP37.7 besitzen im Vergleich zu FKBP12 eine sehr ähnliche räumliche Orientierung (Abbildung 4-2, A). Gravierende Unterschiede können dagegen bei Tyr82/*Tyr98*, sowie bei Val55/*Lys69* beobachtet werden. Tyr82 bildet bei FKBP12 eine der vier Wasserstoffbrücken-bindungen zum FK506 aus (Abbildung 4-2, B).

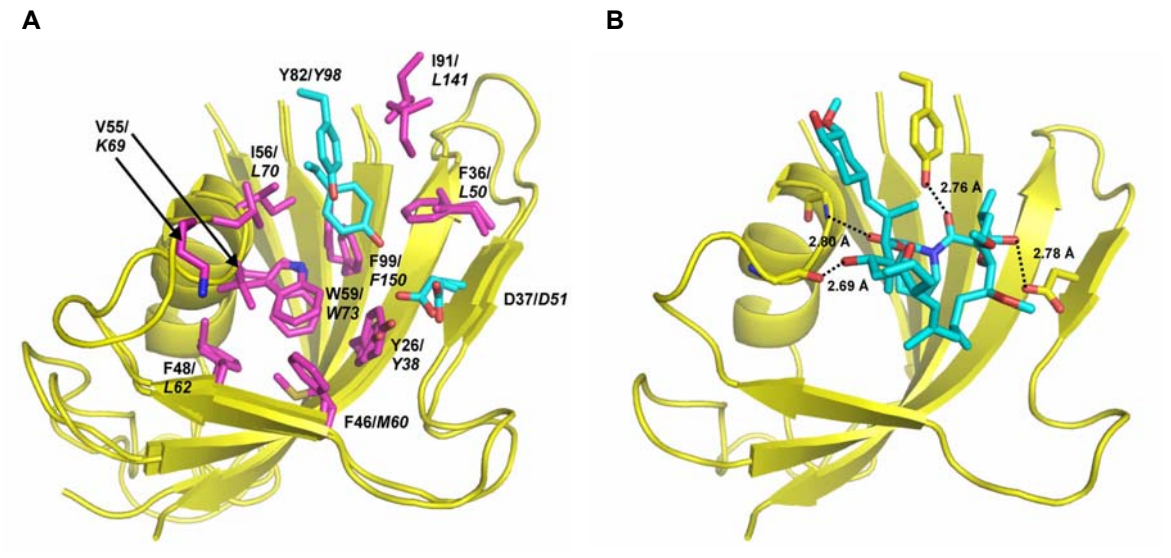


Abbildung 4-2: An der Interaktion zu FK506 beteiligte Aminosäuren von FKBP12 (PDB: 1FKJ). A) Die Seitenketten, welche entweder hydrophobe Interaktionen (magenta) oder Wasserstoffbrücken (cyan) mit dem Liganden FK506 bilden, sind als Stabmodelle hervor gehoben. Die Aminosäuren-Paare geben den FKBP12-Rest und den entsprechenden FKBP37.7-Rest (kursiv) an. Y82/*Y98*, sowie V55/*K69* (Pfeil) sind bei FKBP37.7 gravierend verschoben. **B)** Zeigt die Distanzen der vier Wasserstoffbrückenbindungen zwischen FKBP12 und FK506.

In FKBP37.7 ragt die entsprechende Aminosäure *Tyr98*, hervorgerufen durch die Lokalisation in der βD-βE-Erweiterung, deutlich tiefer in die hydrophobe Tasche hinein. Dies konnte übereinstimmend in allen 20 berechneten Konformeren beobachtet werden. Dabei nimmt *Tyr98* genau die Position ein, welche auch FK506 im Falle einer Bindung einnehmen würde. Eine ähnliche Beobachtung konnte auch für das entsprechende Tyr68 von SlyD aus *E. coli* gemacht werden [Weininger *et al.*, 2009]. Dabei wurde ebenfalls vermutet, dass dies der Grund für die geringe PPIase-Aktivität und die sehr schwache Bindung an FK506 ist.

Noch deutlich gravierender ist die Positionsveränderung von *Lys69* bei FKBP37.7 im Vergleich zu Val55 bei FKBP12. Val55 befindet sich direkt zwischen den Aminosäuren Glu54 und Ile56, welche zwei der vier Wasserstoffbrückenbindungen zu FK506 ausbilden (Abbildung 4-2, B). Die genannten drei Aminosäuren befinden sich in dem Verbindungsstück zwischen dem β-Faltblattstrang C´´ und der zentralen α-Helix. Diese Verbindung hat aber eine grundsätzlich andere Struktur als bei FKBP12 (Abbildung 4-3, A).

Ein Vergleich von FKBP-Domänen zeigt die gleiche Konformation in allen aktiven Domänen. Eine davon abweichende Konformation ist aber in allen inaktiven PPIase-Domänen, mit Ausnahme der dritten Domäne von *Triticum aestivum* FKBP73 zu beobachten [Lücke & Weiwad, 2011]. Vergleicht man FKBP37.7 mit den katalytisch aktiven FKBP, FKBP12, FKBP12.6, FKBP13, FKBP25, *Plasmodium falciparum* FKBP35, sowie den jeweils ersten Domänen von FKBP51, FKBP52 und *Triticum aestivum* FKBP73, so weisen deren Verbindungsstücke alle die gleiche Konformation auf, aber eine deutlich andere als bei FKBP37.7 (Abbildung 4-3, B).

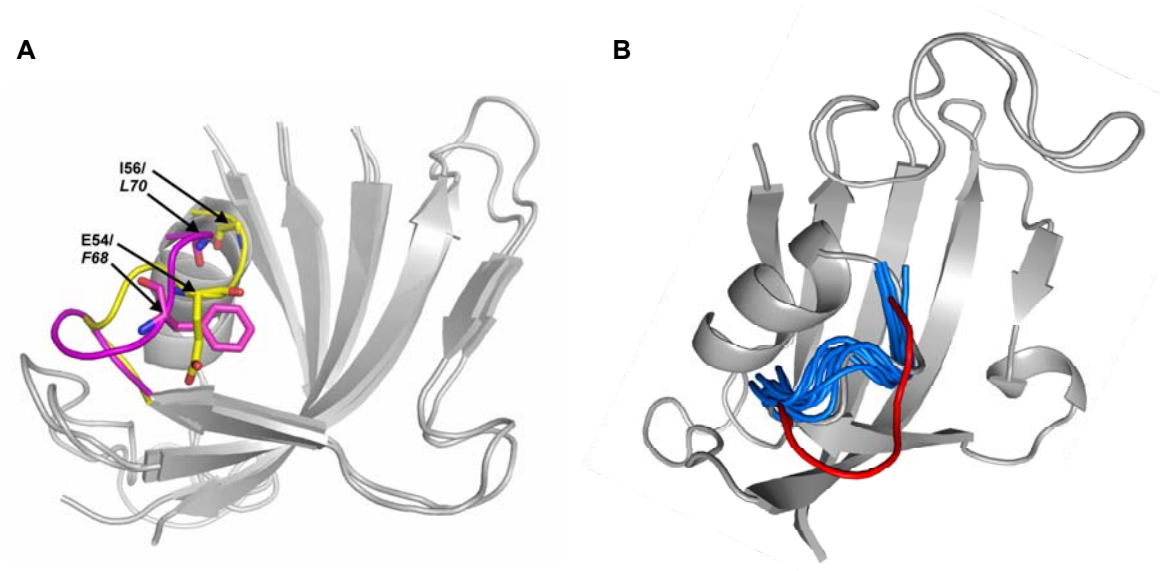


Abbildung 4-3: Konformationen des Bereiches zwischen dem β-Faltblattstrang βC´ und der zentralen α-Helix. A) Zeigt die unterschiedliche Konformation des Peptidrückgrates der Aminosäuren Glu54 und Ile56 von FKBP12 (gelb) (PDB: 1FKJ), sowie *Phe68* und *Leu70* von FKBP37.7 (magenta). **B)** Zeigt die Konformationen des Bereiches in den katalytisch aktiven PPIase-Domänen von FKBP12 (PDB: 2PPN), FKBP12.6, FKBP13, FKBP25, *Plasmodium falciparum* FKBP35, FKBP51, FKBP52 und *Triticum aestivum* FKBP73 (blau) im Vergleich zu FKBP37.7 (rot).

In keinem der 20 Konformere von FKBP37.7$^{1-166}$ konnte eine grundlegend andere Position ermittelt werden. Zur Sicherstellung der Richtigkeit wurde die Zuordnung der NOE´s aus diesem Bereich überprüft. Während Val55 in direktem Kontakt zum FK506 steht, ist die Seitenkette von *Lys69* des FKBP37.7 in die entgegengesetzte Richtung orientiert und zeigt somit vom Liganden weg. Ausgegangen davon ist das Peptidrückgrat ebenfalls entgegengesetzt orientiert, wodurch die Wasserstoffbrücken zwischen der Carbonylgruppe des Peptidrückgrates von Glu54, welche *Phe68* entspricht, und der Hydroxylgruppe von C24 des FK506, sowie die der Amidgruppe von Ile56, welche *Leu70* entspricht, und dem Carbonylsauerstoff des Lacton an Position C1 von FK506 nicht mehr ausgebildet werden können (Abbildung 4-3, A). Eine Erklärung für die veränderte Orientierung liefert möglicherweise der Charakter der Aminosäuren (Tabelle 4-3).

Tabelle 4-3: Charakter der Aminosäuren im Verbindungsstück zwischen dem β-Faltblattstrang C´´ und der zentralen α-Helix. Hydrophobe Aminosäuren sind nicht hinterlegt und hydrophile Aminosäuren sind grau hinterlegt.

FKBP12	**K52**	**Q53**	**E54**	**V55**	**I56**
FKBP37.7	**K66**	**K67**	**F68**	**K69**	**L70**

Hydrophile Aminosäurereste zeigen von der hydrophoben Tasche und somit vom Liganden weg und orientieren sich in Richtung des Lösungsmittels, wohingegen die hydrophoben Aminosäurereste ins aktive Zentrum hinein ragen. Bei FKBP37.7 findet dies bei den Resten *Phe68* und *Lys69* genau entgegengesetzt zu FKBP12 statt, wodurch es möglicherweise zu einer

Verdrillung in diesem Bereich kommt. Zusätzlich nimmt die, in die hydrophobe Tasche ragende, Seitenkette von *Phe68* deutlich mehr Platz ein, als es bei FKBP12 durch das Proteinrückgrat der Fall ist. Die hydrophobe Tasche wird bei FKBP37.7 ebenfalls gut ausgebildet. Allerdings können zwei der vier Wasserstoffbrückenbindungen zwischen FKBP37.7 und dem Liganden FK506 im Verbindungsstück zwischen dem β-Faltblattstrang C´´ und der zentralen α-Helix nicht ausgebildet werden. Die fehlende Interaktion mit FK506 könnte somit erklärt werden.
Anhand der Struktur von SlyD aus *Thermus thermophilus* im Komplex mit dem Peptidsubstrat Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA wurden die Aminosäurereste Tyr13, Asp23, Ile37, Leu40, Tyr63 und Phe128 abgeleitet, welche sich in direkter Nachbarschaft zu Peptidsubstrat befinden [Low *et al.*, 2010]. Diese entsprechen den Aminosäureresten Tyr26/*Tyr38*, Asp37/*Asp51*, Ile56/*Leu70*, Trp59/*Trp73*, Tyr82/*Tyr98* und Phe99/*Phe128* in FKBP12 bzw. *FKBP37.7*. Alle Aminosäurereste der aktiven FKBP, FKBP12 und SlyD, können auch in FKBP37.7 detektiert werden. Lediglich das im Verbindungsstück zwischen dem β-Faltblattstrang C´´ und der zentralen α-Helix befindliche sowie schon zuvor diskutierte *Leu70* unterscheidet sich.

4.4. Funktionen der PPIase-Domäne von FKBP37.7

Zur Aufklärung der Funktion der PPIase-Domäne von FKBP37.7 wurde die Ausprägung einer Chaperon-Aktivität untersucht. Innerhalb der FKBP-Familie sind einige Vertreter bekannt, wie beispielsweise SlyD aus *E. coli* oder FKBP17 aus *Methanococcus thermolithotrophicus*, bei denen die Chaperon-Aktivität durch die PPIase-Domäne vermittelt wird [Furutani *et al.*, 2000; Knappe *et al.*, 2007; Scholz *et al.*, 2006; Weininger *et al.*, 2009]. Als dafür verantwortlicher Bereich wurde die IF-Domäne identifiziert, welche sich als verlängerte Erweiterung zwischen den Faltblatt-Strängen βD und βE befindet. Die Nomenklatur ist dabei an die von FKBP12 angelehnt (Abbildung 1-3). Für humane FKBP konnte eine solche, durch die PPIase-Domäne vermittelte Chaperon-Aktivität bislang nicht festgestellt werden, allerdings ist bislang auch kein humaner Vertreter mit einer IF-Domäne bekannt. Durch die Aufklärung der Struktur der PPIase-Domäne von FKBP37.7 konnte erstmal ein humaner Vertreter identifiziert werden, der ebenfalls eine ähnlich große Erweiterung zwischen den Faltblatt-Strängen βD und βE besitzt.
In früheren Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass FKBP37.7 eine Chaperon-Aktivität gegenüber den Modellsubstraten Citrat-Synthase und Rhodanese besitzt [Yano *et al.*, 2003]. Allerdings wurde dabei nur das Volllängenprotein untersucht. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Domäne von FKBP37.7 identifiziert werden, welche diese Chaperon-Aktivität vermittelt. Die Bestimmung der Chaperon-Aktivität erfolgte durch die Beobachtung der Unterdrückung der Aggregation von Citrat-Synthase (Abbildung 3-35). Mit dem Volllängenprotein

FKBP37.7$^{1-330}$ konnte, wie aus der Literatur bekannt, eine konzentrationsabhängige Verzögerung der Citrat-Synthase-Aggregation beobachtet werden, allerdings keine Unterdrückung [Yano *et al.*, 2003]. Die Untersuchung mit den einzelnen Proteindomänen ergab bei Verwendung der isolierten TPR-Domäne FKBP37.7$^{170-330}$ eine Verzögerung, sowie die Unterdrückung der Aggregation der Citrat-Synthase. Dagegen zeigten die eingesetzten PPIase-Domänen FKBP37.7$^{1-166}$ und FKBP37.7$^{1-166\Delta 100-144}$ keinerlei Unterdrückung der Aggregation. Hierbei wurde sogar eine verstärkte Aggregation beobachtet. Damit konnte für die PPIase-Domäne sowie für die Erweiterung zwischen den Faltblatt-Strängen βD und βE keine Chaperon-Aktivität nachgewiesen werden. Die beobachtete Chaperon-Aktivität des Volllängenproteins wird somit durch die TPR-Domäne hervorgerufen. Dies konnte ebenfalls für das TPR-Motive enthaltende FKBP FKBP52 gezeigt werden [Pirkl *et al.*, 2001].

Trotz der vergleichbaren Größen der Erweiterungen zwischen den Faltblatt-Strängen βD und βE von SlyD aus *E. coli* mit 64 Aminosäuren und von FKBP37.7 mit 52 Aminosäuren, zeigt sich doch ein grundsätzlich verschiedener Aufbau und eine unterschiedliche Orientierung (Abbildung 4-4).

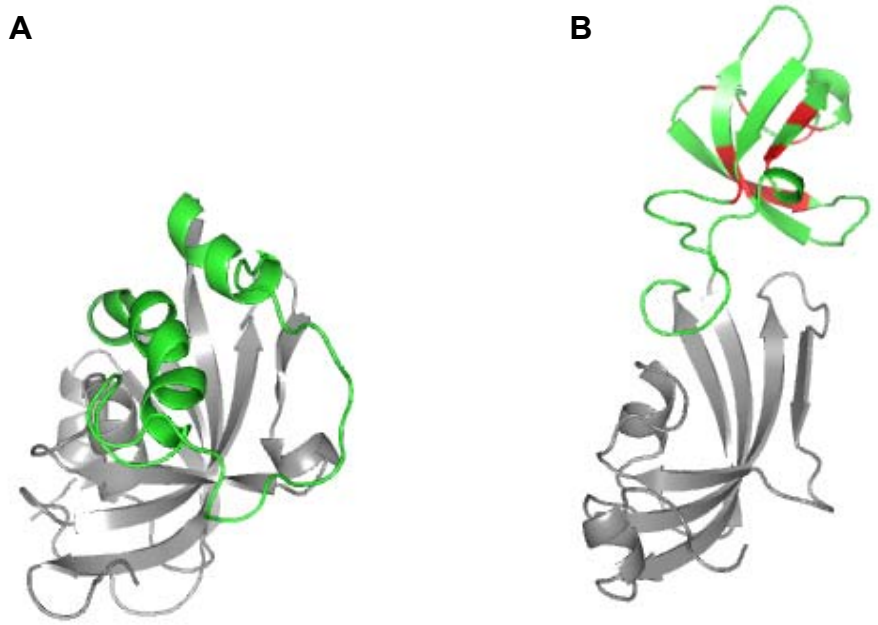


Abbildung 4-4: Gegenüberstellung der PPIase-Domänen von FKBP37.7 (A) und SlyD aus *E. coli* (B). Die PPIase-Domäne ist jeweils in grau dargestellt und die βD-βE-Erweiterung in grün. Rot hervor gehoben sind die mit dem Substrat Tat-Signalpeptid interagierenden Aminosäuren bei SlyD [Weininger *et al.*, 2009]. Die βD-βE-Erweiterung von FKBP37.7 zeigt einen grundsätzlich anderen Aufbau als die von SlyD. Die Orientierung der Strukturen ist vergleichbar mit der von FKBP12 aus Abbildung 1-3. Von FKBP37.7 sind die Aminosäuren 1-166 abgebildet, von SlyD die Aminosäuren 1-155 (PDB: 2K8I).

Die IF-Domäne von SlyD wird aus einem viersträngigem, antiparallel verlaufendem β-Faltblatt und einer kurzen α-Helix gebildet [Weininger *et al.*, 2009]. Dagegen besteht die βD-βE-Erweiterung von FKBP37.7 aus einer 19 Aminosäuren langen und einer kürzeren α-Helix sowie einem größtenteils unstrukturierten Bereich. Durch NMR-Titrationsexperimente mit Substratmolekülen

konnten die interagierenden Aminosäuren der IF-Domäne von SlyD ermittelt werden. Dabei zeigte sich, dass diese in der gesamten IF-Domäne verteilt vorliegen. Eine Substraterkennung von FKBP37.7 müsste somit zusätzlich nach einem vollständig anderen Mechanismus verlaufen als bei SlyD.

Durch die Aufklärung der Proteinstruktur bestätigte sich ein FKBP-typischer Aufbau der PPIase-Domäne von FKBP37.7 mit einer außergewöhnlichen Erweiterung. Dennoch konnte für diese Domäne weder eine PPIase-Aktivität noch eine Chaperon-Aktivität nachgewiesen werden. In der Literatur gibt es allerdings Hinweise auf eine Beteiligung dieser PPIase-Domäne an Protein-Protein-Interaktion. So zeigt zum Beispiel FKBP37.7 in Co-Immunpräzipitationsexperimenten eine schwächere Interaktion mit Hsp90 und dem AhR wenn die PPIase-Domäne oder Teile der PPIase-Domäne deletiert wurden [Kazlauskas *et al.*, 2002]. Beweise für eine direkte Interaktion der PPIase-Domäne von FKBP37.7 mit Hsp90 konnten bislang nicht erbracht werden. Für die TPR-Domäne von FKBP37.7 wurde bereits die Interaktion mit der C-terminalen Domäne von Hsp90 beschrieben [Bell & Poland, 2000; Carver *et al.*, 1998; Meyer & Perdew, 1999]. Aufgrund der Größenverhältnisse ist es möglich, dass auch die PPIase-Domäne von FKBP37.7 mit der C-terminale Domäne von Hsp90 interagiert. Die Distanz zwischen dem Ende der mittleren Domäne und dem Ende der C-terminale Domäne von Hsp90 aus Hefe beträgt laut der Kristallstruktur etwa 4-5 nm, wobei das mit der TPR-Domäne-interagierende MEEVD-Motiv nicht mit gemessen ist (PDB: 2CG9). Vergleicht man dies mit dem Abstand vom Beginn der zweiten PPIase-Domäne bis zur Mitte der Superhelix der TPR-Domäne des TPR-enthaltenden FKBP FKBP51 so ist ersichtlich, dass diese Distanz auch etwa 4 nm beträgt (PDB: 1KT0). Im GST-Präzipitationsexperiment wurden die GST-FKBP37.7-Proteinvarianten der PPIase-Domäne, der TPR-Domäne und des Volllängenproteines immobilisiert und jeweils mit der C-terminalen Domäne von Hsp90α und Hsp90β inkubiert. Im durchgeführten Experiment konnte die Bindung beider, voneinander unabhängig gereinigten Hsp90-Isoformen an die TPR-Domäne, das Volllängenprotein sowie die PPIase-Domäne gezeigt werden. Die Interaktion der TPR-Domäne war dabei stärker als die der PPIase-Domäne. Die Bindung des FKBP37.7-Volllängenproteins an Hsp90 erfolgte allerdings ähnlich schwach wie an die PPIase-Domänenvariante. Dies steht im Widerspruch zur bisherigen Annahme, dass das Volllängenprotein genauso gut oder besser bindet wie die isolierte TPR-Domäne [Kazlauskas *et al.*, 2002]. Eine mögliche Begründung für das Bindungsverhalten liefert das Massenspektrum von GST-FKBP37.7$^{1-330}$ (Anhang 1). Darin können keine Signale für die 26 C-terminalen Aminosäuren mehr detektiert werden, was aber bei allen anderen hergestellten FKBP37.7-Varianten möglich ist. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Deletion der 34 bzw. 19 C-terminalen Aminosäuren bereits zu einer Abschwächung der Interaktion mit Hsp90 führen kann [Kazlauskas *et al.*, 2002; Meyer & Perdew, 1999].

Die Ergebnisse der $^{1}H/^{15}N$-HSQC-NMR-Experimente mit FKBP37.7$^{1-166}$ sprechen für eine schwache Bindung. His_6-Hsp90β$^{620-724}$ (C-terminale Domäne) bzw. His_6-Hsp90β$^{1-724}$ zeigten

Interaktionen mit der βD-βE-Erweiterung und dem unstrukturierten C-Terminus am Ende der PPIase-Domäne. Die Spektren der Komplexmessungen aus PPIase-Domäne und den Hsp90-Proteinvarianten zeigten jedoch nur geringfügige Verschiebungen einiger Signale gegenüber der Referenz. Es besteht die Möglichkeit, dass darüber hinaus weitere Aminosäuren, besonders in der βD-βE-Erweiterung, an einer Interaktion beteiligt sind. Aufgrund nicht detektierbarer Signale der βD-βE-Erweiterung kann darüber allerdings keine Aussage getroffen werden. Neben dem unstrukturierten C-Terminus am Ende der PPIase-Domäne müssen aber weitere Bereiche an einer Interaktion beteiligt sein, da im ersten GST-Präzipitationsexperiment eine Interaktion von FKBP37.7$^{11\text{-}158}$ und Hsp90 beobachtet wurde. Diesem Protein fehlt aber der unstrukturierte C-Terminus.

Bei der Bindung von authentischem Hsp90 aus HEK293-Zelllysat an immobilisierte GST-FKBP37.7-Varianten konnte ebenfalls eine schwache Bindung an die PPIase-Domäne, sowie an die Volllänge beobachtet werden (Abbildung 3-36). Dagegen konnte mit GST-FKBP37.7$^{1\text{-}166\Delta 100\text{-}144}$, dem die βD-βE-Erweiterung entfernt wurde, kaum noch eine Bindung an Hsp90 beobachtet werden. Insgesamt sprechen die Ergebnisse dafür, dass FKBP37.7 neben der bekannten Bindestelle in der TPR-Domäne eine weitere Bindestelle in der PPIase-Domäne besitzt. Diese Bindestelle umfasst Reste am Ende der PPIase-Domäne sowie weitere Bereiche, vermutlich in der βD-βE-Erweiterung. Diese Bindung über die PPIase-Domäne ist allerdings deutlich schwächer als über die TPR-Domäne. Wie schon früher für den AhR vermutet wurde, könnte diese zusätzliche Interaktion beispielsweise zur Regulation der Funktion oder Stabilität des Rezeptorkomplexes beitragen [Kazlauskas *et al.*, 2002]. Denkbar ist auch, dass die Interaktion der korrekten Orientierung von FKBP37.7 im Rezeptorkomplex dient, um eine Erkennung oder Bindung von Substratproteinen zu ermöglichen.

Auch für andere PPIasen konnte gezeigt werden, dass weitere Bereiche außerhalb der TPR-Domäne Interaktionen mit Hsp90 eingehen. Während bei FKBP51 Bereiche C-terminal des letzten TPR-Motives identifiziert wurden, konnte für Cyp40 eine zweite Bindestelle am C-terminalen Ende der PPIase-Domäne nachgewiesen werden [Barent *et al.*, 1998; Ratajczak & Carrello, 1996].

Dass eine direkte Interaktion der PPIase-Domäne von FKBP37.7 mit Hsp90 bisher nicht nachgewiesen werden konnte, könnte in der schwachen Bindung begründet liegen. So wurden in bisher durchgeführten Experimenten zu geringe Mengen an rekombinant hergestelltem Protein eingesetzt oder die Detektion von Hsp90 war zu schwach [Carver *et al.*, 1998; Kazlauskas *et al.*, 2002].

Bei der Reinigung von FLAG-FKBP37$^{1\text{-}330}$ aus HEK293-Zelllysat konnte eine Anreicherung weiterer Proteine im Vergleich zum Kontrollzelllysat beobachtet werden. Durch eine massenspektrometrische Analyse wurden neben den bekannten Interaktionspartnern Hsp90α, Hsp90β und Hsc70 auch Hsp70-1 und das Hsp90 Co-Chaperon Cdc37 sowie mehrere Komponenten des Cytoskeletts identifiziert. HSP70-1 und Cdc37 waren vermutlich über Hsp90 an FKBP37.7

gebunden [Hunter & Poon, 1997; Stepanova *et al.*, 1996]. Die identifizierten Komponenten des Cytoskeletts waren α-Actinin, Fascin, Filamin, α-Tubulin sowie β-Tubulin. Diese Proteine sind als Interaktionspartner von FKBP37.7 bislang nicht bekannt. Das Cytoskelett eukaryotischer Zellen besteht aus drei Hauptkomponenten, den Mikrofilamenten, den Mikrotubuli uns den Intermediärfilamenten [Fletcher & Mullins, 2010]. Zu den Mikrofilamenten zählen Aktin, die Myosine als Motorproteine und unter anderem auch die identifizieren Proteine α-Actinin, Fascin und Filamin. α-Actinin, Fascin und Filamin spielen dabei eine Rolle bei der Quervernetzung und Bündelung von Aktinfilamenten [Adams, 2004; Djinovic-Carugo *et al.*, 1999; Hartwig & Stossel, 1975; Honda *et al.*, 1998; Stossel *et al.*, 2001; Yamashiro *et al.*, 1998]. Die Mikrofilamente stabilisieren hauptsächlich die äußere Form der Zelle und verankern Rezeptoren in der Plasmamembran [Fletcher & Mullins, 2010]. Zu den Mikrotubuli zählen unter anderem Tubulin, sowie die Dyneine und die Kinesine als Motorproteine. Entlang der Mikrotubuli verläuft vorwiegend der Transport von Proteinkomplexen sowie die Bewegung und die Befestigung von Organellen [Vale, 2003]. Zur Stabilität der Zelle tragen die Mikrotubuli allerdings nur wenig bei.

Im GST-Präzipitationsexperiment mit humanem HEK293-Zelllysat konnte die Interaktion zwischen FKBP37.7 und Tubulin bestätigt werden. Diese Protein-Protein-Interaktion konnte dabei für die PPIase-Domäne von FKBP37.7 gezeigt werden, wobei keine Interaktion nach der Entfernung der βD-βE-Erweiterung mehr stattfand. Hierbei kann allerdings nicht gesagt werden, ob es sich um eine direkte oder eine indirekte Interaktion handelt. Für FKBP52 und Cyp40 konnte bereits eine Interaktion mit Dynein, einem Motorprotein zum Transport auf Mikrotubuli, gezeigt werden [Galigniana *et al.*, 2002; Pratt *et al.*, 2004]. Für FKBP52 wurde auch gezeigt, dass die Interaktionsstelle in der PPIase-Domäne lokalisiert ist. Für FKBP37.7 konnte aber keine Bindung an Dynein festgestellt werden. In weiteren Experimenten muss geklärt werden, ob die Interaktion mit Tubulin direkt erfolgt oder über andere Proteine verläuft. Hierfür kommen beispielsweise die Kinesine, als zweite Klasse der Motorproteine, in Frage. Diese sind ebenfalls in der Lage Proteinkomplexe entlang der Mikrotubuli zu transportieren [Miki *et al.*, 2005; Vale, 2003; Verhey *et al.*, 2011]. Anders als die Dyneine bewegen sich die Kinesine normalerweise zum positiven Ende der Mikrotubuli (Anterograder Transport). Es sind aber auch Vertreter bekannt, die sich zum negativen Ende, das heißt in Richtung Zellkern bewegen (Retrograder Transport) [Brady *et al.*, 1990; Paschal & Vallee, 1987]. Allerdings wurde kein Kinesin bei der massenspektrometrischen Analyse als Interaktionspartner von FKBP37.7 identifiziert.

Im GST-Präzipitationsexperiment mit humanem HEK293-Zelllysat wurde auch die Interaktion von FKBP37.7 mit β-Aktin untersucht. Zu dieser Interaktion existieren widersprüchliche Daten. Während Berg und Pongratz in Co-Immunpräzipitationsexperimenten eine Interaktion im nicht aktivierten Arylhydrocarbon-Rezeptorkomplex zeigten, konnte dies von Petrulis *et al.* nicht bestätigt werden [Berg & Pongratz, 2002; Petrulis *et al.*, 2003]. Der Unterschied beider

Untersuchungen lag lediglich in der Verwendung der Zelllinien COS-1 und COS-7. Im hier untersuchten HEK293-Zelllysat konnte ebenfalls keine Interaktion beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnten aber durch die massenspektrometrischen Analysen die Aktin-assozierten Proteine α-Actinin, Fascin und Filamin als Interaktionspartner von FKBP37.7 identifiziert werden. Um die Art und die Funktion der Interaktionen zu klären sollten weitere Untersuchungen folgen.

Die im Laufe dieser Arbeit gezeigten Daten belegen, dass FKBP37.7 keine PPIase-Aktivität besitzt und nicht in der Lage ist FK506 zu binden. Eine Funktion der PPIase-Aktivität anderer Rezeptor-assoziierter aktiver FKBP konnte bislang jedoch auch nicht nachgewiesen werden. Für FKBP52 und Cyp40 konnte beispielsweise keine Änderung der Heterokomplexformation des Glucocortikoid-Rezeptor- und Progesteron-Rezeptorkomplexes bei Inhibition der PPIase-Aktivität festgestellt werden [Hutchison *et al.*, 1993; Pratt & Toft, 1997; Renoir *et al.*, 1994]. Auch konnte eine Beeinflussung der Steroidbindung an den Glucocorticoid-Rezeptor-FKBP52-Komplex durch FK506 nicht gezeigt werden [Hutchison *et al.*, 1993]. Von FKBP51 wurde durch die Einführung von zwei Punktmutationen eine Variante mit einer um 90 % reduzierten PPIase-Aktivität generiert. Dies hatte allerdings auch keinen Einfluß auf die Interaktion mit dem Progesteron-Rezeptor oder Hsp90 [Barent *et al.*, 1998]. Ebenfalls konnte die Interaktion von FKBP52 mit Dynein durch die Behandlung mit FK506 nicht gestört werden [Silverstein *et al.*, 1999].

Neben FKBP37.7 gibt es mindestens sechs weitere Vertreter der 16 humanen FKBP, die ebenfalls keine Bindung an FK506 zeigen (FKBP23, 24, 36, 37, 44, und 133) [Linnert *et al.*, 2012b]. FKBP37.7 scheint damit kein Einzelfall zu sein. Die PPIase-Domänen aller FKBP weisen Sequenz-homologien auf; strukturelle Daten für die nicht-FK506-bindenden FKBP fehlen aber bislang. Lediglich die Struktur von FKBP36 (PDB: 3B7X) und von FKBP37.7 konnten geklärt werden. Beide weisen den typischen Aufbau einer FKBP-Domäne auf. Möglicherweise liegen die Aufgaben der PPIase-Domänen dieser nicht-FK506-bindenden FKBP vorallem in der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktion über strukturelle Motive, anstelle einer Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen.

5. Zusammenfassung

Das humane FKBP37.7 besitzt eine N-terminal lokalisierte putative PPIase-Domäne und eine C-terminal lokalisierte TPR-Domäne. Weder eine PPIase-Aktivität, noch eine Bindung an FK506 konnte für FKBP37.7 nachgewiesen werden. Auch Protein-Protein-Interaktionen waren für die PPIase-Domäne bisher nicht bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher die Funktion der PPIase-Domäne aufzuklären.

- Durch einen Sequenzvergleich mit FKBP12 und FKBP51 wurden die Domänengrenzen der PPIase- (11-158) und der TPR-Domäne (170-330) für die Herstellung von Proteinvarianten bestimmt. Innerhalb der PPIase-Domäne konnte dabei ein ungewöhnlicher Einschub beobachtet werden.
- Die FKBP37.7-Proteinvarianten FKBP37.7$^{1-330}$, His$_6$-FKBP37.7$^{1-330}$, GST-FKBP37.7$^{1-330}$, FKBP37.7$^{1-166}$, GST-FKBP37.7$^{11-158}$, FKBP37.7$^{170-330}$ und GST-FKBP37.7$^{170-330}$ sowie die Hsp90-Proteinvarianten His$_6$-Hsp90β$^{1-724}$, His$_6$-Hsp90α$^{628-732}$ bzw. His$_6$-Hsp90β$^{620-724}$ konnten erfolgreich rekombinant hergestellt und gereinigt werden.
- FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ wurde kloniert und erfolgreich in HEK293-Zellen stabil überexprimiert. Aus diesen Zellen gelang es das Protein zu isolieren.
- Mit den rekombinant hergestellten FKBP37.7-Proteinvarianten, wie auch mit authentischem FKBP37.7 aus verschiedenen humanen Zellen konnte mittels FK506-Affinitätsmatrix keine Bindung nachgewiesen werden.
- Auch konnte für keine der hergestellten FKBP37.7-Proteinvarianten eine PPIase-Aktivität im Protease-freien Test festgestellt werden. Ein Einfluss von Hsp90 oder anderer, mit FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ co-gereinigter Bindepartner konnte nicht gezeigt werden.
- Gegenüber dem Proteinsubstrat RCM-T1 zeigte FKBP37.7 ebenfalls keine PPIase-Aktivität.

Zur Untersuchung der Ursache der fehlenden PPIase-Aktivität und FK506-Bindung sowie zur Aufklärung eines möglichen Aktivierungsmechanismus sollte die Proteinstruktur der PPIase-Domäne durch NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden.

- Zu Beginn der Strukturaufklärung wurde die Stabilität von FKBP37.7$^{1-166}$ verbessert. Geeignete Bedingungen waren: mit Proteaseinhibitoren behandelte Proteinlösung (c= 2 mM) bei 25 °C in 10 mM Na_2HPO_4-Puffer pH 7,5 und 5 mM DTT.
- Durch erfolgreiche Überexpression von FKBP37.7$^{1-166}$ in isotopenmarkiertem 2YT-Medium wurden ^{15}N- und ^{13}C/^{15}N-markierte Proteine hergestellt.
- Aus den Spektren der durchgeführten NMR-Experimente konnten die Resonanzen von 145 Spinsystemen des Peptidrückgrates (90 %) zugeordnet werden. Diese Zuordnung wurde in der BioMagResBank unter der Zugangsnummer 18001 abgelegt.

- Die aufgeklärte Proteinstruktur von FKBP37.7$^{1-166}$ zeigte die typische Faltung einer PPIase-Domäne vom FKBP-Typ mit einem unter den humanen FKBP bislang einzigartigen Einschub. Diese vorwiegend α-helikal organisierte Erweiterung befindet direkt über dem putativ aktiven Zentrum, so dass eine Zugänglichkeit für Substrate und Inhibitoren nicht mehr gegeben zu sein scheint.
- Es wurde eine FKBP37.7-Proteinvariante der PPIase-Domäne ohne diese Erweiterung generiert. Auch dieses Protein zeigte weder eine Bindung an FK506 noch eine PPIase-Aktivität gegenüber Peptidsubstraten bzw. RCM-T1.
- Für FKBP37.7 konnte eine Chaperon-Aktivität nachgewiesen werden, welche allerdings nicht von der PPIase-Domäne, sondern von der TPR-Domäne vermittelt wird.

Neben der Untersuchung der enzymatischen Aktivität der PPIase-Domäne von FKB37.7 sollten auch neue Interaktionspartner identifiziert werden.

- Dabei zeigte die PPIase-Domäne von FKB37.7 sowohl eine Interaktion mit den rekombinant hergestellten Proteinvarianten der C-terminalen Domäne von Hsp90, als auch der Hsp90-Vollänge. Mit authentischem Hsp90 wurde ebenfalls eine Bindung an die PPIase-Domäne beobachtet, wobei eine deutlich schwächere Bindung an die PPIase-Domäne ohne den Einschub erfolgte.
- FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ wurde mit Bindepartnern aus humanen HEK293-Zellen isoliert. Diese konnten durch Massenspektrometrie als Hsp90α, Hsp90β, Cdc37, Hsc70, Hsp70-1, Filamin-A, Fascin, α-Actinin-4, Tubulinα und Tubulinβ identifiziert werden.
- Die PPIase-Domäne von FKB37.7 zeigte ebenfalls eine Interaktion mit authentischem Tubulin aus HEK293-Zellen, wobei auch hier eine schwächere Bindung an die PPIase-Domäne ohne den Einschub beobachtet wurde.

6. Literaturverzeichnis

Adams, J. C. (2004): Roles of fascin in cell adhesion and motility. *Curr Opin Cell Biol*. 16:590-6.

Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., and Knowles, B. B. (1979): Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*. 282:615-6.

Albers, M. W., Walsh, C. T., and Schreiber, S. L. (1990): Substrate-Specificity for the Human Rotamase Fkbp - a View of Fk506 and Rapamycin as Leucine (Twisted Amide) Proline Mimics. *Journal of Organic Chemistry*. 55:4984-4986.

Ali, M. M., Roe, S. M., Vaughan, C. K., Meyer, P., Panaretou, B., Piper, P. W., Prodromou, C., and Pearl, L. H. (2006): Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature*. 440:1013-7.

Allan, R. K., and Ratajczak, T. (2010): Versatile TPR domains accommodate different modes of target protein recognition and function. *Cell Stress Chaperones*. 16:353-67.

Bardwell, J. C., and Craig, E. A. (1988): Ancient heat shock gene is dispensable. *J Bacteriol*. 170:2977-83.

Barent, R. L., Nair, S. C., Carr, D. C., Ruan, Y., Rimerman, R. A., Fulton, J., Zhang, Y., and Smith, D. F. (1998): Analysis of FKBP51/FKBP52 chimeras and mutants for Hsp90 binding and association with progesterone receptor complexes. *Mol Endocrinol*. 12:342-54.

Beischlag, T. V., Luis Morales, J., Hollingshead, B. D., and Perdew, G. H. (2008): The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 18:207-50.

Bell, A., Monaghan, P., and Page, A. P. (2006): Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases (immunophilins) and their roles in parasite biochemistry, host-parasite interaction and antiparasitic drug action. *Int J Parasitol*. 36:261-76.

Bell, D. R., and Poland, A. (2000): Binding of aryl hydrocarbon receptor (AhR) to AhR-interacting protein. The role of hsp90. *J Biol Chem*. 275:36407-14.

Berg, P., and Pongratz, I. (2002): Two parallel pathways mediate cytoplasmic localization of the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor. *J Biol Chem*. 277:32310-9.

Biedler, J. L., Helson, L., and Spengler, B. A. (1973): Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*. 33:2643-52.

Blatch, G. L., and Lassle, M. (1999): The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays*. 21:932-9.

Blum, H., Beier, H., and Gross, H. J. (1987): Improved Silver Staining of Plant-Proteins, Rna and DNA in Polyacrylamide Gels. *Electrophoresis*. 8:93-99.

Bohlke, J. K., De Laeter, J. R., De Bievre, P., Hidaka, H., Peiser, H. S., Rosman, K. J. R., and Taylor, P. D. P. (2003): Atomic weights of the elements: Review 2000 - (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*. 75:683-800.

Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-54.

Brady, S. T., Pfister, K. K., and Bloom, G. S. (1990): A monoclonal antibody against kinesin inhibits both anterograde and retrograde fast axonal transport in squid axoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:1061-5.

Brahms, S., and Brahms, J. (1980): Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J Mol Biol*. 138:149-78.

Brinker, A., Scheufler, C., Von Der Mulbe, F., Fleckenstein, B., Herrmann, C., Jung, G., Moarefi, I., and Hartl, F. U. (2002): Ligand discrimination by TPR domains. Relevance and selectivity of EEVD-recognition in Hsp70 x Hop x Hsp90 complexes. *J Biol Chem*. 277:19265-75.

Buchner, J. (1996): Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J*. 10:10-9.

Buchner, J. (1999): Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci*. 24:136-41.

Buchner, J., Grallert, H., and Jakob, U. (1998): Analysis of chaperone function using citrate synthase as nonnative substrate protein. *Methods Enzymol*. 290:323-38.

Burns, J. A., Butler, J. C., Moran, J., and Whitesides (1991): Selective Reduction of Disulfides by Tris(2-carboxyethyl)phosphine. *J org chem*, New York. ix, 505 p. pp.

Cai, W., Kramarova, T. V., Berg, P., Korbonits, M., and Pongratz, I. (2011): The immunophilin-like protein XAP2 is a negative regulator of estrogen signaling through interaction with estrogen receptor alpha. *PLoS One*. 6:e25201.

Callebaut, I., Renoir, J. M., Lebeau, M. C., Massol, N., Burny, A., Baulieu, E. E., and Mornon, J. P. (1992): An Immunophilin That Binds M(R) 90,000 Heat-Shock Protein - Main Structural Features of a Mammalian P59 Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89:6270-6274.

Cardoso, R. M., Daniels, D. S., Bruns, C. M., and Tainer, J. A. (2003): Characterization of the electrophile binding site and substrate binding mode of the 26-kDa glutathione S-transferase from Schistosoma japonicum. *Proteins*. 51:137-46.

Carlson, D. B., and Perdew, G. H. (2002): A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins. *J Biochem Mol Toxicol*. 16:317-25.

Carrello, A., Allan, R. K., Morgan, S. L., Owen, B. A., Mok, D., Ward, B. K., Minchin, R. F., Toft, D. O., and Ratajczak, T. (2004): Interaction of the Hsp90 cochaperone cyclophilin 40 with Hsc70. *Cell Stress Chaperones*. 9:167-81.

Carver, L. A., and Bradfield, C. A. (1997): Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *J Biol Chem*. 272:11452-6.

Carver, L. A., LaPres, J. J., Jain, S., Dunham, E. E., and Bradfield, C. A. (1998): Characterization of the Ah receptor-associated protein, ARA9. *J Biol Chem*. 273:33580-7.

Chahal, H. S., Chapple, J. P., Frohman, L. A., Grossman, A. B., and Korbonits, M. (2010): Clinical, genetic and molecular characterization of patients with familial isolated pituitary adenomas (FIPA). *Trends Endocrinol Metab*. 21:419-27.

Chambraud, B., Rouviere-Fourmy, N., Radanyi, C., Hsiao, K., Peattie, D. A., Livingston, D. J., and Baulieu, E. E. (1993): Overexpression of p59-HBI (FKBP59), full length and domains, and characterization of PPlase activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 196:160-6.

Chanson, P., and Salenave, S. (2008): Acromegaly. *Orphanet J Rare Dis*. 3:17.

Chen, H. S., and Perdew, G. H. (1994): Subunit composition of the heteromeric cytosolic aryl hydrocarbon receptor complex. *J Biol Chem*. 269:27554-8.

Cliff, M. J., Harris, R., Barford, D., Ladbury, J. E., and Williams, M. A. (2006): Conformational diversity in the TPR domain-mediated interaction of protein phosphatase 5 with Hsp90. *Structure*. 14:415-26.

Compton, L. A., Davis, J. M., Macdonald, J. R., and Bachinger, H. P. (1992): Structural and functional characterization of Escherichia coli peptidyl-prolyl cis-trans isomerases. *Eur J Biochem*. 206:927-34.

Cortajarena, A. L., and Regan, L. (2006): Ligand binding by TPR domains. *Protein Sci*. 15:1193-8.

Coss, M. C., Winterstein, D., Sowder, R. C., 2nd, and Simek, S. L. (1995): Molecular cloning, DNA sequence analysis, and biochemical characterization of a novel 65-kDa FK506-binding protein (FKBP65). *J Biol Chem*. 270:29336-41.

Crackower, M. A., Kolas, N. K., Noguchi, J., Sarao, R., Kikuchi, K., Kaneko, H., Kobayashi, E., Kawai, Y., Kozieradzki, I., Landers, R., Mo, R., Hui, C. C., Nieves, E., Cohen, P. E., Osborne, L. R., Wada, T., Kunieda, T., Moens, P. B., and Penninger, J. M. (2003): Essential role of Fkbp6 in male fertility and homologous chromosome pairing in meiosis. *Science*. 300:1291-5.

Craescu, C. T., Rouviere, N., Popescu, A., Cerpolini, E., Lebeau, M. C., Baulieu, E. E., and Mispelter, J. (1996): Three-dimensional structure of the immunophilin-like domain of FKBP59 in solution. *Biochemistry*. 35:11045-52.

D'Andrea, L. D., and Regan, L. (2003): TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci*. 28:655-62.

Das, A. K., Cohen, P. W., and Barford, D. (1998): The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J*. 17:1192-9.

Defranco, D. B., Madan, A. P., Tang, Y., Chandran, U. R., Xiao, N., and Yang, J. (1995): Nucleocytoplasmic shuttling of steroid receptors. *Vitam Horm*. 51:315-38.

Deivanayagam, C. C., Carson, M., Thotakura, A., Narayana, S. V., and Chodavarapu, R. S. (2000): Structure of FKBP12.6 in complex with rapamycin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 56:266-71.

Denison, M. S., and Nagy, S. R. (2003): Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 43:309-34.

Dittmar, K. D., and Pratt, W. B. (1997): Folding of the glucocorticoid receptor by the reconstituted Hsp90-based chaperone machinery. The initial hsp90.p60.hsp70-dependent step is sufficient for creating the steroid binding conformation. *J Biol Chem*. 272:13047-54.

Dix, D. J., Allen, J. W., Collins, B. W., Poorman-Allen, P., Mori, C., Blizard, D. R., Brown, P. R., Goulding, E. H., Strong, B. D., and Eddy, E. M. (1997): HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes. *Development*. 124:4595-603.

Djinovic-Carugo, K., Young, P., Gautel, M., and Saraste, M. (1999): Structure of the alpha-actinin rod: molecular basis for cross-linking of actin filaments. *Cell*. 98:537-46.

Dolinski, K., Muir, S., Cardenas, M., and Heitman, J. (1997): All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in Saccharomyces cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:13093-8.

Dull, A. B., Carlson, D. B., Petrulis, J. R., and Perdew, G. H. (2002): Characterization of the phosphorylation status of the hepatitis B virus X-associated protein 2. *Arch Biochem Biophys*. 406:209-21.

Edlich, F., Weiwad, M., Erdmann, F., Fanghänel, J., Jarczowski, F., Rahfeld, J. U., and Fischer, G. (2005): Bcl-2 regulator FKBP38 is activated by Ca2+/calmodulin. *EMBO J*. 24:2688-99.

Fanghänel, J., and Fischer, G. (2004): Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. *Front Biosci*. 9:3453-78.

Fischer, G. (1994): Peptidyl-Prolyl Cis/Trans Isomerases and Their Effectors. *Angewandte Chemie-International Edition in English*. 33:1415-1436.

Fischer, G., Bang, H., Berger, E., and Schellenberger, A. (1984a): Conformational specificity of chymotrypsin toward proline-containing substrates. *Biochim Biophys Acta*. 791:87-97.

Fischer, G., Bang, H., and Mech, C. (1984b): [Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides]. *Biomed Biochim Acta*. 43:1101-11.

Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., and Schmid, F. X. (1989): Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature*. 337:476-8.

Fletcher, D. A., and Mullins, R. D. (2010): Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*. 463:485-92.

Fontana, J., Fulton, D., Chen, Y., Fairchild, T. A., McCabe, T. J., Fujita, N., Tsuruo, T., and Sessa, W. C. (2002): Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ Res*. 90:866-73.

Fretz, H., Albers, M. W., Galat, A., Standaert, R. F., Lane, W. S., Burakoff, S. J., Bierer, B. E., and Schreiber, S. L. (1991): Rapamycin and Fk506 Binding-Proteins (Immunophilins). *Journal of the American Chemical Society*. 113:1409-1411.

Furutani, M., Ideno, A., Iida, T., and Maruyama, T. (2000): FK506 binding protein from a thermophilic archaeon, Methanococcus thermolithotrophicus, has chaperone-like activity in vitro. *Biochemistry*. 39:453-62.

Galat, A. (2003): Peptidylprolyl cis/trans isomerases (immunophilins): biological diversity--targets--functions. *Curr Top Med Chem*. 3:1315-47.

Galigniana, M. D., Harrell, J. M., Murphy, P. J., Chinkers, M., Radanyi, C., Renoir, J. M., Zhang, M., and Pratt, W. B. (2002): Binding of hsp90-associated immunophilins to cytoplasmic dynein: direct binding and in vivo evidence that the peptidylprolyl isomerase domain is a dynein interaction domain. *Biochemistry*. 41:13602-10.

Galigniana, M. D., Radanyi, C., Renoir, J. M., Housley, P. R., and Pratt, W. B. (2001): Evidence that the peptidylprolyl isomerase domain of the hsp90-binding immunophilin FKBP52 is involved in both dynein interaction and glucocorticoid receptor movement to the nucleus. *J Biol Chem*. 276:14884-9.

Gatto, G. J., Jr., Geisbrecht, B. V., Gould, S. J., and Berg, J. M. (2000): Peroxisomal targeting signal-1 recognition by the TPR domains of human PEX5. *Nat Struct Biol*. 7:1091-5.

Getz, E. B., Xiao, M., Chakrabarty, T., Cooke, R., and Selvin, P. R. (1999): A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry. *Anal Biochem*. 273:73-80.

Gill, S. C., and von Hippel, P. H. (1989): Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem*. 182:319-26.

Gopalakrishnan, R., Kozany, C., Wang, Y., Schneider, S., Hoogeland, B., Bracher, A., and Hausch, F. (2012): Exploration of Pipecolate Sulfonamides as Binders of the FK506-Binding Proteins 51 and 52. *J Med Chem*.

Gothel, S. F., and Marahiel, M. A. (1999): Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol Life Sci*. 55:423-36.

Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 36:59-74.

Groves, M. R., and Barford, D. (1999): Topological characteristics of helical repeat proteins. *Curr Opin Struct Biol*. 9:383-9.

Hahn, J. S. (2009): The Hsp90 chaperone machinery: from structure to drug development. *BMB Rep*. 42:623-30.

Han, J. C., and Han, G. Y. (1994): A procedure for quantitative determination of tris(2-carboxyethyl)phosphine, an odorless reducing agent more stable and effective than dithiothreitol. *Anal Biochem*. 220:5-10.

Hansen, L. K., Houchins, J. P., and O'Leary, J. J. (1991): Differential regulation of HSC70, HSP70, HSP90 alpha, and HSP90 beta mRNA expression by mitogen activation and heat shock in human lymphocytes. *Exp Cell Res*. 192:587-96.

Harding, M. W., Galat, A., Uehling, D. E., and Schreiber, S. L. (1989): A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature*. 341:758-60.

Harrison, R. K., and Stein, R. L. (1990): Substrate specificities of the peptidyl prolyl cis-trans isomerase activities of cyclophilin and FK-506 binding protein: evidence for the existence of a family of distinct enzymes. *Biochemistry*. 29:3813-6.

Hartwig, J. H., and Stossel, T. P. (1975): Isolation and properties of actin, myosin, and a new actinbinding protein in rabbit alveolar macrophages. *J Biol Chem*. 250:5696-705.

Hawle, P., Siepmann, M., Harst, A., Siderius, M., Reusch, H. P., and Obermann, W. M. (2006): The middle domain of Hsp90 acts as a discriminator between different types of client proteins. *Mol Cell Biol*. 26:8385-95.

Hayflick, L., and Moorhead, P. S. (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 25:585-621.

Hennessey, J. P., and Johnson, W. C. (1981): Information-Content in the Circular-Dichroism of Proteins. *Biochemistry*. 20:1085-1094.

Honda, K., Yamada, T., Endo, R., Ino, Y., Gotoh, M., Tsuda, H., Yamada, Y., Chiba, H., and Hirohashi, S. (1998): Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J Cell Biol*. 140:1383-93.

Hottenrott, S., Schumann, T., Pluckthun, A., Fischer, G., and Rahfeld, J. U. (1997): The Escherichia coli SlyD is a metal ion-regulated peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase. *J Biol Chem*. 272:15697-701.

Hunter, T. (2007): The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol Cell*. 28:730-8.

Hunter, T., and Poon, R. Y. (1997): Cdc37: a protein kinase chaperone? *Trends Cell Biol*. 7:157-61.

Huse, M., Chen, Y. G., Massague, J., and Kuriyan, J. (1999): Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12. *Cell*. 96:425-36.

Hutchison, K. A., Scherrer, L. C., Czar, M. J., Ning, Y., Sanchez, E. R., Leach, K. L., Deibel, M. R., Jr., and Pratt, W. B. (1993): FK506 binding to the 56-kilodalton immunophilin (Hsp56) in the glucocorticoid receptor heterocomplex has no effect on receptor folding or function. *Biochemistry*. 32:3953-7.

Ikura, M., Kay, L. E., and Bax, A. (1990): A Novel-Approach for Sequential Assignment of H-1, C-13, and N-15 Spectra of Larger Proteins - Heteronuclear Triple-Resonance 3-Dimensional Nmr-Spectroscopy - Application to Calmodulin. *Biochemistry*. 29:4659-4667.

Immormino, R. M., Kang, Y., Chiosis, G., and Gewirth, D. T. (2006): Structural and quantum chemical studies of 8-aryl-sulfanyl adenine class Hsp90 inhibitors. *J Med Chem*. 49:4953-60.

Itoh, H., and Tashima, Y. (1993): Domain structure of the 90-kDa stress protein: heparin- and antibody-binding domain. *Int J Biochem*. 25:157-61.

Jabs, A., Weiss, M. S., and Hilgenfeld, R. (1999): Non-proline cis peptide bonds in proteins. *J Mol Biol*. 286:291-304.

Jakob, U., Lilie, H., Meyer, I., and Buchner, J. (1995): Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock in vivo. *J Biol Chem*. 270:7288-94.

Janowski, B., Wollner, S., Schutkowski, M., and Fischer, G. (1997): A protease-free assay for peptidyl prolyl cis/trans isomerases using standard peptide substrates. *Anal Biochem*. 252:299-307.

Jarczowski, F., Fischer, G., and Edlich, F. (2008): FKBP36 forms complexes with clathrin and Hsp72 in spermatocytes. *Biochemistry*. 47:6946-52.

Jensen, O. N. (2006): Interpreting the protein language using proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7:391-403.

Johnson, L. N., and O'Reilly, M. (1996): Control by phosphorylation. *Curr Opin Struct Biol*. 6:762-9.

Johnson, W. C., Jr. (1988): Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*. 17:145-66.

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

Kay, J. E. (1996): Structure-function relationships in the FK506-binding protein (FKBP) family of peptidylprolyl cis-trans isomerases. *Biochem J*. 314 (Pt 2):361-85.

Kay, L. E., Ikura, M., Tschudin, R., and Bax, A. (1990): 3-Dimensional Triple-Resonance Nmr-Spectroscopy of Isotopically Enriched Proteins. *Journal of Magnetic Resonance*. 89:496-514.

Kazlauskas, A., Poellinger, L., and Pongratz, I. (2000): The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor. *J Biol Chem*. 275:41317-24.

Kazlauskas, A., Poellinger, L., and Pongratz, I. (2002): Two distinct regions of the immunophilin-like protein XAP2 regulate dioxin receptor function and interaction with hsp90. *J Biol Chem*. 277:11795-801.

Kazlauskas, A., Sundstrom, S., Poellinger, L., and Pongratz, I. (2001): The hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor. *Mol Cell Biol*. 21:2594-607.

Kiefhaber, T., Grunert, H. P., Hahn, U., and Schmid, F. X. (1990): Replacement of a cis proline simplifies the mechanism of ribonuclease T1 folding. *Biochemistry*. 29:6475-80.

Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H. H., and Buchner, J. (1991): Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology (N Y)*. 9:825-9.

King, R. W., Peters, J. M., Tugendreich, S., Rolfe, M., Hieter, P., and Kirschner, M. W. (1995): A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell*. 81:279-88.

Knappe, T. A., Eckert, B., Schaarschmidt, P., Scholz, C., and Schmid, F. X. (2007): Insertion of a chaperone domain converts FKBP12 into a powerful catalyst of protein folding. *J Mol Biol*. 368:1458-68.

Knowles, B. B., Howe, C. C., and Aden, D. P. (1980): Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*. 209:497-9.

Kofron, J. L., Kuzmic, P., Kishore, V., Colon-Bonilla, E., and Rich, D. H. (1991): Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl cis-trans isomerases by an improved spectrophotometric assay. *Biochemistry*. 30:6127-34.

Kosano, H., Stensgard, B., Charlesworth, M. C., McMahon, N., and Toft, D. (1998): The assembly of progesterone receptor-hsp90 complexes using purified proteins. *J Biol Chem*. 273:32973-9.

Krukenberg, K. A., Street, T. O., Lavery, L. A., and Agard, D. A. (2011): Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90. *Q Rev Biophys*. 44:229-55.

Kuzhandaivelu, N., Cong, Y. S., Inouye, C., Yang, W. M., and Seto, E. (1996): XAP2, a novel hepatitis B virus X-associated protein that inhibits X transactivation. *Nucleic Acids Res*. 24:4741-50.

Kyhse-Andersen, J. (1984): Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*. 10:203-9.

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-5.

Laenger, A., Lang-Rollin, I., Kozany, C., Zschocke, J., Zimmermann, N., Ruegg, J., Holsboer, F., Hausch, F., and Rein, T. (2009): XAP2 inhibits glucocorticoid receptor activity in mammalian cells. *FEBS Lett*. 583:1493-8.

Lahvis, G. P., Lindell, S. L., Thomas, R. S., McCuskey, R. S., Murphy, C., Glover, E., Bentz, M., Southard, J., and Bradfield, C. A. (2000): Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:10442-7.

Lai, B. T., Chin, N. W., Stanek, A. E., Keh, W., and Lanks, K. W. (1984): Quantitation and intracellular localization of the 85K heat shock protein by using monoclonal and polyclonal antibodies. *Mol Cell Biol*. 4:2802-10.

Lamb, J. R., Tugendreich, S., and Hieter, P. (1995): Tetratrico peptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem Sci*. 20:257-9.

Leontiou, C. A., Gueorguiev, M., van der Spuy, J., Quinton, R., Lolli, F., Hassan, S., Chahal, H. S., Igreja, S. C., Jordan, S., Rowe, J., Stolbrink, M., Christian, H. C., Wray, J., Bishop-Bailey, D., Berney, D. M., Wass, J. A., Popovic, V., Ribeiro-Oliveira, A., Jr., Gadelha, M. R., Monson, J. P., Akker, S. A., Davis, J. R., Clayton, R. N., Yoshimoto, K., Iwata, T., Matsuno, A., Eguchi, K., Musat, M., Flanagan, D., Peters, G., Bolger, G. B., Chapple, J. P., Frohman, L. A., Grossman, A. B., and Korbonits, M. (2008): The role of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in familial and sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 93:2390-401.

Liang, J., Hung, D. T., Schreiber, S. L., and Clardy, J. (1996): Structure of the human 25 kDa FK506 binding protein complexed with rapamycin. *Journal of the American Chemical Society*. 118:1231-1232.

Lin, B. C., Sullivan, R., Lee, Y., Moran, S., Glover, E., and Bradfield, C. A. (2007): Deletion of the aryl hydrocarbon receptor-associated protein 9 leads to cardiac malformation and embryonic lethality. *J Biol Chem*. 282:35924-32.

Linnert, M., Haupt, K., Lin, Y. J., Kissing, S., Paschke, A. K., Fischer, G., Weiwad, M., and Lücke, C. (2012a): NMR assignments of the FKBP-type PPIase domain of the human aryl-hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP). *Biomol NMR Assign*.

Linnert[#], M., Theuerkorn[#], M., Wetzel[#], S., Pösel, S., Schulze, B., Kissing, S., Thiele, A., Fischer, G., Weiwad, M. (2012b): Analysis of FK506 binding capacities of human FKBP family. *In Vorbereitung*

Liu, J., Chen, C. M., and Walsh, C. T. (1991a): Human and Escherichia coli cyclophilins: sensitivity to inhibition by the immunosuppressant cyclosporin A correlates with a specific tryptophan residue. *Biochemistry*. 30:2306-10.

Liu, J., Farmer, J. D., Jr., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., and Schreiber, S. L. (1991b): Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*. 66:807-15.

Low, C., Neumann, P., Tidow, H., Weininger, U., Haupt, C., Friedrich-Epler, B., Scholz, C., Stubbs, M. T., and Balbach, J. (2010): Crystal structure determination and functional characterization of the metallochaperone SlyD from Thermus thermophilus. *J Mol Biol*. 398:375-90.

Luan, S. (1998): Immunophilins in animals and higher plants. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 39:217-223.

Lücke, C., and Weiwad, M. (2011): Insights into immunophilin structure and function. *Curr Med Chem*. 18:5333-54.

Ma, Q., and Whitlock, J. P., Jr. (1997): A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Biol Chem*. 272:8878-84.

Maestre-Martinez, M., Edlich, F., Jarczowski, F., Weiwad, M., Fischer, G., and Lücke, C. (2006): Solution structure of the FK506-binding domain of human FKBP38. *J Biomol NMR*. 34:197-202.

Maestre-Martinez, M., Haupt, K., Edlich, F., Neumann, P., Parthier, C., Stubbs, M. T., Fischer, G., and Lücke, C. (2011): A charge-sensitive loop in the FKBP38 catalytic domain modulates Bcl-2 binding. *J Mol Recognit*. 24:23-34.

Manns, A. (2012): Charakterisierung der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Domäne des humanen FK506-bindenden Proteins 37.7. *Diplomarbeit*

Maruyama, T., Suzuki, R., and Furutani, M. (2004): Archaeal peptidyl prolyl cis-trans isomerases (PPIases) update 2004. *Front Biosci*. 9:1680-720.

Meyer, B. K., and Perdew, G. H. (1999): Characterization of the AhR-hsp90-XAP2 core complex and the role of the immunophilin-related protein XAP2 in AhR stabilization. *Biochemistry*. 38:8907-17.

Meyer, B. K., Petrulis, J. R., and Perdew, G. H. (2000): Aryl hydrocarbon (Ah) receptor levels are selectively modulated by hsp90-associated immunophilin homolog XAP2. *Cell Stress Chaperones*. 5:243-54.

Meyer, B. K., Pray-Grant, M. G., Vanden Heuvel, J. P., and Perdew, G. H. (1998): Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol Cell Biol*. 18:978-88.

Meyer, P., Prodromou, C., Hu, B., Vaughan, C., Roe, S. M., Panaretou, B., Piper, P. W., and Pearl, L. H. (2003): Structural and functional analysis of the middle segment of hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions. *Mol Cell*. 11:647-58.

Meyer, P., Prodromou, C., Liao, C., Hu, B., Roe, S. M., Vaughan, C. K., Vlasic, I., Panaretou, B., Piper, P. W., and Pearl, L. H. (2004): Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. *EMBO J*. 23:1402-10.

Michnick, S. W., Rosen, M. K., Wandless, T. J., Karplus, M., and Schreiber, S. L. (1991): Solution structure of FKBP, a rotamase enzyme and receptor for FK506 and rapamycin. *Science*. 252:836-9.

Miki, H., Okada, Y., and Hirokawa, N. (2005): Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends Cell Biol*. 15:467-76.

Minami, Y., Kimura, Y., Kawasaki, H., Suzuki, K., and Yahara, I. (1994): The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function in vivo. *Mol Cell Biol*. 14:1459-64.

Mucke, M., and Schmid, F. X. (1994): Folding mechanism of ribonuclease T1 in the absence of the disulfide bonds. *Biochemistry*. 33:14608-19.

Mulder, F. A., Schipper, D., Bott, R., and Boelens, R. (1999): Altered flexibility in the substrate-binding site of related native and engineered high-alkaline Bacillus subtilisins. *J Mol Biol*. 292:111-23.

Mullis, K. B., and Faloona, F. A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 155:335-50.

Nair, S. C., Toran, E. J., Rimerman, R. A., Hjermstad, S., Smithgall, T. E., and Smith, D. F. (1996): A pathway of multi-chaperone interactions common to diverse regulatory proteins: estrogen receptor, Fes tyrosine kinase, heat shock transcription factor Hsf1, and the aryl hydrocarbon receptor. *Cell Stress Chaperones*. 1:237-50.

Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y., Ota, M., Takagi, T., and Yokoyama, K. (1995): Mechanism of dimer formation of the 90-kDa heat-shock protein. *Eur J Biochem*. 233:1-8.

Nemoto, T., Sato, N., Iwanari, H., Yamashita, H., and Takagi, T. (1997): Domain structures and immunogenic regions of the 90-kDa heat-shock protein (HSP90). Probing with a library of anti-HSP90 monoclonal antibodies and limited proteolysis. *J Biol Chem*. 272:26179-87.

Obermann, W. M., Sondermann, H., Russo, A. A., Pavletich, N. P., and Hartl, F. U. (1998): In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J Cell Biol*. 143:901-10.

Odunuga, O. O., Hornby, J. A., Bies, C., Zimmermann, R., Pugh, D. J., and Blatch, G. L. (2003): Tetratricopeptide repeat motif-mediated Hsc70-mSTI1 interaction. Molecular characterization of the critical contacts for successful binding and specificity. *J Biol Chem*. 278:6896-904.

Owens-Grillo, J. K., Czar, M. J., Hutchison, K. A., Hoffmann, K., Perdew, G. H., and Pratt, W. B. (1996): A model of protein targeting mediated by immunophilins and other proteins that bind to hsp90 via tetratricopeptide repeat domains. *J Biol Chem*. 271:13468-75.

Panaretou, B., Prodromou, C., Roe, S. M., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W., and Pearl, L. H. (1998): ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *EMBO J*. 17:4829-36.

Park, S. M., Jung, H. Y., Chung, K. C., Rhim, H., Park, J. H., and Kim, J. (2002): Stress-induced aggregation profiles of GST-alpha-synuclein fusion proteins: role of the C-terminal acidic tail of alpha-synuclein in protein thermosolubility and stability. *Biochemistry*. 41:4137-46.

Park, S. T., Aldape, R. A., Futer, O., DeCenzo, M. T., and Livingston, D. J. (1992): PPIase catalysis by human FK506-binding protein proceeds through a conformational twist mechanism. *J Biol Chem*. 267:3316-24.

Paschal, B. M., and Vallee, R. B. (1987): Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C. *Nature*. 330:181-3.

Petrulis, J. R., Kusnadi, A., Ramadoss, P., Hollingshead, B., and Perdew, G. H. (2003): The hsp90 Co-chaperone XAP2 alters importin beta recognition of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity. *J Biol Chem*. 278:2677-85.

Pirkl, F., and Buchner, J. (2001): Functional analysis of the Hsp90-associated human peptidyl prolyl cis/trans isomerases FKBP51, FKBP52 and Cyp40. *J Mol Biol*. 308:795-806.

Pirkl, F., Fischer, E., Modrow, S., and Buchner, J. (2001): Localization of the chaperone domain of FKBP52. *J Biol Chem*. 276:37034-41.

Pratt, W. B. (1997): The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 37:297-326.

Pratt, W. B., Galigniana, M. D., Harrell, J. M., and DeFranco, D. B. (2004): Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. *Cell Signal*. 16:857-72.

Pratt, W. B., and Toft, D. O. (1997): Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev*. 18:306-60.

Pratt, W. B., and Toft, D. O. (2003): Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)*. 228:111-33.

Prodromou, C., Panaretou, B., Chohan, S., Siligardi, G., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Roe, S. M., Piper, P. W., and Pearl, L. H. (2000): The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains. *EMBO J*. 19:4383-92.

Prokipcak, R. D., Faber, L. E., and Okey, A. B. (1989): Characterization of the Ah receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: use of chemical crosslinking and a monoclonal antibody directed against a 59-kDa protein associated with steroid receptors. *Arch Biochem Biophys*. 274:648-58.

Rahfeld, J. U., Schierhorn, A., Mann, K., and Fischer, G. (1994): A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from Escherichia coli. *FEBS Lett*. 343:65-9.

Ranganathan, R., Lu, K. P., Hunter, T., and Noel, J. P. (1997): Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent. *Cell*. 89:875-86.

Ratajczak, T., and Carrello, A. (1996): Cyclophilin 40 (CyP-40), mapping of its hsp90 binding domain and evidence that FKBP52 competes with CyP-40 for hsp90 binding. *J Biol Chem*. 271:2961-5.

Renoir, J. M., Le Bihan, S., Mercier-Bodard, C., Gold, A., Arjomandi, M., Radanyi, C., and Baulieu, E. E. (1994): Effects of immunosuppressants FK506 and rapamycin on the heterooligomeric form of the progesterone receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 48:101-10.

Richter, K., and Buchner, J. (2001): Hsp90: chaperoning signal transduction. *J Cell Physiol*. 188:281-90.

Richter, K., Moser, S., Hagn, F., Friedrich, R., Hainzl, O., Heller, M., Schlee, S., Kessler, H., Reinstein, J., and Buchner, J. (2006): Intrinsic inhibition of the Hsp90 ATPase activity. *J Biol Chem*. 281:11301-11.

Ripley, B. J., Stephanou, A., Isenberg, D. A., and Latchman, D. S. (1999): Interleukin-10 activates heat-shock protein 90beta gene expression. *Immunology*. 97:226-31.

Roe, S. M., Prodromou, C., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W., and Pearl, L. H. (1999): Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J Med Chem*. 42:260-6.

Russell, L. C., Whitt, S. R., Chen, M. S., and Chinkers, M. (1999): Identification of conserved residues required for the binding of a tetratricopeptide repeat domain to heat shock protein 90. *J Biol Chem*. 274:20060-3.

Scheibel, T., Weikl, T., and Buchner, J. (1998): Two chaperone sites in Hsp90 differing in substrate specificity and ATP dependence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:1495-9.

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

Scherer, W. F., Syverton, J. T., and Gey, G. O. (1953): Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med*. 97:695-710.

Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F. U., and Moarefi, I. (2000): Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell*. 101:199-210.

Schiene-Fischer, C., and Yu, C. (2001): Receptor accessory folding helper enzymes: the functional role of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. *FEBS Lett*. 495:1-6.

Schmid, F. X. (1993): Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 22:123-42.

Schmid, F. X., Mayr, L. M., Mucke, M., and Schonbrunner, E. R. (1993): Prolyl isomerases: role in protein folding. *Adv Protein Chem*. 44:25-66.

Schneider, U., Schwenk, H. U., and Bornkamm, G. (1977): Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*. 19:621-6.

Scholz, C., Eckert, B., Hagn, F., Schaarschmidt, P., Balbach, J., and Schmid, F. X. (2006): SlyD proteins from different species exhibit high prolyl isomerase and chaperone activities. *Biochemistry*. 45:20-33.

Scholz, C., Rahfeld, J., Fischer, G., and Schmid, F. X. (1997): Catalysis of protein folding by parvulin. *J Mol Biol*. 273:752-62.

Schreiber, S. L. (1991): Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science*. 251:283-7.

Shiau, A. K., Harris, S. F., Southworth, D. R., and Agard, D. A. (2006): Structural Analysis of E. coli hsp90 reveals dramatic nucleotide-dependent conformational rearrangements. *Cell*. 127:329-40.

Shou, W., Aghdasi, B., Armstrong, D. L., Guo, Q., Bao, S., Charng, M. J., Mathews, L. M., Schneider, M. D., Hamilton, S. L., and Matzuk, M. M. (1998): Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. *Nature*. 391:489-92.

Sikorski, R. S., Boguski, M. S., Goebl, M., and Hieter, P. (1990): A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. *Cell*. 60:307-17.

Silverstein, A. M., Galigniana, M. D., Kanelakis, K. C., Radanyi, C., Renoir, J. M., and Pratt, W. B. (1999): Different regions of the immunophilin FKBP52 determine its association with the glucocorticoid receptor, hsp90, and cytoplasmic dynein. *J Biol Chem*. 274:36980-6.

Silverstein, A. M., Grammatikakis, N., Cochran, B. H., Chinkers, M., and Pratt, W. B. (1998): p50(cdc37) binds directly to the catalytic domain of Raf as well as to a site on hsp90 that is topologically adjacent to the tetratricopeptide repeat binding site. *J Biol Chem*. 273:20090-5.

Sinars, C. R., Cheung-Flynn, J., Rimerman, R. A., Scammell, J. G., Smith, D. F., and Clardy, J. (2003): Structure of the large FK506-binding protein FKBP51, an Hsp90-binding protein and a component of steroid receptor complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:868-73.

Smith, D. F. (1993): Dynamics of heat shock protein 90-progesterone receptor binding and the disactivation loop model for steroid receptor complexes. *Mol Endocrinol*. 7:1418-29.

Smith, D. F. (2004): Tetratricopeptide repeat cochaperones in steroid receptor complexes. *Cell Stress Chaperones*. 9:109-21.

Smith, D. F., Stensgard, B. A., Welch, W. J., and Toft, D. O. (1992): Assembly of progesterone receptor with heat shock proteins and receptor activation are ATP mediated events. *J Biol Chem*. 267:1350-6.

Smith, D. F., Sullivan, W. P., Marion, T. N., Zaitsu, K., Madden, B., McCormick, D. J., and Toft, D. O. (1993): Identification of a 60-kilodalton stress-related protein, p60, which interacts with hsp90 and hsp70. *Mol Cell Biol*. 13:869-76.

Soares, B. S., Eguchi, K., and Frohman, L. A. (2005): Tumor deletion mapping on chromosome 11q13 in eight families with isolated familial somatotropinoma and in 15 sporadic somatotropinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 90:6580-7.

Sohocki, M. M., Sullivan, L. S., Tirpak, D. L., and Daiger, S. P. (2001): Comparative analysis of aryl-hydrocarbon receptor interacting protein-like 1 (Aipl1), a gene associated with inherited retinal disease in humans. *Mamm Genome*. 12:566-8.

Soule, H.D., Vazguez, J., Long, A., Albert, S., and Brennan, M. (1973): A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 51:1409-1416.

Stebbins, C. E., Russo, A. A., Schneider, C., Rosen, N., Hartl, F. U., and Pavletich, N. P. (1997): Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell*. 89:239-50.

Stepanova, L., Leng, X., Parker, S. B., and Harper, J. W. (1996): Mammalian p50Cdc37 is a protein kinase-targeting subunit of Hsp90 that binds and stabilizes Cdk4. *Genes Dev*. 10:1491-502.

Stoller, G., Rucknagel, K. P., Nierhaus, K. H., Schmid, F. X., Fischer, G., and Rahfeld, J. U. (1995): A ribosome-associated peptidyl-prolyl cis/trans isomerase identified as the trigger factor. *EMBO J*. 14:4939-48.

Stossel, T. P., Condeelis, J., Cooley, L., Hartwig, J. H., Noegel, A., Schleicher, M., and Shapiro, S. S. (2001): Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:138-45.

Sumanasekera, W. K., Tien, E. S., Turpey, R., Vanden Heuvel, J. P., and Perdew, G. H. (2003): Evidence that peroxisome proliferator-activated receptor alpha is complexed with the 90-kDa heat shock protein and the hepatitis virus B X-associated protein 2. *J Biol Chem*. 278:4467-73.

Suzuki, R., Nagata, K., Yumoto, F., Kawakami, M., Nemoto, N., Furutani, M., Adachi, K., Maruyama, T., and Tanokura, M. (2003): Three-dimensional solution structure of an archaeal FKBP with a dual function of peptidyl prolyl cis-trans isomerase and chaperone-like activities. *J Mol Biol*. 328:1149-60.

Szep, S., Park, S., Boder, E. T., Van Duyne, G. D., and Saven, J. G. (2009): Structural coupling between FKBP12 and buried water. *Proteins*. 74:603-11.

Tanaka, H., Kuroda, A., Marusawa, H., Hatanaka, H., Kino, T., Goto, T., Hashimoto, M., and Taga, T. (1987): Structure of Fk506 - a Novel Immunosuppressant Isolated from Streptomyces. *Journal of the American Chemical Society*. 109:5031-5033.

Thiele, A. (2006): Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen des endoplasmatischen Retikulums – Klonierung und Charakterisierung der humanen FKBP24 und FKBP65. *Diplomarbeit*

Thiele, A. (2010): Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen und posttranslationalen Modifikationen mittels Peptidmikroarrays am Beispiel der humanen Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen. *Dissertation*

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76:4350-4.

Tranguch, S., Cheung-Flynn, J., Daikoku, T., Prapapanich, V., Cox, M. B., Xie, H., Wang, H., Das, S. K., Smith, D. F., and Dey, S. K. (2005): Cochaperone immunophilin FKBP52 is critical to uterine receptivity for embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:14326-31.

Trivellin, G., and Korbonits, M. (2011): AIP and its interacting partners. *J Endocrinol*. 210:137-55.

Vale, R. D. (2003): The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*. 112:467-80.

Van Duyne, G. D., Standaert, R. F., Karplus, P. A., Schreiber, S. L., and Clardy, J. (1993): Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *J Mol Biol*. 229:105-24.

Vanduyne, G. D., Standaert, R. F., Karplus, P. A., Schreiber, S. L., and Clardy, J. (1991): Atomic-Structure of Fkbp-Fk506, an Immunophilin-Immunosuppressant Complex. *Science*. 252:839-842.

Verhey, K. J., Kaul, N., and Soppina, V. (2011): Kinesin assembly and movement in cells. *Annu Rev Biophys*. 40:267-88.

Vierimaa, O., Georgitsi, M., Lehtonen, R., Vahteristo, P., Kokko, A., Raitila, A., Tuppurainen, K., Ebeling, T. M., Salmela, P. I., Paschke, R., Gundogdu, S., De Menis, E., Makinen, M. J., Launonen, V., Karhu, A., and Aaltonen, L. A. (2006): Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. *Science*. 312:1228-30.

von Kleist, S., Chany, E., Burtin, P., King, M., and Fogh, J. (1975): Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor. *J Natl Cancer Inst*. 55:555-60.

Voss, A. K., Thomas, T., and Gruss, P. (2000): Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. *Development*. 127:1-11.

Wandinger, S. K., Richter, K., and Buchner, J. (2008): The Hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem*. 283:18473-7.

Ward, B. K., Allan, R. K., Mok, D., Temple, S. E., Taylor, P., Dornan, J., Mark, P. J., Shaw, D. J., Kumar, P., Walkinshaw, M. D., and Ratajczak, T. (2002): A structure-based mutational analysis of cyclophilin 40 identifies key residues in the core tetratricopeptide repeat domain that mediate binding to Hsp90. *J Biol Chem*. 277:40799-809.

Wayne, N., and Bolon, D. N. (2007): Dimerization of Hsp90 is required for in vivo function. Design and analysis of monomers and dimers. *J Biol Chem*. 282:35386-95.

Weininger, U., Haupt, C., Schweimer, K., Graubner, W., Kovermann, M., Bruser, T., Scholz, C., Schaarschmidt, P., Zoldak, G., Schmid, F. X., and Balbach, J. (2009): NMR solution structure of SlyD from Escherichia coli: spatial separation of prolyl isomerase and chaperone function. *J Mol Biol*. 387:295-305.

Weiss, M. S., Jabs, A., and Hilgenfeld, R. (1998): Peptide bonds revisited. *Nat Struct Biol*. 5:676.

Weiwad, M., Edlich, F., Kilka, S., Erdmann, F., Jarczowski, F., Dorn, M., Moutty, M. C., and Fischer, G. (2006): Comparative analysis of calcineurin inhibition by complexes of immunosuppressive drugs with human FK506 binding proteins. *Biochemistry*. 45:15776-84.

Welch, W. J., and Feramisco, J. R. (1982): Purification of the major mammalian heat shock proteins. *J Biol Chem*. 257:14949-59.

Wetzel, S. (2011): Untersuchung der FK506- und Cycloheximid-Bindung, sowie des Expressions- und Interaktionsmusters von FK506-bindenden Proteinen. *Diplomarbeit*

Wilson, K. P., Yamashita, M. M., Sintchak, M. D., Rotstein, S. H., Murcko, M. A., Boger, J., Thomson, J. A., Fitzgibbon, M. J., Black, J. R., and Navia, M. A. (1995): Comparative X-ray structures of the major binding protein for the immunosuppressant FK506 (tacrolimus) in unliganded form and in complex with FK506 and rapamycin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 51:511-21.

Wishart, D. S., and Sykes, B. D. (1994): The 13C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using 13C chemical-shift data. *J Biomol NMR*. 4:171-80.

Wu, B., Li, P., Liu, Y., Lou, Z., Ding, Y., Shu, C., Ye, S., Bartlam, M., Shen, B., and Rao, Z. (2004): 3D structure of human FK506-binding protein 52: implications for the assembly of the glucocorticoid receptor/Hsp90/immunophilin heterocomplex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:8348-53.

Yamashiro, S., Yamakita, Y., Ono, S., and Matsumura, F. (1998): Fascin, an actin-bundling protein, induces membrane protrusions and increases cell motility of epithelial cells. *Mol Biol Cell*. 9:993-1006.

Yano, M., Terada, K., and Mori, M. (2003): AIP is a mitochondrial import mediator that binds to both import receptor Tom20 and preproteins. *J Cell Biol*. 163:45-56.

Yem, A. W., Tomasselli, A. G., Heinrikson, R. L., Zurcherneely, H., Ruff, V. A., Johnson, R. A., and Deibel, M. R. (1992): The Hsp56 Component of Steroid-Receptor Complexes Binds to Immobilized Fk506 and Shows Homology to Fkbp-12 and Fkbp-13. *Journal of Biological Chemistry*. 267:2868-2871.

Young, J. C., Schneider, C., and Hartl, F. U. (1997): In vitro evidence that hsp90 contains two independent chaperone sites. *FEBS Lett*. 418:139-43.

Zeng, B., MacDonald, J. R., Bann, J. G., Beck, K., Gambee, J. E., Boswell, B. A., and Bachinger, H. P. (1998): Chicken FK506-binding protein, FKBP65, a member of the FKBP family of peptidylprolyl cis-trans isomerases, is only partially inhibited by FK506. *Biochem J*. 330 (Pt 1):109-14.

Zhang, S. L., Yu, J., Cheng, X. K., Ding, L., Heng, F. Y., Wu, N. H., and Shen, Y. F. (1999): Regulation of human hsp90alpha gene expression. *FEBS Lett*. 444:130-5.

Zhang, Y., Daum, S., Wildemann, D., Zhou, X. Z., Verdecia, M. A., Bowman, M. E., Lucke, C., Hunter, T., Lu, K. P., Fischer, G., and Noel, J. P. (2007): Structural basis for high-affinity peptide inhibition of human Pin1. *ACS Chem Biol*. 2:320-8.

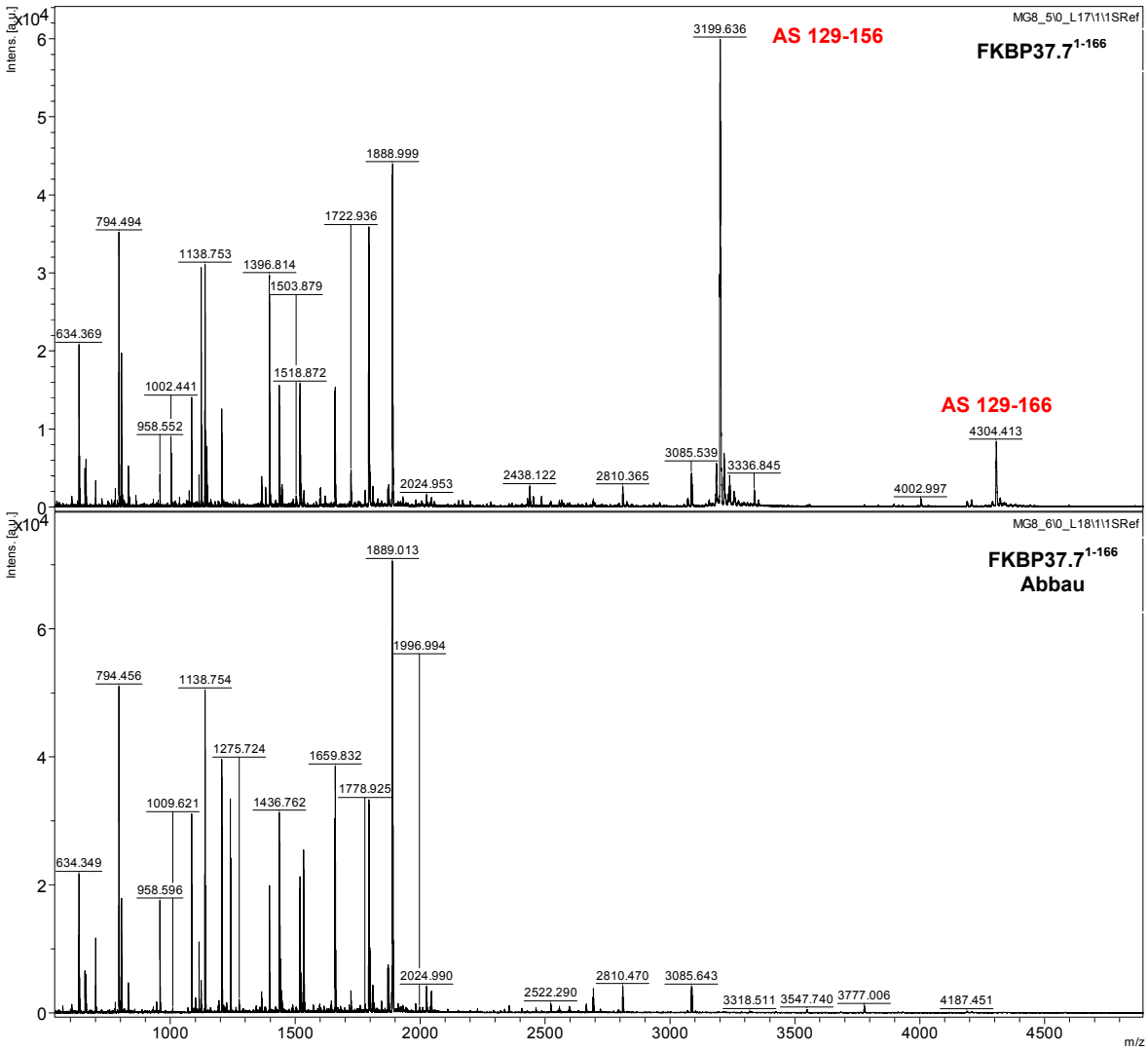
Zoldak, G., Aumuller, T., Lücke, C., Hritz, J., Oostenbrink, C., Fischer, G., and Schmid, F. X. (2009): A library of fluorescent peptides for exploring the substrate specificities of prolyl isomerases. *Biochemistry*. 48:10423-36.

[#] gleichberechtigte Erstautorenschaft

7. Anhang

Anhang 1: Massenspektrometrische Analysen der hergestellten Proteine. Die Analysen erfolgten mittels MALDI-MS. Die identifizierten Peptide sind in der Sequenz hervorgehoben und unterstrichen.

FKBP37.7$^{1-166}$ und FKBP37.7$^{1-166}$ Abbau



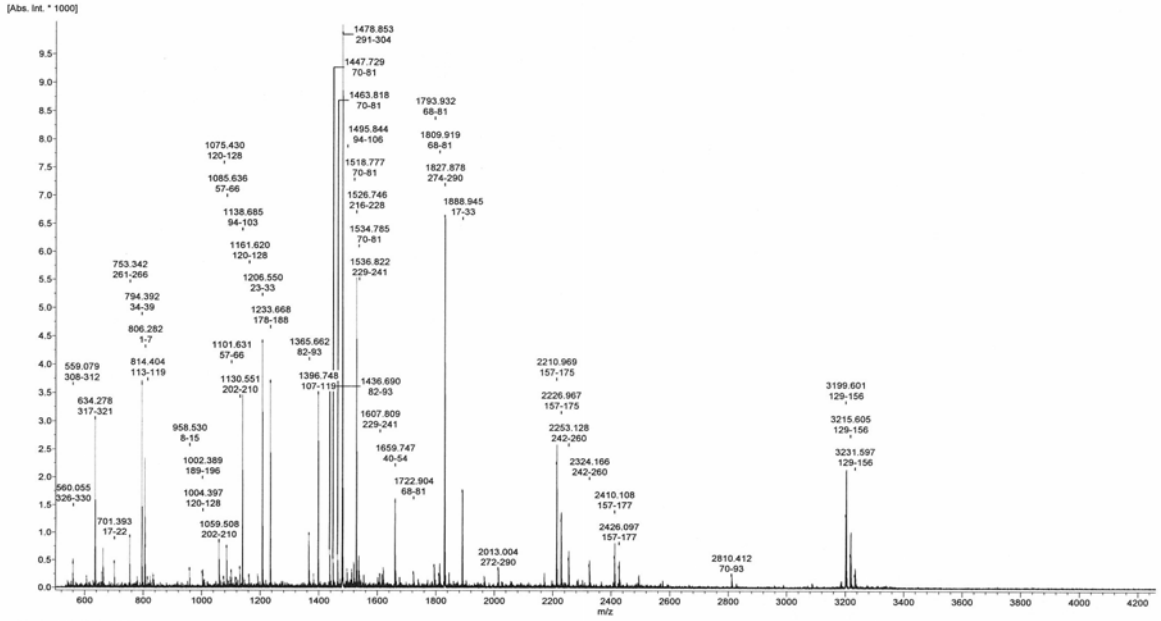
FKBP37.7$^{1-166}$ Abbau

```
         10         20         30         40         50         60
MADIIARLRE DGIQKRVIQE GRGELPDFQD GTKATFHYRT LHSDDEGTVL DDSRARGKPM

         70         80         90        100        110        120
ELIIGKKFKL PVWETIVCTM REGEIAQFLC DIKHVVLYPL VAKSLRNIAV GKDPLEGQRH

        130        140        150        160
CCGVAQMREH SSLGHADLDA LQQNPQPLIF HMEMLKVESP GTYQQD
```

FKBP37.7$^{1-330}$

FileName: D:\Data\1205\LIN\MG12_1\0_A13\1\1SRef\pdata\1\1r

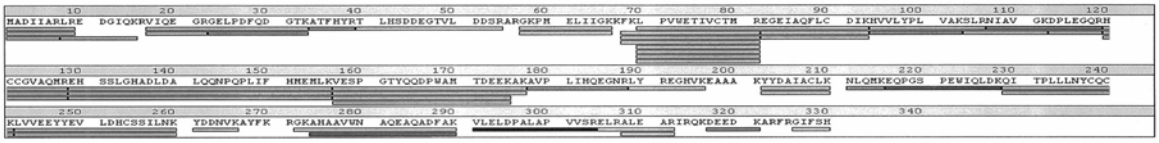
Sequence Name:		Parentmass:		Mass Error:		MH+ (mono):	1.008
MH+ (avg):	1.008	Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	1.000	Number of Peaks:	76
Above Threshold:		Assigned Peaks:		Not assigned Peaks:			



FileName: D:\Data\1205\LIN\MG12_1\0_A13\1\1SRef\pdata\1\1r

Sequence data:

Intensity Coverage:	90.6 % (65243 cnts)	Sequence Coverage MS:	93.3%
Sequence Coverage MS/MS:	0.0%	pI (isoelectric point):	6.1



Display Parameter:

MH+ (mono):	1.008	MH+ (avg):	1.008	Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	1.000
Number of Peaks:	76						

Peaklist:

Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity
1	559.079	224.882	2	560.055	404.197	3	606.005	176.964	4	634.278	2952.145	5	658.366	240.925
6	662.297	686.143	7	664.288	118.221	8	701.393	414.118	9	753.342	863.845	10	779.389	166.414
11	794.392	3487.312	12	804.259	2256.371	13	806.282	691.945	14	814.404	138.851	15	823.500	188.167
16	832.297	266.810	17	835.394	200.641	18	958.530	297.473	19	1002.389	244.053	20	1004.397	191.445
21	1059.508	834.767	22	1075.430	145.963	23	1085.636	682.205	24	1097.535	164.849	25	1101.631	259.093
26	1114.615	187.472	27	1118.536	148.126	28	1130.551	315.066	29	1138.685	3413.311	30	1161.620	181.177
31	1191.532	223.089	32	1206.550	4199.219	33	1233.668	3525.052	34	1365.662	907.002	35	1381.718	203.673
36	1396.748	3379.982	37	1436.690	659.528	38	1447.729	502.841	39	1463.818	578.192	40	1478.853	10162.001
41	1495.844	299.194	42	1511.718	289.210	43	1518.777	453.222	44	1526.746	5405.797	45	1534.785	459.628
46	1536.822	319.654	47	1552.889	190.074	48	1607.809	193.684	49	1615.850	205.617	50	1619.774	320.931
51	1659.747	1476.845	52	1675.778	153.906	53	1722.904	230.319	54	1793.932	352.230	55	1809.919	204.475
56	1812.852	372.204	57	1827.878	6336.218	58	1843.887	200.056	59	1888.945	1650.818	60	1964.886	166.671
61	2013.004	312.184	62	2170.076	164.450	63	2210.969	2135.352	64	2226.967	1146.704	65	2253.128	472.962
66	2285.030	96.185	67	2324.166	358.996	68	2410.108	505.556	69	2426.097	329.420	70	2493.229	141.803
71	2810.412	126.265	72	3085.564	53.514	73	3184.563	58.006	74	3199.601	1240.897	75	3215.605	542.304
76	3231.597	193.923												

Matched Sequences:

Unmatched

MADIIARLREDGIQKRVIQEGRGELPDFQDGTKATFHYRTLHSDDEGTVLDDSRARGKPMELIIGKKFKLPVWETIVCTMREGEIAQFLCDIKHVVLYPLVAKSLRNIAVGKDPLEGQRHCCGVAQMREHSSLGHADLDALQQNPQPLIFHMEMLKVESPGTYQQDPWAMTDEEKAKAVPLIHQEGNRLYREGHVKEA
AAKYYDAIACLKNLQMKEQPGSPEWIQLDKQITPLLLNYCQCKLVVEEYYEVLDHCSSILNKYDDNVKAYFKRGKAHAAVWNAQEAQADFAKVLELDPALAPVVSRELRALEARIRQKDEEDKARFRGIFSH

Digest Results

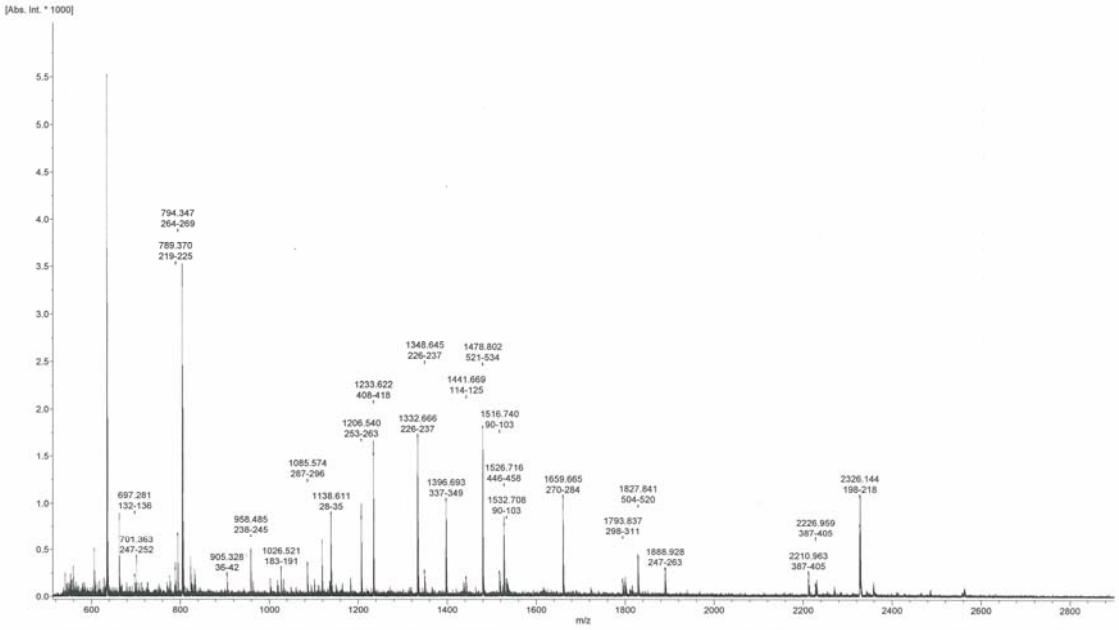
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. Dev.(Da) Dev.(ppm) Range P Sequence

peak 76 3231.597 3231.556 193.923 0.040 12.472 129 - 156 0 EHSSLGHADLDALQQNPQPLIFHMEMLK 24: Oxidation (M) 26: Oxidation (M)
peak 75 3215.605 3215.561 542.304 0.043 13.493 129 - 156 0 EHSSLGHADLDALQQNPQPLIFHMEMLK 26: Oxidation (M)
peak 74 3199.601 3199.566 1240.897 0.035 10.798 129 - 156 0 EHSSLGHADLDALQQNPQPLIFHMEMLK
peak 71 2810.412 2810.393 126.265 0.018 6.574 70 - 93 1 LPVWETIVCTMREGEIAQFLCDIK 11: Oxidation (M)
peak 69 2426.097 2426.082 329.420 0.015 6.311 157 - 177 1 VESPGTYQQDPWAMTDEEKAK 14: Oxidation (M)
peak 68 2410.108 2410.087 505.556 0.021 8.796 157 - 177 1 VESPGTYQQDPWAMTDEEKAK
peak 67 2324.166 2324.148 358.996 0.018 7.711 242 - 260 0 LVVEEYYEVLDHCSSILNK 13: Propionamide (C)
peak 65 2253.128 2253.111 472.962 0.017 7.496 242 - 260 0 LVVEEYYEVLDHCSSILNK
peak 64 2226.967 2226.950 1146.704 0.017 7.419 157 - 175 0 VESPGTYQQDPWAMTDEEK 14: Oxidation (M)
peak 63 2210.969 2210.955 2135.352 0.014 6.305 157 - 175 0 VESPGTYQQDPWAMTDEEK
peak 61 2013.004 2012.994 312.184 0.010 4.922 272 - 290 1 GKAHAAVWNAQEAQADFAK
peak 59 1888.945 1888.940 1650.818 0.004 2.200 17 - 33 1 VIQEGRGELPDFQDGTK
peak 57 1827.878 1827.877 6336.218 0.001 0.285 274 - 290 0 AHAAVWNAQEAQADFAK
peak 55 1809.919 1809.939 204.475 -0.021 -11.378 68 - 81 1 FKLPVWETIVCTMR 11: Propionamide (C) 13: Oxidation (M)
peak 54 1793.932 1793.944 352.230 -0.012 -6.781 68 - 81 1 FKLPVWETIVCTMR 11: Propionamide (C)
peak 53 1722.904 1722.907 230.319 -0.003 -1.887 68 - 81 1 FKLPVWETIVCTMR
peak 51 1659.747 1659.746 1476.845 0.001 0.507 40 - 54 0 THSDDEGTVLDDGR
peak 48 1607.809 1607.828 193.684 -0.020 -12.423 229 - 241 0 QITPLLLNYCQCK 12: Propionamide (C)
peak 46 1536.822 1536.791 319.654 0.030 19.790 229 - 241 0 QITPLLLNYCQCK
peak 45 1534.785 1534.776 459.828 0.008 5.501 70 - 81 0 LPVWETIVCTMR 9: Propionamide (C) 11: Oxidation (M)
peak 44 1526.746 1526.749 5405.797 -0.003 -2.185 216 - 228 0 EQPGSPEWIQLDK
peak 43 1518.777 1518.781 453.222 -0.004 -2.875 70 - 81 0 LPVWETIVCTMR 9: Propionamide (C)
peak 41 1495.844 1494.915 299.194 0.928 621.264 94 - 106 1 HVVLYPLVAKSLR
peak 40 1478.853 1478.858 10162.001 -0.005 -3.583 291 - 304 0 VLELDPALAPVVSR
peak 39 1463.818 1463.739 578.192 0.079 53.753 70 - 81 0 LPVWETIVCTMR 11: Oxidation (M)
peak 38 1447.729 1447.744 502.841 -0.016 -10.744 70 - 81 0 LPVWETIVCTMR
peak 37 1436.690 1436.709 659.528 -0.019 -13.490 82 - 93 0 EGEIAQFLCDIK 9: Propionamide (C)
peak 36 1396.748 1396.754 3379.982 -0.007 -5.241 107 - 119 1 NIAVGKDPLEGQR
peak 34 1365.662 1365.672 907.002 -0.011 -7.795 82 - 93 0 EGEIAQFLCDIK
peak 33 1233.668 1233.670 3525.052 -0.003 -2.223 178 - 188 0 AVPLIHQEGNR
peak 32 1206.550 1206.564 4199.219 -0.014 -11.715 23 - 33 0 GELPDFQDGTK
peak 30 1161.620 1162.491 181.177 -0.872 -751.115 120 - 128 0 HCCGVAQMR 2: Propionamide (C) 3: Propionamide (C) 8: Oxidation (M)
peak 29 1138.685 1138.698 3413.311 -0.014 -12.335 94 - 103 0 HVVLYPLVAK
peak 28 1130.551 1130.555 315.066 -0.005 -4.074 202 - 210 0 YYDAIACLK 7: Propionamide (C)
peak 25 1101.631 1101.634 259.093 -0.004 -3.305 57 - 66 1 GKPMELIIGK 4: Oxidation (M)
peak 23 1085.636 1085.639 682.205 -0.003 -2.700 57 - 66 1 GKPMELIIGK
peak 22 1075.430 1075.459 145.963 -0.030 -28.001 120 - 128 0 HCCGVAQMR 2: Propionamide (C)
peak 22 1075.430 1074.609 145.963 0.820 764.240 1 - 9 1 MADIIARLR 1: Oxidation (M)
peak 21 1059.508 1059.518 834.767 -0.010 -9.445 202 - 210 0 YYDAIACLK
peak 21 1059.508 1058.614 834.767 0.894 845.339 1 - 9 1 MADIIARLR
peak 20 1004.397 1004.422 191.445 -0.026 -26.058 120 - 128 0 HCCGVAQMR
peak 19 1002.389 1001.553 244.053 0.836 835.087 189 - 196 1 LYREGHVK
peak 18 958.530 958.532 297.473 -0.002 -1.878 8 - 15 1 LREDGIQK
peak 18 958.530 957.584 297.473 0.946 988.767 104 - 112 1 SLRNIAVGK
peak 18 958.530 957.548 297.473 0.982 1026.844 305 - 312 1 ELRALEAR
peak 14 814.404 814.405 138.851 -0.002 -2.012 113 - 119 0 DPLEGQR
peak 13 806.282 805.424 691.945 0.858 1066.688 1 - 7 0 MADIIAR 1: Oxidation (M)
peak 11 794.392 794.394 3487.312 -0.003 -4.340 34 - 39 0 ATFHYR
peak 9 753.342 753.341 863.845 -0.000 -0.086 261 - 266 0 YDDNVK
peak 8 701.393 701.394 414.118 -0.002 -2.836 17 - 22 0 VIQEGR
peak 4 634.278 635.252 2952.145 -0.975 -1536.735 317 - 321 0 DEEDK
peak 4 634.278 633.339 2952.145 0.938 1483.958 211 - 215 0 NLQMK
peak 2 560.055 560.283 404.197 -0.228 -408.522 326 - 330 0 GIFSH
peak 1 559.079 559.320 224.882 -0.241 -431.547 308 - 312 0 ALEAR

GST-FKBP37.7$^{1-330}$

FileName: D:\Data\1202\LIN\11_2\0_L2\1\1SRef\pdata\1\1r

Sequence Name:		Parentmass:		Mass Error:		MH+ (mono):	1.008
MH+ (avg):	1.008	Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	1.000	Number of Peaks:	39
Above Threshold:		Assigned Peaks:		Not assigned Peaks:			



FileName: D:\Data\1202\LIN\11_2\0_L2\1\1SRef\pdata\1\1r

Sequence data:

Intensity Coverage:	50.8 % (14129 cnts)	Sequence Coverage MS:	46.8%
Sequence Coverage MS/MS:	0.0%	pI (isoelectric point):	5.9

```
        10        20        30        40        50        60        70        80        90       100       110       120
MSPILGYWKI KGLVQPTRLL LEYLEEKYEE HLYERDEGDK WRNKKFELGL EFPNLPYYID GDVKLTQSMA IIRYIADKHN MLGGCPKERA EISMLEGAVL DIRYGVSRIA YSKDFETLKV
       130       140       150       160       170       180       190       200       210       220       230       240
DFLSKLPEML KMFEDRLCHK TYLNGDHVTH PDFMLYDALD VVLYMDFMCL DAFPKLVCFK KRIEAIPQID KYLKSSKYIA WPLQGWQATF GGGDHPPSSD LIEGRGIPEF MADIIARLRE
       250       260       270       280       290       300       310       320       330       340       350       360
DGIQKRVIQE GRGELPDFQD GTKATFHYRT LHSDDEGTVL DDSRARGKPM ELIIGKKFKL FVWETIVCTM REGEIAQFLC DIKHVVLYPL VAKSLRNIAV GKDPLEGQRH CCGVAQMREH
       370       380       390       400       410       420       430       440       450       460       470       480
SSLGHADLDA LQQNPQPLIF HMEMLKVESP GTYQQDPWAM TDEEKAKAVP LIHQEGNRLY REGHVKEAAA KYYDAIACLK NLQKEEQPGS PEWIQLDEQI TPLLLNYCQC KLVVEETYEV
       490       500       510       520       530       540       550       560       570
LDHCSSILNK YDDNVKAYFK RGKAHAAVWN AQEAQADFAK VLELDPALAP VVSRELRALE ARIRQKDEED KARFRGIFSH
```

Display Parameter:

MH+ (mono):	1.008	MH+ (avg):	1.008	Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	1.000
Number of Peaks:	39						

Peaklist:

Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity
1	541.017	197.978	2	559.024	290.034	3	606.002	458.359	4	634.267	5270.691	5	636.282	886.066
6	662.298	792.591	7	697.281	194.834	8	701.363	321.792	9	776.206	190.537	10	789.370	265.310
11	794.347	625.831	12	804.245	3153.655	13	806.263	1067.015	14	823.428	404.576	15	832.280	279.139
16	905.328	189.622	17	958.485	434.028	18	1026.521	227.743	19	1085.574	314.379	20	1118.419	542.008
21	1138.611	875.983	22	1206.540	801.421	23	1233.622	1444.634	24	1332.666	1564.803	25	1348.645	234.589
26	1396.693	1014.546	27	1441.669	169.217	28	1478.802	1722.679	29	1516.740	229.589	30	1526.716	730.895
31	1532.708	147.349	32	1659.665	895.291	33	1793.837	139.397	34	1798.798	151.501	35	1827.841	389.527
36	1888.928	219.848	37	2210.963	154.730	38	2226.959	96.491	39	2326.144	724.469			

Matched Sequences:

Unmatched

```
MSSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMRGSEFPMADIIARLREDGIQKRVIQEGRGELPDFQDGTKATFHYRTLHSDDEGTVLDDSRARGKPMELIIGKKFKLFVWETIVCTMREGEIAQFLCDIKHVVLYPLVAKSLRNIAVGKDPLEGQRHCCGVAQMREHSSLGHADLDALQQNPQPLIFHMEMLKVESPGT
YQQDPWAMTDEEKAKAVPLIHQEGNRLYREGHVKEAAAKYYDAIACLKNLQMKEQPGSPEWIQLDKQITPLLLNYCQCKLVVEEYYEVLDHCSSILNKYDDNVKAYFKRGKAHAAVWNAQEAQADFAKVLELDPALAPVVSRELRALEARIRQKDEEDKARFRGIFSH
```

```
MSPILGYWKINGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDFMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPQIDKYLKSSKY
IAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLIEGRGIPEFMADIIARLREDGIQKRVIQEGRGELPDFQDGTKATFHYRTLHSDDEGTVLDDSRARGKPMELIIGKKFKLFVWETIVCTMREGEIAQFLCDIKHVVLYPLVAKSLRNIAVGKDPLEGQRHCCGVAQMREHSSLGHADLDALQQNPQPLIFHMEMLKVESPGTYQQD
PWAMTDEEKAKAVPLIHQEGNRLYREGHVKEAAAKYYDAIACLKNLQMKEQPGSPEWIQLDKQITPLLLNYCQCKLVVEEYYEVLDHCSSILNKYDDNVKAYFKRGKAHAAVWNAQEAQADFAKVLELDPALAPVVSRELRALEARIRQKDEEDKARFRGIFSH
```

Digest Results

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. Dev.(Da) Dev.(ppm) Range P Sequence

peak 21 1138.611 1138.516 875.983 0.094 82.748 28 - 35 0 YEEHLYER
peak 16 905.328 905.411 189.622 -0.084 -92.519 36 - 42 1 DEGDKWR
peak 29 1516.740 1516.804 229.589 -0.064 -42.274 90 - 103 0 AEISMLEGAVLDIR
peak 31 1532.708 1532.799 147.349 -0.091 -59.664 90 - 103 0 AEISMLEGAVLDIR 5: Oxidation (M)
peak 27 1441.669 1441.757 169.217 -0.089 -61.779 114 - 125 1 DFETLKVDFLSK
peak 7 697.281 697.297 194.834 -0.017 -24.882 132 - 136 0 MFEDR
peak 18 1026.521 1026.583 227.743 -0.062 -60.734 183 - 191 0 IEAIPQIDK
peak 39 2326.144 2326.140 724.469 0.003 1.447 198 - 218 0 YIAWPLQGWQATFGGGDHPPK
peak 10 789.370 789.410 265.310 -0.041 -51.938 219 - 225 0 SDLIEGR
peak 24 1332.666 1332.698 1564.803 -0.033 -24.678 226 - 237 0 GIPEFMADIIAR
peak 25 1348.645 1348.693 234.589 -0.049 -36.177 226 - 237 0 GIPEFMADIIAR 6: Oxidation (M)
peak 17 958.485 958.532 434.028 -0.047 -49.438 236 - 245 1 LREDGIQK
peak 8 701.363 701.394 321.792 -0.032 -45.098 247 - 252 0 VIQEGR

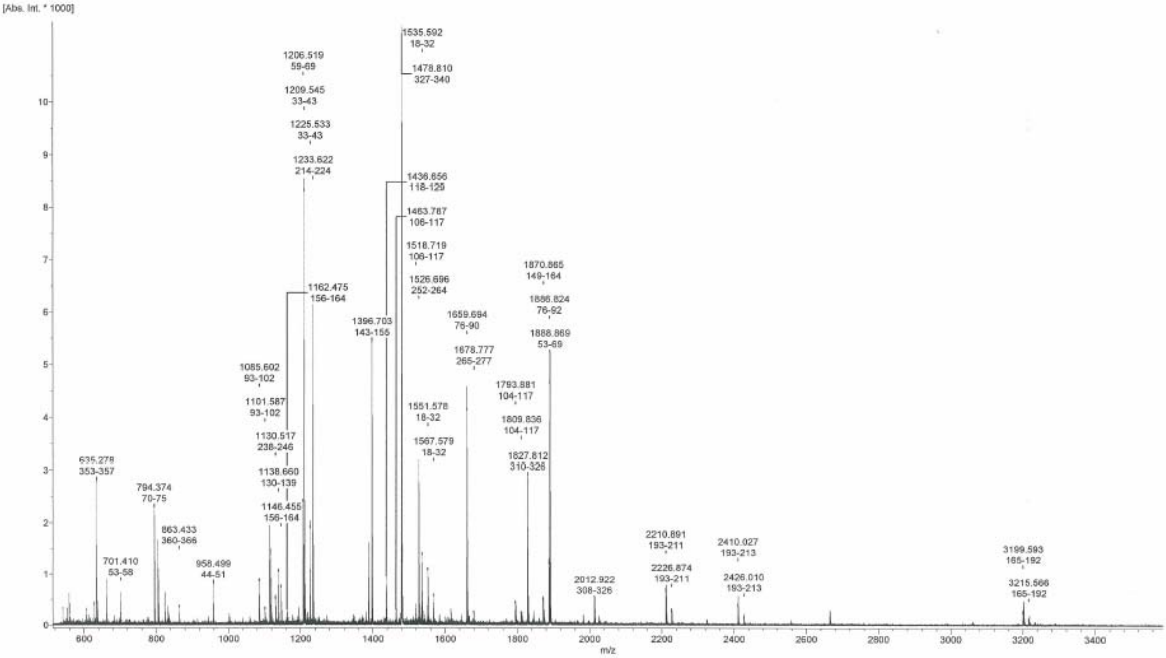
FileName: D:\Data\1202\LIN\11_2\0_L2\1\1SRef\pdata\1\1r

peak 36 1888.928 1888.940 219.848 -0.013 -6.735 247 - 263 1 VIQEGRGELPDFQDGTK
peak 22 1206.540 1206.564 801.421 -0.024 -20.180 253 - 263 0 GELPDFQDGTK
peak 11 794.347 794.394 625.831 -0.048 -61.062 264 - 269 0 ATFHYR
peak 32 1659.665 1659.746 895.291 -0.081 -48.899 270 - 284 0 TLHSDDEGTVLDDSR
peak 19 1085.574 1085.639 314.379 -0.065 -59.871 287 - 296 1 GKPMELIIGK
peak 33 1793.837 1793.944 139.397 -0.107 -59.891 298 - 311 1 FKLPVWETIVCTMR 11: Propionamide (C)
peak 21 1138.611 1138.698 875.983 -0.088 -77.174 324 - 333 0 HVVLYPLVAK
peak 26 1396.693 1396.754 1014.546 -0.062 -44.396 337 - 349 1 NIAVGKDPLEGQR
peak 37 2210.963 2210.955 154.730 0.008 3.719 387 - 405 0 VESPGTYQQDPWAMTDEEK
peak 38 2226.959 2226.950 96.491 0.009 4.186 387 - 405 0 VESPGTYQQDPWAMTDEEK 14: Oxidation (M)
peak 23 1233.622 1233.670 1444.634 -0.048 -39.155 408 - 418 0 AVPLIHQEGNR
peak 30 1526.716 1526.749 730.895 -0.034 -21.993 446 - 458 0 EQPGSPEWIQLDK
peak 35 1827.841 1827.877 389.527 -0.037 -20.125 504 - 520 0 AHAAVWNAQEAQADFAK
peak 28 1478.802 1478.858 1722.679 -0.056 -37.755 521 - 534 0 VLELDPALAPVVSR

His_6-FKBP37.7$^{1-330}$

FileName: D:\Data\1202\LIN\11_1\0_L1\1\1SRef\pdata\1\1r

Sequence Name:		Parentmass:		Mass Error:		MH+ (mono):	1.008
MH+ (avg):	1.008	Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	1.000	Number of Peaks:	59
Above Threshold:		Assigned Peaks:		Not assigned Peaks:			



FileName: D:\Data\1202\LIN\11_1\0_L1\1\1SRef\pdata\1\1r

Sequence data:

Intensity Coverage:	84.6 % (67631 cnts)	Sequence Coverage MS:	77.0%
Sequence Coverage MS/MS:	0.0%	pI (isoelectric point):	6.5

```
        10         20         30         40         50         60         70         80         90        100        110        120
MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MASMTGGQQM GRGSEFMADI IARLREDGIQ KRVIQEGRGE LPDFQDGTKA TFHYRTLHSD DEGTVLDDSR ARGKPMELII GKKFKLPVWE TIVCTMREGE
       130        140        150        160        170        180        190        200        210        220        230        240
IAQFLCDIKH VVLYPLVAKS LRNIAVGKDP LEGQRHCCGV AQMREHSSLG HADLDALQQN PQPLIFHMEM LKVESPGTYQ QDPWAMTDEE KAKAVPLIHQ EGNRLYREGH VKEAAAKYYD
       250        260        270        280        290        300        310        320        330        340        350        360
AIACLKNLQM KEQPGSPEWI QLDKQITPLL LNYCQCKLVV EEYYEVLDHC SSILNKYDDN VKAYFKRGKA HAAVWNAQEA QADFAKVLEL DPALAPVVSR ELRALEARIR QKDEEDKARF RGIFSH
       370
```

Display Parameter:

MH+ (mono):	1.008	MH+ (avg):	1.008	Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	1.000
Number of Peaks:	59						

Peaklist:

Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity
1	541.042	284.478	2	553.041	285.695	3	559.087	546.818	4	560.036	214.021	5	606.039	283.305
6	628.390	371.843	7	634.294	2644.308	8	635.278	385.447	9	636.317	544.922	10	662.322	833.706
11	701.410	603.669	12	794.374	2264.326	13	804.271	1663.232	14	806.284	623.806	15	823.486	517.154
16	832.297	359.691	17	863.433	324.970	18	958.499	753.096	19	1085.602	813.476	20	1101.587	283.192
21	1114.585	1856.440	22	1118.508	1332.637	23	1130.517	485.765	24	1138.660	997.387	25	1146.455	700.223
26	1162.475	291.614	27	1194.537	334.426	28	1206.519	2299.423	29	1209.545	7967.367	30	1225.533	1817.308
31	1233.622	5923.369	32	1387.677	1328.572	33	1396.703	5194.191	34	1436.656	916.535	35	1463.787	282.134
36	1478.810	11123.633	37	1518.719	332.328	38	1526.696	3054.774	39	1535.592	1310.311	40	1551.578	1027.169
41	1567.579	536.193	42	1615.792	231.590	43	1659.694	3964.226	44	1678.777	212.345	45	1793.881	399.632
46	1809.836	205.781	47	1827.812	2744.311	48	1843.819	187.157	49	1870.865	464.844	50	1886.824	1142.486
51	1888.869	4443.715	52	2012.922	458.019	53	2210.891	634.008	54	2226.874	245.275	55	2410.027	350.181
56	2426.010	120.706	57	2664.269	146.445	58	3199.593	222.042	59	3215.566	76.730			

Matched Sequences:

Unmatched

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFMADIIARLREDGIQKRVIQEGRGELPDFQDGTKATFHYRTLHSDDEGTVLDDSRARGKPMELIIGKKFKLPVWETIVCTMREGEIAQFLCDIKHVVLYPLVAKSLRNIAVGKDPLEGQRHCCGVAQMREHSSLGHADLDALQQNPQPLIFHMEMLKVESPGT
TQQDPWAMTDEEKAKAVPLIHQEGNRLYREGHVKEAAAKYYDAIACLKNLQMKEQPGSPEWIQLDKQITPLLLNYCQCKLVVEEYYEVLDHCSSILNKYDDNVKAYFKRGKAHAAVWNAQEAQADFAKVLELDPALAPVVSRELRALEARIRQKDEEDKARFRGIFSH

Digest Results

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. Dev.(Da) Dev.(ppm) Range P Sequence

peak 59 3215.566 3215.561 76.730 0.004 1.355 165 - 192 0 EHSSLGHADLDALQQNPQPLIFHMEMLK 26: Oxidation (M)
peak 58 3199.593 3199.566 222.042 0.026 8.272 165 - 192 0 EHSSLGHADLDALQQNPQPLIFHMEMLK
peak 56 2426.010 2426.082 120.706 -0.072 -29.642 193 - 213 1 VESPGTYQQDPWAMTDEEKAK 14: Oxidation (M)
peak 55 2410.027 2410.087 350.181 -0.060 -24.892 193 - 213 1 VESPGTYQQDPWAMTDEEKAK
peak 54 2226.874 2226.950 245.275 -0.076 -34.336 193 - 211 0 VESPGTYQQDPWAMTDEEK 14: Oxidation (M)
peak 53 2210.891 2210.955 634.008 -0.064 -29.031 193 - 211 0 VESPGTYQQDPWAMTDEEK
peak 52 2012.922 2012.994 458.019 -0.072 -36.033 308 - 326 1 QKAHAAVWNAQEAQADFAK
peak 51 1888.869 1888.940 4443.715 -0.071 -37.643 53 - 69 1 VIQEGRGELPDFQDGTK
peak 50 1886.824 1886.884 1142.486 -0.061 -32.163 76 - 92 1 TLHSDDEGTVLDDSRAR
peak 50 1886.824 1886.842 1142.486 -0.019 -9.870 149 - 164 1 DPLEGQRHCCGVAQMR 9: Propionamide (C) 15: Oxidation (M)
peak 49 1870.865 1870.847 464.844 0.018 9.521 149 - 164 1 DPLEGQRHCCGVAQMR 9: Propionamide (C)
peak 47 1827.812 1827.877 2744.311 -0.066 -36.211 310 - 326 0 AHAAVWNAQEAQADFAK
peak 46 1809.836 1809.939 205.781 -0.103 -57.011 104 - 117 1 FKLPVWETIVCTMR 11: Propionamide (C) 13: Oxidation (M)
peak 45 1793.881 1793.944 399.632 -0.064 -35.653 104 - 117 1 FKLPVWETIVCTMR 11: Propionamide (C)
peak 44 1678.777 1678.866 212.345 -0.089 -53.075 265 - 277 0 QITPLLLNYCQCK 10: Propionamide (C) 12: Propionamide (C)

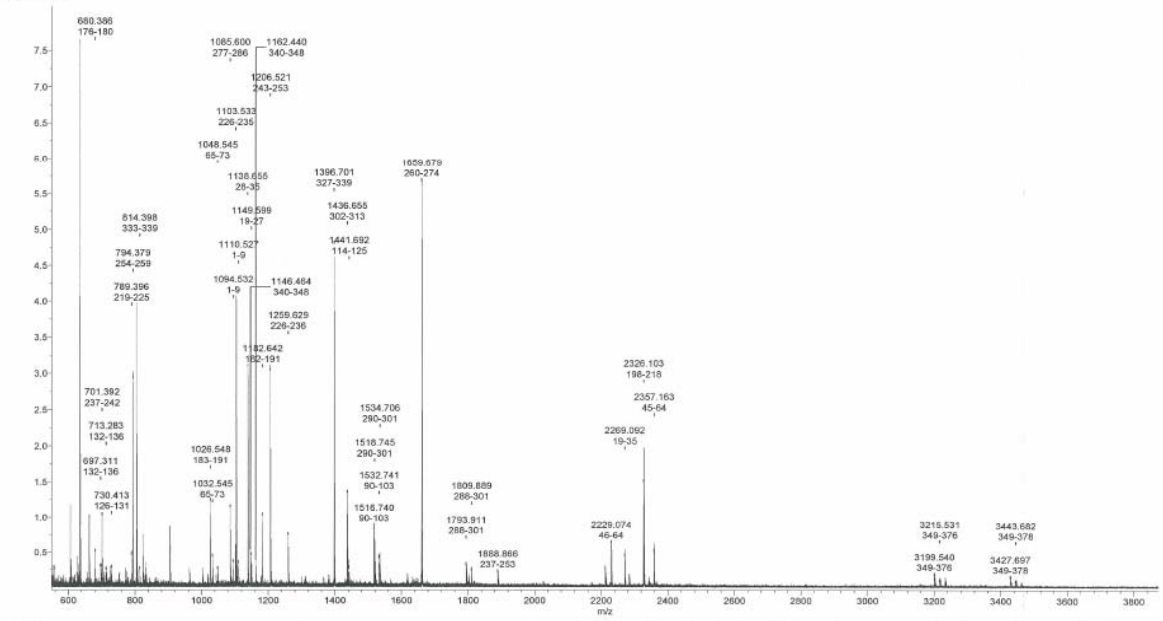
FileName: D:\Data\1202\LIN\11_1\0_L1\1\1SRef\pdata\1\1r

peak 43 1659.694 1659.746 3964.225 -0.052 -31.516 76 - 90 0 TLHSDDEGTVLDDSR
peak 41 1567.579 1567.641 536.193 -0.063 -40.124 18 - 32 0 GSHMASMTGGQQMGR 4: Oxidation (M) 7: Oxidation (M)
peak 40 1551.578 1551.646 1027.169 -0.068 -44.064 18 - 32 0 GSHMASMTGGQQMGR 4: Oxidation (M)
peak 39 1535.592 1535.651 1310.311 -0.060 -38.810 18 - 32 0 GSHMASMTGGQQMGR
peak 38 1526.696 1526.749 3054.774 -0.053 -34.494 252 - 264 0 EQPGSPEWIQLDK
peak 37 1518.719 1518.781 332.328 -0.062 -40.727 106 - 117 0 LPVWETIVCTMR 9: Propionamide (C)
peak 36 1478.810 1478.858 11123.633 -0.048 -32.546 327 - 340 0 VLELDPALAPVVSR
peak 36 1478.810 1478.778 11123.633 0.031 21.111 33 - 45 1 GSEFMADIIARLR
peak 35 1463.787 1463.739 282.134 0.047 32.461 106 - 117 0 LPVWETIVCTMR 11: Oxidation (M)
peak 34 1436.656 1436.709 916.535 -0.054 -37.416 118 - 129 0 EGEIAQFLCDIK 9: Propionamide (C)
peak 33 1396.703 1396.754 5194.191 -0.052 -37.261 143 - 155 1 NIAVGKDPLEGQR
peak 31 1233.622 1233.670 5923.369 -0.048 -39.180 214 - 224 0 AVPLIHQEGNR
peak 30 1225.533 1225.588 1817.308 -0.056 -45.548 33 - 43 0 GSEFMADIIAR 5: Oxidation (M)
peak 29 1209.545 1209.593 7967.367 -0.049 -40.224 33 - 43 0 GSEFMADIIAR
peak 28 1206.519 1206.564 2299.423 -0.045 -37.583 59 - 69 0 GELPDFQDGTK
peak 26 1162.475 1162.491 291.614 -0.017 -14.715 156 - 164 0 HCCGVAQMR 2: Propionamide (C) 3: Propionamide (C) 8: Oxidation (M)
peak 25 1146.455 1146.497 700.223 -0.042 -36.345 156 - 164 0 HCCGVAQMR 2: Propionamide (C) 3: Propionamide (C)
peak 24 1138.660 1138.698 997.387 -0.039 -34.392 130 - 139 0 HVVLYPLVAK
peak 23 1130.517 1130.555 485.765 -0.039 -34.517 238 - 246 0 YYDAIACLK 7: Propionamide (C)
peak 20 1101.587 1101.634 283.192 -0.048 -43.229 93 - 102 1 GKPMELIIGK 4: Oxidation (M)
peak 19 1085.602 1085.639 813.476 -0.037 -34.313 93 - 102 1 GKPMELIIGK
peak 18 958.499 958.532 753.096 -0.034 -35.116 44 - 51 1 LREDGIQK
peak 17 863.433 863.452 324.970 -0.020 -23.113 360 - 366 1 FRGIFSH
peak 12 794.374 794.394 2264.326 -0.021 -26.572 70 - 75 0 ATFHYR
peak 11 701.410 701.394 603.669 0.015 21.314 53 - 58 0 VIQEGR
peak 8 635.278 635.252 385.447 0.025 39.816 353 - 357 0 DEEDK

GST-FKBP37.7[11-158]

FileName: D:\Data\1202\LIN\11_3\0_L3\1\1SRefpdata\1\1r

Sequence Name:		Parent/mass:		Mass Error:		MH+ (mono):	1.008
MH+ (avg):	1.008	Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	1.000	Number of Peaks:	59
Above Threshold:		Assigned Peaks:		Not assigned Peaks:			



FileName: D:\Data\1202\LIN\11_3\0_L3\1\1SRefpdata\1\1r

Sequence data:

Intensity Coverage:	65.8 % (38942 cnts)	Sequence Coverage MS:	74.6%
Sequence Coverage MS/MS:	0.0%	pI (isoelectric point):	5.9

```
        10        20        30        40        50        60        70        80        90       100       110       120
MSPILGYWKI KGLVQPTRLL LEYLEKKYEE HLYERDEGDK WRNKKFELGL EFPNLPYYID GDVKLTQSMA IIRYIADKHN HLGGCPKERA EISMLEGAVL DIRYGVSRIA YSKDFETLKV
       130       140       150       160       170       180       190       200       210       220       230       240
DFLSKLPEML KMFEDRLCHK TYLNGDHVTH PDFMLYDALD VVLYMDPMCL DAFPKLVCFK KRIEAIPQID KYLKSSKVIA WFLQGWQATF GGGDHPPKSD LIEGRGIPEF DGIQKRVIQE
       250       260       270       280       290       300       310       320       330       340       350       360
GRGELPDFQD GTKATFHYRT LHSDDEGTVL DDSRARGKPN ELIIGKKFKL PVWETIVCTM REGEIAQFLC DIKHVVLYPL VAKSLRNIAV GKDPLEGQRH CCGVAQMREH SSLGHADLDA
       370       360
LQQNPQPLIF HMEMLKVE
```

Display Parameter:

MH+ (mono):	1.008	MH+ (avg):	1.008	Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	1.000
Number of Peaks:	59						

Peaklist:

Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity
1	553.045	234.341	2	559.046	235.981	3	606.036	1147.101	4	628.386	406.910	5	634.297	7307.756
6	638.312	846.133	7	662.323	964.607	8	680.386	481.691	9	697.311	277.631	10	699.962	290.302
11	701.392	985.582	12	713.283	232.499	13	726.310	278.377	14	730.413	258.927	15	789.396	442.408
16	794.379	2808.169	17	804.272	4039.782	18	806.283	1341.747	19	814.398	237.908	20	823.497	730.876
21	832.315	355.966	22	906.367	464.216	23	963.506	255.908	24	1002.371	238.771	25	1026.548	1182.844
26	1032.545	416.441	27	1048.545	244.143	28	1085.600	1091.558	29	1094.532	339.313	30	1103.533	3999.313
31	1110.527	325.706	32	1138.655	2981.287	33	1146.464	513.288	34	1149.599	437.525	35	1162.440	377.005
36	1182.642	984.717	37	1206.521	2915.887	38	1259.629	712.811	39	1396.701	4605.150	40	1436.655	1286.601
41	1441.692	248.287	42	1516.740	808.497	43	1518.745	558.317	44	1532.741	393.585	45	1534.706	265.010
46	1659.679	5387.014	47	1793.911	297.546	48	1809.889	218.317	49	1888.866	169.807	50	2211.033	245.191
51	2229.074	542.026	52	2269.092	413.899	53	2283.125	140.539	54	2326.103	1435.952	55	2357.163	480.469
56	3199.540	99.837	57	3215.531	69.779	58	3427.697	61.403	59	3443.682	51.271			

Matched Sequences:

Unmatched

```
MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPQIDKYLKSSKY
IAWFLQGWQATFGGGDHPPKSDLIEGRGIPEFDGIQKRVIQEGRGELPDFQDGTKATFHYRTLHSDDEGTVLDDSRARGKPNELIIGKKFKLPVWETIVCTMREGEIAQFLCDIKHVVLYPLVAKSLRNIAVGKDPLEGQRHCCGVAQMREHSSLGHADLDALQQNPQPLIFHMEMLKVE
```

Digest Results

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. Dev.(Da) Dev.(ppm) Range P Sequence

```
 peak 29 1094.532 1094.570 339.313  -0.039 -35.789 1 - 9 0 MSPILGYWK
 peak 31 1110.527 1110.565 325.706  -0.039 -35.255 1 - 9 0 MSPILGYWK  1: Oxidation (M)
 peak 34 1149.599 1149.640 437.525  -0.041 -35.887 19 - 27 0 LLLEYLEEK
 peak 52 2269.092 2269.139 413.899  -0.048 -20.998 19 - 35 1 LLLEYLEEKYEEHLYER
 peak 32 1138.655 1138.516 2981.287  0.138  121.332 28 - 35 0 YEEHLYER
 peak 55 2357.163 2357.206 480.469  -0.044 -18.643 45 - 64 1 KFELGLEFPNLPYYIDGDVK
 peak 51 2229.074 2229.111 542.026  -0.038 -16.950 46 - 64 0 FELGLEFPNLPYYIDGDVK
 peak 26 1032.545 1032.587 416.441  -0.042 -41.117 65 - 73 0 LTQSMAIIR
 peak 27 1048.545 1048.582 244.143  -0.037 -35.704 65 - 73 0 LTQSMAIIR  5: Oxidation (M)
 peak 42 1516.740 1516.804 808.497  -0.065 -42.634 90 - 103 0 AEISMLEGAVLDIR
 peak 44 1532.741 1532.799 393.585  -0.058 -38.061 90 - 103 0 AEISMLEGAVLDIR  5: Oxidation (M)
 peak 41 1441.692 1441.757 248.287  -0.066 -45.664 114 - 125 1 DFETLKVDFLSK
 peak 14  730.413  730.417  258.927  -0.004  -5.480 126 - 131 0 LPEMLK
  peak 9  697.311  697.297  277.631   0.013  18.803 132 - 136 0 MFEDR
```

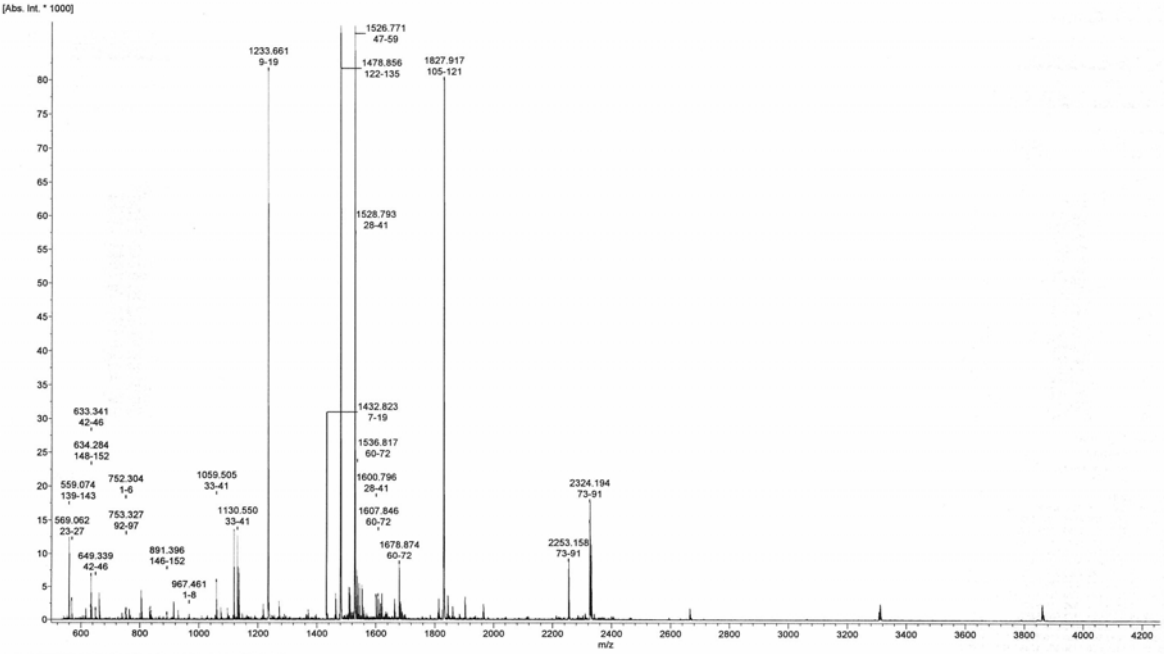
FileName: D:\Data\1202\LIN\11_3\0_L3\1\1SRefpdata\1\1r

```
 peak 12  713.283  713.292  232.499  -0.010 -14.298 132 - 136 0 MFEDR  1: Oxidation (M)
  peak 8  680.386  680.380  481.691   0.006   8.450 176 - 180 0 LVCFK  3: Propionamide (C)
 peak 36 1182.642 1182.684  984.717  -0.043 -36.238 182 - 191 1 RIEAIPQIDK
 peak 25 1026.548 1026.583 1182.844  -0.035 -34.432 183 - 191 0 IEAIPQIDK
 peak 54 2326.103 2326.140 1435.952  -0.038 -16.244 198 - 218 0 YIAWFLQGWQATFGGGDHPPK
 peak 15  789.396  789.410  442.408  -0.014 -18.317 219 - 225 0 SDLIEGR
 peak 30 1103.533 1103.573 3999.313  -0.040 -36.469 226 - 235 0 GIPEFDGIQK
 peak 38 1259.629 1259.674  712.811  -0.046 -36.281 226 - 236 1 GIPEFDGIQKR
 peak 11  701.392  701.394  985.582  -0.002  -3.143 237 - 242 0 VIQEGR
 peak 49 1888.866 1888.940  169.807  -0.075 -39.854 237 - 253 1 VIQEGRGELPDFQDGTK
 peak 37 1206.521 1206.564 2915.887  -0.043 -35.659 243 - 253 0 GELPDFQDGTK
 peak 16  794.379  794.394 2808.169  -0.016 -19.742 254 - 259 0 ATFHYR
 peak 46 1659.679 1659.746 5387.014  -0.067 -40.244 260 - 274 0 TLHSDDEGTVLDDSR
 peak 28 1085.600 1085.639 1091.558  -0.039 -35.922 277 - 286 1 GKPMELIIGK
 peak 47 1793.911 1793.944  297.546  -0.034 -18.922 288 - 301 1 FKLPVWETIVCTMR  11: Propionamide (C)
 peak 48 1809.889 1809.939  218.317  -0.050 -27.747 288 - 301 1 FKLPVWETIVCTMR  11: Propionamide (C) 13: Oxidation (M)
 peak 43 1518.745 1518.781  558.317  -0.037 -24.146 290 - 301 0 LPVWETIVCTMR  9: Propionamide (C)
 peak 45 1534.706 1534.776  265.010  -0.070 -45.571 290 - 301 0 LPVWETIVCTMR  9: Propionamide (C) 11: Oxidation (M)
 peak 40 1436.655 1436.709 1286.601  -0.055 -38.032 302 - 313 0 EGEIAQFLCDIK  9: Propionamide (C)
 peak 32 1138.655 1138.698 2981.287  -0.044 -38.596 314 - 323 0 HVVLYPLVAK
 peak 39 1396.701 1396.754 4605.150  -0.054 -38.568 327 - 339 1 NIAVGKDPLEGQR
 peak 19  814.398  814.405  237.908  -0.008  -9.996 333 - 339 0 DPLEGQR
 peak 33 1146.464 1146.497  513.288  -0.033 -28.814 340 - 348 0 HCCGVAQMR  2: Propionamide (C) 3: Propionamide (C)
 peak 35 1162.440 1162.491  377.005  -0.052 -45.124 340 - 348 0 HCCGVAQMR  2: Propionamide (C) 3: Propionamide (C) 8: Oxidation (M)
 peak 56 3199.540 3199.566   99.837  -0.027  -8.296 349 - 376 0 EHSSLGHADLDALQQNPQPLIFHMEMLK
 peak 57 3215.531 3215.561   69.779  -0.031  -9.702 349 - 376 0 EHSSLGHADLDALQQNPQPLIFHMEMLK  26: Oxidation (M)
 peak 58 3427.697 3427.677   61.403   0.019   5.578 349 - 378 1 EHSSLGHADLDALQQNPQPLIFHMEMLKVE
 peak 59 3443.682 3443.672   51.271   0.010   2.820 349 - 378 1 EHSSLGHADLDALQQNPQPLIFHMEMLKVE  26: Oxidation (M)
```

FKBP37.7$^{170\text{-}330}$

FileName: D:\Data\1205\LIN\MG12_2\0_A14\1\1SRef\pdata\1\1r

Sequence Name:	FKBP37_7_170-330	Parentmass:		Mass Error:		MH+ (mono):	1.008
MH+ (avg):	1.008	Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	1.000	Number of Peaks:	100
Above Threshold:		Assigned Peaks:		Not assigned Peaks:			



FileName: D:\Data\1205\LIN\MG12_2\0_A14\1\1SRef\pdata\1\1r

Sequence data:

FKBP37_7_170-330

Intensity Coverage:	72.3 % (446165 cnts)	Sequence Coverage MS:	69.9%
Sequence Coverage MS/MS:	0.0%	pI (isoelectric point):	5.6

```
        10         20         30         40         50         60         70         80         90        100        110        120
MTDEEKAKAV PLIHQEGNRL YREGHVKEAA AKYYDAIACL KNLQMKEQPG SPEWIQLDKQ ITPLLLNYCQ CKLVVEEYYE VLDHCSSILN KYDDNVKAYF KRGKAHAAVW NAQEAQADFA
       130        140        150        160        170        180        190        200
KVLELDPALA PVVSRELRAL EARIRQKDEE DKARFRGIFS HSLGHADLDA LQQNPQPLIF HMEMLKVESP GTYQQD
```

Display Parameter:

Sequence Name:	FKBP37_7_170-330	MH+ (mono):	1.008	MH+ (avg):	1.008	Threshold (a.i.):	0.000
Tolerance (Da):	1.000	Number of Peaks:	100				

Peaklist:

Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity
1	541.011	488.682	2	553.020	581.085	3	559.074	12936.799	4	561.040	1877.380	5	569.062	2713.815
6	606.020	460.092	7	613.113	421.084	8	633.341	1764.869	9	634.284	6284.555	10	637.292	409.750
11	649.339	1317.846	12	662.305	3897.682	13	664.298	720.296	14	752.304	778.421	15	753.327	1258.768
16	800.451	806.605	17	804.254	4290.320	18	805.263	1266.334	19	806.264	1793.260	20	832.292	1663.960
21	834.293	695.659	22	835.381	1569.608	23	838.386	1175.241	24	867.403	427.471	25	891.396	670.697
26	909.536	453.326	27	929.496	1272.357	28	966.473	439.982	29	967.461	568.165	30	1009.542	450.406
31	1059.505	5429.679	32	1074.598	1795.488	33	1097.506	1544.713	34	1118.555	12860.185	35	1130.550	12334.391
36	1135.514	7482.480	37	1146.555	887.952	38	1189.632	494.583	39	1218.635	2158.217	40	1233.661	78553.715
41	1271.665	2552.815	42	1289.678	608.490	43	1370.666	1306.919	44	1397.661	604.288	45	1432.823	645.660
46	1434.826	739.438	47	1463.816	3717.260	48	1478.856	92919.407	49	1480.883	21019.429	50	1508.738	4731.713
51	1511.712	3229.469	52	1516.792	1041.118	53	1520.811	895.062	54	1526.771	90727.485	55	1528.793	17489.770
56	1534.806	7214.362	57	1536.817	2967.867	58	1542.772	5337.839	59	1552.913	5116.346	60	1558.766	1578.881
61	1568.782	834.024	62	1600.796	3278.249	63	1607.846	3347.613	64	1612.806	670.710	65	1614.890	1092.540
66	1615.876	1431.699	67	1619.795	3892.199	68	1637.828	639.573	69	1662.776	2671.928	70	1678.874	8574.723
71	1683.831	2510.904	72	1688.814	1071.953	73	1698.817	582.624	74	1783.862	579.855	75	1809.846	862.093
76	1812.865	3015.548	77	1827.917	77261.572	78	1829.969	14216.677	79	1843.912	3315.541	80	1859.901	1812.108
81	1883.935	701.655	82	1901.949	2946.941	83	1964.932	1776.991	84	2116.020	375.917	85	2211.088	452.170
86	2253.158	7430.030	87	2285.132	458.691	88	2301.077	366.987	89	2309.125	624.729	90	2324.194	14050.963
91	2329.158	9144.250	92	2340.143	537.377	93	2398.186	314.828	94	2593.286	213.746	95	2664.394	1127.239
96	3305.593	650.413	97	3309.748	1291.406	98	3786.936	69.768	99	3858.022	1000.172	100	3863.008	250.314

Matched Sequences:

Unmatched

FKBP37_7_170-330

MTDEEKAKAVPLIHQEGNRLYREGHVKEAAAKYYDAIACLKNLQMKEQPGSPEWIQLDKQITPLLLNYCQCKLVVEEYYEVLDHCSSILNKYDDNVKAYFKRGKAHAAVWNAQEAQADFAKVLELDPALAPVVSRELRALEARIRQKDEEDKARFRGIFSHSLGHADLDALQQNPQPLIFHMEMLKVESPGTYQQD

Digest Results

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. Dev.(Da) Dev.(ppm) Range P Sequence

peak 90 2324.194 2324.148 14050.963 0.046 19.610 73 - 91 0 LVVEEYYEVLDHCSSILNK 13: Propionamide (C)
peak 86 2253.158 2253.111 7430.030 0.046 20.647 73 - 91 0 LVVEEYYEVLDHCSSILNK
peak 77 1827.917 1827.877 77261.572 0.039 21.393 105 - 121 0 AHAAVWNAQEAQADFAK
peak 70 1678.874 1678.866 8574.723 0.008 4.948 60 - 72 0 QITPLLLNYCQCK 10: Propionamide (C) 12: Propionamide (C)
peak 63 1607.846 1607.828 3347.613 0.017 10.436 60 - 72 0 QITPLLLNYCQCK 12: Propionamide (C)
peak 62 1600.796 1600.804 3278.249 -0.008 -5.212 28 - 41 1 EAAAKYYDAIACLK 12: Propionamide (C)
peak 57 1536.817 1536.791 2967.867 0.025 16.554 60 - 72 0 QITPLLLNYCQCK
peak 55 1528.793 1529.767 17489.770 -0.974 -637.410 28 - 41 1 EAAAKYYDAIACLK
peak 54 1526.771 1526.749 90727.485 0.022 14.265 47 - 59 0 EQPGSPEWIQLDK
peak 48 1478.856 1478.858 92919.407 -0.002 -1.472 122 - 135 0 VLELDPALAPVVSR
peak 45 1432.823 1432.802 645.660 0.021 14.499 7 - 19 1 AKAVPLIHQEGNR
peak 40 1233.661 1233.670 78553.715 -0.010 -7.936 9 - 19 0 AVPLIHQEGNR
peak 35 1130.550 1130.555 12334.391 -0.006 -5.035 33 - 41 0 YYDAIACLK 7: Propionamide (C)

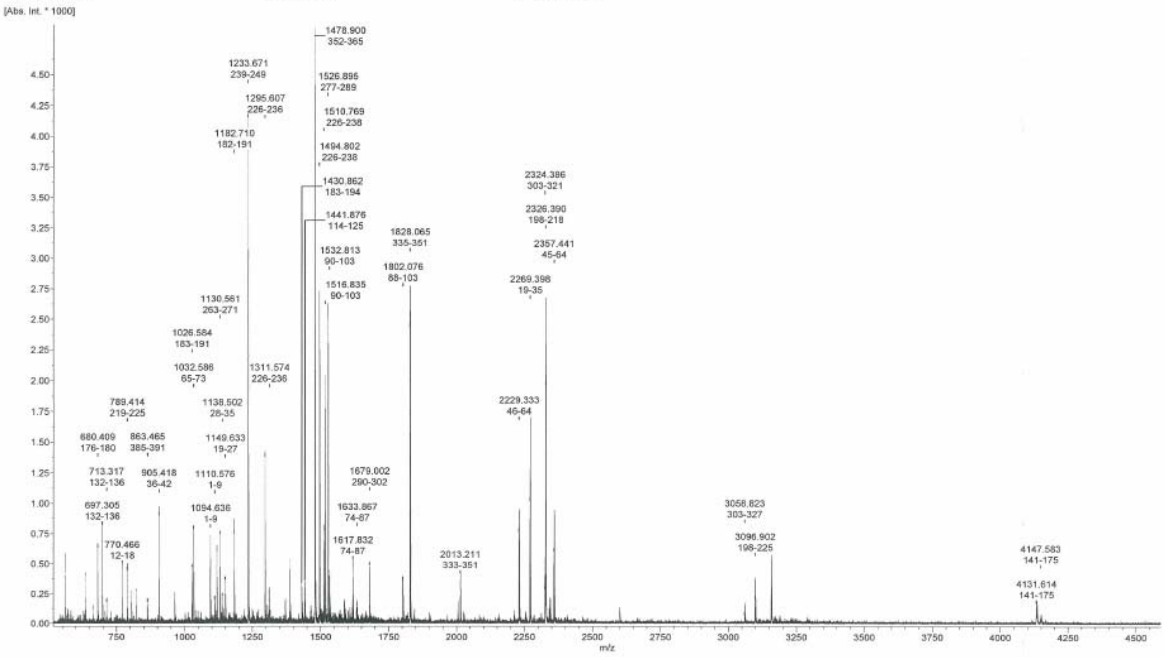
FileName: D:\Data\1205\LIN\MG12_2\0_A14\1\1SRef\pdata\1\1r

peak 31 1059.505 1059.518 5429.679 -0.014 -12.864 33 - 41 0 YYDAIACLK
peak 29 967.461 967.440 568.165 0.020 21.064 1 - 8 1 MTDEEKAK 1: Oxidation (M)
peak 25 891.396 891.405 670.697 -0.010 -10.780 146 - 152 1 QKDEEDK
peak 15 753.327 753.341 1258.768 -0.015 -19.315 92 - 97 0 YDDNVK
peak 14 752.304 752.313 778.421 -0.010 -13.289 1 - 6 0 MTDEEK
peak 11 649.339 649.334 1317.846 0.005 6.991 42 - 46 0 NLQMK 4: Oxidation (M)
peak 9 634.284 635.252 6284.555 -0.968 -1526.798 148 - 152 0 DEEDK
peak 8 633.341 633.339 1764.869 0.002 2.511 42 - 46 0 NLQMK
peak 5 569.062 569.304 2713.815 -0.243 -427.811 23 - 27 0 EGHVK
peak 3 559.074 559.320 12936.799 -0.247 -441.648 139 - 143 0 ALEAR

GST-FKBP37.7$^{170\text{-}330}$

FileName: D:\Data\1202\LIN\11_5\0_L5\1\1SRef\pdata\1\1r

Sequence Name:		Parentmass:		Mass Error:		MH+ (mono):	1.008
MH+ (avg):	1.008	Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	1.000	Number of Peaks:	57
Above Threshold:		Assigned Peaks:		Not assigned Peaks:			



FileName: D:\Data\1202\LIN\11_5\0_L5\1\1SRef\pdata\1\1r

Sequence data:

Intensity Coverage:	84.8 % (33997 cnts)	Sequence Coverage MS:	82.1%
Sequence Coverage MS/MS:	0.0%	pI (isoelectric point):	5.9

```
        10        20        30        40        50        60        70        80        90       100       110       120
MSPILGYWKI  KGLVQPTRLL  LEYLEEKYEE  HLYERDEGDK  WRNKKFELGL  EFPNLPYYID  GDVKLTQSHA  IIRYIADKHN  MLGGCPKERA  EISMLEGAVL  DIRYGVSRIA  YSKDFETLKV
       130       140       150       160       170       180       190       200       210       220       230       240
DFLSKLPEML  KMFEDRLCHK  TYLNGDHVTH  PDFMLYDALD  VVLYMDPMCL  DAFPKLVCFK  KRIEAIPQID  KYLKSSKYIA  WPLQGWQATF  GGGDHPPKSD  LIEGRGIPEF  MTDEEKARAV
       250       260       270       280       290       300       310       320       330       340       350       360
PLIHQEGNRL  YREGHVKEAA  AKYYDAIACL  KNLQMKEQPG  SPEWIQLDKQ  ITPLLLNYCQ  CKLVVEEYYE  VLDHCSSILN  KYDDNVKAYF  KRGKAHAAVW  NAQEAQADFA  KVLELDPALA
       370       380       390       400
PVVSRELRAL  EARIRQKDEE  DKARFRGIFS  H
```

Display Parameter:

MH+ (mono):	1.008	MH+ (avg):	1.008	Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	1.000
Number of Peaks:	57						

Peaklist:

Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity
1	559.094	364.500	2	560.064	414.269	3	634.342	362.923	4	662.397	115.493	5	680.409	608.661
6	697.305	793.869	7	713.317	173.018	8	770.466	442.285	9	789.414	428.546	10	804.300	264.754
11	823.498	260.814	12	863.465	178.137	13	905.418	864.282	14	963.525	253.973	15	1026.584	451.369
16	1032.586	758.623	17	1094.636	711.141	18	1110.576	195.218	19	1118.535	576.080	20	1130.561	718.803
21	1138.502	220.597	22	1149.633	364.196	23	1182.710	720.561	24	1233.671	3989.843	25	1295.607	1325.031
26	1310.759	222.212	27	1311.574	179.610	28	1369.641	171.983	29	1387.744	526.565	30	1430.862	325.472
31	1441.876	349.107	32	1478.900	5093.719	33	1494.802	2621.554	34	1510.769	748.269	35	1516.835	1965.594
36	1526.895	2404.800	37	1532.813	421.302	38	1586.958	136.678	39	1617.832	435.847	40	1633.867	142.626
41	1679.002	466.801	42	1802.076	352.057	43	1828.065	2341.609	44	2013.211	280.304	45	2229.333	733.358
46	2269.398	978.543	47	2324.386	275.231	48	2326.390	1884.192	49	2342.409	147.468	50	2357.441	577.413
51	2599.626	63.656	52	3058.823	66.832	53	3096.902	195.698	54	3155.942	220.718	55	3157.051	125.585
56	4131.614	46.536	57	4147.583	17.746									

Matched Sequences:

Unmatched

```
MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPQIDKYLKSSKY
LNWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLIEGRGIPEFMTDEEKARAVPLIHQEGNRLYREGHVKEAAKYYDAIACLKNLQMKEQPGSPEWIQLDKQITPLLLNYCQCKLVVEEYYEVLDHCSSILNKYDDNVKAYFKRGKAHAAVWNAQEAQADFAKVLELDPALAPVVSRELRALEARIRQKDEEDKARFRGIFSH
```

Digest Results

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. Dev.(Da) Dev.(ppm) Range P Sequence

```
 peak 17 1094.636 1094.570 711.141  0.065  59.596 1 - 9 0 MSPILGYWK
 peak 18 1110.576 1110.565 195.218  0.011   9.566 1 - 9 0 MSPILGYWK 1: Oxidation (M)
  peak 8  770.466  770.452 442.285  0.013  17.167 12 - 18 0 GLVQPTR
 peak 22 1149.633 1149.640 364.196 -0.008  -7.044 19 - 27 0 LLLEYLEEK
 peak 46 2269.398 2269.139 978.543  0.259 114.016 19 - 35 1 LLEYLEEKYEEHLYER
 peak 21 1138.502 1138.516 220.597 -0.015 -13.514 28 - 35 0 YEEHLYER
 peak 13  905.418  905.411 864.282  0.007   7.220 36 - 42 1 DEGDKWR
 peak 50 2357.441 2357.206 577.413  0.234  99.250 45 - 64 1 KFELGLEFPNLPYYIDGDVK
 peak 45 2229.333 2229.111 733.358  0.221  99.160 46 - 64 0 FELGLEFPNLPYYIDGDVK
 peak 16 1032.586 1032.587 758.623 -0.001  -1.323 65 - 73 0 LTQSMAIR
 peak 39 1617.832 1617.788 435.847  0.043  26.865 74 - 87 1 YIADKHNMLGGCPK 12: Propionamide (C)
 peak 40 1633.867 1633.783 142.626  0.084  51.631 74 - 87 1 YIADKHNMLGGCPK 8: Oxidation (M) 12: Propionamide (C)
 peak 42 1802.076 1801.948 352.057  0.128  70.878 88 - 103 1 ERAEISMLEGAVLDIR
 peak 35 1516.835 1516.804 1965.594  0.031  20.429 90 - 103 0 AEISMLEGAVLDIR
 peak 37 1532.813 1532.799 421.302  0.013   8.728 90 - 103 0 AEISMLEGAVLDIR 5: Oxidation (M)
```

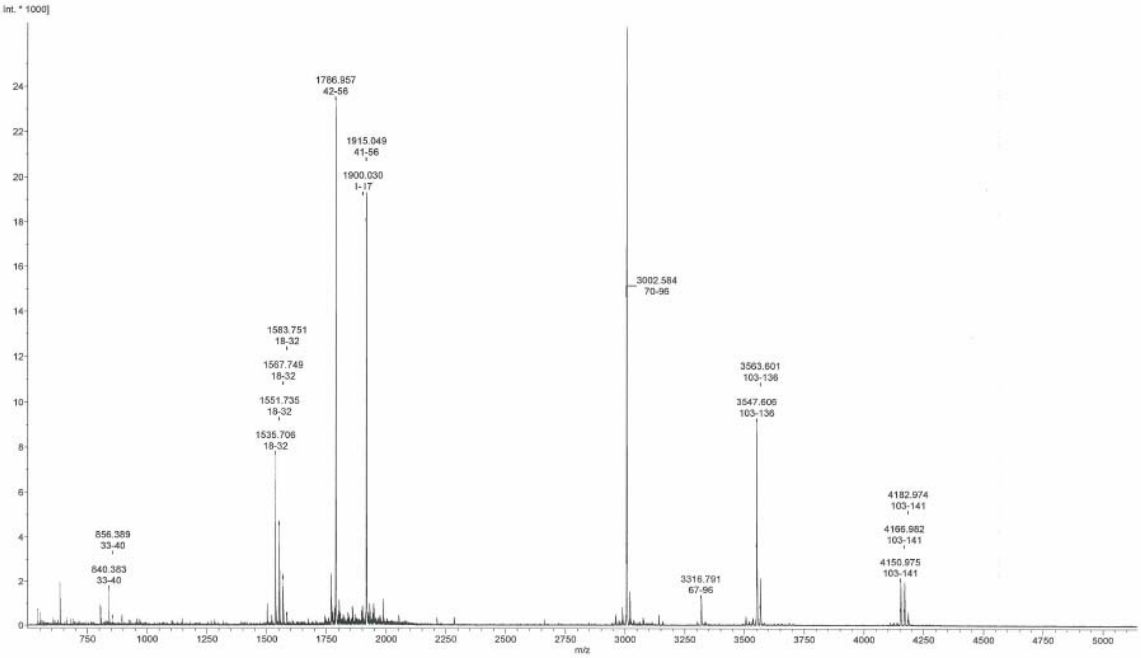
FileName: D:\Data\1202\LIN\11_5\0_L5\1\1SRef\pdata\1\1r

```
 peak 31 1441.876 1441.757 349.107  0.118  81.733 114 - 125 1 DFETLKVDFLSK
  peak 6  697.305  697.297 793.869  0.007  10.511 132 - 136 0 MFEDR
  peak 7  713.317  713.292 173.018  0.024  33.207 132 - 136 0 MFEDR 1: Oxidation (M)
 peak 56 4131.614 4130.905  46.536  0.709 171.674 141 - 175 0 TYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPK 29: Propionamide (C)
 peak 57 4147.583 4146.900  17.746  0.683 164.757 141 - 175 0 TYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPK 14: Oxidation (M) 29: Propionamide (C)
  peak 5  680.409  680.380 608.661  0.028  41.345 176 - 180 0 LVCFK 3: Propionamide (C)
 peak 23 1182.710 1182.684 720.561  0.025  21.372 182 - 191 1 RIEAIPQIDK
 peak 15 1026.584 1026.583 451.369  0.000   0.287 183 - 191 0 IEAIPQIDK
 peak 30 1430.862 1430.825 325.472  0.036  25.151 183 - 194 1 IEAIPQIDKYLK
 peak 48 2326.390 2326.140 1884.192  0.249 107.080 198 - 218 0 YIAWPLQGWQATFGGGDHPPK
 peak 53 3096.902 3096.533 195.698  0.368 119.028 198 - 225 1 YIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLIEGR
  peak 9  789.414  789.410 428.546  0.004   4.835 219 - 225 0 SDLIEGR
 peak 25 1295.607 1295.582 1325.031  0.024  18.861 226 - 236 0 GIPEFMTDEEK
 peak 27 1311.574 1311.577 178.610 -0.004  -3.019 226 - 236 0 GIPEFMTDEEK 6: Oxidation (M)
 peak 33 1494.802 1494.714 2621.554  0.087  58.075 226 - 238 1 GIPEFMTDEEKAK
 peak 34 1510.769 1510.709 748.269  0.059  39.355 226 - 238 1 GIPEFMTDEEKAK 6: Oxidation (M)
 peak 24 1233.671 1233.670 3989.843  0.001   0.875 239 - 249 0 AVPLIHQEGNR
 peak 20 1130.561 1130.555 718.803  0.005   4.763 263 - 271 0 YYDAIACLK 7: Propionamide (C)
 peak 36 1526.895 1526.749 2404.800  0.146  95.748 277 - 289 0 EQPGSPEWIQLDK
 peak 41 1679.002 1678.866 466.801  0.135  80.732 290 - 302 0 QITPLLLNYCQCK 10: Propionamide (C) 12: Propionamide (C)
 peak 47 2324.386 2324.148 275.231  0.238 102.345 303 - 321 0 LVVEEYYEVLDHCSSILNK 13: Propionamide (C)
 peak 52 3058.823 3058.471  66.832  0.351 114.705 303 - 327 1 LVVEEYYEVLDHCSSILNKYDDNVK 13: Propionamide (C)
 peak 44 2013.211 2012.994 280.304  0.216 107.489 333 - 351 1 GKAHAAVWNAQEAQADFAK
 peak 43 1828.065 1827.877 2341.609  0.187 102.279 335 - 351 0 AHAAVWNAQEAQADFAK
 peak 32 1478.900 1478.858 5093.719  0.042  28.498 352 - 365 0 VLELDPALAPVVSR
 peak 12  863.465  863.452 178.137  0.012  14.220 385 - 391 1 FRGIFSH
```

His_6-HSP90α$^{628-732}$

FileName: D:\Data\1202\LIN\11_6\0_L7\1\1SRef\pdata\1\1r

Sequence Name:	MG11_6	Parentmass:		Mass Error:		MH+ (mono):	1.008
MH+ (avg):	1.008	Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	1.000	Number of Peaks:	56
Above Threshold:		Assigned Peaks:		Not assigned Peaks:			

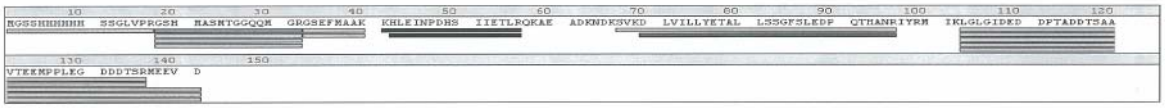


FileName: D:\Data\1202\LIN\11_6\0_L7\1\1SRef\pdata\1\1r

Sequence data:

MG11_6

Intensity Coverage:	79.8 % (76800 cnts)	Sequence Coverage MS:	88.7%
Sequence Coverage MS/MS:	0.0%	pI (isoelectric point):	4.9



Display Parameter:

Sequence Name:	MG11_6	MH+ (mono):	1.008	MH+ (avg):	1.008	Threshold (a.i.):	0.000
Tolerance (Da):	1.000	Number of Peaks:	56				

Peaklist:

Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity
1	541.000	667.364	2	553.014	545.884	3	606.008	339.349	4	634.277	1764.880	5	635.278	499.073
6	636.283	360.490	7	662.297	296.671	8	691.326	260.130	9	804.266	841.578	10	805.291	462.624
11	806.270	488.471	12	840.383	1506.706	13	856.389	311.128	14	1146.655	254.564	15	1520.722	391.187
16	1535.706	7509.924	17	1551.735	4353.855	18	1553.791	563.995	19	1567.749	2017.238	20	1583.751	437.949
21	1766.870	2219.321	22	1771.928	617.645	23	1774.782	357.039	24	1786.957	22611.481	25	1801.051	390.929
26	1802.963	652.837	27	1806.905	369.545	28	1839.876	493.376	29	1858.027	550.556	30	1895.980	418.448
31	1900.030	537.558	32	1915.049	17322.028	33	1929.485	273.491	34	1931.038	482.104	35	1947.109	503.845
36	1986.072	892.473	37	2052.059	289.977	38	2211.119	258.205	39	2283.186	256.340	40	2661.390	162.220
41	2956.558	270.817	42	2987.555	467.213	43	3002.584	14086.416	44	3018.591	768.773	45	3034.576	121.165
46	3073.633	161.284	47	3138.599	250.893	48	3316.791	550.258	49	3503.585	168.466	50	3532.624	191.031
51	3547.606	3420.156	52	3563.601	751.638	53	3564.240	189.805	54	4150.975	625.380	55	4166.982	598.665
56	4182.974	159.545												

Matched Sequences:

Unmatched

MG11_6

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFMAAKKHLEINPDHSIIETLRQKAEADKNDKSVKDLVILLYETALLSSGFSLEDPQTHANRIYRMIKLGLGIDEDDPTADDTSAAVTEEMPPLEGDDDTSRMEEVD

Digest Results

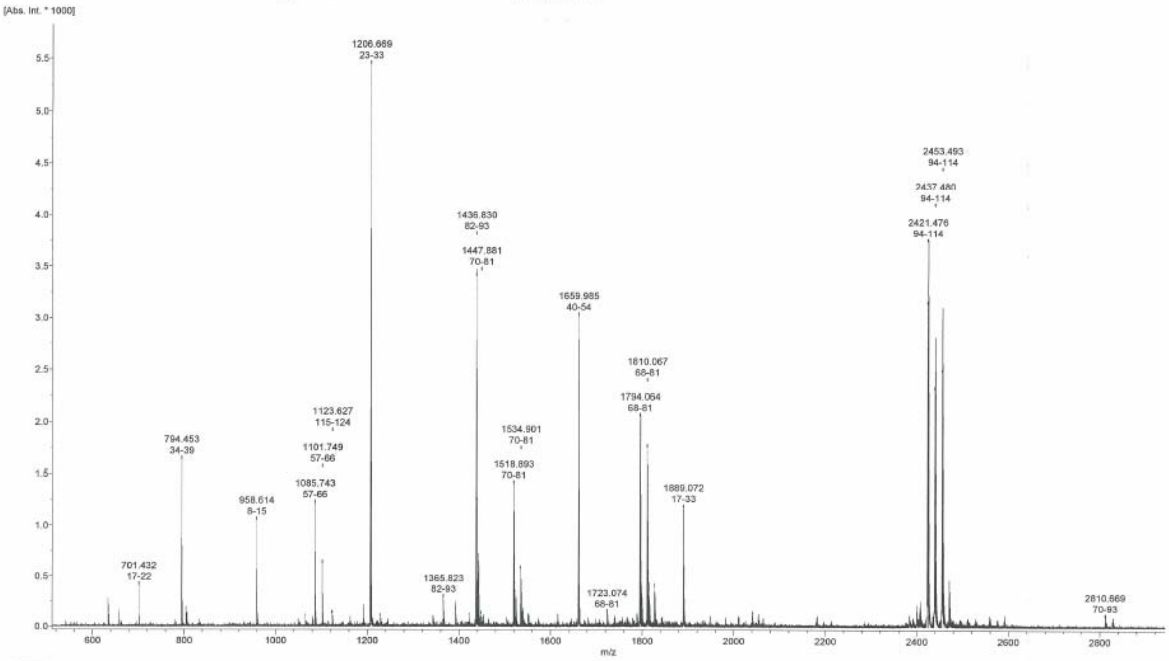
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. Dev.(Da) Dev.(ppm) Range P Sequence

peak 31 1900.030 1899.889 537.558 0.140 73.677 1 - 17 0 MGSSHHHHHHSSGLVPR
peak 16 1535.706 1535.651 7509.924 0.055 35.585 18 - 32 0 GSHMASMTGGQQMGR
peak 17 1551.735 1551.646 4353.855 0.088 57.042 18 - 32 0 GSHMASMTGGQQMGR 7: Oxidation (M)
peak 19 1567.749 1567.641 2017.238 0.107 68.414 18 - 32 0 GSHMASMTGGQQMGR 4: Oxidation (M) 7: Oxidation (M)
peak 20 1583.751 1583.636 437.949 0.115 72.667 18 - 32 0 GSHMASMTGGQQMGR 4: Oxidation (M) 7: Oxidation (M) 13: Oxidation (M)
peak 12 840.383 840.392 1506.706 -0.010 -11.733 33 - 40 0 GSEFMAAK
peak 13 856.389 856.387 311.128 0.002 1.868 33 - 40 0 GSEFMAAK 5: Oxidation (M)
peak 32 1915.049 1915.040 17322.028 0.009 4.764 41 - 56 1 KHLEINPDHSIIETLR
peak 24 1786.957 1786.945 22611.481 0.012 6.835 42 - 56 0 HLEINPDHSIIETLR
peak 48 3316.791 3316.742 550.258 0.049 14.635 67 - 96 1 SVKDLVILLYETALLSSGFSLEDPQTHANR
peak 43 3002.584 3002.547 14086.416 0.037 12.279 70 - 96 0 DLVILLYETALLSSGFSLEDPQTHANR
peak 51 3547.606 3547.539 3420.156 0.066 18.710 103 - 136 0 LGLGIDEDDPTADDTSAAVTEEMPPLEGDDDTSR
peak 52 3563.601 3563.534 751.638 0.067 18.820 103 - 136 0 LGLGIDEDDPTADDTSAAVTEEMPPLEGDDDTSR 23: Oxidation (M)
peak 54 4150.975 4150.760 625.380 0.214 51.670 103 - 141 1 LGLGIDEDDPTADDTSAAVTEEMPPLEGDDDTSRMEEVD
peak 55 4166.982 4166.755 598.665 0.227 54.378 103 - 141 1 LGLGIDEDDPTADDTSAAVTEEMPPLEGDDDTSRMEEVD 23: Oxidation (M)
peak 56 4182.974 4182.750 159.545 0.224 53.540 103 - 141 1 LGLGIDEDDPTADDTSAAVTEEMPPLEGDDDTSRMEEVD 23: Oxidation (M) 35: Oxidation (M)

FKBP37.7$^{1\text{-}166\Delta100\text{-}144}$

FileName: D:\Data\1202\LIN\11_7\0_L8\1\1SRef\pdata\1\1r

Sequence Name:	MG11_7	Parentmass:		Mass Error:		MH+ (mono):	1.008
MH+ (avg):	1.008	Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	1.000	Number of Peaks:	52
Above Threshold:		Assigned Peaks:		Not assigned Peaks:			

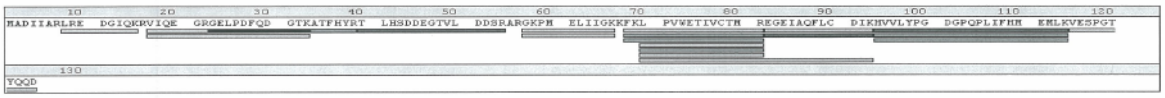


FileName: D:\Data\1202\LIN\11_7\0_L8\1\1SRef\pdata\1\1r

Sequence data:

MG11_7

Intensity Coverage:	85.0 % (31166 cnts)	Sequence Coverage MS:	91.1%
Sequence Coverage MS/MS:	0.0%	pI (isoelectric point):	5.2



Display Parameter:

Sequence Name:	MG11_7	MH+ (mono):	1.008	MH+ (avg):	1.008	Threshold (a.i.):	0.000
Tolerance (Da):	1.000	Number of Peaks:	52				

Peaklist:

Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity
1	634.265	271.782	2	635.272	137.488	3	658.437	159.699	4	701.432	400.064	5	794.453	1605.269
6	804.273	194.154	7	806.273	99.878	8	958.614	1041.619	9	1048.630	82.970	10	1064.626	94.007
11	1085.743	1151.227	12	1101.749	602.165	13	1123.627	123.713	14	1162.689	77.477	15	1191.635	155.248
16	1206.669	5262.423	17	1228.673	94.946	18	1342.726	84.448	19	1365.823	233.469	20	1391.899	171.051
21	1421.741	107.427	22	1436.830	3272.128	23	1441.814	698.320	24	1447.881	120.687	25	1452.836	105.313
26	1518.893	1380.571	27	1523.824	328.519	28	1534.901	551.582	29	1539.948	142.121	30	1550.855	121.246
31	1659.985	2887.060	32	1723.074	117.030	33	1788.061	111.590	34	1794.064	1954.750	35	1797.089	143.393
36	1799.029	213.866	37	1810.067	1690.714	38	1815.043	330.875	39	1826.071	376.624	40	1889.072	1088.861
41	2040.093	123.992	42	2180.253	80.198	43	2399.194	108.216	44	2405.427	159.426	45	2421.476	3018.174
46	2424.425	293.687	47	2437.480	2222.431	48	2453.493	2384.193	49	2457.477	93.934	50	2469.483	288.996
51	2557.489	60.731	52	2810.669	57.780									

Matched Sequences:

Unmatched

MG11_7

MADIIARLREDGIQKRVIQEGRGELPDFQDGTKATFHYRTLHSDDEGTVLDDSRARGKPMELIIGKKFKLPVWETIVCTMREGEIAQFLCDIKHVVLYPGDGPQPLIFHMEMLKVESPGTYQQD

Digest Results

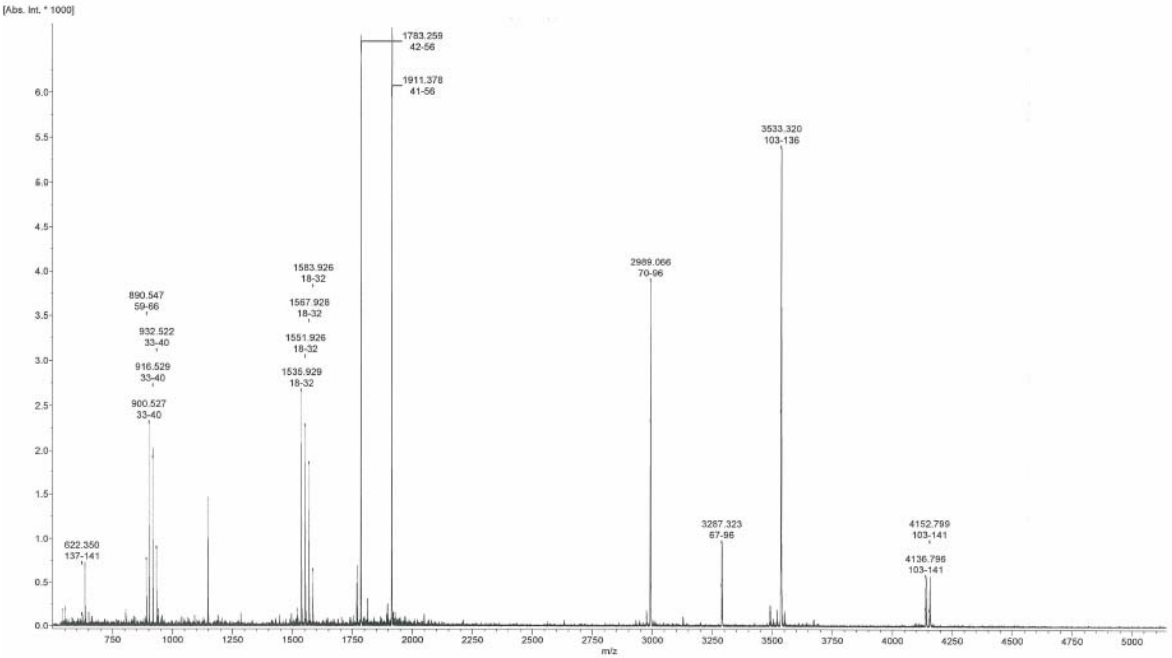
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. Dev.(Da) Dev.(ppm) Range P Sequence

peak 8 958.614 958.532 1041.619 0.082 85.209 8 - 15 1 LREDGIQK
peak 4 701.432 701.394 400.064 0.037 53.526 17 - 22 0 VIQEGR
peak 40 1889.072 1888.940 1088.861 0.132 69.887 17 - 33 1 VIQEGRGELPDFQDGTK
peak 16 1206.669 1206.564 5262.423 0.104 86.491 23 - 33 0 GELPDFQDGTK
peak 5 794.453 794.394 1605.269 0.058 73.054 34 - 39 0 ATFHYR
peak 31 1659.985 1659.746 2887.060 0.239 143.923 40 - 54 0 TLHSDDEGTVLDDSR
peak 11 1085.743 1085.639 1151.227 0.104 95.464 57 - 66 1 GKPMELIIGK
peak 12 1101.749 1101.634 602.165 0.115 104.742 57 - 66 1 GKPMELIIGK 4: Oxidation (M)
peak 32 1723.074 1722.907 117.030 0.166 96.541 68 - 81 1 FKLPVWETIVCTMR
peak 34 1794.064 1793.944 1954.750 0.119 66.434 68 - 81 1 FKLPVWETIVCTMR 11: Propionamide (C)
peak 37 1810.067 1809.939 1690.714 0.127 70.246 68 - 81 1 FKLPVWETIVCTMR 11: Propionamide (C) 13: Oxidation (M)
peak 24 1447.881 1447.744 120.687 0.137 94.708 70 - 81 0 LPVWETIVCTMR
peak 26 1518.893 1518.781 1380.571 0.112 73.819 70 - 81 0 LPVWETIVCTMR 9: Propionamide (C)
peak 28 1534.901 1534.776 551.582 0.124 81.055 70 - 81 0 LPVWETIVCTMR 9: Propionamide (C) 11: Oxidation (M)
peak 52 2810.669 2810.393 57.780 0.276 98.175 70 - 93 1 LPVWETIVCTMREGEIAQFLCDIK 11: Oxidation (M)
peak 19 1365.823 1365.672 233.469 0.150 110.231 82 - 93 0 EGEIAQFLCDIK
peak 22 1436.830 1436.709 3272.128 0.120 83.808 82 - 93 0 EGEIAQFLCDIK 9: Propionamide (C)
peak 45 2421.476 2421.246 3018.174 0.230 95.014 94 - 114 0 HVVLYPGDGPQPLIFHMEMLK
peak 47 2437.480 2437.241 2222.431 0.239 98.037 94 - 114 0 HVVLYPGDGPQPLIFHMEMLK 19: Oxidation (M)
peak 48 2453.493 2453.236 2384.193 0.257 104.809 94 - 114 0 HVVLYPGDGPQPLIFHMEMLK 17: Oxidation (M) 19: Oxidation (M)
peak 13 1123.627 1123.490 123.713 0.136 121.052 115 - 124 0 VESPGTYQQD

His_6-HSP90α$^{628-732}$

FileName: D:\Data\1202\LIN\11_8\0_L9\1\1SRef\pdata\1\1r

Sequence Name:	MG8	Parentmass:		Mass Error:		MH+ (mono):	1.008
MH+ (avg):	1.008	Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	1.000	Number of Peaks:	31
Above Threshold:		Assigned Peaks:		Not assigned Peaks:			



FileName: D:\Data\1202\LIN\11_8\0_L9\1\1SRef\pdata\1\1r

Sequence data:

MG8

Intensity Coverage:	87.8 % (30133 cnts)	Sequence Coverage MS:	82.3%
Sequence Coverage MS/MS:	0.0%	pI (isoelectric point):	4.9

```
        10        20        30        40        50        60        70        80        90       100       110       120
MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MASMTGGQQM GRGSEFMMAK KHLEINPDHP IVETLRQKAE ADKNDKAVKD LVVLLFETAL LSSGFSLEDP QTHSNRIYRM IKLGLGIDED EVAAEEPNAA
        130       140       150
VPDEIPPLEG DEDASRMEEV D
```

Display Parameter:

Sequence Name:	MG8	MH+ (mono):	1.008	MH+ (avg):	1.008	Threshold (a.i.):	0.000
Tolerance (Da):	1.000	Number of Peaks:	31				

Peaklist:

Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity
1	541.132	164.893	2	553.107	162.991	3	622.350	112.160	4	634.361	619.527	5	804.368	192.299
6	890.547	720.818	7	900.527	2242.660	8	916.529	1836.278	9	932.522	846.704	10	934.488	137.777
11	939.526	148.224	12	1146.760	1398.443	13	1520.894	157.984	14	1535.929	2581.885	15	1551.926	2177.699
16	1567.928	1758.846	17	1583.926	600.291	18	1769.152	516.277	19	1783.259	6189.761	20	1811.152	243.049
21	1856.320	168.553	22	1911.378	5717.632	23	2973.961	88.597	24	2989.066	2233.567	25	3287.323	437.941
26	3469.285	94.278	27	3518.286	55.927	28	3533.320	2334.131	29	3549.299	49.026	30	4136.796	179.041
31	4152.799	163.414												

Matched Sequences:

Unmatched

MG8

```
MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFMMAKKHLEINPDHPIVETLRQKAEADKNDKAVKDLVVLLFETALLSSGFSLEDPQTHSNRIYRMIKLGLGIDEDEVAAEEPNAAVPDEIPPLEGDEDASRMEEVD
```

Digest Results

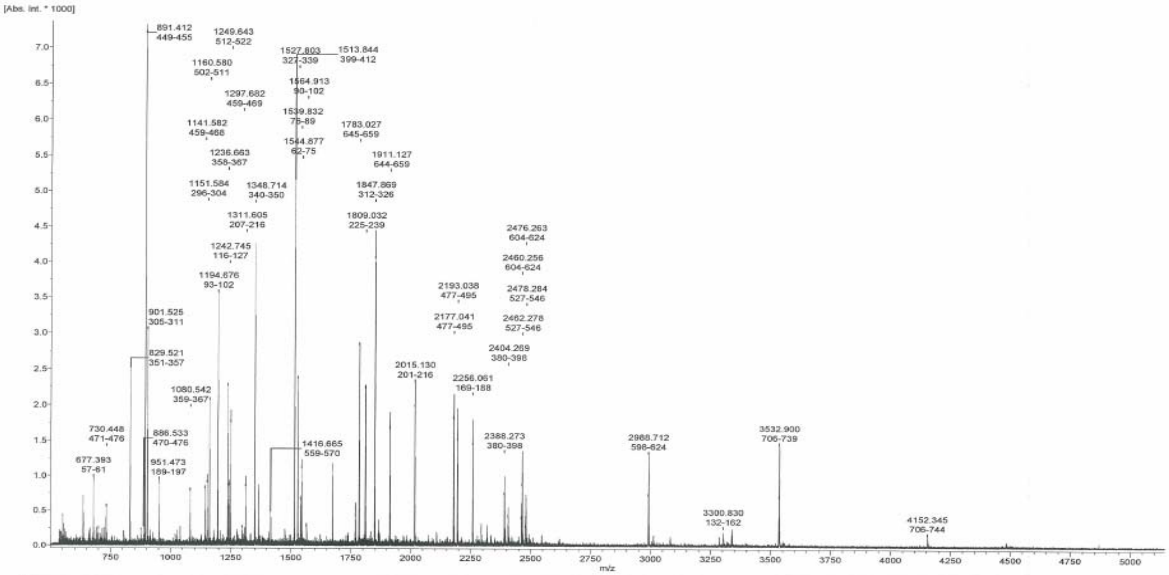
Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. Dev.(Da) Dev.(ppm) Range P Sequence

```
 peak 14 1535.929 1535.651 2581.885   0.278  180.959 18 - 32 0 GSHMASMTGGQQMGR
 peak 15 1551.926 1551.646 2177.699   0.279  180.064 18 - 32 0 GSHMASMTGGQQMGR 7: Oxidation (M)
 peak 16 1567.928 1567.641 1758.846   0.287  183.137 18 - 32 0 GSHMASMTGGQQMGR 4: Oxidation (M) 7: Oxidation (M)
 peak 17 1583.926 1583.636  600.291   0.289  182.738 18 - 32 0 GSHMASMTGGQQMGR 4: Oxidation (M) 7: Oxidation (M) 13: Oxidation (M)
  peak 7  900.527  900.395 2242.660   0.131  146.031 33 - 40 0 GSEFMMAK
  peak 8  916.529  916.390 1836.278   0.138  151.006 33 - 40 0 GSEFMMAK 6: Oxidation (M)
  peak 9  932.522  932.385  846.704   0.136  146.096 33 - 40 0 GSEFMMAK 5: Oxidation (M) 6: Oxidation (M)
 peak 22 1911.378 1911.045 5717.632   0.333  174.285 41 - 56 1 KHLEINPDHPIVETLR
 peak 19 1783.259 1782.950 6189.761   0.309  173.253 42 - 56 0 HLEINPDHPIVETLR
  peak 6  890.547  890.421  720.818   0.125  140.965 59 - 66 1 AEADKNDK
 peak 25 3287.323 3286.732  437.941   0.591  179.907 67 - 96 1 AVKDLVVLLFETALLSSGFSLEDPQTHSNR
 peak 24 2989.066 2988.531 2233.567   0.534  178.815 70 - 96 0 DLVVLLFETALLSSGFSLEDPQTHSNR
 peak 28 3533.320 3532.645 2334.131   0.674  190.885 103 - 136 0 LGLGIDEDEVAAEEPNAAVPDEIPPLEGDEDASR
 peak 30 4136.796 4135.866  179.041   0.930  224.817 103 - 141 1 LGLGIDEDEVAAEEPNAAVPDEIPPLEGDEDASRMEEVD
 peak 31 4152.799 4151.861  163.414   0.937  225.832 103 - 141 1 LGLGIDEDEVAAEEPNAAVPDEIPPLEGDEDASRMEEVD 35: Oxidation (M)
  peak 3  622.350  622.239  112.160   0.110  177.508 137 - 141 0 MEEVD
```

His_6-HSP90β$^{1-724}$

FileName: D:\Data\1202\LIN\11_9\0_L10\1\1SRef\pdata\1\1r

Sequence Name:	MG9	Parentmass:		Mass Error:		MH+ (mono):	1.008
MH+ (avg):	1.008	Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	1.000	Number of Peaks:	55
Above Threshold:		Assigned Peaks:		Not assigned Peaks:			



FileName: D:\Data\1202\LIN\11_9\0_L10\1\1SRef\pdata\1\1r

Sequence data:

MG9

Intensity Coverage:	91.2 % (62294 cnts)	Sequence Coverage MS:	63.2%
Sequence Coverage MS/MS:	0.0%	pI (isoelectric point):	5.0

```
        10         20         30         40         50         60         70         80         90        100        110        120
MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MPEEVHHGEE EVETFAFQAE IAQLMSLIIN TFYSNKEIFL RELISNASDA LDKIRYESLT DPSKLDSGKE LKIDIIPNPQ ERTLTLVDTG IGMTKADLIN
       130        140        150        160        170        180        190        200        210        220        230        240
NLGTIAKSGT KAFMEALQAG ADISMIGQFG VGFYSAYLVA EKVVVITKHN DDEQYAWESS AGGSFTVRAD HGEPIGRGTK VILHLKEDQT EYLEERRVKE VVKKHSQFIG YPITLYLEKE
       250        260        270        280        290        300        310        320        330        340        350        360
REKEISDDEA EEEKGEKEEK DKDDEEKPKI EDVGSDEEDD SGKDKKKKTK KIKEKYIDQE ELNKTKPIWT RNPDDITQEE YGEFYKSLTN DWEDHLAVKH FSVEGQLEFR ALLFIPRRAP
       370        380        390        400        410        420        430        440        450        460        470        480
FDLFENKKKK NNIKLYVRRV FIMDSCDELI PEYLNFIRGV VDSEDLPLNI SREMLQQSKI LKVIRKNIVK KCLELFSELA EDKENYKKFY EAFSKNLKLG IHEDSTNRRR LSELLRYHTS
       490        500        510        520        530        540        550        560        570        580        590        600
QSGDEMTSLS EYVSRMKETQ KSIYYITGES KEQVANSAFV ERVRKRGFEV VYMTEPIDEY CVQQLKEFDG KSLVSVTKEG LELPEDEEEK KKMEESKAKF ENLCKLMKEI LDKKVEKVTI
       610        620        630        640        650        660        670        680        690        700        710        720
SNRLVESPCC IVTSTYGWTA NMERIMKAQA LRDNSIMGYM MAKKHLEINP DHPIVETLRQ KAEADKNDKA VKDLVVLLFE TALLSSGFSL EDPQTHSNRI YRMIKLGLGI DEDEVAAEEP
       730        740        750
NAAVPDEIPP LEGDEDASRM EEVD
```

Display Parameter:

Sequence Name:	MG9	MH+ (mono):	1.008	MH+ (avg):	1.008	Threshold (a.i.):	0.000
Tolerance (Da):	1.000	Number of Peaks:	55				

Peaklist:

Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity
1	550.069	388.699	2	553.049	206.695	3	634.299	671.758	4	677.393	882.854	5	699.022	227.022
6	730.448	529.522	7	829.521	2418.911	8	876.399	217.866	9	886.533	259.686	10	891.412	7097.587
11	901.525	2929.796	12	951.473	853.492	13	1080.542	753.619	14	1141.582	776.926	15	1151.584	861.514
16	1160.580	1986.109	17	1194.676	3430.231	18	1236.663	2177.855	19	1242.745	823.164	20	1249.643	1686.941
21	1297.682	242.815	22	1311.605	811.918	23	1348.714	4093.258	24	1364.763	768.364	25	1416.665	462.445
26	1513.844	4957.760	27	1527.803	2276.759	28	1539.832	628.670	29	1544.877	1063.805	30	1564.913	257.758
31	1672.883	1028.451	32	1768.921	398.859	33	1783.027	2717.551	34	1809.032	2146.455	35	1847.869	3891.774
36	1865.928	261.054	37	1911.127	1604.883	38	2015.130	1899.941	39	2177.041	1738.592	40	2193.038	1444.558
41	2256.061	1387.865	42	2293.161	184.812	43	2316.134	173.425	44	2388.273	699.407	45	2393.209	132.830
46	2404.269	394.078	47	2460.256	372.679	48	2462.278	825.106	49	2476.263	249.048	50	2478.284	384.013
51	2988.712	688.746	52	3300.830	93.059	53	3336.665	112.004	54	3532.900	658.066	55	4152.345	43.864

Matched Sequences:

Unmatched

MG9

```
MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMPEEVHHGEEEVETFAFQAEIAQLMSLIINTFYSNKEIFLRELISNASDALDKIRYESLTDPSKLDSGKELKIDIIPNPQERTLTLVDTGIGMTKADLINNLGTIAKSGTKAFMEALQAGADISMIGQFGVGFYSAYLVAEKVVVITKHNDDEQYAWESSAGGSFTVRADHGEPIGRG
TKVILHLKEDQTEYLEERRVKEVVKKHSQFIGYPITLYLEKEREKEISDDEAEEEKGEKEEEKDKDDEEKPKIEDVGSDEEDDSGKDKKKKTKKIKEKYIDQEELNKTKPIWTRNPDDITQEEYGEFYKSLTNDWEDHLAVKHFSVEGQLEFRALLFIPRRAPFDLFENKKKKNNIKLYVRRVFIMDSCDELIPEYLNF
IRGVVDSEDLPLNISREMLQQSKILKVIRKNIVKKCLELFSELAEDKENYKKFYEAFSKNLKLGIHEDSTNRRRLSELLRYHTSQSGDEMTSLSEYVSRMKETQKSIYYITGESKEQVANSAFVERVRKRGFEVVYMTEPIDEYCVQQLKEFDGKSLVSVTKEGLELPEDEEEKKKMEESKAKFENLCKLMKEILDKK
VEKVTISNRLVESPCCIVTSTYGWTANMERIMKAQALRDNSIMGYMMAKKHLEINPDHPIVETLRQKAEADKNDKAVKDLVVLLFETALLSSGFSLEDEQTHSNRIYRMIKLGLGIDEDEVAAEEPNAAVPDEIPPLEGDEDASRMEEVD
```

Digest Results

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. Dev.(Da) Dev.(ppm) Range P Sequence

```
 peak 4  677.393 677.398 882.854  -0.005  -7.740 57 - 61 0 EIFLR
 peak 29 1544.877 1544.828 1063.805  0.049  31.789 62 - 75 1 ELISNASDALDKIR
 peak 28 1539.832 1539.754 628.670  0.078  50.394 76 - 89 1 YESLTDPSKLDSGK
 peak 30 1564.913 1564.869  257.758  0.043  27.713 90 - 102 1 ELKIDIIPNPQER
 peak 17 1194.676 1194.648 3430.231  0.028  23.283 93 - 102 0 IDIIPNPQER
```

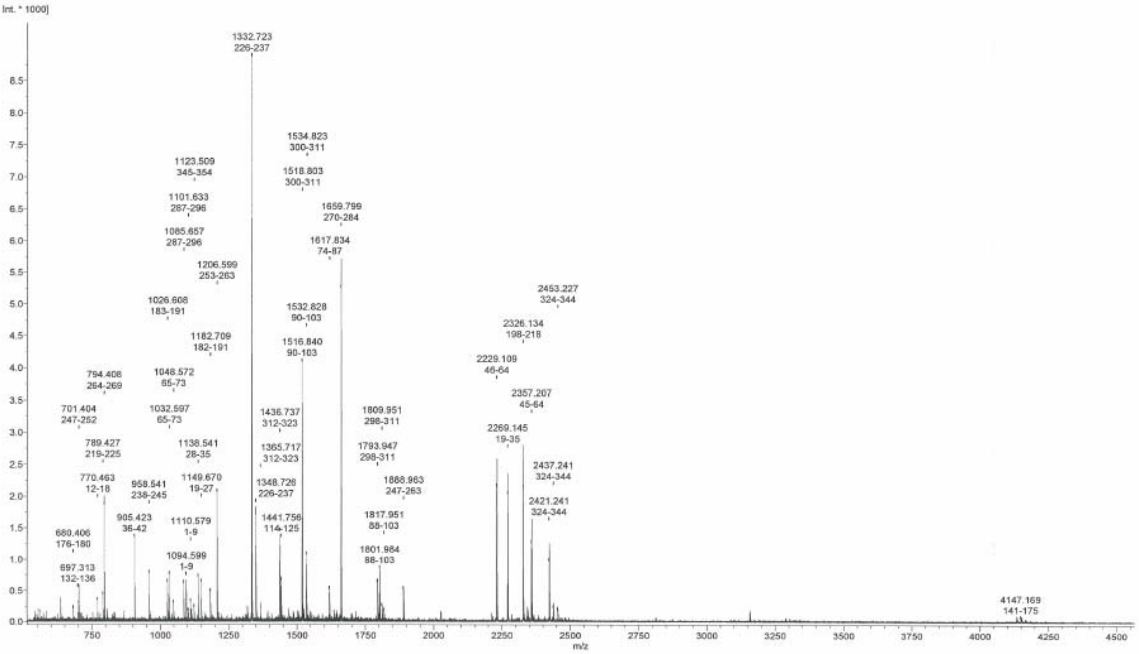
FileName: D:\Data\1202\LIN\11_9\0_L10\1\1SRef\pdata\1\1r

```
 peak 19 1242.745 1242.705  823.164  0.039  31.429 116 - 127 0 ADLINNLGTIAK
 peak 52 3300.830 3300.596   93.059  0.234  71.015 132 - 162 0 AFMEALQAGADISMIGQFGVGFYSAYLVAEK  14: Oxidation (M)
 peak 41 2256.061 2255.959 1387.865  0.101  44.936 169 - 188 0 HNDDEQYAWESSAGGSFTVR
 peak 12  951.473  951.464  853.492  0.008   8.463 189 - 197 0 ADHGEPIGR
 peak 38 2015.130 2015.044 1899.941  0.085  42.170 201 - 216 1 VILHLKEDQTEYLEER
 peak 22 1311.605 1311.570  811.918  0.034  26.222 207 - 216 0 EDQTEYLEER
 peak 34 1809.032 1808.958 2146.455  0.074  40.820 225 - 239 0 HSQFIGYPITLYLEK
 peak 15 1151.584 1151.558  861.514  0.025  22.065 296 - 304 0 YIDQEELNK
 peak 11  901.525  901.525 2929.796  -0.001  -0.708 305 - 311 1 TKPIWTR
 peak 35 1847.869 1847.797 3891.774  0.071  38.682 312 - 326 0 NPDDITQEEYGEFYK
 peak 27 1527.803 1527.744 2276.759  0.059  38.451 327 - 339 0 SLTNDWEDHLAVK
 peak 23 1348.714 1348.664 4093.258  0.049  36.580 340 - 350 0 HFSVEGQLEFR
 peak 7  829.521  829.529 2418.911  -0.009  -11.124 351 - 357 0 ALLFIPR
 peak 18 1236.663 1236.637 2177.855  0.026  20.654 358 - 367 1 RAPFDLFENK
 peak 13 1080.542 1080.536  753.619  0.005   5.037 359 - 367 0 APFDLFENK
 peak 44 2388.273 2388.161  699.407  0.111  46.309 380 - 398 0 VFIMDSCDELIPEYLNFIR  7: Propionamide (C)
 peak 46 2404.269 2404.156  394.078  0.112  46.631 380 - 398 0 VFIMDSCDELIPEYLNFIR  4: Oxidation (M) 7: Propionamide (C)
 peak 26 1513.844 1513.786 4957.760  0.058  38.141 399 - 412 0 GVVDSEDLPLNISR
 peak 10  891.412  891.425 7097.587  -0.013  -14.915 449 - 455 0 FYEAFSK
 peak 14 1141.582 1141.560  776.926  0.022  19.300 459 - 468 0 LGIHEDSTNR
 peak 21 1297.682 1297.661  242.815  0.021  16.164 459 - 469 1 LGIHEDSTNRR
 peak 9  886.533  886.547  259.686  -0.014  -16.011 470 - 476 1 RLSELLR
 peak 6  730.448  730.446  529.522  0.002   2.651 471 - 476 0 LSELLR
 peak 39 2177.041 2176.945 1738.592  0.096  43.964 477 - 495 0 YHTSQSGDEMTSLSEYVSR
 peak 40 2193.038 2192.940 1444.558  0.098  44.552 477 - 495 0 YHTSQSGDEMTSLSEYVSR  10: Oxidation (M)
 peak 16 1160.580 1160.583 1986.109  -0.004  -3.629 502 - 511 0 SIYYITGESK
 peak 20 1249.643 1249.617 1686.941  0.025  20.023 512 - 522 0 EQVANSAFVER
 peak 48 2462.278 2462.162  825.106  0.115  46.845 527 - 546 0 GFEVVYMTEPIDEYCVQQLK  15: Propionamide (C)
 peak 50 2478.284 2478.157  384.013  0.127  51.238 527 - 546 0 GFEVVYMTEPIDEYCVQQLK  7: Oxidation (M) 15: Propionamide (C)
 peak 25 1416.665 1416.638  462.445  0.027  19.139 559 - 570 0 EGLELPEDEEEK
 peak 29 1544.877 1544.733 1063.805  0.144  93.485 559 - 571 1 EGLELPEDEEEKK
 peak 14 1141.582 1141.574  776.926  0.007   6.335 580 - 588 1 FENLCKLMK  8: Oxidation (M)
 peak 51 2988.712 2988.438  688.746  0.274  91.803 598 - 624 1 VTISNRLVSSPCCIVTSTYGWTANMER
 peak 47 2460.256 2460.136  372.679  0.120  48.897 604 - 624 0 LVSSPCCIVTSTYGWTANMER  6: Propionamide (C) 7: Propionamide (C)
 peak 49 2476.263 2476.131  249.048  0.132  53.147 604 - 624 0 LVSSPCCIVTSTYGWTANMER  6: Propionamide (C) 7: Propionamide (C) 19: Oxidation (M)
 peak 37 1911.127 1911.045 1604.883  0.082  42.726 644 - 659 1 KHLEINPDHPIVETLR
 peak 33 1783.027 1782.950 2717.551  0.077  43.202 645 - 659 0 HLEINPDHPIVETLR
 peak 51 2988.712 2988.531  688.746  0.181  60.442 673 - 699 0 DLVVLLFETALLSSGFSLEDPQTHSNR
 peak 54 3532.900 3532.645  658.066  0.254  72.050 706 - 739 0 LGLGIDEDEVAAEEPNAAVPDEIPPLEGDEDASR
 peak 55 4152.345 4151.861   43.864  0.484 116.614 706 - 744 1 LGLGIDEDEVAAEEPNAAVPDEIPPLEGDEDASRMEEVD  35: Oxidation (M)
```

GST-FKBP37.7$^{1\text{-}166\Delta100\text{-}144}$

FileName: D:\Data\1202\LIN\11_10\0_L11\1\1SRef\pdata\1\1r

Sequence Name:	M10	Parentmass:		Mass Error:		MH+ (mono):	1.008
MH+ (avg):	1.008	Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	1.000	Number of Peaks:	59
Above Threshold:		Assigned Peaks:		Not assigned Peaks:			



FileName: D:\Data\1202\LIN\11_10\0_L11\1\1SRef\pdata\1\1r

Sequence data:

M10

Intensity Coverage:	92.0 % (46975 cnts)	Sequence Coverage MS:	90.1%
Sequence Coverage MS/MS:	0.0%	pI (isoelectric point):	5.5

```
        10        20        30        40        50        60        70        80        90       100       110       120
MSPILGYWKI  KGLVQPTRLL  LEYLEEKYEE  HLYERDEGDK  WRNKKFELGL  EFPNLPYYID  GDVKLTQSMA  IIRYIADKHN  MLGGCPKERA  EISMLEGAVL  DIRYGVSRIA  YSKDFETLKV
       130       140       150       160       170       180       190       200       210       220       230       240
DFLSKLPEML  KMFEDRLCHK  TYLNGDHVTH  PDFMLYDALD  VVLYMDPMCL  DAFPKLVCFK  KRIEAIPQID  KYLKSSKYIA  WPLQGWQATF  GGGDHPPKSD  LIEGRGIPEF  MADIIARLRE
       250       260       270       280       290       300       310       320       330       340       350       360
DGIQKRVIQE  GRGELPDFQD  GTKATFHYRT  LHSDDEGTVL  DDSRARGKPM  ELIIGKKFKL  PVWETIVCTM  REGEIAQFLC  DIKHVVLYPG  DGPQPLIFHM  EMLKVESPGT  YQQD
```

Display Parameter:

Sequence Name:	M10	MH+ (mono):	1.008	MH+ (avg):	1.008	Threshold (a.i.):	0.000
Tolerance (Da):	1.000	Number of Peaks:	59				

Peaklist:

Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity
1	541.039	143.822	2	553.024	170.633	3	559.040	146.509	4	634.296	393.789	5	680.406	203.932
6	697.313	305.600	7	701.404	529.912	8	770.463	329.363	9	789.427	417.215	10	794.408	1790.326
11	804.268	208.989	12	864.453	152.590	13	905.423	1308.204	14	958.541	747.838	15	963.532	151.723
16	1026.608	615.477	17	1032.597	733.839	18	1048.572	286.652	19	1085.657	592.524	20	1094.599	647.865
21	1101.633	164.370	22	1110.579	305.916	23	1123.509	221.466	24	1138.541	690.624	25	1149.670	615.192
26	1182.709	466.021	27	1206.599	1986.300	28	1317.711	251.708	29	1332.723	8574.483	30	1348.726	1645.501
31	1365.717	194.850	32	1436.737	1395.006	33	1441.756	637.527	34	1469.747	159.511	35	1516.840	3982.623
36	1518.803	1224.824	37	1523.752	150.889	38	1532.828	1034.136	39	1534.823	363.660	40	1617.834	504.496
41	1659.799	5048.013	42	1793.947	613.084	43	1801.984	828.169	44	1809.951	242.619	45	1817.951	168.477
46	1888.963	500.117	47	2024.946	137.578	48	2211.121	102.162	49	2229.109	2073.290	50	2269.145	1956.738
51	2326.134	2055.073	52	2342.147	180.350	53	2357.207	1210.639	54	2421.241	936.409	55	2437.241	207.766
56	2453.227	171.950	57	3155.588	101.574	58	4132.191	32.302	59	4147.169	35.007			

Matched Sequences:

Unmatched

M10

```
MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPQIDKYLKSSKY
IAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLIEGRGIPEFMADIIARLREGIQKRVIQEGRGELPDFQDGTKATFHYRTLHSDDEGTVLDDSRARGKPMELIIGKKFKLPVWETIVCTMREGEIAQFLCDIKHVVLYPGDGPQPLIFHMEMLKVESPGTYQQD
```

Digest Results

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. Dev.(Da) Dev.(ppm) Range P Sequence

```
 peak 20 1094.599 1094.570 647.865  0.028  25.525 1 - 9 0 MSPILGYWK
 peak 22 1110.579 1110.565 305.916  0.013  11.668 1 - 9 0 MSPILGYWK  1: Oxidation (M)
  peak 8  770.463  770.452 329.363  0.010  13.100 12 - 18 0 GLVQPTR
 peak 25 1149.670 1149.640 615.192  0.030  25.812 19 - 27 0 LLLEYLEEK
 peak 50 2269.145 2269.139 1956.738  0.006  2.559 19 - 35 1 LLLEYLEEKYEEHLYER
 peak 24 1138.541 1138.516 690.624  0.024  20.839 28 - 35 0 YEEHLYER
 peak 13  905.423  905.411 1308.204  0.012  12.807 36 - 42 1 DEGDKWR
 peak 53 2357.207 2357.206 1210.639  -0.000  -0.126 45 - 64 1 KFELGLEFPNLPYYIDGDVK
 peak 49 2229.109 2229.111 2073.290  -0.003  -1.130 46 - 64 0 FELGLEFPNLPYYIDGDVK
 peak 17 1032.597 1032.587  733.839  0.010  9.696 65 - 73 0 LTQSMAIIR
 peak 18 1048.572 1048.582  286.652  -0.011  -10.281 65 - 73 0 LTQSMAIIR 5: Oxidation (M)
 peak 40 1617.834 1617.788  504.496  0.046  28.460 74 - 87 1 YIADKHNMLGGCPK  12: Propionamide (C)
 peak 43 1801.984 1801.948  828.169  0.036  20.099 88 - 103 1 ERAEISMLEGAVLDIR
 peak 45 1817.951 1817.943  168.477  0.008  4.411 88 - 103 1 ERAEISMLEGAVLDIR  7: Oxidation (M)
 peak 35 1516.840 1516.804 3982.623  0.036  23.525 90 - 103 0 AEISMLEGAVLDIR
 peak 38 1532.828 1532.799 1034.136  0.028  18.459 90 - 103 0 AEISMLEGAVLDIR  5: Oxidation (M)
```

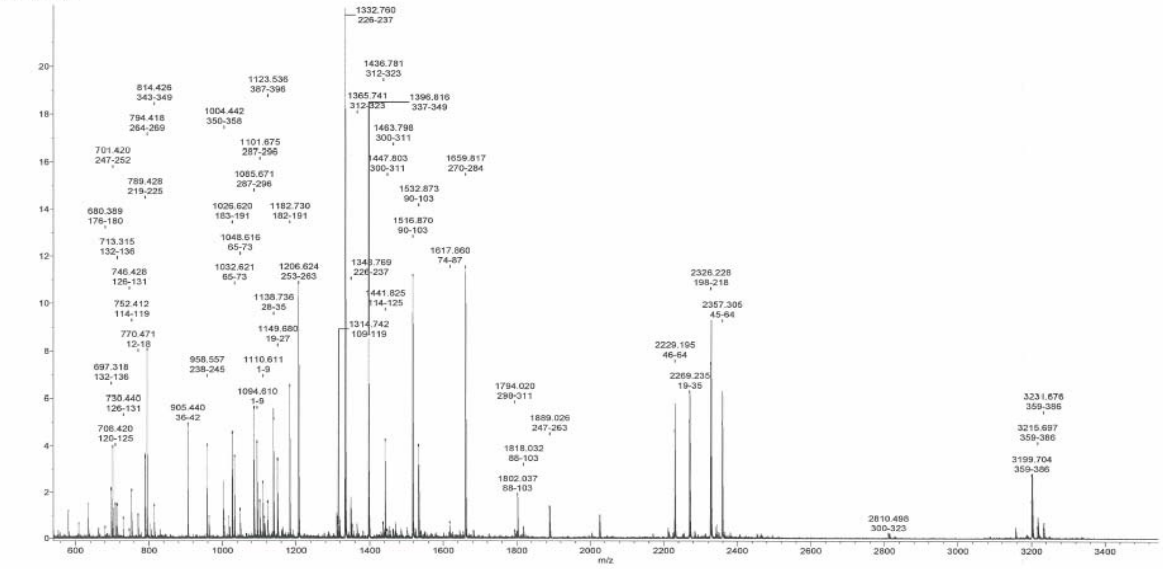
FileName: D:\Data\1202\LIN\11_10\0_L11\1\1SRef\pdata\1\1r

```
 peak 33 1441.756 1441.757  637.527  -0.002  -1.516 114 - 125 1 DFETLKVDFLSK
  peak 6  697.313  697.297  305.600  0.015  21.776 132 - 136 0 MFEDR
 peak 59 4147.169 4146.900   35.007  0.269  64.783 141 - 175 0 TYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPK  14: Oxidation (M) 29: Propionamide (C)
  peak 5  680.406  680.380  203.932  0.026  38.111 176 - 180 0 LVCFK  3: Propionamide (C)
 peak 26 1182.709 1182.684  466.021  0.024  20.718 182 - 191 1 RIEAIPQIDK
 peak 16 1026.608 1026.583  615.477  0.024  23.720 183 - 191 0 IEAIPQIDK
 peak 51 2326.134 2326.140 2055.073  -0.007  -2.842 198 - 218 0 YIAWPLQGWQATFGGGDHPPK
  peak 9  789.427  789.410  417.215  0.017  21.280 219 - 225 0 SDLIEGR
 peak 29 1332.723 1332.698 8574.483  0.024  17.973 226 - 237 0 GIPEFMADIIAR
 peak 30 1348.726 1348.693 1645.501  0.032  23.749 226 - 237 0 GIPEFMADIIAR  6: Oxidation (M)
 peak 40 1617.834 1617.878  504.496  -0.045  -27.532 226 - 239 1 GIPEFMADIIARLR  6: Oxidation (M)
 peak 14  958.541  958.532  747.838  0.009  9.097 238 - 245 1 LREDGIQK
  peak 7  701.404  701.394  529.912  0.009  13.217 247 - 252 0 VIQEGR
 peak 46 1888.963 1888.940  500.117  0.023  12.001 247 - 263 1 VIQEGRGELPDFQDGTK
 peak 27 1206.599 1206.564 1986.300  0.035  29.119 253 - 263 0 GELPDFQDGTK
 peak 10  794.408  794.394 1790.326  0.013  16.544 264 - 269 0 ATFHYR
 peak 41 1659.799 1659.746 5048.013  0.052  31.535 270 - 284 0 TLHSDDEGTVLDDSR
 peak 19 1085.657 1085.639  592.524  0.018  16.175 287 - 296 1 GKPMELIIGK
 peak 21 1101.633 1101.634  164.370  -0.001  -1.231 287 - 296 1 GKPMELIIGK  4: Oxidation (M)
 peak 42 1793.947 1793.944  613.084  0.003  1.501 298 - 311 1 FKLPVWETIVCTMR  11: Propionamide (C)
 peak 44 1809.951 1809.939  242.619  0.012  6.496 298 - 311 1 FKLPVWETIVCTMR  11: Propionamide (C) 13: Oxidation (M)
 peak 36 1518.803 1518.781 1224.824  0.022  14.268 300 - 311 0 LPVWETIVCTMR  9: Propionamide (C)
 peak 39 1534.823 1534.776  363.660  0.047  30.658 300 - 311 0 LPVWETIVCTMR  9: Propionamide (C) 11: Oxidation (M)
 peak 31 1365.717 1365.672  194.850  0.045  32.665 312 - 323 0 EGEIAQFLCDIK
 peak 32 1436.737 1436.709 1395.006  0.027  19.062 312 - 323 0 EGEIAQFLCDIK  9: Propionamide (C)
 peak 54 2421.241 2421.246  936.409  -0.005  -2.113 324 - 344 0 HVVLYPGDGPQPLIFHMEMLK
 peak 55 2437.241 2437.241  207.766  -0.001  -0.217 324 - 344 0 HVVLYPGDGPQPLIFHMEMLK  19: Oxidation (M)
 peak 56 2453.227 2453.236  171.950  -0.010  -3.922 324 - 344 0 HVVLYPGDGPQPLIFHMEMLK  17: Oxidation (M) 19: Oxidation (M)
 peak 23 1123.509 1123.490  221.466  0.018  16.155 345 - 354 0 VESPGTYQQD
```

GST-FKBP37.7[1-166]

FileName: D:\Data\1202\LIN\11_11\0_L12\1\1SRef\pdata\1\1r

Sequence Name:		Parentmass:		Mass Error:		MH+ (mono):	1.008
MH+ (avg):	1.008	Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	1.000	Number of Peaks:	91
Above Threshold:		Assigned Peaks:		Not assigned Peaks:			



FileName: D:\Data\1202\LIN\11_11\0_L12\1\1SRef\pdata\1\1r

Sequence data:

Intensity Coverage:	89.5 % (176916 cnts)	Sequence Coverage MS:	84.3%
Sequence Coverage MS/MS:	0.0%	pI (isoelectric point):	5.8

```
        10        20        30        40        50        60        70        80        90       100       110       120
MSPILGYWKI  KGLVQPTRLL  LEYLEEKYEE  HLYERDEGDK  WRNKKFELGL  EFPNLPYYID  GDVKLTQSMA  IIRYIADKHN  MLGGCPKERA  EISMLEGAVL  DIRYGVSRIA  YSKDFETLKV
       130       140       150       160       170       180       190       200       210       220       230       240
DFLSKLPEHL  KMFEDRLCHK  TYLNGDHVTH  PDFMLYDALD  VVLYMDPMCL  DAFPKLVCFK  ERIEAIPQID  KVLKSSSKYIA  WPLQGWQATF  GGGDHPPKSD  LIEGRGIPEF  MADIIARLRE
       250       260       270       280       290       300       310       320       330       340       350       360
DGIQKRVIQE  GRGELPDFQD  GTKATFHYRT  LHSDDEGTVL  DDSRARGKPM  ELIIGKKFKL  PVWETIVCTH  REGEIAQFLC  DIKHVVLYPL  VAKSLRNIAV  GKDPLEGQRH  CCGVAQMREH
       370       380       390       400
SSLGHADLDA  LQQNPQPLIF  HMEMLKVESP  GTYQQD
```

Display Parameter:

MH+ (mono):	1.008	MH+ (avg):	1.008	Threshold (a.i.):	0.000	Tolerance (Da):	1.000
Number of Peaks:	91						

Peaklist:

Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity	Peak	Mass	Intensity
1	541.067	287.638	2	553.067	298.966	3	581.064	1089.199	4	609.139	565.867	5	634.296	1390.309
6	635.340	416.270	7	663.477	374.720	8	680.389	404.205	9	697.318	1972.613	10	701.420	3727.461
11	708.420	1372.874	12	713.315	1343.778	13	730.440	794.440	14	746.428	295.722	15	752.412	1941.643
16	770.471	919.806	17	789.428	3330.624	18	794.418	7684.756	19	804.302	625.320	20	814.426	1319.581
21	905.440	4601.231	22	958.557	3802.215	23	963.566	905.156	24	1002.440	2394.255	25	1004.442	749.744
26	1018.444	876.137	27	1020.620	4323.994	28	1032.621	3349.490	29	1048.616	1143.851	30	1085.671	5345.939
31	1094.610	3940.826	32	1101.675	1502.342	33	1110.611	2277.121	34	1114.663	848.068	35	1123.536	1465.395
36	1138.736	4879.852	37	1149.680	3226.553	38	1160.709	340.920	39	1182.730	6231.043	40	1206.624	10405.386
41	1310.832	1080.853	42	1314.742	566.797	43	1317.744	916.181	44	1332.760	22585.350	45	1334.778	2502.233
46	1348.769	1739.100	47	1354.743	453.288	48	1365.741	519.173	49	1381.783	276.990	50	1396.816	8347.175
51	1436.781	582.482	52	1441.825	4098.922	53	1447.803	287.670	54	1453.758	448.857	55	1463.798	273.468
56	1469.781	658.616	57	1484.822	369.670	58	1501.850	417.874	59	1516.870	10679.756	60	1523.818	412.310
61	1532.873	3799.037	62	1538.847	332.136	63	1617.860	616.686	64	1644.788	242.380	65	1659.817	11023.511
66	1681.806	331.278	67	1794.020	265.110	68	1798.977	286.650	69	1802.037	1704.648	70	1818.032	385.954
71	1889.026	1244.395	72	2025.008	903.104	73	2211.184	354.685	74	2229.195	4399.417	75	2251.208	149.783
76	2269.235	4772.440	77	2283.229	258.403	78	2311.229	166.871	79	2326.228	7130.891	80	2342.248	390.078
81	2348.207	182.568	82	2357.305	4692.374	83	2379.273	147.258	84	2452.311	136.757	85	2463.245	138.910
86	2810.498	150.154	87	3155.681	231.209	88	3184.645	77.544	89	3199.704	1488.640	90	3215.697	410.074
91	3231.676	346.430												

Matched Sequences:

Unmatched

```
MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEHLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPQIDKVLKSSKY
IAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLIEGRGIPEFMADIIARLREDGIQKRVIQEGRGELPDFQDGTKATFHYRTLHSDDEGTVLDDSRARGKPMELIIGKKFKLPVWETIVCTHREGEIAQFLCDIKHVVLYPLVAKSLRNIAVGKDPLEGQRHCCGVAQMREHSSLGHADLDALQQNPQPLIFHMEMLKVESPGTYQQD
```

Digest Results

Entries: Meas. M/z Calc. MH+ Int. Dev.(Da) Dev.(ppm) Range P Sequence

```
peak 31 1094.610 1094.570 3940.826   0.039  35.910 1 - 9 0 MSPILGYWK
peak 33 1110.611 1110.565 2277.121   0.045  40.410 1 - 9 0 MSPILGYWK  1: Oxidation (M)
peak 16 770.471 770.452 919.806   0.019  24.379 12 - 18 0 GLVQPTR
peak 37 1149.680 1149.640 3226.553   0.040  34.440 19 - 27 0 LLLEYLEEK
peak 76 2269.236 2269.139 4772.440   0.095  42.041 19 - 35 1 LLLEYLEEKYEEHLYER
peak 36 1138.736 1138.516 4879.852   0.219 192.889 28 - 35 0 YEEHLYER
peak 21  905.440  905.411 4601.231   0.028  31.454 36 - 42 1 DEGDKWR
peak 82 2357.305 2357.206 4692.374   0.098  41.665 45 - 64 1 KFELGLEFPNLPYYIDGDVK
peak 74 2229.195 2229.111 4399.417   0.083  37.202 46 - 64 0 FELGLEFPNLPYYIDGDVK
peak 28 1032.621 1032.587 3349.490   0.033  32.213 65 - 73 0 LTQSMAIIR
peak 29 1048.616 1048.582 1143.851   0.034  32.298 65 - 73 0 LTQSMAIIR  5: Oxidation (M)
peak 63 1617.860 1617.788  616.686   0.071  44.215 74 - 87 1 YIADKHNMLGGCPK  12: Propionamide (C)
peak 69 1802.037 1801.948 1704.648   0.089  49.166 88 - 103 1 ERAEISMLEGAVLDIR
peak 70 1818.032 1817.943  385.054   0.089  48.759 88 - 103 1 ERAEISMLEGAVLDIR  7: Oxidation (M)
peak 59 1516.870 1516.804 10679.756   0.065  43.148 90 - 103 0 AEISMLEGAVLDIR
peak 61 1532.873 1532.799 3799.037   0.073  47.877 90 - 103 0 AEISMLEGAVLDIR  5: Oxidation (M)
peak 42 1314.742 1314.694  566.797   0.047  36.156 109 - 119 1 IAYSKDFETLK
peak 15  752.412  752.382 1941.643   0.029  37.950 114 - 119 0 DFETLK
peak 52 1441.825 1441.757 4098.922   0.067  46.254 114 - 125 1 DFETLKVDFLSK
peak 11  708.420  708.393 1372.874   0.027  38.240 120 - 125 0 VDFLSK
peak 13  730.440  730.417  794.440   0.023  31.695 126 - 131 0 LPEMLK
peak 14  746.428  746.412  295.722   0.016  20.822 126 - 131 0 LPEMLK  4: Oxidation (M)
peak 9  697.318  697.297 1972.613   0.021  29.449 132 - 136 0 MFEDR
peak 12  713.315  713.292 1343.778   0.022  31.366 132 - 136 0 MFEDR  1: Oxidation (M)
peak 8  680.389  680.380  404.205   0.008  12.478 176 - 180 0 LVCFK  3: Propionamide (C)
peak 39 1182.730 1182.684 6231.043   0.046  38.537 182 - 191 1 RIEAIPQIDK
peak 27 1026.620 1026.583 4323.994   0.036  35.366 183 - 191 0 IEAIPQIDK
peak 79 2326.228 2326.140 7130.891   0.087  37.568 198 - 218 0 YIAWPLQGWQATFGGGDHPPK
peak 17  789.428  789.410 3330.624   0.018  22.578 219 - 225 0 SDLIEGR
peak 44 1332.760 1332.698 22585.350   0.062  46.356 226 - 237 0 GIPEFMADIIAR
peak 46 1348.769 1348.693 1739.100   0.075  55.860 226 - 237 0 GIPEFMADIIAR  6: Oxidation (M)
peak 63 1617.860 1617.878  616.686  -0.019  -11.778 226 - 239 1 GIPEFMADIIARLR  6: Oxidation (M)
peak 22  958.557  958.532 3802.215   0.025  26.010 238 - 245 1 LREDGIQK
peak 10  701.420  701.394 3727.461   0.025  36.121 247 - 252 0 VIQEGR
peak 71 1889.026 1888.940 1244.395   0.085  45.053 247 - 263 1 VIQEGRGELPDFQDGTK
peak 40 1206.624 1206.564 10405.386   0.059  49.318 253 - 263 0 GELPDFQDGTK
peak 18  794.418  794.394 7684.756   0.023  29.313 264 - 269 0 ATFHYR
peak 65 1659.817 1659.746 11023.511   0.071  42.916 270 - 284 0 TLHSDDEGTVLDDSR
peak 30 1085.671 1085.639 5345.939   0.032  29.391 287 - 296 1 GKPMELIIGK
peak 32 1101.675 1101.634 1502.342   0.041  37.339 287 - 296 1 GKPMELIIGK  4: Oxidation (M)
peak 67 1794.020 1793.944  265.110   0.076  42.255 298 - 311 1 FKLPVWETIVCTMR  11: Propionamide (C)
peak 53 1447.803 1447.744  287.670   0.059  40.948 300 - 311 0 LPVWETIVCTMR
peak 55 1463.798 1463.739  273.468   0.059  40.229 300 - 311 0 LPVWETIVCTMR  11: Oxidation (M)
peak 86 2810.498 2810.393  150.154   0.105  37.471 300 - 323 1 LPVWETIVCTMREGEIAQFLCDIK  11: Oxidation (M)
peak 48 1365.741 1365.672  519.173   0.068  50.019 312 - 323 0 EGEIAQFLCDIK
peak 51 1436.781 1436.709  582.482   0.072  50.101 312 - 323 0 EGEIAQFLCDIK  9: Propionamide (C)
peak 36 1138.736 1138.698 4879.852   0.037  32.949 324 - 333 0 HVVLYPLVAK
peak 50 1396.816 1396.754 8347.175   0.061  43.468 337 - 349 1 NIAVGKDPLEGQR
peak 20  814.426  814.405 1319.581   0.020  24.592 343 - 349 0 DPLEGQR
peak 25 1004.442 1004.422  749.744   0.019  19.204 350 - 358 0 HCCGVAQMR
peak 89 3199.704 3199.566 1488.640   0.137  42.883 359 - 386 0 EHSSLGHADLDALQQNPQPLIFHMEMLK
peak 90 3215.697 3215.561  410.074   0.135  42.053 359 - 386 0 EHSSLGHADLDALQQNPQPLIFHMEMLK  24: Oxidation (M)
peak 91 3231.676 3231.556  346.430   0.119  36.840 359 - 386 0 EHSSLGHADLDALQQNPQPLIFHMEMLK  24: Oxidation (M) 26: Oxidation (M)
peak 35 1123.536 1123.490 1465.395   0.046  40.643 387 - 396 0 VESPGTYQQD
```

Anhang 2: Zugeordnete chemische Verschiebungen von FKBP37.7$^{1-166}$ (ppm). Nicht zugeordnete Signale sind mit n. z. gekennzeichnet.

Amino-säure	Nr.	N	HN	CO	Cα, β, und andere	Hα, β, und andere	Seiten-ketten N
MET	1	n. z.	n. z.	n. z.	17.1 ε	2.06 ε	
ALA	2	n. z.	n. z.	n. z.	51.9 α, 20.3 β	3.97 α, 1.44 β	
ASP	3	n. z.	n. z.	176.3	53.6 α, 41.5 β	4.73 α, 2.77 β2, 2.84 β3	
ILE	4	123.6	8.43	176.9	63.8 α, 38.5 β, 29.1 γ1, 18 γ2, 18 13.5 δ1	3.84 α, 1.91 β, 12.8 γ12, 1.57 γ13, 0.97 γ2, 0.93 δ1	
ILE	5	120.0	7.84	179.4	64.2 α, 35.8 β, 29.0 γ1, 17.4 γ2, 11.2 δ1	3.74 α, 2.20 β, 1.66 γ12, 1.38 γ13, 1.02 γ2, 0.85 δ1	
ALA	6	124.5	8.04	180.0	55.1 α, 18.5 β	4.10 α, 1.49 β	
ARG	7	119.2	8.08	179.8	59.2 α, 30.0 β, 27.4 γ, 43.6 δ	4.09 α, 1.91 β2, 1.91 β3, 1.67 γ2, 1.67 γ3, 3.16 δ2, 3.16 δ3, 7.30ε	
LEU	8	120.1	8.22	179.4	58.1 α, 41.0 β, 25.1 γ, 27.1 δ1, 22.7 δ2	4.10 α, 1.67 β2, 1.97 β3, 19.6 γ, 0.95 δ1, 0.76 δ2	
ARG	9	120.7	8.01	180.8	59.8 α, 29.8 β, 27.3 γ, 43.5 δ	4.01 α, 2.06 β2, 2.06 β3, 1.79 γ2, 1.68 γ3, 3.27 δ2, 3.27 δ3, 7.34 ε	
GLU	10	119.7	7.97	176.9	58.7 α, 29.4 β, 36.5γ	4.15 α, 2.18 β2, 2.18 β3, 2.51 γ2, 2.40 γ3	
ASP	11	117.8	7.63	177.0	53.3 α, 42.7 β	5.21 α, 2.58 β2, 2.85 β3	
GLY	12	107.6	8.01	173.8	47.6 α	4.23 α2, 3.96 α3	
ILE	13	120.2	8.00	175.0	60.4 α, 40.9 β, 27.4 γ1, 18.7 γ2, 14.9 δ	4.88 α, 1.60 β, 1.31 γ12, 0.57 γ13, 0.86 γ2, 0.39 δ	
GLN	14	126.1	9.13	174.9	54.1 α, 29.7 β, 33.5 γ, 179.7 δ	4.57 α, 1.97 β2, 2.08 β3, 2.45 γ2, 2.18 γ3, 7.73 ε21, 6.91 ε22	112.5 ε2
LYS	15	127.9	8.67	174.6	55.5 α, 34.9 β, 24.6 γ, 23.9 δ, 42.2 ε	4.69 α, 1.81 β2, 1.68 β3, 1.39 γ2, 1.39 γ3, 1.65 δ2, 1.65 δ3, 2.98 ε2, 2.98 ε3	
ARG	16	128.0	8.80	174.9	55.0 α, 33.3 β, 27.4 γ, 43.7 δ	4.47 α, 1.60 β2, 1.60 β3, 1.48 γ2, 1.31 γ3, 3.13 δ2, 3.05 δ3, 7.17 ε	
VAL	17	127.3	9.08	175.4	64.7 α, 31.6 β, 22.6 γ1, 21.1 γ2	3.64 α, 1.93 β, 0.85 γ1, 0.73 γ2	
ILE	18	131.0	8.86	175.8	61.9 α, 38.3 β, 28.2 γ1, 16.8 γ2, 12.2 δ1	3.99 α, 1.38 β, 1.32 γ12, 1.13 γ13, 0.89 γ2, 0.68 δ1	
GLN	19	120.6	8.26	174.2	54.7 α, 33.4 β, 34.1 γ, 180.4 δ	4.57 α, 1.82 β2, 1.98 β3, 2.38 γ2, 2.27 γ3, 7.75 ε21, 6.99 ε22	113.4 ε2
GLU	20	126.6	8.88	177.8	57.1 α, 30.1 β, 35.6 γ	4.15 α, 2.04 β2, 1.85 β3, 2.28 γ2, 2.38 γ3	

Amino-säure	Nr.	N	HN	CO	Cα, β, und andere	Hα, β, und andere	Seiten-ketten N
GLY	21	109.1	9.54	171.6	43.6 α	3.39 α2, 4.16 α3	
ARG	22	117.2	8.50	176.2	54.4 α, 33.2 β, 27.1 γ, 43.2 δ	4.69 α, 1.74 β2, 1.74 β3, 1.54 γ2, 1.54 γ3, 3.14 δ2, 3.20 δ3, 7.37 ε	
GLY	23	108.2	8.60	174.1	45.1 α	3.88 α2, 4.06 α3	
GLU	24	120.0	8.51	177.0	54.8 α, 30.9 β, 36.1 γ	4.42 α, 1.74 β2, 2.03 β3, 2.31 γ2, 2.24 γ3	
LEU	25	126.4	8.83	175.0	54.1 α, 42.2 β, 26.4 γ, 26.2 δ1, 24.6 δ2	4.30 α, 1.39 β2, 1.82 β3, 1.91 γ, 0.97 δ1, 0.86 δ2	
PRO	26	n. z.	-	173.8	62.4 α, 31.3 β, 27.2 γ, 51.8 δ	4.21 α, 1.85 β2, 0.64 β3, 1.69 γ2, 1.69 γ3, 3.74 δ2, 3.74 δ3	
ASP	27	118.7	8.24	176.8	54.0 α, 40.3 β	4.52 α, 2.63 β2, 2.63 β3	
PHE	28	119.3	8.03	174.8	60.1 α, 38.3 β, 133.2 δ1, 133.2 δ2, 132.0 ε1, 132.0 ε2, 131.8 ζ	4.01 α, 3.22 β2, 2.94 β3, 7.04 δ1, 7.04 δ2, 7.65 ε1, 7.65 ε2, 7.03 ζ	
GLN	29	117.7	8.22	176.0	55.0 α, 31.2 β, 33.3 γ, 180.6 δ	4.42 α, 2.11 β2, 1.91 β3, 2.17 γ2, 2.29 γ3, 7.84 ε21, 6.84 ε22	113.0 ε2
ASP	30	123.3	8.85	177.0	56.6 α, 40.1 β	4.18 α, 2.61 β2, 2.61 β3	
GLY	31	110.9	8.95	175.5	45.1 α	3.45 α2, 4.55 α3	
THR	32	123.4	8.60	172.1	65.6 α, 69.4 β, 22.9 γ2	4.43 α, 4.07 β, 1.09 γ2	
LYS	33	127.8	9.14	175.0	55.0 α, 34.6 β, 24.9 γ, 29.1 δ, 41.9 ε	5.04 α, 1.14 β2, 0.92 β3, 0.97 γ2, 0.79 γ3, 1.12 δ2, 1.07 δ3, 2.26 ε2, 2.26 ε3	
ALA	34	134.6	9.57	175.1	50.5 α, 21.7 β	5.33 α, 1.44 β	
THR	35	120.1	9.09	173.8	61.9 α, 69.7 β, 21.3 γ2	5.37 α, 3.92 β, 0.98 γ2	
PHE	36	122.2	8.81	173.2	55.5 α, 41.6 β, 132.7 δ1, 132.7 δ2, 130.1 ε1, 130.1 ε2, 128.2 ζ	5.46 α, 2.89 β2, 3.23 β3, 6.65 δ1, 6.65 δ2, 6.31 ε1, 6.31 ε2, 6.39 ζ	
HIS	37	118.7	8.74	175.6	55.3 α, 34.4 β, 117.7 δ2, 138.7 ε1	5.31 α, 2.78 β2, 3.02 β3, 6.82 δ2, 7.13 ε1	
TYR	38	118.0	9.53	174.0	55.7 α, 44.3 β, 133.5 δ1, 133.5 δ2, 118.1 ε1, 118.1 ε2	6.24 α, 2.70 β2, 2.91 β3, 6.93 δ1, 6.93 δ2, 6.90 ε1, 6.90 ε2	
ARG	39	120.6	9.34	175.2	55.1 α, 34.7 β, 28.2 γ, 44.0 δ, 159.5 ζ	5.36 α, 1.84 β2, 1.91 β3, 1.77 γ2, 1.57 γ3, 2.96 δ2, 2.96 δ3, 6.85 ε	83.4 ε
THR	40	123.2	9.22	173.6	61.3 α, 70.1 β, 24.7 γ2	5.48 α, 4.29 β, 0.85 γ2	

Amino-säure	Nr.	N	HN	CO	Cα, β, und andere	Hα, β, und andere	Seiten-ketten N
LEU	41	128.3	9.77	176.7	53.7 α, 44.8 β, 28.0 γ, 26.0 δ1, 25.7 δ2	5.28 α, 1.71 β2, 1.55 β3, 1.60 γ, 0.83 δ1, 0.84 δ2	
HIS	42	118.7	8.23	175.7	57.6 α, 31.5 β, 119.5 δ2, 138.3 ε1	4.42 α, 3.28 β2, 3.01 β3, 6.75 δ2, 7.65 ε1	
SER	43	115.1	8.74	174.8	57.9 α, 63.3 β	4.37 α, 3.38 β2, 3.95 β3	
ASP	44	120.8	8.02	176.2	53.1 α, 40.9 β	4.61 α, 2.68 β2, 3.01 β3	
ASP	45	118.7	8.14	177.4	56.3 α, 40.5 β	4.36 α, 2.62 β2, 2.62 β3	
GLU	46	118.7	8.29	177.3	57.8 α, 29.7 β, 36.6 γ	4.12 α, 1.92 β2, 2.04 β3, 2.26 γ2, 2.21 γ3	
GLY	47	109.2	8.00	174.7	46.8 α	3.72 α2, 3.99 α3	
THR	48	117.5	8.73	174.5	64.2 α, 68.8 β, 21.4 γ2	3.94 α, 3.95 β, 1.10 γ2	
VAL	49	127.1	8.56	176.8	63.0 α, 32.7 β, 21.9 γ1, 21.7 γ2	4.81 α, 2.05 β, 1.02 γ1, 0.92 γ2	
LEU	50	129.0	9.27	175.7	57.0 α, 44.2 β, 27.9 γ, 25.0 δ1, 26.6 δ2	4.39 α, 1.48 β2, 1.48 β3, 1.47 γ, 0.84 δ1, 0.56 δ2	
ASP	51	113.7	7.36	174.3	54.5 α, 48.4 β	5.09 α, 2.83 β2, 2.64 β3	
ASP	52	120.0	8.33	177.0	53.3 α, 43.4 β	5.16 α, 2.48 β2, 2.84 β3	
SER	53	123.9	8.93	177.3	62.7 α, 61.2 β	4.43 α, 3.93 β2, 3.93 β3	
ARG	54	123.8	8.43	179.5	59.7 α, 29.1 β, 28.5 γ, 43.0 δ, 159.5 ζ	3.55 α, 1.43 β2, 1.43 β3, 0.37 γ2, 0.92 γ3, 2.87 δ2, 2.87 δ3, 7.61 ε	86.0 ε
ALA	55	121.9	7.46	179.1	54.4 α, 18.0 β	4.10 α, 1.48 β	
ARG	56	115.0	7.49	177.3	56.7 α, 30.9 β, 27.7 γ, 43.7 δ	4.43 α, 2.05 β2, 2.05 β3, 1.79 γ2, 1.79 γ3, 3.29 δ2, 3.36 δ3	
GLY	57	106.7	7.75	173.6	46.0 α	4.30 α2, 3.74 α3	
LYS	58	120.2	7.58	172.9	53.8 α, 34.4 β, 24.4 γ, 29.4 δ, 42.2 ε	4.85 α, 1.83 β2, 1.70 β3, 1.46 γ2, 1.46 γ3, 1.69 δ2, 1.69 δ3, 3.02 ε2, 3.02 ε3	
PRO	59	n. z.	-	175.7	62.4 α, 31.4 β, 26.1 γ, 50.2 δ	4.05 α, 1.33 β2, 0.60 β3, 1.41 γ2, 1.56 γ3, 3.52 δ2, 3.64 δ3	
MET	60	121.3	8.30	173.4	53.6 α, 31.9 β, 34.2 γ, 18.0 ε	4.35 α, 0.86 β2, 1.40 β3, 2.46 γ2, 1.92 γ3, 2.12 ε	
GLU	61	119.7	7.48	175.2	54.0 α, 32.9 β, 36.4 γ	5.19 α, 1.55 β2, 1.77 β3, 2.00 γ2, 2.14 γ3	
LEU	62	124.2	9.00	174.2	54.6 α, 47.2 β, 27.5 γ, 25.1 δ1, 25.5 δ2	4.52 α, 1.30 β2, 1.62 β3, 1.37 γ, 0.50 δ1, 0.44 δ2	
ILE	63	125.7	8.71	176.2	59.6 α, 37.6 β, 27.9 γ1, 17.8 γ2, 12.8 δ1	4.86 α, 1.72 β, 1.49 γ12, 1.49 γ13, 0.78 γ2, 0.88 δ1	
ILE	64	130.1	9.17	178.1	60.5 α, 35.5 β, 28.6 γ1, 17.9 γ2, 9.8 δ1	3.77 α, 2.25 β, 1.82 γ12, 1.37 γ13, 0.98 γ2, 0.64 δ1	

Amino-säure	Nr.	N	HN	CO	Cα, β, und andere	Hα, β, und andere	Seiten-ketten N
GLY	65	117.3	9.37	175.6	45.8 α	4.43 α2, 3.92 α3	
LYS	66	119.5	7.90	176.3	54.7 α, 31.0 β, 25.4 γ, 28.4 δ, 42.3 ε	4.50 α, 1.85 β2, 2.13 β3, 1.45 γ2, 1.27 γ3, 1.62 δ2, 1.62 δ3, 2.93 ε2, 3.01 ε3	
LYS	67	119.1	9.08	176.2	56.2 α, 28.8 β, 24.8 γ, 29.2 δ, 42.4 ε	3.99 α, 1.99 β2, 1.71 β3, 1.35 γ2, 1.27 γ3, 1.66 δ2, 1.60 δ3, 2.97 ε2, 2.97 ε3	
PHE	68	121.7	8.31	177.7	59.7 α, 40.1 β, 133.5 δ1, 133.5 δ2, 132.0 ε1, 132.0 ε2, 129.5 ζ	4.39 α, 3.53 β2, 2.60 β3, 7.49 δ1, 7.49 δ2, 7.27 ε1, 7.27 ε2, 6.98 ζ	
LYS	69	122.8	7.03	173.9	58.2 α, 32.5 β, 24.8 γ, 29.0 δ, 42.0 ε	3.71 α, 1.27 β2, 1.39 β3, 1.21 γ2, 1.11 γ3, 1.50 δ2, 1.50 δ3, 2.88 ε2, 2.83 ε3	
LEU	70	117.5	5.74	n. z.	50.6 α, 42.9 β, 27.2 γ, 25.4 δ1, 24.3 δ2	4.90 α, 1.62 β2, 0.62 β3, 1.16 γ, 0.70 δ2	
PRO	71	n. z.	-	179.3	65.8 α, 32.3 β, 27.3 γ, 51.1 δ	4.41 α, 1.96 β2, 2.48 β3, 1.98 γ2, 2.09 γ3, 3.75 δ2, 3.91 δ3	
VAL	72	116.6	8.87	176.8	64.2 α, 30.8 β, 20.4 γ1, 23.5 γ2	4.03 α, 2.56 β, 0.90 γ1, 0.80 γ2	
TRP	73	119.9	7.80	177.7	59.5 α, 28.3 β, 121.1 δ1, 120.5 ε3, 112.5 ζ2, 121.7 ζ3, 125.5 η2	4.20 α, 3.25 β2, 2.63 β3, 5.92 δ1, 5.39 ε1, 7.11 ε3, 6.66 ζ2, 6.65 ζ3, 5.84 η2	120.2 ε1
GLU	74	118.0	7.32	177.1	60.8 α, 29.3 β, 37.9 γ	3.59 α, 2.20 β2, 2.20 β3, 2.12 γ2, 2.20 γ3	
THR	75	114.4	7.45	n. z.	66.1 α, 68.8 β, 21.7 γ2	3.60 α, 4.05 β, 0.93 γ2	
ILE	76	112.6	7.83	n. z.	13.4 δ1	0.18 δ1	
VAL	77	122.3	7.72	175.7	66.2 α, 30.7 β, 21.1 γ1, 20.6 γ2	3.04 α, 1.73 β, 0.34 γ1, 0.13 γ2	
CYS	78	110.6	6.27	172.8	59.9 α, 26.1 β	2.13 α, 2.49 β2, 2.49 β3	
THR	79	106.3	7.00	174.4	61.1 α, 70.8 β, 21.5 γ2	4.48 α, 4.42 β, 1.25 γ2	
MET	80	122.8	7.44	173.3	56.5 α, 35.8 β, 32.7 γ, 18.1 ε	4.63 α, 2.05 β2, 2.05 β3, 1.46 γ2, 1.46 γ3, 1.97 ε	
ARG	81	115.0	7.26	177.3	55.1 α, 33.7 β, 29.1 γ, 44.1 δ, 159.6 ζ	4.38 α, 2.00 β2, 2.00 β3, 1.65 γ2, 1.65 γ3, 3.01 δ2, 2.94 δ3, 7.09 ε	84.2 ε
GLU	82	119.4	8.76	176.3	60.1 α, 30.1 β, 38.5 γ	3.47 α, 2.03 β2, 1.93 β3, 1.96 γ2, 2.33 γ3	
GLY	83	111.8	8.24	173.5	45.5 α	3.83 α2, 4.30 α3	
GLU	84	122.6	7.89	175.2	56.0 α, 33.9 β, 37.4 γ	4.35 α, 2.49 β2, 1.96 β3, 2.34 γ2, 2.34 γ3	
ILE	85	123.8	8.84	175.7	60.4 α, 39.9 β, 27.5 γ1, 17.3 γ2, 13.3 δ1	5.16 α, 1.46 β, 1.72 γ12, 1.72 γ13, 0.62 γ2, 0.79 δ1	

Amino-säure	Nr.	N	HN	CO	Cα, β, und andere	Hα, β, und andere	Seiten-ketten N
ALA	86	129.1	9.11	173.6	50.8 α, 24.2 β	4.88 α, 1.08 β	
GLN	87	116.8	8.72	174.9	53.6 α, 31.8 β, 34.7 γ, 179.0 δ	5.47 α, 1.78 β2, 1.78 β3, 2.30 γ2, 2.25 γ3, 6.99 ε21, 8.84 ε22	112.8 ε2
PHE	88	120.1	9.05	174.3	55.6 α, 41.1 β, 134.0 δ1, 134.0 δ2, 133.1 ε1, 133.1 ε2, 131.5 ζ	5.25 α, 3.07 β2, 2.54 β3, 7.37 δ1, 7.37 δ2, 6.75 ε1, 6.75 ε2, 7.01 ζ	
LEU	89	129.5	9.00	176.6	55.2 α, 42.3 β, 27.8 γ, 25.6 δ1, 23.7 δ2	4.85 α, 1.52 β2, 1.87 β3, 1.48 γ, 0.84 δ1, 0.74 δ2	
CYS	90	127.3	9.21	172.6	58.8 α, 30.5 β	5.13 α, 2.99 β2, 2.68 β3	
ASP	91	119.9	8.41	175.9	54.6 α, 43.0 β	4.52 α, 2.94 β2, 2.84 β3	
ILE	92	118.6	8.30	177.9	65.5 α, 38.8 β, 29.4 γ1, 17.3 γ2, 14.0 δ1	3.48 α, 1.66 β, 1.49 γ12, 1.49 γ13, 0.76 γ2, 0.86 δ1	
LYS	93	116.4	8.56	177.5	58.8 α, 30.8 β, 23.5 γ, 29.5 δ, 42.3 ε	4.11 α, 1.66 β2, 1.75 β3, 0.26 γ2, 0.96 γ3, 1.47 δ2, 1.39 δ3, 2.66 ε2, 2.62 ε3	
HIS	94	115.7	7.88	178.4	57.8 α, 33.6 β, 117.3 δ2, 140.3 ε1	4.78 α, 3.20 β2, 3.15 β3, 6.98 δ2, 7.94 ε1	
VAL	95	108.6	8.16	177.1	61.1 α, 32.8 β, 23.0 γ1, 19.0 γ2	4.80 α, 2.77 β, 1.00 γ1, 1.03 γ2	
VAL	96	125.0	7.44	177.5	65.8 α, 32.2 β, 21.5 γ1, 21.0 γ2	3.99 α, 2.15 β, 1.03 γ1, 1.07 γ2	
LEU	97	116.8	8.59	177.3	54.6 α, 42.0 β, 27.3 γ, 25.5 δ1, 22.9 δ2	4.53 α, 1.70 β2, 1.59 β3, 1.65 γ, 0.96 δ1, 0.86 δ2	
TYR	98	119.5	8.18	172.1	64.9 α, 36.9 β, 132.6 δ1, 132.6 δ2, 119.8 ε1, 119.8 ε2	3.86 α, 2.91 β2, 3.15 β3, 6.71 δ1, 6.71 δ2, 6.63 ε1, 6.63 ε2	
PRO	99	n. z.	-	176.8	67.4 α, 31.1 β, 29.5 γ, 49.7 δ	4.00 α, 1.89 β2, 2.31 β3, 2.20 γ2, 1.88 γ3, 3.97 δ2, 3.78 δ3	
LEU	100	114.9	6.99	179.8	58.0 α, 42.2 β, 27.3 γ, 24.8 δ1, 24.7 δ2	3.93 α, 1.69 β2, 1.62 β3, 1.57 γ, 0.89 δ1, 0.83 δ2	
VAL	101	120.4	7.65	178.2	65.8 α, 31.9 β, 20.2 γ1, 23.1 γ2	3.42 α, 1.52 β, 0.42 γ1, 0.58 γ2	
ALA	102	123.4	9.09	179.6	55.0 α, 18.1 β	3.69 α, 0.85 β	
LYS	103	117.6	7.57	178.3	60.7 α, 32.2 β, 25.8 γ, 30.2 δ, 42.3 ε	3.46 α, 1.85 β2, 1.85 β3, 1.60 γ2, 1.19 γ3, 1.74 δ2, 1.66 δ3, 2.90 ε2, 2.90 ε3	
SER	104	113.8	7.17	176.6	61.5 α, 63.0 β	4.35 α, 4.00 β2, 4.00 β3	
LEU	105	121.8	8.01	179.7	57.4 α, 41.2 β, 26.6 γ, 22.3 δ1, 25.3 δ2	4.20 α, 1.95 β2, 1.62 β3, 1.80 γ, 0.97 δ1, 0.86 δ2	
ARG	106	118.2	8.14	177.5	58.8 α, 31.1 β, 27.4 γ, 43.8 δ, 159.9 ζ	4.09 α, 1.91 β2, 1.91 β3, 1.67 γ2, 1.67 γ3, 3.17 δ2, 3.17 δ3, 8.74 ε	84.5 ε

Amino-säure	Nr.	N	HN	CO	Cα, β, und andere	Hα, β, und andere	Seiten-ketten N
ASN	107	117.9	7.78	176.2	54.2 α, 38.4 β, 176.7 γ	4.69 α, 2.90 β2, 2.90 β3, 7.62 δ21, 7.22 δ22	111.7 δ2
ILE	108	120.8	8.04	176.8	62.7 α, 38.5 β, 28.1 γ1, 17.6 γ2, 13.7 δ1	4.10 α, 1.95 β, 1.25 γ12, 1.64 γ13, 0.97 γ2, 0.92 δ1	
ALA	109	125.8	8.11	177.9	53.1 α, 19.2 β	4.37 α, 1.48 β	
VAL	110	116.5	7.90	176.7	62.3 α, 32.5 β, 20.6 γ1, 21.3 γ2	4.24 α, 2.23 β, 1.02 γ1, 0.99 γ2	
GLY	111	111.7	8.30	174.0	45.5 α	4.01 α2, 3.96 α3	
LYS	112	120.4	8.14	176.0	55.8 α, 33.5 β, 24.8 γ, 39.0 δ, 42.1 ε	4.35 α, 1.67 β2, 1.80 β3, 1.38 γ2, 1.38 γ3, 1.65 δ2, 1.65 δ3, 2.98 ε2, 2.98 ε3	
ASP	113	123.2	8.49	175.5	52.3 α, 41.6 β	4.84 α, 2.77 β2, 2.60 β3	
PRO	114	n. z.	-	177.4	64.0 α, 32.2 β, 27.4 γ, 51.0 δ	4.41 α, 2.32 β2, 1.95 β3, 2.02 γ2, 2.02 γ3, 3.89 δ2, 3.89 δ3	
LEU	115	119.8	8.42	177.7	55.0 α, 41.5 β, 27.1 γ, 25.1 δ1, 23.1 δ2	4.29 α, 1.57 β2, 1.70 β3, 1.59 γ, 0.90 δ1, 0.81 δ2	
GLU	116	121.0	7.96	177.4	57.7 α, 30.0 β, 36.1 γ	4.12 α, 2.05 β2, 2.05 β3, 2.26 γ2, 2.26 γ3	
GLY	117	110.4	8.53	174.5	45.6 α	3.99 α2, 3.91 α3	
GLN	118	119.2	8.11	n. z.	56.0 α, 29.5 β, 33.8 γ, 180.2 δ	4.35 α, 1.96 β2, 2.11 β3, 2.30 γ2, 2.30 γ3, 7.54 ε21, 6.86 ε22	112.4 ε2
ARG	119	n. z.	n. z.	n. z.	43.7 δ	3.13 δ2, 3.07 δ3, 7.01 ε	
HIS	120	n. z.	n. z.	n. z.	59.0 α, 28.2 β, 120.1 δ2, 138.6 ε1	4.49 α, 2.89 β2, 2.94 β3, 6.98 δ2, 7.75 ε1	
CYS	121	n. z.	n. z.	177.7			
CYS	122	120.9	8.02	n. z.	52.2 α, 42.6 β	4.70 α, 2.61 β2, 2.48 β3	
GLY	123	n. z.	n. z.	174.2	45.4 α	3.98 α2, 3.98 α3	
VAL	124	119.7	8.04	176.3	62.8 α, 32.6 β, 21.2 γ1, 20.6 γ2	4.07 α, 2.08 β, 0.92 γ1, 0.91 γ2	
ALA	125	126.9	8.42	177.8	53.0 α, 19.0 β	4.24 α, 1.37 β	
GLN	126	118.9	8.22	n. z.	56.2 α, 29.4 β, 34.0 γ, 180.4 δ	4.27 α, 2.09 β2, 1.97 β3, 2.35 γ2, 2.35 γ3, 7.53 ε21, 6.87 ε22	112.5 ε2
MET	127	n. z.	n. z.	n. z.	11.1 ε	2.06 ε	
ARG	128	n. z.	n. z.	176.3	56.5 α, 31.1 β, 27.7 γ, 43.3 δ	4.29 α, 1.60 β2, 1.60 β3, 1.79 γ2, 1.79 γ3, 3.18 δ2, 3.18 δ3	
GLU	129	121.4	8.45	n. z.	56.9 α, 30.3 β, 36.3 γ	4.20 α, 1.89 β2, 1.95 β3, 2.20 γ2, 2.15 γ3	

Amino-säure	Nr.	N	HN	CO	Cα, β, und andere	Hα, β, und andere	Seiten-ketten N
HIS	130	n. z.	n. z.	n. z.	56.4 α, 31.2 β, 119.6 δ2, 138.6 ε1	4.62 α, 3.11 β2, 3.07 β3, 6.98 δ2, 7.75 ε1	
SER	131	n. z.	n. z.	n. z.	58.3 α, 61.9 β	4.61 α, 4.05 β2, 3.83 β3	
SER	132	n. z.	n. z.	175.4	58.2 α, 63.9 β	4.52 α, 3.96 β2, 3.77 β3	
LEU	133	126.8	9.62	178.0	55.6 α, 42.5 β, 27.2 γ, 26.1 δ1, 23.4 δ2	4.35 α, 1.71 β2, 1.57 β3, 1.72 γ, 0.83 δ1, 0.85 δ2	
GLY	134	108.2	8.67	173.2	45.2 α	3.92 α2, 3.69 α3	
HIS	135	117.4	7.46	n. z.	54.8 α, 33.4 β, 119.2 δ2, 139.5 ε1	4.80 α, 3.17 β2, 2.82 β3, 6.96 δ2, 7.82 ε1	
ALA	136	n. z.	n. z.	179.7	55.6 α, 18.5 β	4.22 α, 1.52 β	
ASP	137	117.9	9.04	179.1	56.0 α, 38.0 β	4.38 α, 2.70 β2, 2.98 β3	
LEU	138	123.0	7.98	178.8	57.0 α, 41.3 β, 26.5 γ, 25.2 δ1, 22.0 δ2	4.20 α, 1.96 β2, 1.96 β3, 1.86 γ, 0.77 δ1, 0.82 δ2	
ASP	139	120.8	8.56	179.2	57.7 α, 39.8 β	4.48 α, 2.72 β2, 2.72 β3	
ALA	140	122.1	7.93	180.5	55.2 α, 17.9 β	4.19 α, 1.57 β	
LEU	141	119.1	7.39	178.4	56.9 α, 42.2 β, 26.7 γ, 25.4 δ1, 24.5 δ2	4.18 α, 1.89 β2, 1.89 β3, 1.98 γ, 1.08 δ1, 1.07 δ2	
GLN	142	117.1	8.04	177.9	58.6 α, 28.8 β, 34.2 γ, 179.9 δ	4.11 α, 2.23 β2, 2.18 β3, 2.41 γ2, 2.41 γ3, 6.77 ε21, 7.51 ε22	111.0 ε2
GLN	143	115.0	7.48	176.1	57.2 α, 29.4 β, 34.0 γ, 180.3 δ	4.15 α, 2.17 β2, 2.09 β3, 2.48 γ2, 2.48 γ3, 7.50 ε21, 6.86 ε22	112.1 ε2
ASN	144	116.0	7.69	169.8	51.1 α, 39.7 β, 178.2 γ	5.11 α, 2.71 β2, 2.66 β3, 7.71 δ21, 6.92 δ22	113.8 δ2
PRO	145	n. z.	-	176.2	64.2 α, 32.7 β, 27.4 γ, 50.0 δ	4.58 α, 2.39 β2, 1.74 β3, 2.09 γ2, 2.02 γ3, 3.63 δ2, 3.45 δ3	
GLN	146	118.6	8.19	n. z	53.0 α, 32.2 β, 33.2 γ, 180.7 δ	4.81 α, 2.28 β2, 2.17 β3, 2.25 γ2, 2.38 γ3, 6.75 ε21, 7.48 ε22	111.8 ε2
PRO	147	n. z.	-	176.2	63.7 α, 32.3 β, 28.1 γ, 50.7 δ	4.41 α, 2.38 β2, 1.99 β3, 2.12 γ2, 2.12 γ3, 3.56 δ2, 3.67 δ3	
LEU	148	118.1	7.21	175.0	52.5 α, 46.9 β, 26.5 γ, 25.9 δ1, 22.9 δ2	4.85 α, 0.64 β2, 0.85 β3, 1.70 γ, 0.35 δ1, 0.58 δ2	
ILE	149	119.2	8.43	175.5	59.5 α, 40.3 β, 29.6 γ1, 17.7 γ2, 14.1 δ1	4.86 α, 1.59 β, 1.34 γ12, 1.34 γ13, 0.71 γ2, 0.83 δ1	
PHE	150	122.9	8.87	174.9	56.1 α, 40.7 β, 133.8 δ1, 133.8 δ2, 132.4 ε1, 132.4 ε2, 128.8 ζ	5.79 α, 2.81 β2, 3.27 β3, 7.60 δ1, 7.60 δ2, 7.27 ε1, 7.27 ε2, 6.84 ζ	
HIS	151	130.5	10.15	174.5	56.5 α, 32.9 β, 117.4 δ2, 138.6 ε1	5.06 α, 2.77 β2, 3.50 β3, 6.89 δ2, 7.51 ε1	

Amino-säure	Nr.	N	HN	CO	Cα, β, und andere	Hα, β, und andere	Seiten-ketten N
MET	152	125.1	9.17	174.0	53.6 α, 37.4 β, 33.1 γ, 17.5 ε	5.43 α, 2.00 β2, 1.46 β3, 1.95 γ2, 2.50 γ3, 0.31 ε	
GLU	153	122.4	9.00	175.2	53.9 α, 31.6 β, 35.4 γ	5.06 α, 1.89 β2, 1.89 β3, 2.09 γ2, 2.04 γ3	
MET	154	125.1	8.81	175.9	55.0 α, 30.3 β, 32.4 γ, 17.9 ε	4.81 α, 1.97 β2, 1.97 β3, 2.36 γ2, 2.36 γ3, 1.92 ε	
LEU	155	132.1	9.29	177.7	56.8 α, 42.1 β, 27.2 γ, 25.7 δ1, 22.7 δ2	4.53 α, 1.56 β2, 1.49 β3, 1.80 γ, 0.68 δ1, 0.84 δ2	
LYS	156	116.5	7.92	173.2	56.0 α, 36.3 β, 24.9 γ, 29.2 δ, 42.0 ε	4.67 α, 1.63 β2, 1.78 β3, 1.40 γ2, 1.27 γ3, 1.57 δ2, 1.57 δ3, 2.85 ε2, 2.85 ε3	
VAL	157	124.8	9.23	175.5	62.5 α, 33.6 β, 21.9 γ1, 22.8 γ2	4.70 α, 1.79 β, 1.02 γ1, 0.45 γ2	
GLU	158	126.3	9.05	175.0	54.6 α, 34.0 β, 37.6 γ	4.76 α, 1.97 β2, 1.97 β3, 2.18 γ2, 2.18 γ3	
SER	159	120.6	8.84	171.9	58.4 α, 61.9 β	4.43 α, 3.86 β2, 3.82 β3	
PRO	160	n. z.	-	177.4	64.2 α, 31.7 β, 27.9 γ, 50.5 δ	4.29 α, 2.29 β2, 1.95 β3, 2.04 γ2, 2.04 γ3, 3.68 δ2, 3.75 δ3	
GLY	161	110.4	8.44	175.6	45.4 α	4.14 α2, 3.69 α3	
THR	162	108.2	7.60	173.4	62.4 α, 70.3 β, 21.4 γ2	4.47 α, 4.48 β, 1.13 γ2	
TYR	163	117.9	7.07	174.3	54.7 α, 40.3 β, 134.1 δ1, 134.1 δ2, 118.3 ε1, 118.3 ε2	4.94 α, 3.02 β2, 2.75 β3, 6.89 δ1, 6.89 δ2, 6.79 ε1, 6.79 ε2	
GLN	164	121.9	8.72	175.5	55.7 α, 29.5 β, 33.7 γ, 180.5 δ	4.26 α, 2.07 β2, 1.97 β3, 2.32 γ2, 2.32 γ3, 7.68 ε21, 6.80 ε22	113.1 ε2
GLN	165	125.0	8.64	174.6	55.9 α, 30.2 β, 34.0 γ, 180.6 δ	4.39 α, 1.97 β2, 2.11 β3, 2.33 γ2, 2.33 γ3, 7.60 ε21, 6.83 ε22	112.5 ε2
ASP	166	128.2	8.15	180.9	56.0 α, 42.2 β	4.39 α, 2.56 β2, 2.67 β3	

Anhang 3: Strukturstatistik der 20 ausgewählten Konformere von FKBP37.7$^{1-166}$.

Strukturstatistik

Gesamtanzahl der Aminosäurereste	**165**	
Gesamtanzahl der Distanzlimits (*restraints*)		3678
intraresiduell		577
sequenziell ($\|i - j\| = 1$)		987
medium-range ($1 < \|i - j\| \leq 4$)		724
long-range ($\|i - j\| > 4$)		1390
Gesamtanzahl der Distanzverletzungen >0.3 Å		**1**
Gesamtanzahl der Distanzverletzungen >0.2 Å		15
Maximale Distanzverletzung (Å)		0,33

Ramachandran-Diagramm-Statistik (%)	**alle**	**(Strukturiert[a])**
Aminosäurereste in favorisierten Bereichen	77,4	(81,8)
Aminosäurereste in zusätzlich erlaubten Bereichen	20,0	(17,3)
Aminosäurereste in noch erlaubten Bereichen	1,5	(0,7)
Aminosäurereste in nicht erlaubten Bereichen	1,2	(0,2)

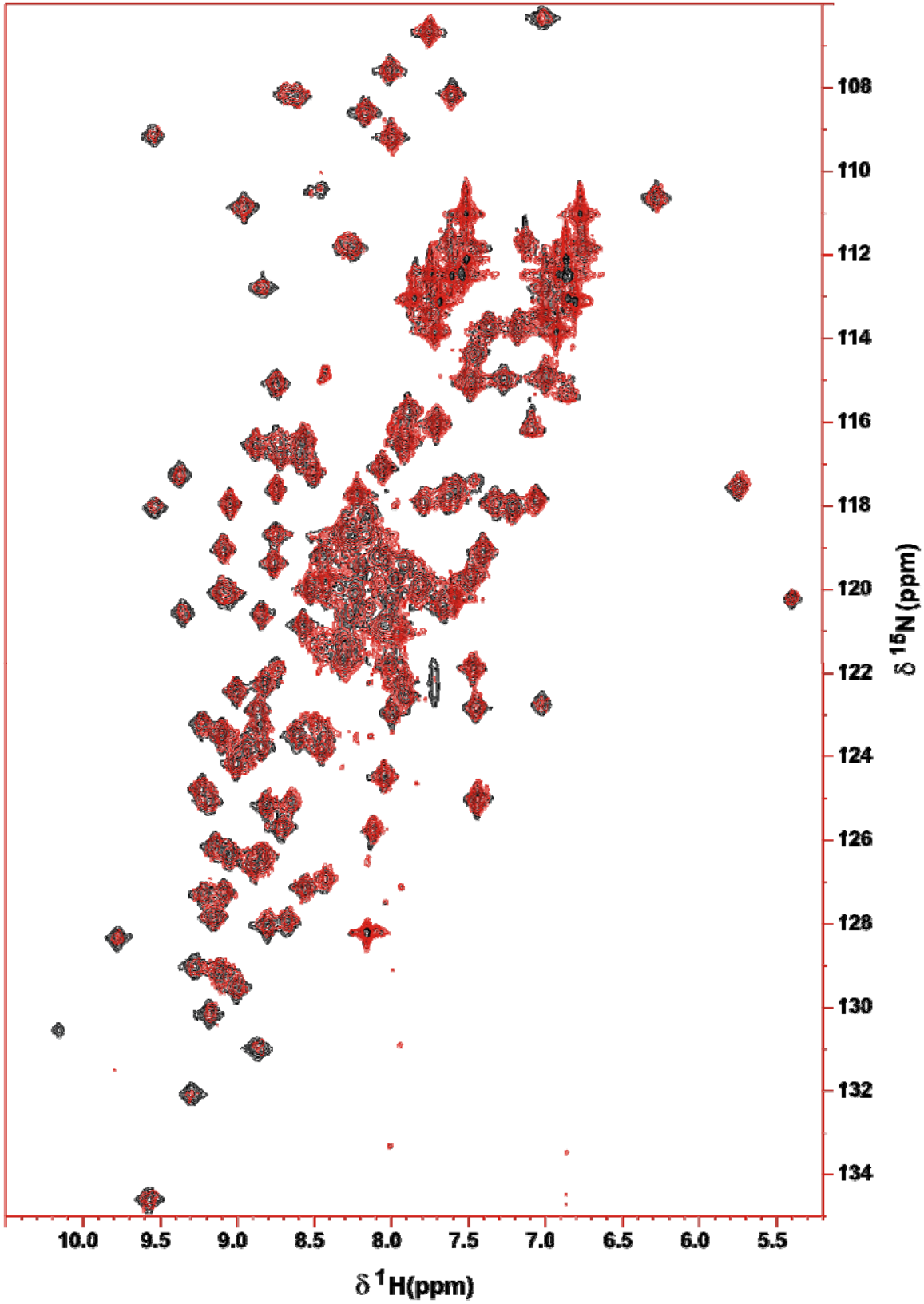
Mittlere Abweichung (RMSD) von der gemittelten Struktur (Å)

Peptidrückgrat [c] RMSD (Reste 3-110, 136-165)	0,75 ± 0,14
Gesamtstruktur (außer H) RMSD (Reste 3-110, 136-165)	1,44 ± 0,15

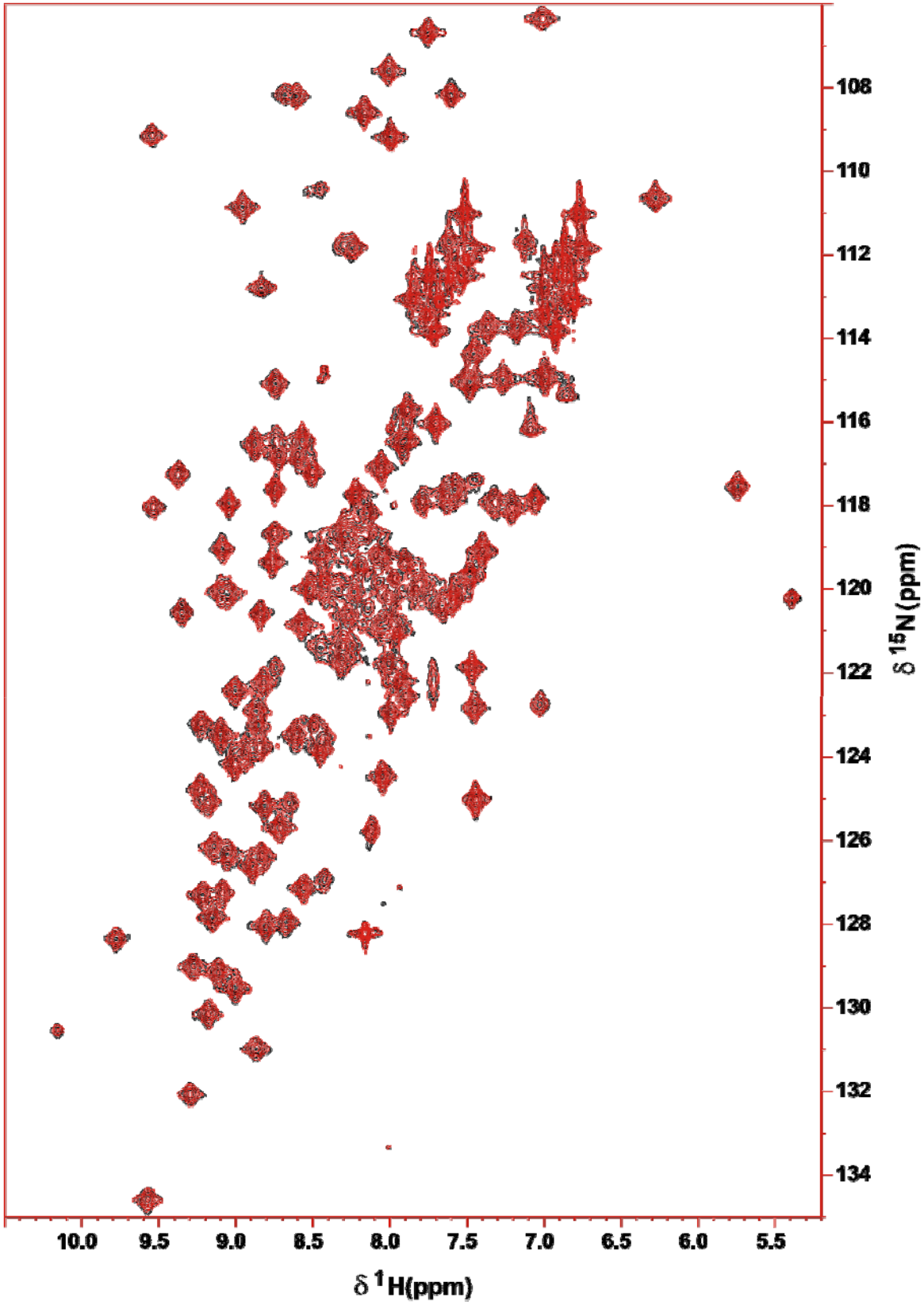
[a] Aminosäurereste 2-110 und 136-165

[c] N, Cα, C' und O

Anhang 4-1: Überlagerte $^{1}H/^{15}N$-HSQC-Spektren von FKBP37.7$^{1-166}$ in An- (rot) und in Abwesenheit von His_6-HSP90β$^{1-724}$ (schwarz).



Anhang 4-2: Überlagerte $^{1}H/^{15}N$-HSQC-Spektren von FKBP37.7$^{1-166}$ in An- (rot) und in Abwesenheit von His_6-HSP90β$^{620-724}$ (schwarz).



Anhang 5: Vergleich der massenspektrometrisch identifizierten Peptide mit allen humanen Proteinen der Swiss-Prot-Proteindatenbank durch das Program Scaffold. Bait 1-5 bezeichnet die Elutionsfraktionen (E1-E5) der Reinigung von FLAG-FKBP37.7$^{1-330}$ aus HEK293-Zellen. Co bezeichnet die Elutionsfraktionen (E1-E5) der Parallelreinigung aus den nicht-überexprimierenden Kontrollzellen. Farbig hinterlegt ist die Anzahl der gefundenen Peptide des entsprechenden Proteins in der jeweiligen Elutionsfraktion. a bzw. b bezeichnen die Auswertungen der Doppelbestimmung.

Probability Legend:
over 95%
80% to 94%
50% to 79%
20% to 49%
0% to 19%

Bio Sample 1

#	Visible?	Starred?	MS/MS View: Identified Proteins (59)	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	bait10_a_111225_O4_CS_KD_Li...	bait10_b_111231_O4_CS_KD_Li...	bait6_a_111225_O4_CS_KD_Lin...	bait6_b_111231_O4_CS_KD_Lin...	bait7_a_111225_O4_CS_KD_Lin...	bait7_b_111231_O4_CS_KD_Lin...	bait8_a_111225_O4_CS_KD_Lin...	bait8_b_111231_O4_CS_KD_Lin...	bait9_a_111225_O4_CS_KD_Lin...	bait9_b_111231_O4_CS_KD_Lin...	co1_a_111225_O4_CS_KD_Linne...	co1_b_111231_O4_CS_KD_Linne...	co2_a_111225_O4_CS_KD_Linne...	co2_b_111231_O4_CS_KD_Linne...	co3_a_111225_O4_CS_KD_Linne...	co3_b_111231_O4_CS_KD_Linne...	co4_a_111225_O4_CS_KD_Linne...	co4_b_111231_O4_CS_KD_Linne...	co5_a_111225_O4_CS_KD_Linne...	co5_b_111231_O4_CS_KD_Linne...
1	☑	☆	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapi...	sp|P60709|...	42 kDa	★	18	18	17	17	20	17	22	19	19	16	13	12	16	12	15	16	13	15	12	13
2	☑	☆	AH receptor-interacting protein OS...	sp|O00170|...	38 kDa		11	10	25	22	26	25	22	20	14	13				1						
3	☑	☆	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=H...	sp|P04264|...	66 kDa	★	17	24	6	7	7	10	20	7	30	3	8	14	12	25	3	26	16	12	20	18
4	☑	☆	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=...	sp|P13645|...	59 kDa	★	18	12	2	4	2	7	19	6	18	10	4	10	17	17		12	13	17	13	13
5	☑	☆	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=H...	sp|P35527|...	62 kDa	★	3	14	3	5	4	6	11	4	16	1	6	13	1	13	1	15	4	4	14	13
6	☑	☆	Vimentin OS=Homo sapiens GN=VIM...	sp|P08670|...	54 kDa	★	12	8	2	2	3	2	11	6	6	6	5	5	9	8	10	7	7	8	0	4
7	☑	☆	Keratin, type II cytoskeletal 2 epide...	sp|P35908|...	65 kDa	★	10	5	2	3	2	7	7		13	3		11	7	10		6	6	10	12	7
8	☑	☆	Heat shock protein HSP 90-beta OS...	sp|P08238|...	83 kDa	★	5	2	10	12	20	17	8	8	4	2	2	3	3	3	1	1	1	1		
9	☑	☆	Heat shock cognate 71 kDa protein ...	sp|P11142|...	71 kDa	★	3	1	8	10	16	10	3	3	3	2	4	2	4	4	2	1	3	2		2
10	☑	☆	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B OS...	sp|P08107|...	70 kDa	★	5	2	3	1	11	7	5	5	5	1	1		6	5	3	3	3	2		1
11	☑	☆	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Hom...	sp|P68104|...	50 kDa		5	3	1	1	7	6	5	4	5	3		1	5	5	4	4	5	3	1	3
12	☑	☆	Filamin-A OS=Homo sapiens GN=FLN...	sp|P21333|...	281 kDa		13	4	1		5		13	5	15	4			1							
13	☑	☆	Heat shock protein HSP 90-alpha OS...	sp|P07900|...	85 kDa	★	2		6	7	14	9	4	6	3	1	1		1							
14	☑	☆	Brain acid soluble protein 1 OS=Hom...	sp|P80723|...	23 kDa		5	5			1	2	3	1	4	2	1		4	5	6	4	6	3	2	3
15	☑	☆	Histone H4 OS=Homo sapiens GN=H...	sp|P62805|...	11 kDa		2	2	1	1	2	2	3	2	2	2	3	3	3	5	4	3	3	2	1	3
16	☑	☆	Fascin OS=Homo sapiens GN=FSCN1 ...	sp|Q16658|...	55 kDa		2	4			6	3	8	8	6	6										
17	☑	☆	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase ...	sp|P23284|...	24 kDa		4	2			1	1	4	4	5	3	2		4	3	4	3	3			
18	☑	☆	Alpha-actinin-4 OS=Homo sapiens G...	sp|O43707|...	105 kDa		10	6	1			1	6	1	10	2	1	0	2	2	2	1	2			
19	☑	☆	Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens ...	sp|Q06830|...	22 kDa		1	1	1	1	4	1	2	1	1	1	2	2	5	3	3	1	3	2		1
20	☑	☆	Calmodulin OS=Homo sapiens GN=C...	sp|P62158|...	17 kDa		2	1					2	1	1		2		1	2	4	2	2	1		1
21	☑	☆	Histone H2A type 1 OS=Homo sapie...	sp|P0C0S8|...	14 kDa		2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1		3	2	2	2	2	1		1
22	☑	☆	Spectrin alpha chain, brain OS=Hom...	sp|Q13813|...	285 kDa		2								1				5		7	2	4	1		
23	☑	☆	High mobility group protein B2 OS=...	sp|P26583|...	24 kDa						1	1	2	1		0			3	4	2	2	2			
24	☑	☆	Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=...	sp|P08779|...	51 kDa	★	2	2				1	4		1			5	1	1		1		2		
25	☑	☆	Caldesmon OS=Homo sapiens GN=C...	sp|Q05682|...	93 kDa		0	1			1		1	1					5	3	2	2	0			
26	☑	☆	Histone H3.1 OS=Homo sapiens GN=...	sp|P68431|...	15 kDa		1		1	0	1		0	1	1	1	1	1	1		1	2		1		
27	☑	☆	Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DC...	sp|P81605|...	11 kDa		2								3		3		2	3		3				
28	☑	☆	Cofilin-1 OS=Homo sapiens GN=CFL1...	sp|P23528|...	19 kDa			1	1			1		1		1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1
29	☑	☆	Drebrin OS=Homo sapiens GN=DBN1...	sp|Q16643|...	71 kDa												1	0	3	0	2	0	3	2		
30	☑	☆	Tubulin alpha-1B chain OS=Homo sa...	sp|P68363|...	50 kDa		1		2	1	4	2	2						2	1						

Probability Legend:

- over 95%
- 80% to 94%
- 50% to 79%
- 20% to 49%
- 0% to 19%

MS/MS View: Identified Proteins (59)

Bio Sample 1

#	Visible?	Starred?	Identified Proteins	Accession Number	Molecular Weight	Protein Grouping Ambiguity	bait10_a_111225_O4_CS_KD_Li...	bait10_b_111231_O4_CS_KD_Li...	bait6_a_111225_O4_CS_KD_Lin...	bait6_b_111231_O4_CS_KD_Lin...	bait7_a_111225_O4_CS_KD_Lin...	bait7_b_111231_O4_CS_KD_Lin...	bait8_a_111225_O4_CS_KD_Lin...	bait8_b_111231_O4_CS_KD_Lin...	bait9_a_111225_O4_CS_KD_Lin...	bait9_b_111231_O4_CS_KD_Lin...	co1_a_111225_O4_CS_KD_Linne...	co1_b_111231_O4_CS_KD_Linne...	co2_a_111225_O4_CS_KD_Linne...	co2_b_111231_O4_CS_KD_Linne...	co3_a_111225_O4_CS_KD_Linne...	co3_b_111231_O4_CS_KD_Linne...	co4_a_111225_O4_CS_KD_Linne...	co4_b_111231_O4_CS_KD_Linne...	co5_a_111225_O4_CS_KD_Linne...	co5_b_111231_O4_CS_KD_Linne...
30	✓	☆	Tubulin alpha-1B chain OS=Homo sa...	sp|P68363|...	50 kDa		1		2	1	4	2	2						2	1						
31	✓	☆	Keratin, type II cytoskeletal 6C OS=...	sp|P48668|...	60 kDa	★		3					1					6	1			1		1		1
32	✓	☆	Septin-2 OS=Homo sapiens GN=SEP...	sp|Q15019|...	41 kDa	★					2								5	4						
33	✓	☆	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=H...	sp|P13647|...	62 kDa	★		1					4		0			1		1				1	1	0
34	✓	☆	Prostaglandin E synthase 3 OS=Hom...	sp|Q15185|...	19 kDa				2	2	3	4														
35	✓	☆	Thioredoxin OS=Homo sapiens GN=...	sp|P10599|...	12 kDa				0	1							1	1	2	1	2	1	2			
36	✓	☆	Histone H2B type 1-K OS=Homo sapi...	sp|O60814|...	14 kDa	★	1				1		1						1	2	1	1		0		
37	✓	☆	Proliferation-associated protein 2G4...	sp|Q9UQ80|...	44 kDa		2	1					0						3	1	0	1		1		
38	✓	☆	Spectrin beta chain, brain 1 OS=Ho...	sp|Q01082|...	275 kDa			1											3	2	2	1		1		
39	✓	☆	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) l...	sp|P27695|...	36 kDa						1	0	2	1	0				1	2						
40	✓	☆	Heterogeneous nuclear ribonucleop...	sp|P61978|...	51 kDa		2				1		1	0	1				2	1						
41	✓	☆	Guanine nucleotide-binding protein ...	sp|P62879|...	37 kDa														3	1	2	1	2			
42	✓	☆	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=...	sp|P02533|...	52 kDa	★	1						4					3								
43	✓	☆	WD repeat-containing protein 1 OS=...	sp|O75083|...	66 kDa			1								1			1		2		1	1		
44	✓	☆	Septin-8 OS=Homo sapiens GN=SEP...	sp|Q92599|...	56 kDa	★						0							6							
45	✓	☆	Septin-9 OS=Homo sapiens GN=SEP...	sp|Q9UHD8|...	65 kDa	★													3	4						
46	✓	☆	Ezrin OS=Homo sapiens GN=EZR PE...	sp|P15311|...	69 kDa		1												1	2	1	1				
47	✓	☆	Src substrate cortactin OS=Homo s...	sp|Q14247|...	62 kDa						2		2						1	1						
48	✓	☆	Tubulin beta chain OS=Homo sapien...	sp|P07437|...	50 kDa						4								1	1						
49	✓	☆	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase ...	sp|P62937|...	18 kDa												2		1	1	1					
50	✓	☆	Coronin-1C OS=Homo sapiens GN=C...	sp|Q9ULV4|...	53 kDa														2		0			1		
51	✓	☆	Keratin, type II cytoskeletal 8 OS=H...	sp|P05787|...	54 kDa	★	2	1							1											
52	✓	☆	Hsp90 co-chaperone Cdc37 OS=Ho...	sp|Q16543|...	44 kDa						3	0														
53	✓	☆	Suppressor of G2 allele of SKP1 hom...	sp|Q9Y2Z0|...	41 kDa						3															
54	✓	☆	40S ribosomal protein SA OS=Homo ...	sp|P08865|...	33 kDa														2	1						
55	✓	☆	60S ribosomal protein L18 OS=Hom...	sp|Q07020|...	22 kDa														2	1						
56	✓	☆	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase ...	sp|Q9Y237|...	14 kDa														2	1						
57	✓	☆	Guanine nucleotide-binding protein ...	sp|P63244|...	35 kDa														2		1					
58	✓	☆	Keratin, type II cuticular Hb6 OS=Ho...	sp|O43790|...	53 kDa	★																				3
59	✓	☆	Keratin, type I cuticular Ha1 OS=Ho...	sp|Q15323|...	47 kDa	★																				2

Eigene Veröffentlichungen

Kühn, U., Gündel, M., Knoth, A., Kerwitz, Y., Ruedel, S., and Wahle, E. (2009): Poly(A) tail length is controlled by the nuclear poly(A) binding protein regulating the interaction between poly(A) polymerase and the cleavage and polyadenylation specificity factor. *J Biol Chem*.

Burgardt, N. I., Linnert, M., Weiwad, M., Geisler, M., and Lücke, C. (2011): NMR assignments of the FKBP-type PPIase domain of FKBP42 from Arabidopsis thaliana. *Biomol NMR Assign*.

Linnert, M., Haupt, K., Lin, Y. J., Kissing, S., Paschke, A. K., Fischer, G., Weiwad, M., and Lücke, C. (2012): NMR assignments of the FKBP-type PPIase domain of the human aryl-hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP). *Biomol NMR Assign*.

Haupt, K., Jahreis, G., Linnert, M., Maestre-Martinez, M., Malesevic, M., Pechstein, A., Edlich, F., and Lücke, C. (2012): The Catalytic Domain of FKBP38 Binds to Bcl-2 via a Charge-sensitive Loop. *J Biol Chem*.

Henrichs, S., Wang, B., Fukao, Y., Zhu, J., Charrier, L., Bailly, A., Oehring, S. C., Linnert, M., Weiwad, M., Endler, A., Nanni, P., Pollmann, S., Mancuso, S., Schulz, A., and Geisler, M. (2012): Regulation of ABCB1/PGP1-catalysed auxin transport by linker phosphorylation. *EMBO J*.

Linnert[#], M., Theuerkorn[#], M., Wetzel[#], S., Pösel, S., Schulze, B., Kissing, S., Thiele, A., Fischer, G., Weiwad, M. : Analysis of FK506 binding capacities of human FKBP family. *In Vorbereitung*

Linnert[#], M., Lin[#], Y. J., Manns, A., Haupt, K., Paschke, A. K., Fischer, G., Weiwad, M., and Lücke, C. : The human aryl-hydrocarbon receptor-interacting protein features a uniquely structured FKBP-type PPIase domain that interacts with Hsp90. *In Vorbereitung*

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt zu haben. Alle wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet. Diese Arbeit wurde noch keiner Prüfungskommission vorgelegt.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Linnert, geb. Gündel
Vorname	Miriam
Strasse	Fischer-von-Erlach Strasse 61
PLZ/ Wohnort	06114 Halle (Saale)
Geburtsdatum	26. November 1982
Geburtsort	Rodewisch
Familienstand	verheiratet
Nationalität	deutsch

SCHULISCHE AUSBILDUNG

09/1989 – 08/1993	Grundschule in Waldkirchen
09/1993 – 06/2001	Gymnasium „Johann-Heinrich-Pestalozzi“ in Rodewisch Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

STUDIUM

10/2002 – 09/2007	Studienrichtung „Biochemie Diplom“ an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg - Abschluss: Diplombiochemikerin

FACHLICHE AUSBILDUNG

11/2006 – 09/2007	Diplomarbeit in der Abteilung Allgemeine Biochemie zum Thema: „Die Längenkontrolle der Polyadenylierung ist auf den Interaktionsverlust zwischen der Poly(A)-Polymerase mit dem *cleavage and polyadenylation specificity factor* zurückzuführen“
11/2007 – heute	Promotionsarbeit an der Max Planck Forschungsstelle – Enzymologie der Proteinfaltung zum Thema: „Struktur und Funktion der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Domäne des humanen FK506-bindenden Proteins 37.7”

Halle (Saale), 24.05.2012

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Gunther Fischer für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die sehr guten Arbeitsbedingungen sowie für die Überlassung des interessanten Themas.

Ganz besonders herzlich möchte ich meinem Betreuer Dr. Matthias Weiwad für die Betreuung dieser Arbeit, die vielen nützlichen Ratschläge, sein ständig offenes Ohr und seine großartige Unterstützung danken.

Ebenfalls ganz herzlich möchte ich PD Dr. Christian Lücke für die Einführung in die NMR-Spektroskopie, die sehr gute Zusammenarbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft danken.

PD Dr. Christian Lücke, Dr. Katja Haupt und Dr. Yi-Jan Lin danke ich zudem für die Durchführung aller NMR-spektroskopischen Experimente und für die Strukturrechnung.

Dr. Angelika Schierhorn sowie Dr. Christian Scharf danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen.

Bei Sebastian Wetzel und Annika Manns möchte ich mich für ihre Unterstützung während der Anfertigung ihrer Diplomarbeiten bedanken. Ebenfalls danke ich Sandra Kissing für die Unterstützung während ihres Forschungsgruppenpraktikums.

Weiterhin möchte ich mich für die technische Unterstützung bei Martina Heidler, Helga Ungar sowie Hella Klemens bedanken.

Bei allen nicht namentlich erwähnten Personen, die in irgendeiner Form zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Meiner Familie, meinen Freunden und insbesondere meinem Mann Matthias danke ich von ganzem Herzen für jegliche Unterstützung während der gesamten Entstehungszeit dieser Arbeit.