

**Biochemie und
Protein-Protein-Interaktionen des
Multidomänen-Cyclophilins Cyp58**

DISSERTATION

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
– Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt von

Herrn MARIO TRÄGER

geboren am 22. September 1981 in Reichenbach im Vogtland

Gutachter:

1. Prof. Dr. Gunter Fischer
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie Göttingen BO Halle
2. Prof. Dr. Thomas Kiefhaber
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
3. Prof. Dr. Holger Barth
Universitätsklinikum Ulm

Halle (Saale), den 24.09.2014 (verteidigt am 30.03.2015)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	vi
1 Einleitung	1
1.1 Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerasen	1
1.2 Multidomänen-Cyclophiline	3
1.3 Das Multidomänen-Cyclophilin Cyp58	8
1.4 Ubiquitin-vermittelter Proteinabbau	10
1.4.1 Ubiquitin-Protein-Ligasen	11
1.4.2 U-Box-Domänen-Proteine	12
1.4.3 PPIasen im Proteinabbau	13
1.5 Zielstellung der Arbeit	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Materialien	15
2.2 Mikrobiologische Methoden	23
2.2.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> -Zellen	23
2.2.2 Anlegen von Glycerinkulturen	23
2.2.3 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	23
2.2.4 Kultivierung von Expressionsklonen	23
2.3 Molekularbiologische Methoden	23
2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA	23
2.3.2 Polymerasekettenreaktion	24
2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese	24
2.3.4 Klonierung	24
2.3.5 Ortsspezifische Mutagenese	24
2.4 Präparative Methoden	25
2.4.1 <i>E. coli</i> -Zellaufschluss für die Proteinreinigung	25
2.4.2 Proteinreinigung	25
2.4.3 Dialyse	26
2.4.4 Proteinkonzentrierung	26
2.4.5 Trichloressigsäure-Fällung	26
2.4.6 Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie	26
2.4.7 <i>Spot</i> -Synthese	27

2.5	Analytische Methoden	27
2.5.1	Konzentrationsbestimmung	27
2.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
2.5.3	Blaue Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
2.5.4	Coomassie-Färbung	28
2.5.5	Western-Blot-Analyse	28
2.5.6	Circulardichroismus-Spektroskopie	29
2.5.7	PPIase-Aktivitätstest	29
2.5.8	Ubiquitin-Protein-Ligase-Aktivitätstest	31
2.5.9	Limitierte Proteolyse	32
2.5.10	Pulldown-Experimente	32
2.5.11	Bindungsstudien mit Peptid-Bibliotheken	33
2.5.12	Analytische Größenausschluss-Chromatographie	33
2.5.13	Analytische Ultrazentrifugation	34
2.5.14	Phosphatase-Aktivitätstest und Inhibition von PP2A	34
2.5.15	Massenspektrometrische Analyse	35
2.6	Zellkultur	36
2.6.1	Kultivierung von HeLa-Zellen	36
2.6.2	HeLa-Zellernte und Erstellen von HeLa-Zelllysaten	36
2.6.3	Transfektion von HeLa-Zellen	36
2.6.4	Induktion von RNAi in HeLa-Zellen	37
2.6.5	Untersuchung des Proteinabbaus	37
2.6.6	Untersuchung des Proteingehalts im Verlauf des Zellzyklus	37
2.6.7	MTT-Test	38
2.6.8	Konfokale Mikroskopie	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Sequenzanalyse von Cyp58	39
3.2	Expression und Reinigung von Cyp58 und Cyp58-Fragmenten	40
3.3	Sekundärstruktur und Temperaturstabilität von Cyp58	44
3.4	PPIase-Aktivität von Cyp58	45
3.4.1	PPIase-Aktivität von Cyp58 und Cyp58-Fragmenten	45
3.4.2	Substratspezifität von Cyp58	47
3.4.3	Inhibition von Cyp58 durch CsA	48
3.4.4	Suche nach Cyp58-Inhibitoren	49
3.4.5	Einfluss der U-Box-Domäne auf die Aktivität der PPIase-Domäne von Cyp58	50
3.5	Ubiquitin-Protein-Ligase-Aktivität von Cyp58	51
3.5.1	Autoubiquitylierung und E2-Präferenz von Cyp58	51
3.5.2	Expression und Reinigung von UbcH3	52
3.5.3	Aktivität von rekombinantem UbcH3	53

3.5.4	Verifizierung der Autoubiquitylierung von Cyp58	53
3.5.5	Identifizierung der Autoubiquitylierungspositionen	54
3.5.6	Einfluss der PPIase-Aktivität auf die Autoubiquitylierung von Cyp58	55
3.6	Analyse der Domänenstruktur von Cyp58	56
3.7	Untersuchung des oligomeren Zustands von Cyp58	57
3.8	Identifizierung von Interaktionspartnern von Cyp58	60
3.9	Interaktion von Cyp58 mit 14-3-3-Proteinen	61
3.9.1	Expression und Reinigung von 14-3-3-Protein-Isoformen	61
3.9.2	Isoformspezifität der Cyp58/14-3-3-Protein-Interaktion	62
3.9.3	Identifizierung der Interaktionsstellen zwischen Cyp58 und 14-3-3-Proteinen	62
3.10	Interaktion von Cyp58 mit SET-Protein	66
3.10.1	Expression und Reinigung von SET-Protein	66
3.10.2	Identifizierung der Interaktionsstellen zwischen Cyp58 und SET-Protein	67
3.10.3	Einfluss von Cyp58 auf die Histon-Bindung von SET-Protein	70
3.10.4	Einfluss von Cyp58 auf die PP2A-Inhibition durch SET-Protein	70
3.10.5	Einfluss von Cyp58 auf die Proteolyse von SET-Protein durch Granzym A	71
3.11	Ubiquitylierung in Cyp58/Interaktionspartner-Kombinationen	72
3.12	Einfluss der Interaktionspartner auf die Cyp58-PPIase-Aktivität	73
3.13	Untersuchung von Cyp58 in humanen HeLa-Zellen	74
3.13.1	Einfluss der Cyp58-Depletion auf Proteingehalte von Interaktionspartnern	75
3.13.2	Proteingehalt von Cyp58 und SET-Protein während des Zellzyklus	75
3.13.3	Einfluss von Cyp58 auf den Abbau von Interaktionspartnern	76
3.13.4	Einfluss von Cyp58 auf die Zellebensfähigkeit	77
3.13.5	Subzelluläre Lokalisation von Cyp58 während des Zellzyklus	78
3.13.6	Subzelluläre Lokalisation von Cyp58-Interaktionspartnern	81
3.13.7	Einfluss der Cyp58-Depletion auf die Lokalisation von SET-Protein	83
4	Diskussion	85
4.1	Charakterisierung der Proteineigenschaften von Cyp58	85
4.2	Protein-Protein-Interaktionen von Cyp58	97
4.3	Cyp58 als Multidomänen-Protein	103
	Zusammenfassung	104
	Literatur	I
	Anhang	XVII

Abkürzungsverzeichnis

Abz	2-Aminobenzoyl
ACN	Acetonitril
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BN-PAGE	Blaue Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
Bt-Ub	biotinyliertes Ubiquitin
Cam	Chloramphenicol
CD	Circulardichroismus
CHX	Cycloheximid
cpm	<i>counts per minute</i>
CsA	Cyclosporin A
Cyp	Cyclophilin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Protein-Ligase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced</i> grün fluoreszierendes Protein
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisation
FBS	Fötale Rinderserum
FKBP	FK506-bindendes Protein
GSH	L-Glutathion, reduziert
GST	Glutathion-S-Transferase
GzmA	Granzym A
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IC_{50}	mittlere inhibitorische Konzentration
IgG	Immunglobulin G
ISD	<i>In-Source Decay</i>
ITC	isotherme Titrationskalorimetrie
Kan	Kanamycin
k_{app}	apparente Geschwindigkeitskonstante

k_{cat}	Wechselzahl, Katalyse-Konstante
$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$	Spezifitätskonstante, katalytische Effizienz
K_{d}	Dissoziationskonstante
k_{enz}	Geschwindigkeitskonstante der enzymkatalysierten Reaktion
K_{m}	Michaelis-Konstante, halbmaximale Enzymaktivität
k_{unkat}	Geschwindigkeitskonstante der unkatalysierten Reaktion
LB	<i>lysogeny broth</i>
m_{M}	molekulare Masse
MPF	Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanz
NTA	Nitrilotriessigsäure
OA	Okadasäure
ORF	<i>open reading frame</i> , Offenes Leseraster
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Par	Parvulin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNA	<i>p</i> -Nitroanilid
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RP-HPLC	<i>reversed phase high performance liquid chromatography</i> , Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i> -Duplex
siRNA _{scr}	<i>scrambled</i> -siRNA-Duplex
Suc	Succinyl
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
$[\theta]_{\lambda, \text{MRW}}$	mittlere molare Elliptizität pro Peptidbindung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TPR	<i>tetratricopeptide repeat</i>
Tricin	<i>N</i> -[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycine
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-isothiocyanat
U	<i>Unit</i> , Einheit der Enzymaktivität
Ub	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	Ultraviolett
wt	wildtypisch
% v/v	Volumenprozent
% w/v	Massenprozent

1 Einleitung

1.1 Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen

Proteine sind lineare Polymere aus α -Aminosäuren, die über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Die Abfolge der Aminosäuren wird dabei als Primärstruktur und die räumliche Anordnung als Sekundär- oder Tertiärstruktur von Proteinen bezeichnet. Die räumliche Anordnung der Aminosäuren resultiert aus der Konformation des Proteinrückgrats, beschrieben durch die Torsionswinkel ϕ (N-C $_{\alpha}$ -Bindung), ψ (C $_{\alpha}$ -C(O)-Bindung) und ω (C(O)-N-Bindung). Während ϕ und ψ formal frei drehbar sind, ist die Peptidbindung mit dem Torsionswinkel ω aufgrund ihres partiellen Doppelbindungscharakters auf zwei ineinander umwandelbare Konformationen beschränkt. In Bezug auf die Anordnung benachbarter C $_{\alpha}$ -Atome wird dabei von *trans*- ($\omega \approx 180^\circ$) und *cis*-Konformation ($\omega \approx 0^\circ$) gesprochen (Abb. 1.1). Aufgrund sterischer Hinderung ist die *cis*-Konformation energetisch stark benachteiligt [1]. Innerhalb von Proteinen können die durch *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidbindungen hervorgerufenen lokalen Konformationsänderungen häufig durch Variation benachbarter Winkel des Proteinrückgrats ausgeglichen werden. Manchmal sind diese kleinen Veränderungen aber entscheidend für biologische Funktionen, wie für die katalytische Aktivität in aktiven Zentren von Enzymen oder bei molekularen Erkennungsmechanismen [2].

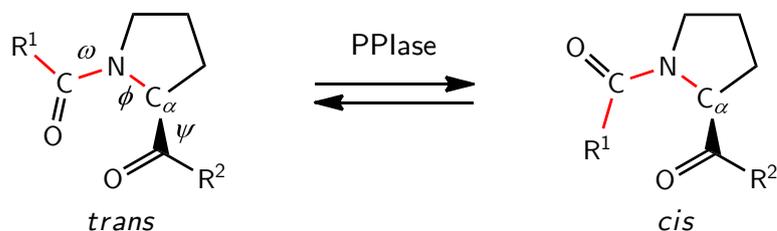


Abb. 1.1: Reaktionsgleichung für die *cis/trans*-Isomerisierung der Peptidyl-Prolyl-Bindung. In rot sind die die Isomer-Bezeichnungen *trans* und *cis* begründenden Bindungen dargestellt. ω , ϕ , ψ , Torsionswinkel.

Eine Sonderrolle unter den Peptidbindungen kommt der Xaa-Pro-Bindung (Prolyl-Bindung) zu, die aufgrund der Iminosäure Prolin eine tertiäre Amidbindung darstellt. Prolyl-Bindungen haben im Vergleich zu nicht-Prolyl-Bindungen eine höhere Rotationsbarriere und weisen aufgrund eines geringeren Energieunterschieds zwischen *cis*- und *trans*-Isomer einen deutlich erhöhten *cis*-Anteil auf [3, 4]. In Modellpeptiden wurde, in Abhängigkeit von der dem Prolin vorausgehenden Aminosäure, ein *cis*-Prolyl-Anteil von 6–38 % im Vergleich zu 0,1–0,4 % in nicht-Prolyl-Bindungen bestimmt [5]. Eine Untersuchung von bekannten Proteinstrukturen zeigte, dass 5,2 % aller Prolyl-Bindungen und 0,03 % aller nicht-Prolyl-Bindungen in Proteinen in *cis*-Konformation vorliegen [6, 7].

Da ω im Vergleich zu ϕ und ψ eine deutlich höhere Rotationsbarriere aufweist, kann bei Faltungsvorgängen von *cis*-Prolyl-haltigen Proteinen die *cis/trans*-Isomerisierung zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt werden [1]. FISCHER *et al.* war es 1984 erstmals gelungen, ein Enzym zu isolieren, das die Konformationsumwandlung von Prolyl-Bindungen in Peptidsubstraten katalysieren kann [8]. Entsprechend seiner Substratspezifität wurde es als Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase (PPIase; EC 5.2.1.8) bezeichnet. Anschließend wurde auch die Aktivität gegenüber Proteinsubstraten gezeigt. Langsame Schritte während der Rückfaltung verschiedener *cis*-Prolyl-haltiger Proteine konnten durch PPIase beschleunigt werden [9–11].

Durch die Entdeckung, dass die initial entdeckte PPIase identisch ist mit Cyclophilin, dem zellulären Rezeptor des immunsuppressiven, in der Transplantationsmedizin eingesetzten zyklischen Undecapeptids Cyclosporin A (CsA), wurde für dieses Enzym und seine Aktivität eine fundamentale Rolle im zellulären Metabolismus vermutet [12–14]. Unmittelbar danach erfolgte die Entdeckung eines weiteren Proteins mit PPIase-Aktivität, das ebenfalls ein zellulärer Rezeptor für Immunsuppressiva, die beiden strukturell verwandten Makrolide FK506 und Rapamycin, ist [15, 16]. Dieses neue, strukturell von Cyclophilin verschiedene Protein wurde entsprechend seiner Bindungseigenschaft als FK506-bindendes Protein (FKBP) bezeichnet. Cyclophilin und FKBP zeigen beide eine starke Bindung ihrer jeweiligen Liganden, was zu einer effektiven Immunsuppression und reversiblen kompetitiven Inhibition der PPIase-Aktivität führt. Dabei tritt keine Kreuzinhibition der Enzymaktivitäten auf [15, 16].

Durch den Einsatz von nicht-immunsuppressiven Derivaten von CsA und FK506 konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der PPIase-Aktivität nicht ausreichend ist für die Immunsuppression [17, 18]. Als eigentliche immunsuppressiv wirksame Komponenten wurden die Cyclophilin/CsA- und FKBP/FK506-Komplexe identifiziert [19]. Erstaunlicherweise haben beide Komplexe, trotz starker struktureller Unterschiede der PPIasen und Peptidliganden, die Fähigkeit die Proteinphosphatase Calcineurin in einem ternären Komplex zu binden. Diese Calcineurin-Inaktivierung führt zu einer Unterbindung der T-Lymphozyten-Aktivierung, indem die Translokation des Transkriptionsfaktors NF-AT vom Cytosol in den Zellkern blockiert und damit die Transkription von Cytokinen verhindert wird [20, 21]. Die Wirkung des FKBP/Rapamycin-Komplexes verläuft über einen alternativen Signalweg, der ebenfalls zur Inhibition der T-Lymphozyten-Aktivierung führt [22]. Aufgrund des immunsuppressiven Charakters dieser Komplexe werden Cyclophilin und FKBP auch als Immunophiline bezeichnet. Die drei Immunsuppressiva CsA, FK506 und Rapamycin, welche ursprünglich als mikrobielle Abwehrstoffe isoliert wurden, finden auch heute noch einen breiten Einsatz in der Medizin.

Mittlerweile wurden eine Vielzahl weiterer Isoformen der Cyclophiline und FKBP identifiziert. Diese bilden zwei hoch konservierte Proteinfamilien, die ubiquitär vertreten und in nahezu allen Geweben und subzellulären Kompartimenten anzutreffen sind [23–25]. Mit dem Parvulin aus *Escherichia coli* wurde der erste Vertreter einer dritten Familie von PPIasen identifiziert, der weder eine Bindung von CsA noch von FK506 oder Rapamycin zeigt [26]. Parvuline können jedoch durch den Naturstoff Juglon aus der Walnuss *Juglans sp.* selektiv, aber irreversibel inaktiviert werden [27]. Der prominenteste Vertreter der Parvulin-Familie ist das humane Pin1, welches spezifisch die Isomerisierung von Phospho-Ser-Pro- und Phospho-Thr-Pro-Bindungen katalysiert und ein essentieller Regulator des Zellzyklus ist [28–30].

Für die wachsende Zahl an PPIasen in verschiedenen Organismen wurde eine einheitliche Nomenklatur vorgeschlagen. Dabei wird der Ursprungsorganismus der Abkürzung der Enzymfamilie voranzustellen und die ungefähre molekulare Masse folgt als Suffix [31]. Für die zuerst entdeckten, prototypischen Vertreter der drei PPIase-Familien ergeben sich so die Bezeichnungen humanes Cyp18, humanes FKBP12 und *E.coli* Par10¹.

Die Konservierung der katalytischen Aktivität von PPIasen über mehrere in Sequenz und Struktur verschiedene Proteinfamilien mit einer teils großen Anzahl an Familienmitgliedern spricht für eine wichtige biologische Funktion dieser Enzymklasse. Dennoch wurde durch Untersuchungen in *Saccharomyces cerevisiae* festgestellt, dass viele PPIasen nicht essentiell für die Lebensfähigkeit von Hefen sind [32]. Als Erklärung wird eine funktionelle Redundanz gesehen, die es PPIasen erlaubt, die Funktion anderer PPIasen zumindest teilweise zu übernehmen [33, 34]. Die Bedeutung einzelner PPIasen für Organismen wird häufig erst nach der Deletion des betreffenden PPIase-Gens unter bestimmten Bedingungen oder bei der Untersuchung spezieller Vorgänge offensichtlich. So führt die Deletion von murinem Cyp18 zwar zu lebensfähigen Mäusen, diese entwickeln aber allergische Krankheiten mit erhöhten IgE-Werten und zeigen Gewebsinfiltration durch Mastzellen und Eosinophile [35]. Die Deletion von Cyp23 in Mäusen führt hingegen zu Kyphose und schwerer Osteoporose. Außerdem zeigen Collagen-Fibrillen in Cyp23-defizienten Mäusen eine abnorme Morphologie [36].

PPIasen sind hoch effiziente Katalysatoren der Isomerisierung von Prolyl-Bindungen, die Isomerisierung von nicht-Prolyl-Bindungen kann durch diese Enzyme aber nicht beschleunigt werden [37]. Für die Katalyse dieser Reaktion wurde mit den sekundären amidischen Peptidbindungs-*cis/trans*-Isomerasen (APIasen) eine neue Enzymklasse identifiziert [38].

1.2 Multidomänen-Cyclophiline

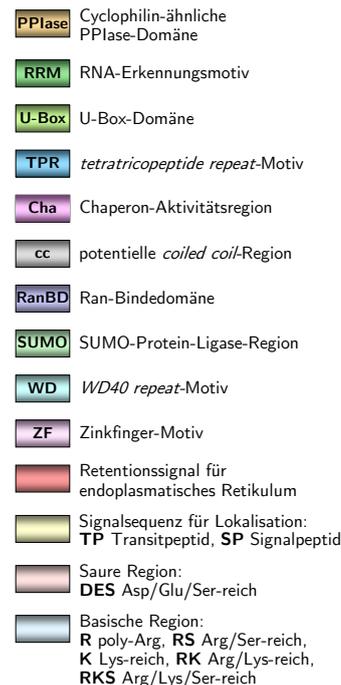
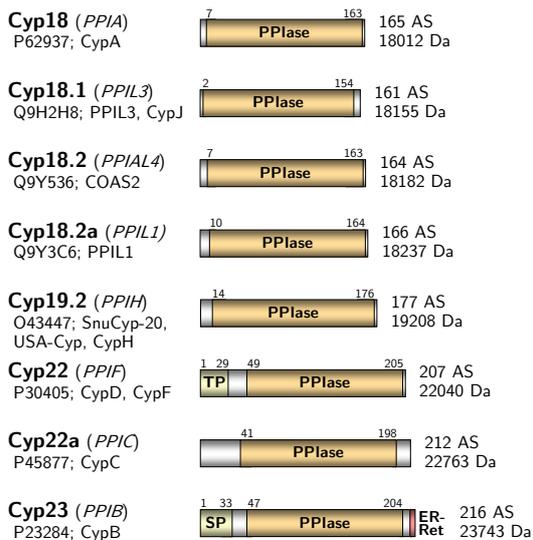
Cyclophiline sind wie die Mitglieder der anderen PPIase-Familien modular aufgebaut. Sie bestehen aus einer ca. 18kDa großen Cyclophilin-ähnlichen PPIase-Domäne, die entweder allein steht oder *N*- und *C*-terminal durch weitere funktionale Domänen ergänzt wird. Es wird zwischen Einzeldomänen- und Multidomänen-Cyclophilinen unterschieden.

Cyclophiline sind in Bakterien, Archaeen und Eukaryoten verbreitet. Zahlreiche Bakterien und Archaeen verfügen über 1 bis 5 Cyclophiline, einige kommen jedoch auch ganz ohne aus. Komplexere Organismen können auf deutlich mehr Cyclophiline zurückgreifen. So verfügt *S. cerevisiae* über 8, *Caenorhabditis elegans* über 17 und *Drosophila melanogaster* über 14 Isoformen [39]. In höheren Pflanzen liegt eine besonders hohe Zahl an Cyclophilinen vor, wobei *Arabidopsis thaliana* mit 29 dieser Enzyme der Organismus mit den derzeit meisten identifizierten Isoformen ist [40]. In humanen Zellen umfasst die PPIase-Familie der Cyclophiline 18 Mitglieder. Zusätzlich existieren für einige der Cyclophiline alternative Spleißvarianten. Abbildung 1.2 gibt einen Überblick über die humanen Cyclophiline mit ihrer Domänen- und Regionenstruktur, wie sie in der UniProt-Datenbank² angegeben wird.

¹Im Folgenden wird der Ursprungsorganismus nur bei nicht-humanen Proteinen genannt, da in der hier vorliegenden Arbeit vornehmlich humane Proteine besprochen werden.

²<http://www.uniprot.org/>

Einzeldomänen-Cyclophiline



Multidomänen-Cyclophiline

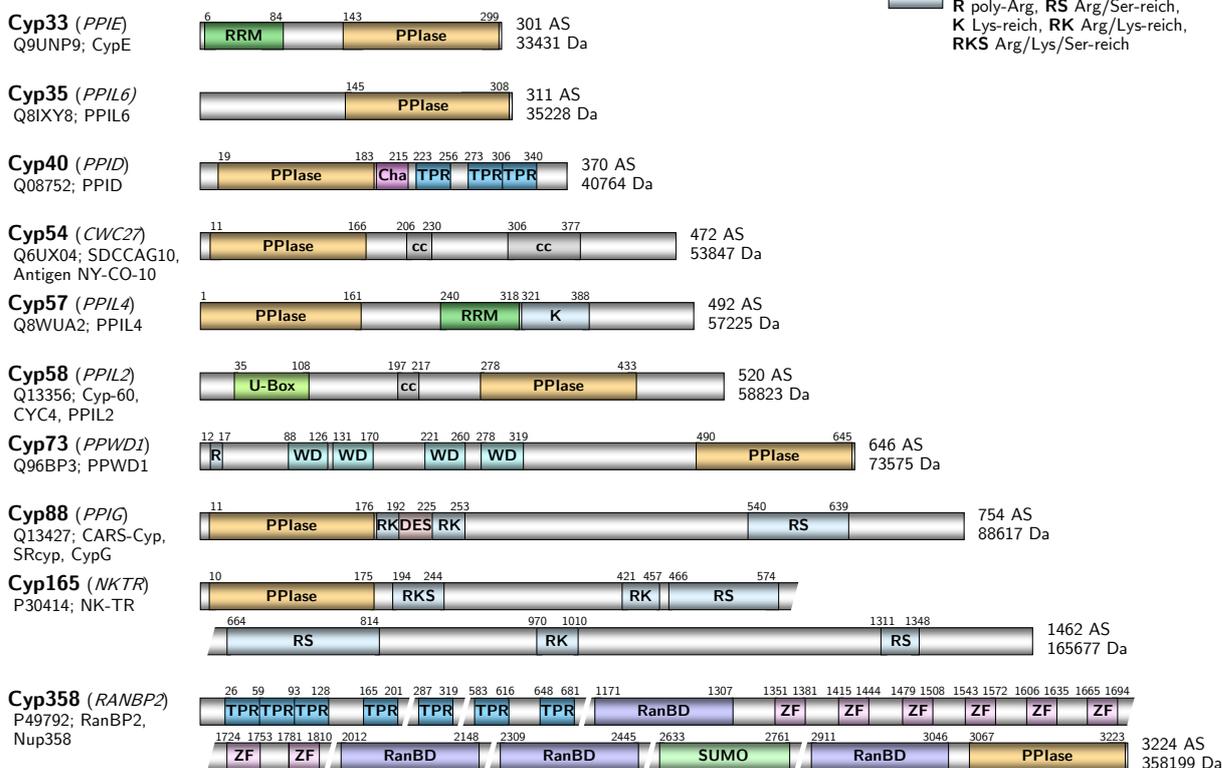


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Domänen- und Regionenstruktur der humanen Cyclophiline. Abbildung modifiziert nach FISCHER & AUMÜLLER [25]. Die Domänen- und Regionengrenzen sind entsprechend der UniProt-Datenbank angegeben. Abgebildet ist die nach UniProt kanonische Isoform des jeweiligen Proteins. Hinter der Protein-Bezeichnung steht der Gen-Name in *Klammern*, die Zugriffsnummer und alternative Bezeichnungen in der *zweiten* und *dritten* *Reihe*. Hinter dem Proteinschema folgt die Anzahl der Aminosäuren (AS) und die molekulare Masse des nicht-prozessierten Proteins. PPIL, *PPIase-like protein*; COAS2, *chromosome 1-amplified sequence 2*; SnuCyp-20, *Snurp Cyp-20*; USA-Cyp, *U-snRNP-associated cyclophilin*; SDCCAG10, *serologically defined colon cancer antigen 10*; CARS-Cyp, *Clk-associating RS-cyclophilin*; NK-TR, *natural killer cells tumor recognition protein*; RanBP2, *Ran-binding protein 2*; Nup358, *358 kDa nucleoporin*.

Das prototypische Cyp18 ist mit ca. 0,1–0,4 % des cytosolischen Gesamtproteins das am stärksten exprimierte humane Cyclophilin [41]. Cyp18 wurde mit verschiedenen zellulären Prozessen, wie Signaltransduktion, Zellzyklus-Regulation oder Schutz gegen oxidativen Stress, in Verbindung gebracht [33, 42–45].

Für die PPIase-Aktivität von Cyp18 gegenüber Peptidsubstraten wurde ein Beschleunigungsfaktor ($k_{\text{cat}}/k_{\text{unkat}}$) von 10^5 – 10^6 bestimmt [46]. Dieser verhältnismäßig kleine Wert [47] ergibt sich aufgrund der relativ schnellen unkatalysierten Prolyl-Isomerisierung (k_{unkat}). Tatsächlich befindet sich die Aktivität von Cyp18 mit einer katalytischen Effizienz (k_{cat}/K_m) von ca. $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [48] nah am Bereich für diffusionskontrollierte enzymatische Reaktionen (10^8 – $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), was als Hinweis auf katalytische Perfektion gewertet wird [47]. Für Multidomänen-Cyclophiline ist meist eine deutlich geringere Aktivität mit katalytischen Effizienzen im Bereich von 10^4 bis $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ beschrieben [49].

In T-Lymphozyten ist Cyp18 hauptverantwortlich für die CsA-induzierte Immunsuppression [50]. Damit hat die CsA-Bindung von Cyp18 eine herausragende Bedeutung in der Medizin. Sie stellt aber keine eigentliche biologische Funktion dieses Enzyms dar, da CsA aus dem Schlauchpilz *Tolyocladium inflatum* stammt und normalerweise nicht mit menschlichen Zellen in Berührung kommt [51]. Ungeachtet dessen ist sie ein nützliches Werkzeug zur Untersuchung der PPIase-Aktivität von Cyclophilinen und ihrer Bedeutung in physiologischen Prozessen. Für den Cyp18/CsA-Komplex wurde von FANGHÄNEL & FISCHER durch isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) eine Dissoziationskonstante (K_d) von 11 nm bestimmt [52]. In der weiteren Literatur schwankt dieser Wert in Abhängigkeit von der verwendeten Messmethode im Bereich von 1,6 bis 5 000 nm [52]. Neben CsA wurden noch weitere Cyclophilin-Inhibitoren identifiziert, wie die ebenfalls immunsuppressiven Sanglifehrine [53, 54] oder die weit weniger potenten, aber zwischen verschiedenen Isoformen diskriminierenden Aryl-1-indanyl-ketone [55].

Zehn der 18 bisher bekannten humanen Cyclophiline sind Multidomänen-Proteine. Diese können aufgrund ihrer Mehr-Domänen-Struktur neben der PPIase-Funktion noch weitere zelluläre Funktionen wahrnehmen. Durch die Kombination der PPIase-Domäne mit anderen Domänen auf einer Polypeptidkette wird eine funktionale Kopplung ermöglicht, die das Funktionsspektrum von PPIasen deutlich erweitern kann. Multidomänen-Cyclophiline liegen meist in niedrigeren zellulären Konzentrationen vor als Einzeldomänen-Cyclophiline und sind schwieriger rekombinant zu gewinnen. Viele Multidomänen-Cyclophiline sind bisher auf Proteinebene wenig charakterisiert. Für die Mehrzahl der humanen Multidomänen-Cyclophiline wurde die Kristallstruktur der PPIase-Domäne gelöst, eine Gesamtstruktur liegt für das bovine Cyp40 vor [56, 57].

Das Chaperon-assoziierte Cyp40

Cyp40 ist das bisher am besten charakterisierte Multidomänen-Cyclophilin. Es besitzt neben einer aktiven PPIase-Domäne drei *tetratricopeptide repeat* (TPR)-Motive und verfügt über eine Chaperon-Aktivität, die in einer Linker-Region im Übergangsbereich zwischen PPIase-Domäne und TPR-Motiven lokalisiert ist [58–60]. Cyp40 kann neben seiner intrinsischen Chaperon-Aktivität mithilfe der TPR-Motive noch die Hitzeschockproteine Hsp90 und Hsc70 als weitere Chaperone rekrutieren [61, 62]. Zusammen mit weiteren Co-Chaperonen ergeben sich größere

Chaperon-Komplexe unterschiedlicher Zusammensetzung [63]. In diesen Hsp90-Heterokomplexen konkurriert Cyp40 mit den TPR-PPIasen FKBP51 und FKBP52 um die Bindestelle an Hsp90, nicht aber um die Bindestelle an Hsc70 [62, 64]. Die Funktion der PPIase-Aktivität von Cyp40 in diesen Komplexen ist noch unbekannt.

Hsp90-Heterokomplexe sind mit Steroid-Rezeptoren assoziiert und notwendig für deren Reifung und Aktivierung. Steroid-Rezeptoren wirken nach Aktivierung durch die entsprechenden Steroide und anschließender Translokation vom Cytosol in den Zellkern als Transkriptionsfaktoren [65]. In Untersuchungen zur Bedeutung von Cyp40 für die Funktion des Glucocorticoid-Rezeptors (GR) wurde eine Beteiligung am Kerntransport des aktivierten GR entlang des Cytoskeletts identifiziert, während eine Beteiligung an der Faltung des GR oder der Assemblierung des GR/Hsp90-Heterokomplexes ausgeschlossen wurde. Die PPIase-Domäne von Cyp40 dient beim Kerntransport als Verbindungsstelle von Rezeptor-Chaperon-Komplexen zum Motorprotein Dynein [66, 67].

Cyp40 ist in Prostatakrebszellen überexprimiert und ein positiver Regulator des am Wachstum von Prostatakrebs beteiligten Androgen-Rezeptors (AR). Cyp40 ist notwendig für optimale AR-Aktivität und wird durch Zugabe von CsA selektiv angesteuert zur Inhibition der Androgen-induzierten Zellproliferation. Damit ist Cyp40 ein potentiell wichtiges Ziel für die Prostatakrebs-Behandlung [68, 69]. In Brustkrebszellen wurde ebenfalls eine Überexpression von Cyp40 beobachtet [70].

Für Cyp40 wurde außerdem eine Beteiligung an der Funktion des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors (AhR), der die Stressantwort auf planare aromatische Kohlenwasserstoffe vermittelt, gezeigt. Cyp40 fördert im Zellkern die Komplexbildung von AhR mit seinem Partnerprotein *AhR nuclear translocator* und dem Erkennungsmotiv in der DNA, dem *dioxin response element* [71]. Entscheidend für diese Komplexbildung ist die die Chaperon-Aktivität beinhaltende Linker-Region zwischen PPIase-Domäne und TPR-Motiven [72].

Spleißosomale Multidomänen-Cyclophiline

Viele Cyclophiline wurden mit dem Spleißosom, dem hochmolekularen RNA-Protein-Komplex zur posttranskriptionellen RNA-Prozessierung, in Verbindung gebracht. Neben den Einzeldomänen-Cyclophilinen Cyp18.1 (PPIL3), Cyp18.2a (PPIL1) und Cyp19.2 (USA-Cyp) wurden die Multidomänen-Cyclophiline Cyp33, Cyp54, Cyp58, Cyp73 und Cyp88 durch massenspektrometrische Analysen im Spleißosom identifiziert [73–76]. Cyp33 und Cyp58 wurden sowohl im B- als auch im C-Komplex des Spleißosoms gefunden, wohingegen Cyp54, Cyp73 und Cyp88 nur im C-Komplex vorlagen [77–79]. Die genauen Funktionen der Multidomänen-Cyclophiline im Spleißosom sind noch weitgehend unbekannt.

Cyp33 (CypE) ist innerhalb des Spleißosoms mit dem Prp19/CDC5L-Komplex (Abschn. 1.4.2) assoziiert [80]. Neben seiner PPIase-Domäne besitzt Cyp33 ein RNA-Erkennungsmotiv, das spezifisch mRNA bindet. Durch diese Bindung wird die PPIase-Aktivität von Cyp33 stimuliert [81, 82]. Cyp33 reguliert über seine PPIase-Aktivität einen molekularen Schalter für die Aktivierung und Repression von Zielgenen [83, 84]. Außerdem inhibiert Cyp33 als Wirtsfaktor die virale Replikation und Transkription von Influenza-A-Viren. Cyp33 interagiert mit dem viralen Nukleo-

protein und beeinträchtigt damit die Bildung des viralen Ribonukleoprotein-Komplexes. Diese antivirale Funktion ist unabhängig von der PPIase-Aktivität von Cyp33, da PPIase-inaktives Cyp33 die virale Replikation in gleichem Maße hemmt [85].

Cyp54 und Cyp73 sind neben der Beteiligung am Spleißosom noch weitestgehend uncharakterisiert auf Proteinebene. Cyp54 (Antigen NY-CO-10) wurde ursprünglich als humanes Colon-Tumor-Antigen identifiziert, das von autologen Antikörpern erkannt wird [86]. Neben der PPIase-Domäne sind für Cyp54 zwei potentielle *coiled coil*-Regionen beschrieben. Für Cyp73 (PPWD1) wurden neben der aktiven PPIase-Domäne vier *WD40 repeat*-Motive identifiziert [56]. Sieben dieser Motive bilden eine β -Propeller-Struktur, eine WD40-Domäne, aus, die als Gerüst zur Koordination von Protein-Protein-Interaktionen dient [87].

Cyp88 (CARS-Cyp) ist das Multidomänen-Cyclophilin, dem die meisten Interaktionspartner im Spleißosom zugeordnet werden können. Cyp88 besitzt neben seiner aktiven PPIase-Domäne eine Arginin/Serin-reiche (RS-)Region, die (wie auch bei den Spleißfaktoren der SR-Protein-Familie) eine Interaktion mit der C-terminalen Domäne der größten Untereinheit von RNA-Polymerase II (Pol II) ermöglicht [88–91]. Die Pol II/Cyp88-Interaktion lässt eine Funktion am Übergang zwischen Transkription und Spleißen vermuten, auch wenn Cyp88 nur im C-Komplex des Spleißosoms, in der letzten Phase des Spleißens, nachgewiesen wurde. Als weitere Interaktionspartner für Cyp88 wurden die SR-Protein-Kinase Clk/Sty [89] und der Spleißfaktor Pinin beschrieben. Die Überexpression von Cyp88, das selbst in Kern-Speckles lokalisiert, führte zu einer Verschiebung der subnukleären Lokalisation von Pinin und SR-Proteinen von Kern-Speckles zu einer diffusen nukleären Verteilung [91, 92].

Das Kernporen-Protein Cyp358

Cyp358 (RanBP2) wurde erstmals als spezifischer Bindepartner des *Ras-related nuclear protein* (Ran) beschrieben und als Nukleoporin identifiziert [93, 94]. Ran ist während der Interphase ein Schlüsselprotein für den nukleären Import und Export von Proteinen und RNA sowie während der Mitose für die Ausbildung des Spindelapparats und die Neubildung der Kernhülle [95]. Als 358-kDa-Nukleoporin ist Cyp358 die größte lösliche Komponente des Kernporen-Komplexes und lokalisiert an dessen cytoplasmatischen Filamenten. Neben einer aktiven PPIase-Domäne verfügt Cyp358 über sieben TPR-Motive, vier Ran-Bindedomänen, acht Zinkfinger (ZF)-Motive und eine Region mit SUMO-Protein-Ligase-Aktivität (Abschn. 1.4) [93, 94, 96, 97]. Die SUMO-Protein-Ligase-Region bildet einen festen Komplex mit dem SUMO-konjugierenden Enzym Ubc9 und SUMO-1-modifiziertem *Ran GTPase-activating protein 1*, einem wichtigen Regulator der Ran-GTPase-Aktivität [98]. Nur über diesen Komplex erfolgt eine SUMO-Protein-Ligase-Aktivität [99]. Damit befindet sich Cyp358 an der Schnittstelle von SUMOylierung und dem Ran-GTPase-Zyklus [100]. Über seine ZF-Motive kann Cyp358 sowohl Proteine wie Exportin-1 oder den *coat protein complex 1* als auch spezielle mRNA-Elemente binden [101–103]. Außerdem besteht eine Verbindung von Cyp358 zum Transportsystem der Zelle durch Interaktionen mit dem Motorprotein Kinesin-1, dem Motorprotein-Adapterprotein Bicaudal D2 oder direkt mit den Mikrotubuli [104–106]. Für die PPIase-Domäne von Cyp358 wurde in Mäusen ein Einfluss auf die Proteostase von selektiven Substraten gezeigt. Sowohl die heterogenen nukleären Ribonukleoproteine

(hnRNP) A2 und B1 als auch Di-Ubiquitin und ubiquitinylierte Proteine wurden in der Retina von Mäusen mit PPIase-inaktivem Cyp358 posttranskriptionell herunterregelt [96].

Sonstige Multidomänen-Cyclophiline

Cyp165 (NK-TR) ist stark homolog zu Cyp88 und besitzt neben seiner aktiven PPIase-Domäne ebenfalls RS-Regionen, ohne bisher mit dem Spleißosom in Verbindung gebracht worden zu sein [107, 108]. Cyp165 wurde erstmals an der Oberfläche von natürlichen Killerzellen als potentielles Tumor-Erkennungsmolekül identifiziert und spielt dort eine wichtige Rolle bei deren lytischer Funktion [107, 109]. Es wurde aber auch an der Oberfläche von T-Lymphozyten nachgewiesen [110]. Für Cyp165 wird eine wichtige Rolle bei der Reifung von myeloiden Zellen vermutet [111].

Cyp35 und Cyp57 sind auf Proteinebene noch uncharakterisiert. Sequenzanalysen zeigen für Cyp35 neben der PPIase-Domäne keine weiteren bekannten Sequenzabschnitte. Cyp57 verfügt wie Cyp33 über ein RNA-Erkennungsmotiv und zusätzlich über eine Lysin-reiche Region [112].

1.3 Das Multidomänen-Cyclophilin Cyp58

Cyp58 hat eine molekulare Masse von 58,8 kDa und wird auch als Cyp-60, CYC4 oder entsprechend des Gen-Namens als PPIL2 bezeichnet. Die Erstbeschreibung von Cyp58 erfolgte als Bindepartner des Proteinase-Inhibitors Eglin C aus dem Blutegel *Hirudo medicinalis*. Dabei wurde im Hefe-Zwei-Hybrid-System die Prolin-haltige Proteinase-Bindestelle von Eglin C als Köder für neue noch unidentifizierte PPIasen verwendet [113]. Neben seiner PPIase-Domäne verfügt Cyp58 über eine N-terminale U-Box-Domäne und eine potentielle *coiled coil*-Region (Abb. 1.3) [114]. U-Box-Proteine sind Ubiquitin-Protein-Ligasen (EC 6.3.2.19; Abschn. 1.4). Von Cyp58 sind zwei Isoformen bekannt, die sich im C-terminalen Bereich voneinander unterscheiden. Isoform 1 besteht aus 520 und Isoform 2 aus 527 Aminosäuren, wobei die Aminosäuren 1–489 identisch sind. Im Rahmen dieser Arbeit wird nur die Isoform 1 betrachtet.

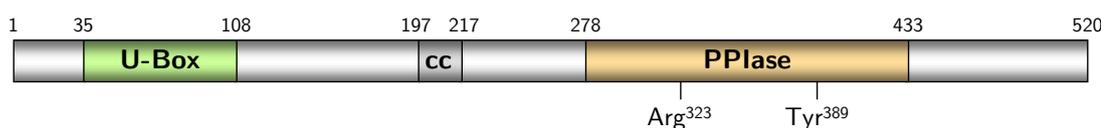


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Domänen- und Regionenstruktur von Cyp58 Isoform 1. Neben der Cyclophilin-ähnlichen PPIase-Domäne liegt eine U-Box-Domäne und eine potentielle *coiled coil*-Region vor. Domänen- und Regionengrenzen entsprechend UniProt-Datenbank. Cyp58-Reste Arg³²³ und Tyr³⁸⁹ entsprechen Cyp18-Resten Arg⁵⁵ und Trp¹²¹, entscheidend für PPIase-Aktivität bzw. CsA-Bindung [115, 116].

In Eukaryoten ist Cyp58 konserviert. Im Tierreich ist es von den Schwämmen bis zum Menschen mit jeweils einem einzelnen Gen vertreten [117]. Dabei sind die Orthologen in den Nematoden *Dirofilaria immitis* (*DiCyp-3*) und *C. elegans* (*CeCyp-4*) näher untersucht. Außerdem sind Orthologe im Protozoen *Plasmodium falciparum*, der Pflanze *A. thaliana* (*AtCyp65*, *AtPUB49*) und der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* (*SpCyp8*) beschrieben. In der Backhefe *S. cerevisiae* ist Cyp58 hingegen nicht konserviert [39].

In Untersuchungen zur gewebespezifischen Expression von Cyp58 wurde mRNA-Synthese in allen untersuchten Geweben, besonders im Thymus, Pankreas und Hoden, beobachtet. Der

höchste Gehalt an Cyp58-Protein lag in Nieren vor, aber auch in Gehirn-, Herz- und Lungengewebe wurde Cyp58 nachgewiesen [113].

Für Cyp58 wurde eine Ubiquitin-Protein-Ligase-Aktivität gezeigt [118]. Eine enzymatische Aktivität der PPIase-Domäne von Cyp58 konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden [56].

Die PPIase-Domäne von Cyp58 bildet eine aus acht antiparallelen β -Strängen bestehende geschlossene β -Fass-Struktur aus, die durch zwei α -Helices und eine kurze α -helikale Windung ergänzt wird (Abb. 1.4). Diese in Cyclophilinen konservierte geschlossene Struktur ist einzigartig unter β -Fass-Proteinen und erlaubt die Bindung von Substraten und CsA nur an der Proteinoberfläche. Eine Besonderheit der Struktur der PPIase-Domäne von Cyp58 ist eine zusätzliche ausgedehnte α -Helix direkt C-terminal im Anschluss an den konservierten Bereich [56].

Über die mögliche biologische Funktion von Cyp58 gibt es in der Literatur zahlreiche Hinweise. Cyp58 wurde durch massenspektrometrische Analysen von Spleißosom-Präparationen im B- und C-Komplex des Spleißosoms nachgewiesen [77, 78]. Eine Interaktionsstudie unter spleißosomalen Proteinen zeigte Interaktionen von Cyp58 mit dem Zinkfingerprotein 830 und dem Prolin-reichen Protein PRCC, das wie Cyp33 mit dem Prp19/CDC5L-Komplex (Abschn. 1.4.2) assoziiert ist [119]. Als weitere Interaktionspartner von Cyp58 wurden in der Maus Hsp90 und das ebenfalls Prp19/CDC5L-assoziierte *crooked neck-like protein 1* (CRN, Syf3) identifiziert, die möglicherweise einen trimeren Komplex zusammen bilden [80, 120]. Des Weiteren wurde Cyp58 als intrazellulärer Interaktionspartner des extrazellulären integralen Membranproteins CD147 identifiziert. Cyp58 reguliert die Zelloberflächen-Expression von CD147, indem es durch Bindung an eine Prolin-haltige Transmembran-Region von CD147 dessen Transport vom Golgi-Apparat zur Zellmembran unterstützt [121]. Außerdem interagiert Cyp58 in Mäusen als Wirtsfaktor mit dem Nicht-Strukturprotein NSm des Rifttalfeber-Virus, dessen Funktion noch unbekannt ist [122]. Auf der Suche nach Ubiquitin-Protein-Ligasen, die die für die Alzheimer-Erkrankung entscheidende Amyloid- β -Produktion beeinflussen, wurde Cyp58 als Regulator des mRNA-Gehalts von β -Sekretase identifiziert. Der β -Sekretase-mRNA-Gehalt in Zellkulturen verringerte sich nach Cyp58-Depletion durch RNAi und erhöhte sich nach Cyp58-Überexpression [123]. Bei einer Untersuchung in der nordirischen Population konnte aber kein signifikanter Zusammenhang zwischen häufigen genetischen Variationen in *PPIL2* und der Thrombozyten- β -Sekretase-Aktivität oder dem Alzheimer-Risiko festgestellt werden [124].

Das Cyp58-Orthologe *CeCyp-4* ist für die larvale Muskelzellentwicklung von *C. elegans* wichtig. Für *CeCyp-4* wurde eine exklusive Expression in den gestreiften Körperwand-Muskelzellen der Nematoden mit dem höchsten mRNA-Gehalt in den frühen Larvenstadien gezeigt. Eine *CeCyp-4*-Depletion durch RNAi führte zu Nachkommen mit abnormer Morphologie in den frü-

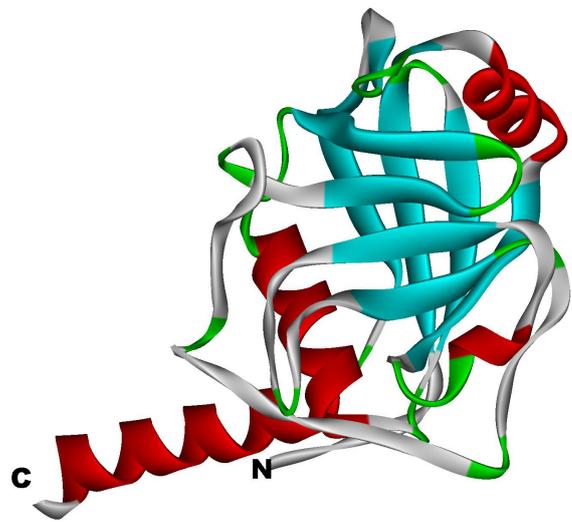


Abb. 1.4: Kristallstruktur der PPIase-Domäne von Cyp58 (Cyp58²⁸⁰⁻⁴⁵⁷). PDB: 1ZKC [56]. N, N-Terminus; C, C-Terminus. Sekundärstrukturelemente: rot, α -Helix; türkis, β -Faltblatt; grün, β -Schleife.

hen Larvenstadien [125]. *CeCyp-4* (Mog-6) wurde außerdem als Mitglied der Mog-Proteine identifiziert, die in der larvalen Entwicklung von *C. elegans*-Hermaphroditen als Schalter für den Wechsel von Spermien- zu Oozyten-Produktion notwendig sind. Bei einem Verlust von *CeCyp-4* können nur noch Spermien produziert werden [126]. Weitere Untersuchungen zeigten eine direkte Interaktion von *CeCyp-4* mit dem nukleären Zinkfingerprotein MEP-1, einem weiteren Regulator des Spermien-/Oozyten-Schalters. Sowohl die Bindung an MEP-1 als auch die Regulation dieses Schalters ist unabhängig von der PPIase-Domäne von *CeCyp-4*. Im Gegensatz zur vorangegangenen Studie wurde eine weitreichende Expression von *CeCyp-4* in somatischen Zellen und der Keimbahn, mit Ausnahme der Spermien, gezeigt. Die höchsten mRNA-Gehalte lagen hier im embryonalen und im adulten Stadium vor [127].

1.4 Ubiquitin-vermittelter Proteinabbau

Der zelluläre Gehalt von Proteinen wird durch die Balance zwischen ihrer Synthese und ihrem Abbau reguliert. Der Proteinabbau in Eukaryoten findet dabei vorwiegend über zwei verschiedene Wege statt. Zum einen werden Proteine über das Autophagie-System, vermittelt durch ER, Endosomen, Lysosomen oder Vakuolen, vornehmlich nicht-selektiv abgebaut [128]. Zum anderen erfolgt der Abbau von Proteinen über das ATP-abhängige Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Dabei werden die zum Abbau bestimmten Proteine zunächst durch eine kovalente Verknüpfung mit Ubiquitin selektiv markiert. Dieser Prozess erfolgt in drei Schritten (Abb. 1.5). Zuerst wird Ubiquitin mit ATP durch ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1) transient adenyliert und anschließend über eine Thioester-Bindung kovalent an E1 gebunden. Im zweiten Schritt wird der energiereiche Ubiquitin-Thioester von E1 auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) übertragen. Die Übertragung von Ubiquitin auf das Zielprotein erfolgt in einem dritten Schritt durch eine Ubiquitin-Protein-Ligase (E3). Dabei entsteht eine Isopeptid-Bindung zwischen dem C-Terminus von Ubiquitin und einer Lysin-Seitenkette des Zielproteins. Über Ubiquitin-interne Lysyl-Reste kann weiteres Ubiquitin angeheftet werden, was zu einer Kettenbildung, einer Polyubiquitinylierung, führt [129]. Ab einer Kettenlänge von vier über Lys⁴⁸ verknüpften Ubiquitinen kann das Zielprotein vom 26S-Proteasom effektiv erkannt und ATP-abhängig zu kurzen Peptiden abgebaut werden [130]. Das 26S-Proteasom ist ein 2,5-MDa-Proteinkomplex, der sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern vorliegt. Die Rückgewinnung von Ubiquitin erfolgt am 26S-Proteasom durch deubiquitinylierende Enzyme (DUB). 80–90% des zellulären Proteins wird über das UPS abgebaut [131].

Neben Ubiquitin gibt es noch weitere strukturell verwandte Ubiquitin-ähnliche Proteine (Ubl), wie NEDD8, ISG15 oder die *small ubiquitin-like modifier* (SUMO)-Proteine 1–4. Diese werden analog zu dem zuvor beschriebenen Mechanismus auf das Zielprotein übertragen und wieder entfernt, verfügen jedoch über eigene Ubl-spezifische E1, E2, E3 und Proteasen, wie Cyp358 als SUMO-Protein-Ligase (Abschn. 1.2). Modifikationen durch Ubl dienen als wichtige Regulatoren für zelluläre Prozesse, wie Transkription, Zellzyklus-Kontrolle, DNA-Reparatur, Signaltransduktion, Stressantwort, Autophagie oder subzelluläre Lokalisation [132, 133].

Neben dem kanonischen Mechanismus ist die Bindung von Ubiquitin an das Zielprotein auch über den freien N-Terminus oder andere Aminosäurereste (Cys, Ser, Thr) möglich. Die Verknüp-

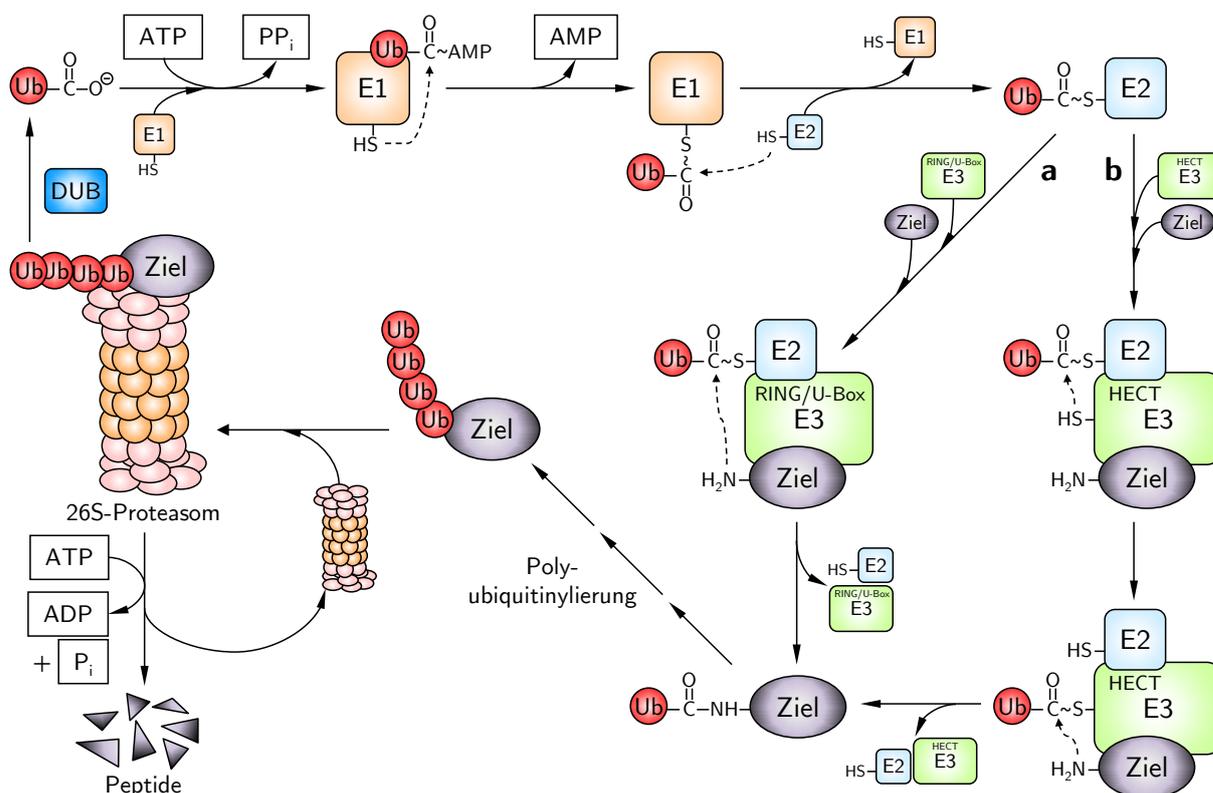


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des Ubiquitin-vermittelten Proteinabbaus. Ubiquitin (Ub) wird durch ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1) ATP-abhängig aktiviert, indem es über ein intermediäres Ub~AMP energiereich kovalent (~) an E1 gebunden wird. Nach dem Transfer von Ub auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) erfolgt die Übertragung auf das Zielprotein (Ziel) mittels Ubiquitin-Protein-Ligase (E3). RING- und U-Box-E3 katalysieren die direkte Übertragung von Ub auf das Ziel (**a**). HECT-E3 katalysieren die Ub-Übertragung in zwei Schritten unter Bildung eines E3~Ub-Intermediats (**b**). Durch Wiederholung der Ubiquitinylierungskaskade kommt es zur Polyubiquitinylierung des Zielproteins und anschließendem ATP-abhängigen proteasomalen Abbau. Deubiquitinylierende Enzyme (DUB) entfernen Ub wieder vom Zielprotein.

fung der Ubiquitine untereinander kann neben Lys⁴⁸ auch über die sechs anderen Ubiquitin-internen Lysyl-Reste (Lys⁶, Lys¹¹, Lys²⁷, Lys²⁹, Lys³³, Lys⁶³), den freien *N*-Terminus oder in Kombination mit SUMO erfolgen. Resultierende Ubiquitinketten können in Bezug auf den zur Verknüpfung verwendeten Lysyl-Rest in homogener Form oder gemischt auftreten. Auch verzweigte Ketten, durch Verknüpfung mehrerer Lysyl-Reste eines Ubiquitins, sind beschrieben. All diese atypischen Ubiquitinketten können zwar ebenfalls vom 26S-Proteasom erkannt werden, aber auch vielfältige nicht-proteolytische Funktionen übernehmen, wie Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs, Regulation von DNA-Reparatur oder Endozytose-Aktivierung [134, 135].

1.4.1 Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3)

Während im Menschen für die Ubiquitinylierung nur zwei E1 existieren, wurden bisher 35 aktive E2 und mehr als 600 E3 identifiziert [136, 137]. E3 sind für die Substratspezifität der Ubiquitinylierung verantwortlich und decken jeweils nur ein kleines Spektrum an Substraten ab. Es gibt drei verschiedene Familien von E3, definiert durch die Anwesenheit einer HECT- (*homologous to E6AP C-terminus*), RING- (*really interesting new gene*) oder U-Box-Domäne (*Ufd2-homology*).

Diese unterscheiden sich sowohl strukturell als auch mechanistisch. HECT-E3 übernehmen das aktivierte Ubiquitin zunächst transient von E2 durch Umesterung und übertragen es anschließend auf das Zielprotein. RING- und U-Box-E3 fungieren hingegen als Adaptoren, die die direkte Übertragung des Ubiquitins von E2 auf das Substrat vermitteln, ohne Ubiquitin selbst kovalent zu binden (Abb. 1.5). HECT-, RING- und U-Box-Domänen rekrutieren dabei das E2. Die Bindung des Zielproteins erfolgt an anderer Stelle der Proteinkette oder über multimere Komplexe, wie den APC/C (*anaphase-promoting complex/cyclosome*) oder den SCF (Skp1/Cullin/F-Box)-Komplex [138]. RING-E3 sind mit ca. 300 Genen und einer Vielzahl an alternativen Substraterkennungsuntereinheiten in multimeren Komplexen Bestandteil von 95 % aller E3 [137]. Die Familien der HECT- und U-Box-E3 umfassen 28 und 8 Mitglieder [117, 139].

1.4.2 U-Box-Domänen-Proteine

U-Box-Domänen bestehen aus einer zentralen α -Helix, einem kleinen drei-strängigen antiparallelen β -Faltblatt, einer kurzen α -helikalen Windung und einem hydrophoben Kern (Abb. 1.6). Sie sind strukturell mit RING-Domänen verwandt, werden aber anstatt über Chelierung von Zn^{2+} -Ionen durch Wasserstoff- und Salzbrücken-Netzwerke stabilisiert [114, 140].

Im Menschen gibt es neben Cyp58 die U-Box-Domänen-Proteine CHIP, Prp19, UIP5, Ube4A, Ube4B, WDSUB1 und Act1 [117]. Näher untersucht sind der Spleißfaktor Prp19, die beiden nah verwandten Ube4A und Ube4B sowie das am besten charakterisierte U-Box-Domänen-Protein CHIP.

Prp19 (*pre-mRNA-processing factor 19*) ist ein in Mäusen essentielles Protein, das neben der U-Box-Domäne über eine WD40-Domäne verfügt [141, 142]. Es ist Teil des evolutionär konservierten Prp19/CDC5L-Komplexes, der notwendig für die Aktivierung und Stabilisierung des Spleißosoms ist [143]. Dieser Komplex ist auch in weitere zelluläre Funktionen, wie Transkriptions-Elongation, Aufrechterhaltung der Genomstabilität oder Biogenese von Lipidtropfen, involviert [144]. Für Prp19 wurden außerdem Interaktionen mit mehreren Komponenten des 26S-Proteasoms gezeigt, weshalb eine Funktion beim Transport von ubiquitinylierten Substraten zum Proteasom vermutet wird [145, 146].

Ube4A und Ube4B sind Orthologe von *S. cerevisiae* Ufd2, das als erster Vertreter der Ubiquitinylierungsfaktoren E4 identifiziert wurde. E4 katalysieren die Verlängerung von kurzen Ubiquitinketten, die durch andere E3-Proteine generiert wurden [147]. Ube4A und Ube4B zeigen ebenfalls E4-Aktivität, sind selbst aber auch E3-aktiv [118, 148].

CHIP (*carboxy terminus of Hsp70-interacting protein*) befindet sich an der Schnittstelle zwischen UPS und Chaperon-System. Es bindet über TPR-Motive die Chaperone Hsc70, Hsp70 und Hsp90 und liegt somit wie Cyp40 als Co-Chaperon in Hsp90-Heterokomplexen vor [149, 150].

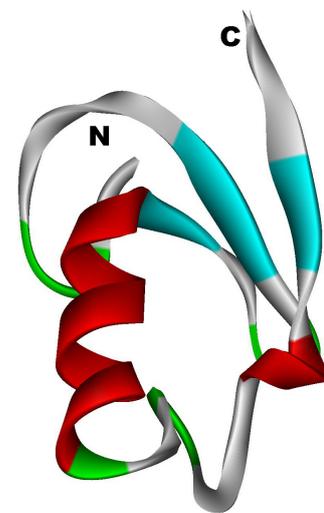


Abb. 1.6: NMR-Struktur der U-Box-Domäne von *S. cerevisiae* Prp19 (*ScPrp19*¹⁻⁵⁶). PDB: 1N87 [140]. N, N-Terminus; C, C-Terminus. Sekundärstrukturelemente: rot, α -Helix; türkis, β -Faltblatt; grün, β -Schleife.

Dort ubiquitinyliert CHIP vorwiegend Chaperon-gebundene Substrate [151]. Damit fungiert CHIP als Kontrollinstanz für den weiteren Weg von abnormen Proteinen, entweder Rückfaltung durch Chaperone oder proteasomaler Abbau [152]. Außerdem trägt CHIP zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase bei. CHIP verstärkt bei Stress die Induktion von Hsp70 und sorgt nach Erholung wieder für dessen Abbau durch Ubiquitinylierung [153, 154]. Da CHIP E2-Proteine über seine U-Box-Domäne rekrutiert, die Substraterkennung hingegen über die gebundenen Chaperone erfolgt, kann der CHIP/Chaperon-Komplex als multimeres E3 betrachtet werden [155].

1.4.3 PPIasen im Proteinabbau

PPIasen wurden bisher nur begrenzt mit dem UPS in Verbindung gebracht. Die nach derzeitigem Kenntnisstand am stärksten in den zellulären Proteinabbau involvierte PPIase ist das Parvulin Pin1. Für Pin1 wurde vielfach gezeigt, dass es an phosphorylierte Proteine binden und diese damit entweder dem UPS zuführen oder vor dem Abbau durch das UPS schützen kann [156]. Beispielsweise führt die Bindung von Pin1 an den phosphorylierten Transkriptionsfaktor IRF3 zu dessen Polyubiquitinylierung und anschließenden Abbau [157]. Andererseits wird der Zellzyklus-Regulator Cyclin D1 nach Phosphorylierung durch die Pin1-Bindung stabilisiert und damit sein Kernexport mit anschließendem Ubiquitin-vermittelten Abbau verhindert [158]. Weitere Untersuchungen identifizierten Pin1 als binären molekularen Schalter, der den Ubiquitinylierungsgrad von Proteinen kontrollieren und damit ihr weiteres Schicksal bestimmen kann [159]. So bindet Pin1 spezifisch an das als Antwort auf DNA-Schäden phosphorylierte Tumorsuppressor-Protein p53 [160]. In Anwesenheit von Pin1 kann phosphoryliertes p53 durch das E3 Mdm2 nur mono- bzw. oligoubiquitinyliert werden, was zum Kernexport von p53 führt. Ohne Pin1 oder in Gegenwart von PPIase-inaktivem Pin1 wird p53 hingegen umgehend durch Mdm2 polyubiquitinyliert und proteasomal abgebaut [159, 161]. Die PPIase-Aktivität von Pin1 hat somit die umgekehrte Funktion der zuvor genannten E4-Aktivität (Abschn. 1.4.2). Pin1 verhindert die Verlängerung von Ubiquitinketten, anstatt sie zu fördern.

Auch mehrere FKBP sind in den Proteinabbau involviert. Das prototypische FKBP12 interagiert mit dem Activin-Typ-I-Rezeptor und fördert dessen Ubiquitinylierung durch Rekrutierung des E3 Smurf1. Diese Funktion von FKBP12 ist abhängig vom aktiven Zentrum, da sie durch FK506-Zugabe unterbunden werden kann [162]. FKBP25 ist wie Pin1 ein Regulator von p53, indem es mit Mdm2 interagiert und dessen Autoubiquitinylierung zum proteasomalen Abbau stimuliert [163]. FKBP37.7 (XAP2) stabilisiert als Komponente des AhR/Hsp90-Heterokomplexes den AhR, indem es ihn vor Ubiquitinylierung schützt [164]. FKBP38 ist auf der cytosolischen Seite der ER- und der äußeren Mitochondrien-Membran lokalisiert und interagiert dort mit mehreren Komponenten des 26S-Proteasoms, wodurch dieses an der Organellmembran verankert wird [165]. Über diese Interaktion reguliert FKBP38 die Stabilität des Prolyl-4-Hydroxylase-Domänen-Proteins PHD2. Dabei fungiert FKBP38 als Adapterprotein für PHD2 zum 26S-Proteasom und fördert so Ubiquitin-unabhängig den PHD2-Abbau [166, 167]. Außerdem reguliert FKBP38 die Proteininstabilität der in Tumorgenese und Metastase involvierten Protein-Phosphatase PRL-3 und fördert deren proteasomalen Abbau [168].

Für Cyclophiline sind neben Cyp58 nur wenige Verbindungen zum UPS beschrieben. Cyp18 interagiert als Wirtsfaktor mit dem Matrixprotein M1 des Influenza-A-Virus und inhibiert die Initiation der Virus-Replikation, indem es den Abbau von M1 durch das UPS beschleunigt. Diese Funktion ist unabhängig von der PPIase-Aktivität von Cyp18, da PPIase-inaktives Cyp18 die virale Replikation in gleichem Maße hemmt [169, 170]. Cyp358 interagiert mit mehreren Komponenten der regulatorischen 19S-Untereinheit des 26S-Proteasoms, was zu einer selektiven Modulation der Aktivität des UPS führt [171, 172]. Cyp358 ist außerdem über seine PPIase-Aktivität in die Proteostase von Ubiquitin involviert (Abschn. 1.2) [96].

1.5 Zielstellung der Arbeit

Cyp58 ist ein konserviertes Protein in Eukaryoten und eines der zehn Multidomänen-Cyclophiline im Menschen. Aufgrund seiner U-Box-Domäne besitzt Cyp58 Ubiquitin-Protein-Ligase-Aktivität [118] und ist damit wahrscheinlich in den Ubiquitin-vermittelten Stoffwechselweg des Proteinabbaus involviert. Das lässt für Cyp58 eine Funktion an der Schnittstelle zwischen Proteinfaltung und Proteinabbau vermuten.

Cyp58 wurde schon mit zahlreichen zellulären Funktionen in Verbindung gebracht, auf Proteinebene ist es aber bisher noch wenig charakterisiert. Das erste Ziel dieser Arbeit war die rekombinante Gewinnung von funktionalem Cyp58 durch heterologe Expression in *E. coli*. Nach chromatographischer Reinigung sollte eine proteochemische Charakterisierung erfolgen.

Es sollten die enzymatischen Eigenschaften von Cyp58 näher untersucht werden. Außerdem sollten die individuellen funktionalen Domänen von Cyp58 separat und in Kombination in Bezug auf ihre katalytischen Aktivitäten untersucht und mögliche synergistische Effekte identifiziert werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, einen Einblick in die *in vivo*-Funktion von Cyp58 zu gewinnen. Dazu sollte die subzelluläre Lokalisation von Cyp58 im Verlauf des Zellzyklus analysiert werden. Außerdem sollten durch Pulldown-Experimente neue Interaktionspartner von Cyp58 identifiziert werden. Durch Untersuchungen zum Einfluss der enzymatischen Aktivitäten von Cyp58 auf die Interaktionspartner sowie zum Einfluss der Interaktion auf die Funktion von Cyp58 sollten Hinweise auf die mögliche biologische Funktion der identifizierten Protein-Protein-Interaktionen erhalten werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Alle verwendeten Chemikalien (Tab. 2.1) hatten die höchste Reinheitsstufe und wurden ohne weitere Behandlung verwendet.

Tab. 2.1: Verwendete Chemikalien.

Bezeichnung	Quelle
Aceton	Merck (Darmstadt)
Acetonitril (ACN)	AppliChem (Darmstadt)
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
[γ - ³³ P]-ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	Hartmann Analytic (Braunschweig)
Ampicillin	AppliChem (Darmstadt)
Agar-Agar	AppliChem (Darmstadt)
Agarose	Carl Roth (Karlsruhe)
ϵ -Aminocapronsäure	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Ammoniumpersulfat	Serva (Heidelberg)
Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Bis-Tris	AppliChem (Darmstadt)
Bromphenolblau	AppliChem (Darmstadt)
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck (Darmstadt)
Chloramphenicol	Carl Roth (Karlsruhe)
Coomassie [®] Brillant Blau G250	Serva (Heidelberg)
Coomassie [®] Brillant Blau R250	Serva (Heidelberg)
D-Desthiobiotin	IBA (Göttingen)
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	AppliChem (Darmstadt)
Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	Merck (Darmstadt)
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)
Essigsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	Carl Roth (Karlsruhe)
D(+)-Glucose-Monohydrat	AppliChem (Darmstadt)
Glycerin	KMF (Lohmar)
Glycerin-2-phosphat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Glycin	MP Biomedicals (Eschwege)
Harnstoff	MP Biomedicals (Eschwege)
4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	AppliChem (Darmstadt)
Imidazol	Merck (Darmstadt)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Kanamycin	AppliChem (Darmstadt)
Lithiumchlorid, wasserfrei	Fluka (Buchs, CH)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck (Darmstadt)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Methanol	VWR (Radnor, PA, USA)

Bezeichnung	Quelle
MTT	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat	Serva (Heidelberg)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)
Nickelsulfat-Hexahydrat	Merck (Darmstadt)
Nonidet [®] P-40	Fluka (Buchs, CH)
Okadasäure (OA)	Calbiochem (Schwalbach)
Paraformaldehyd	Carl Roth (Karlsruhe)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Ponceau S	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Saccharose	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Salzsäure, konz.	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe)
Thymidin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Trichloressigsäure (TCA)	Merck (Darmstadt)
<i>N</i> -[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycine (Tricin)	Serva (Heidelberg)
Trifluoressigsäure (TFA)	Merck (Darmstadt)
Trifluorethanol (TFE)	Fluka (Buchs, CH)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	AppliChem (Darmstadt)
Tween [®] 20	Serva (Heidelberg)

Zur Vereinfachung von Abläufen wurden kommerzielle Komplettpakete, Fertiglösungen und Fertigformulierungen (Tab. 2.2) verwendet.

Tab. 2.2: Verwendete Kits, Fertiglösungen und -formulierungen.

Bezeichnung	Quelle
cOmplete [®] Protease-Inhibitor (EDTA-frei)	Roche (Rotkreuz, CH)
DAPI-Lösung (0,1 mg/ml)	Chemicon International (Hofheim)
Desoxynukleotidtriphosphat-Mix (dNTPs)	Fermentas (Vilnius, LT)
DMEM mit L-Glutamin, 4,5 g/l Glucose	PAA (Pasching, AUT)
Easypure [®] Gel-Reinigungs-Kit	Biozym (Oldendorf)
ECL [™] Western-Blot-Detektionsreagenz	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Eichproteine Combithek	Boehringer (Mannheim)
Fötales Rinderserum (FBS)	Biowest (Nuaille, FR)
GenElute [™] HP Plasmid-Maxipräparations-Kit	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
GenElute [™] Plasmid-Minipräparations-Kit	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Gibco [®] PBS-Tabletten	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Invisorb [®] Fragment-Aufreinigung	Invitex (Berlin)
1 kB DNA-Leiter	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
Milbona Milchpulver	Lidl (Neckarsulm)
Nanofectin siRNA	PAA (Pasching, AUT)
PageRuler [®] Vorgefärbte Protein-Leiter	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Pepton von Gelatine, enzym. verdaut	Fluka (Buchs, CH)
Propidiumiodid-Lösung (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Rotiphorese [®] Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth (Karlsruhe)
Rotiphorese [®] Gel 40 (19:1)	Carl Roth (Karlsruhe)
Rotiszint [®] eco plus Szintillationscocktail	Carl Roth (Karlsruhe)
SERVABACTER [®] Hefextrakt	Serva (Heidelberg)
SuperSignal [®] Chemilumineszenz-Substrat	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Trilencer-27-siRNA-Kit mit Duplex-Puffer	OriGene (Rockville, MD, USA)
SYBR [®] Safe	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Trypsin-EDTA (1×)	PAA (Pasching, AUT)
Ubiquitinylierungs-Kit	Enzo Life Sciences (Lörrach)

Für die Proteinreinigung kamen verschiedene Chromatographiesäulen und Chromatographiematerialien (Tab. 2.3) zur Anwendung.

Tab. 2.3: Für die Proteinreinigung verwendete Chromatographiesäulen und -materialien.

Bezeichnung	Quelle
Fractogel EMD-DEAE-650(M)	Merck (Darmstadt)
Glutathion-Sepharose 4B	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75 prep grade	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 prep grade	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
HIS-Select® Nickel-Affinitätsigel	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Strep-Tactin®-Sepharose	IBA (Göttingen)
Vydac® 208TP RP-C8-Säule (4,6 mm × 250 mm; 5 μm)	Grace (Deerfield, IL, USA)

Es wurden außerdem kommerzielle Antikörper (Tab. 2.4), Proteine und Peptide (Tab. 2.5) verwendet.

Tab. 2.4: Antikörper. Verwendete Antikörper mit ihrer Herkunft und ihrer Klonalität.

Bezeichnung	Wirt	Klonalität	Quelle	Katalog-Nr.
Anti-pan14-3-3-AK	Maus	monoklonal	Santa Cruz Biotechnology ^a	sc-1657
Anti-β-Aktin-AK	Ziege	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology ^a	sc-1616
Anti-Cyp58-AK	Kaninchen	polyklonal	Genetex ^b	GTX111142
Anti-eGFP-AK	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology ^a	sc-8334
Anti-FLAG-AK	Kaninchen	polyklonal	Bethyl Laboratories ^c	A190-102A
Anti-GAPDH-AK	Maus	monoklonal	Sigma-Aldrich ^d	G8795
Anti-GST-AK	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling Technology ^e	2633
Anti-Penta-His-AK	Maus	monoklonal	Quiagen (Hilden)	34660
Anti-Histon-H2B-AK	Kaninchen	polyklonal	Epitomics ^f	1750
Anti-Histon-H3-AK	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling Technology ^e	9715
Anti-MKLP1-AK	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology ^a	sc-867
Anti-PLK1-AK	Kaninchen	monoklonal	Cell Signaling Technology ^e	4513
Anti-SET-AK	Kaninchen	polyklonal	Genetex ^b	GTX113834
Anti-α-Tubulin-AK	Maus	monoklonal	Sigma-Aldrich ^d	T9026
Anti-β-Tubulin-AK	Kaninchen	monoklonal	Cell Signaling Technology ^e	2128
Anti-Kaninchen-IgG-AK (HRP-konjugiert)	Ziege	polyklonal	Sigma-Aldrich ^d	A6154
Anti-Kaninchen-IgG-AK (Rhodamine Red™-X-konj.)	Ziege	polyklonal	Invitrogen ^g	A11003
Anti-Maus-IgG-AK (HRP-konjugiert)	Schaf	polyklonal	Sigma-Aldrich ^d	A5906
Anti-Maus-IgG-AK (TRITC-konjugiert)	Ziege	polyklonal	Sigma-Aldrich ^d	T5393
Anti-Ziege-IgG-AK (HRP-konjugiert)	Kaninchen	polyklonal	Sigma-Aldrich ^d	A5420

^a Dallas, TX, USA ^b Irvine, CA, USA ^c Montgomery, TX, USA ^d St. Louis, MO, USA ^e Danvers, MA, USA

^f Burlingame, CA, USA ^g Carlsbad, CA, USA

Tab. 2.5: Verwendete Proteine und Peptide.

Bezeichnung	Quelle
Benzonase [®] -Nuklease	Novagen (Madison, WI, USA)
Rinderserumalbumin (BSA), monomer	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
α -Chymotrypsin aus Rinderpankreas	Merck (Darmstadt)
Gesamt-Histon aus Kalbsthymus	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Granzym A, human	Enzo Life Sciences (Lörrach)
His ₆ -UBE1, human	Boston Biochem (Cambridge, MA, USA)
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase mit Reaktionspuffer	Fermentas (Vilnius, LT)
Phosphorylase b aus Kaninchenmuskel	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Phosphorylase-Kinase aus Kaninchenmuskel	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Phusion [®] -DNA-Polymerase mit Reaktionspuffer	Finnzymes (Espoo, FIN)
Restriktionsendonukleasen mit Reaktionspuffer (<i>Bam</i> HI, <i>Bsm</i> BI, <i>Bsm</i> FI, <i>Dpn</i> I, <i>Eco</i> RI, <i>Hind</i> III, <i>Nde</i> I, <i>Xho</i> I)	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
RNase A (10 mg/ml)	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Streptavidin-HRP-Polymer	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
T4-DNA-Ligase mit Reaktionspuffer	Fermentas (Vilnius, LT)
Thrombin (1 U/ μ l)	Novagen (Madison, WI, USA)
Trypsin aus Schweinepankreas	Serva (Heidelberg)
Ubiquitin mit <i>N</i> -term. Biotin, human (1 mg/ml)	Boston Biochem (Cambridge, MA, USA)
Ubiquitin aus bovinen Erythrozyten	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Cyclosporin A	LC Laboratories (Woburn, MA, USA)
Debio-025	Debiopharm (Lausanne, CH)
L-Glutathion, reduziert	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
NIM811	Scynexis (Durham, NC, USA)
SCY635	Scynexis (Durham, NC, USA)
Suc-Ala-Ala-Pro-Arg-pNA	Bachem (Bubendorf, CH)
Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA (Xaa = Ala, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Phe)	Bachem (Bubendorf, CH)

His₆-Sentrin-spezifische Protease 2 wurde freundlicherweise von Dr. C. SCHIENE-FISCHER (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, MPF, Halle) zur Verfügung gestellt.

Heterotrimere Proteinphosphatase 2A aus Schweinehirn [30] wurde freundlicherweise von Dr. A. WERNER (MPF, Halle) zur Verfügung gestellt.

Abz-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA wurde freundlicherweise von A. RENTZSCH (MPF, Halle) zur Verfügung gestellt.

Die Bibliothek von CsA-Derivaten, modifiziert an Position 1 von CsA, und die CsA-Derivate MM-258, MM-284 und MM-494 wurden freundlicherweise von Dr. M. MALEŠEVIĆ (MPF, Halle) zur Verfügung gestellt.

Das CsA-Derivat VK-61 wurde freundlicherweise von Dr. V. KAHLERT (MPF, Halle) zur Verfügung gestellt.

Die Klonierung und Mutagenese von Expressionsvektoren erfolgte mit Primern (Tab. 2.6) von Eurofins MWG Operon (Ebersberg).

Tab. 2.6: Primer. Verwendete Primer für die Klonierung und Mutagenese von Expressionsvektoren.

Primer	Sequenz
1	5'-GGGAATTCATATGGGGAAGCGACAGCACCAAAAAG-3'
2	5'-CACGTAAGCTTCTATTTTTCAAACGCGGATGGCTCCAGCTGCCGCGCGGCAC CAGCCAGGAGCTGAAGTCCCCAAAAC-3'
3	5'-CACGTAAGCTTCTACTACTTGATATTTAGCTGTTCCAC-3'
4	5'-GCGAATTCATATGAAGCCAGATCTCCACAAAAC-3'
5	5'-GGGAATTCATATGTACCAGTTTGTGAAGAAGAAG-3'
6	5'-CACGTAAGCTTCTACTACCGCTCCTGCGCAATCTGGGC-3'
7	5'-GATCCTCGAGCTACCAGGAGCTGAAGTCCCCAAAAC-3'
8	5'-GGGAATTCATATGTCGGCGCCGGCGGCCAAAAGTC-3'
9	5'-GTCGATCCTCGAGTTAGTCATCTTCTCCTTCATCC-3'
10	5'-GTTACGTCTCAAGGTATGGGGAAGCGACAGCACC-3'
11	5'-GTTAGGGACATCTTGTACAAGGTATGGGGAAGCGACAGCACC-3'
12	5'-GTTAGGGACGATGCTAGACAGGTAAGCCAGATCTCCACAAAAC-3'
13	5'-GATCCTCGAGCTACTAGCGCAGCACATCCTCGTCGATG-3'
14	5'-GGGAATTCGGATCCTCGGCGCCGGCGGCCAAAAGTC-3'
15	5'-CTATGGATCCATGGGGAAGCGACAGCACCAAAAAG-3'
16	5'-CTATGGATCCGCAAGAACTTCCGGGACCTGCTG-3'
17	5'-GTCGATCCTCGAGTCATGGGGAAGCGACAGCACCAAAAAG-3'
18	5'-GTCGATCAAGCTTCTACCAGGAGCTGAAGTCCCCAAAAC-3'
19	5'-GCACCATCTTCCACGCGTCCATCCGGAAC-3'
20	5'-GTTCCGGATGGACGCGTGAAGATGGTGC-3'
21	5'-GAGGTATGGGGGCGCGACAGCACCAAAAAG-3'
22	5'-CTTTTGGTGCTGTCGCGCCCCCATACTC-3'
23	5'-GAAGGCCCCGGAGGCGAAGAAAGTGGAC-3'
24	5'-GTCCACTTTCTTGCCTCCGGGGCCTTC-3'
25	5'-CCGGAGAAGAAGGCAGTGGACAAGCTG-3'
26	5'-CAGCTTGTCCTACTGCCTTCTTCTCCGG-3'
27	5'-CCAGCAGCCACGGCGCGAGCAGCAGAG-3'
28	5'-CTCTGCTGCTCGCGCCGTGGCTGCTGG-3'
29	5'-GGCCCCGGAGGCGAAGGCAGTGGACAAGC-3'
30	5'-GCTTGTCCACTGCCTTCGCTCCGGGGCC-3'
31	5'-CCCAGATTGCGCAGGCGGCGGCGCGCAGCTCAAGGTAGC-3'
32	5'-GCTACCTTGAGCTGCGCCGCCGCCGCTGCGCAATCTGGG-3'
33	5'-GCTCAAGGTAGCCCCGCGGCGGCGGCGAAGAGCAGCCAGCC-3'
34	5'-GGCTGGCTGCTCTTCGCCGCCGCCGGGGCTACCTTGAGC-3'

Für die Klonierung von Expressionsvektoren und die rekombinante Expression von Proteinen wurden verschiedene *E. coli*-Stämme (Tab. 2.7) verwendet.

Für die Zellkultur-Experimente wurden HeLa-Zellen, Epithelzellen eines humanen Gebärmutterhalskarzinoms [173], verwendet.

Tab. 2.7: *E. coli*-Stämme. Verwendete *E. coli*-Stämme mit ihrem Genotyp und ihren Resistenzen.

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Resist.	Quelle
DH5 α	F ⁻ <i>endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96</i> <i>relA1 λ⁻ deoR Δ(lacZYA-argF)U169 ϕ80d/lacZΔM15</i>	-	Invitrogen ^a
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	-	Novagen ^b
Rosetta(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE ² (Cm ^R)	Cam	Novagen ^b
M15[pREP4]	F ⁻ <i>nal^S str^S rif^S thi⁻ lac⁻ ara⁺ gal⁺ mtl⁻ recA⁺ uvr⁺</i> <i>lon⁺ pREP4</i> (Kan ^R)	Kan	Quiagen ^c

^a Carlsbad, CA, USA ^b Madison, WI, USA ^c Hilden

Alle Vektoren (Tab. 2.8) wurden vor ihrer Verwendung durch Sequenzierung (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) überprüft.

Tab. 2.8: Vektoren. Verwendete Vektoren mit ihren Resistenzen und die zu ihrer Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen und Primer.

Bezeichnung	Res.	kodiertes Protein	Schnittstellen	Primer	Quelle
pET-28a(+)	Kan	–	–	–	Novagen ^b
		His ₆ -Cyp58- <i>StreptII</i> (wt, R323A)	<i>NdeI/HindIII</i>	1/2	diese Arbeit
		His ₆ -Cyp58 ¹⁻¹³⁷	<i>NdeI/HindIII</i>	1/3	diese Arbeit
		His ₆ -Cyp58 ²⁶⁻¹³⁷	<i>NdeI/HindIII</i>	4/3	diese Arbeit
		His ₆ -Cyp58 ²⁷³⁻⁴⁴⁹	<i>NdeI/HindIII</i>	5/6	diese Arbeit
		His ₆ -Cyp58 ²⁷³⁻⁵²⁰	<i>NdeI/XhoI</i>	5/7	diese Arbeit
pE-SUMO	Amp	His ₆ -SET-Protein	<i>NdeI/XhoI</i>	8/9	diese Arbeit
		His ₆ -SUMO	–	–	LifeSensors ^c
		His ₆ -SUMO-Cyp58 (wt, K3A, K230A, K232A, K490A, K3/230/232/490A)	<i>BsmBI/XhoI</i>	10/7	diese Arbeit
		His ₆ -SUMO-Cyp58 ¹⁻¹³⁷	<i>BsmFI/HindIII</i>	11/3	diese Arbeit
		His ₆ -SUMO-Cyp58 ²⁶⁻¹³⁷	<i>BsmFI/HindIII</i>	12/3	diese Arbeit
		His ₆ -SUMO-Cyp58 ¹⁻²⁷²	<i>BsmFI/HindIII</i>	11/13	diese Arbeit
pGEX-4T-1	Kan	GST	–	–	GE Healthcare ^d
		GST-SET-Protein	<i>BamHI/XhoI</i>	14/9	diese Arbeit
		GST-14-3-3-Protein β	<i>BamHI/XhoI</i>		Dr. T. REIMER ^a
		GST-14-3-3-Protein γ	<i>EcoRI/XhoI</i>		Dr. T. REIMER ^a
		GST-14-3-3-Protein ϵ	<i>BamHI/SmaI</i>		Dr. T. REIMER ^a
		GST-14-3-3-Protein ζ	<i>BamHI/XhoI</i>		Dr. T. REIMER ^a
pT7argU	Amp	His ₆ -14-3-3-Protein ζ			Dr. T. REIMER ^a
pT7-7	Amp	His ₆ -UbcH3	<i>NdeI/BamHI</i>		K. Iwai, PhD ^f
pQE70	Amp	<i>StreptII</i> -Cyp18			Dr. S. LIEBSCHER ^a
pCMV-Tag 2B	Kan	–	–	–	Stratagene ^g
		FLAG-Cyp58 (wt, ERKT→AAAA, ETKV→AAAA)	<i>BamHI/XhoI</i>	15/7	diese Arbeit
		FLAG-Cyp58 ¹⁻²⁷²	<i>BamHI/XhoI</i>	15/13	diese Arbeit
		FLAG-Cyp58 ¹⁻⁴⁴⁹	<i>BamHI/HindIII</i>	15/6	diese Arbeit
		FLAG-Cyp58 ¹³⁸⁻⁴⁴⁹	<i>BamHI/HindIII</i>	16/6	diese Arbeit
		FLAG-Cyp58 ²⁷³⁻⁵²⁰	<i>EcoRI/XhoI</i>	5/7	diese Arbeit
pEGFP-C1	Kan	eGFP	–	–	Clontech ^h
		eGFP-Cyp58	<i>XhoI/HindIII</i>	17/18	diese Arbeit
pBluescriptR	Amp	Cyp58			imaGenes ^e
pCMV-SPORT6	Amp	SET-Protein			imaGenes ^e

^a MPF, Halle ^b Madison, WI, USA ^c Malvern, PA, USA ^d Little Chalfont, UK ^e Berlin

^f Prof. Kazuhiro Iwai, MD, PhD (Kyoto University, J) ^g La Jolla, CA, USA ^h Mountain View, CA, USA

Alle sonstigen verwendeten Materialien finden sich in Tabelle 2.9. In Tabelle 2.10 werden die verwendeten Geräte aufgelistet.

Tab. 2.9: Sonstige verwendete Materialien.

Bezeichnung	Quelle
Amicon [®] Ultra-15 10K Zentrifugen-Filtereinheiten	Millipore (Billerica, MA, USA)
Biotrace [™] NT Nitrocellulose-Membran	Pall (Port Washington, NY, USA)
Molekularsieb 3 Å	Carl Roth (Karlsruhe)
Rotilabo [®] -Spritzenfilter, PES, steril 0,22 µm	Carl Roth (Karlsruhe)
SERVAPOR [®] Dialysemembran	Serva (Heidelberg)
µ-slide-8-Well	Ibidi (Martinsried)
Whatman [®] -Papier	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Tab. 2.10: Verwendete Geräte.

Bezeichnung	Hersteller
Agarose-Gel-Apparatur	Biotec-Fischer (Reiskirchen)
ÄKTAprime-plus-System	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Auto-Spot-Roboter ASP 222	Abimed Analysentechnik (Langenfeld)
CCD-Kamera Chemi-Smart 5000	Peqlab (Erlangen)
CD-Spektropolarimeter J-710	Jasco (Groß-Umstadt)
CO ₂ -Inkubator HERAcCell [®]	Heraeus (Hanau)
Diodenarray-Spektrophotometer HP 8452A	Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA)
Elektro-Blot-Apparatur Fastblot B43	Biometra (Göttingen)
FACSort	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
Fluoreszenz-Spektrophotometer F-3010	Hitachi (Tokyo, J)
Hochdruckzellaufschlussgerät TS 0.75	Constant Systems (Daventry, UK)
HPLC-System Class-LC10	Shimadzu Corporation (Kyoto, J)
Konfokalmikroskop C1	Nikon (Tokyo, J)
Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg)
Mikroplatten-Lesegerät VersaMax	Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA)
PAGE-Apparatur Minigel-Twin	Biometra (Göttingen)
Peristaltikpumpe P-1	Pharmacia (Uppsala, S)
pH-Meter pH 650 GLP	WTW (Weilheim)
Spektrophotometer Nanodrop [®] ND-1000	Paqlab (Erlangen)
Szintillationsdetektor Tri-Carb [®] 2100TR	Perkin Elmer (Waltham, MA, USA)
Ultrazentrifuge Optima [™] LE-80K, 45 Ti-Rotor	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)
Ultrazentrifuge Optima [™] XL-A, An-50 Ti-Rotor	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)
Ultrazentrifuge WX Ultra, T-647.5-Rotor	Sorvall (Langensfeld)
UV-Detektor Uvicord SII	Pharmacia (Uppsala, S)
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge Multifuge 3SR	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge RC 5B Plus, SLA-3000-Rotor	Sorvall (Langensfeld)

Alle verwendeten Puffer und wässrige Lösungen wurden mit entionisiertem H₂O hergestellt. Häufig verwendete Puffer und Lösungen sind in Tabelle 2.11 aufgelistet. Weitere Puffer und Lösungen sind in den entsprechenden Abschnitten angegeben.

Tab. 2.11: Häufig verwendete Puffer und wässrige Lösungen.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
5×-DNA-Probenpuffer	20 mM Tris/HCl pH 8,0; 200 mM EDTA; 25 % v/v Glycerin; 0,2 % w/v Bromphenolblau
Ampicillin-Lösung	100 mg/ml Ampicillin
APS-Lösung	10 % w/v (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈
AUZ-Puffer	20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 150 mM NaCl
Blockierungspuffer 1	3 % w/v Milchpulver in TBST-Puffer
Blockierungspuffer 2	1 % w/v BSA in TBST-Puffer
Blockierungspuffer 3	2 % w/v Milchpulver in PBS-Puffer
BN-Anodenpuffer	50 mM Bis-Tris/HCl pH 7,0
BN-Gelpuffer	150 mM Bis-Tris/HCl pH 7,0; 1,5 M ε-Aminocaprinsäure
BN-Kathodenpuffer	15 mM Bis-Tris/HCl pH 7,0; 50 mM Tricin;
	0,01 % w/v Coomassie® G250
BN-Probenpuffer	100 mM Bis-Tris/HCl pH 7,0; 500 mM ε-Aminocaprinsäure; 5 % w/v Coomassie® G250; 30 % w/v Saccharose
CaCl ₂ -Lösung	2 M CaCl ₂
CD-Messpuffer	5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4
Chloramphenicol-Lösung	34 mg/ml Chloramphenicol in Ethanol (nicht wässrig)
Coomassie-Entfärbelösung	45 % v/v Ethanol; 10 % v/v Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	10 % v/v Essigsäure; 30 % v/v Methanol; 17,5 % v/v Ethanol; 0,2 % w/v Coomassie® R250; 0,05 % w/v Coomassie® G250
FACS-Messpuffer	50 μg/ml Propidiumiodid; 100 μg/ml RNase A in PBS-Puffer
Histon-Pulldown-Puffer	20 mM Tris/HCl pH 7,5; 300 mM NaCl; 5 % w/v Saccharose; 0,1 % v/v Nonidet® P-40; 1 mM EDTA; 1 mM DTT
IPTG-Lösung	1 M Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kanamycin-Lösung	10 mg/ml Kanamycin
Lyse-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 % v/v Nonidet® P-40; cOmplete® Protease-Inhibitor-Tablette (EDTA-frei)
Membran-Bindepuffer	10 mM Tris/HCl pH 7,8
MTT-Lösung	5 mg/ml MTT in PBS-Puffer
MTT-Lyse-Lösung	0,6 % v/v Essigsäure; 10 % w/v SDS in DMSO (nicht wässrig)
PBS-Puffer	10 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ ; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl
Phosphatasepuffer	100 mM Tris/HCl pH 7,5; 200 mM MgCl ₂ ; 4 mM DTT
Phosphorylierungspuffer	50 mM Tris/HCl pH 8,2; 50 mM Glycerin-2-phosphat; 10 mM MgCl ₂ ; 1 mM CaCl ₂ ; 1 mM DTT
PMSF-Lösung	200 mM PMSF in Methanol (nicht wässrig)
Ponceau-S-Färbelösung	0,5 % w/v Ponceau S; 1 % v/v Essigsäure
PPlase-Messpuffer 1	35 mM HEPES/KOH pH 7,8
PPlase-Messpuffer 2	20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 500 mM NaCl
Präzipitationspuffer	50 mM HEPES/KOH pH 7,05; 280 mM NaCl; 10 mM KCl; 1,5 mM NaH ₂ PO ₄ ; 12 mM D-Glucose
Proteolyse-Puffer 1	20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 150 mM NaCl
Proteolyse-Puffer 2	20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 100 mM NaCl; 1 mM CaCl ₂ ; 1 mM MgCl ₂
Pulldown-Puffer	20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 50 mM NaCl
Sammelgelpuffer	1,25 M Tris/HCl pH 6,8
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,3; 190 mM Glycin; 0,1 % w/v SDS
SDS-Lösung	10 % w/v SDS
SDS-Probenpuffer	65 mM Tris/HCl pH 6,8; 10 % v/v Glycerin; 5 % w/v SDS; 0,05 % w/v Bromphenolblau; 5 % v/v β-Mercaptoethanol
siRNA-Lösung	20 μM siRNA-Duplex in bereitgestelltem Duplex-Puffer
Strip-Lösung A	8 M Harnstoff; 1 % w/v SDS; 14 mM β-Mercaptoethanol
Strip-Lösung B	50 % v/v Ethanol; 10 % v/v Essigsäure
TAE-Puffer	40 mM Tris/HCl pH 8,0; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA
TBST-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,2 % v/v Tween® 20
Transferpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,3; 150 mM Glycin; 10 % v/v Methanol
Trenngelpuffer	1,8 M Tris/HCl pH 8,8
Ubiquitinylierungspuffer	50 mM HEPES/KOH pH 7,5; 40 mM NaCl; 5 mM MgCl ₂ ; 0,5 mM DTT

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung von *E. coli*-Zellen

Die Kultivierung von *E. coli*-Zellen erfolgte in LB-Medium (10 g/l Pepton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt) oder auf LB-Agarplatten (20 g/l Agar-Agar in LB-Medium). Die Medien wurden autoklaviert und nach dem Abkühlen nach Bedarf Antibiotika, durch eine 1:1 000-Verdünnung aus einer Antibiotikum-Stammlösung, zugesetzt. Die Endkonzentrationen betragen dabei 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin, 10 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin oder 34 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol.

E. coli-Zellen wurden entweder auf LB-Agarplatten bei 37 °C im Inkubator oder mit LB-Medium in Kulturröhrchen oder Erlenmeyerkolben im Inkubationsschüttler (180 min^{-1} , 30 °C bzw. 37 °C) bis zur gewünschten Zelldichte kultiviert. Die Inokulation erfolgte entweder aus Glycerinkulturen oder mit Einzelkolonien von LB-Agarplatten. Das Wachstum der Kulturen wurde spektrophotometrisch über die optische Dichte bei 600 nm verfolgt.

2.2.2 Anlegen von Glycerinkulturen

920 μl einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden mit 80 μl 87 %igem Glycerin versetzt und anschließend bei –80 °C gelagert.

2.2.3 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation wurden chemisch kompetente *E. coli*-Zellen [174] verwendet. Nach einer 30-minütigen Inkubation der Plasmide mit einem Aliquot kompetenter Zellen auf Eis erfolgte ein Hitzeschock von 90 s bei 42 °C und einer Abkühlung auf Eis für 3 min. Anschließend wurde LB-Medium zugegeben und 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach Ausbringen der Zellen auf LB-Agarplatten in Gegenwart von Antibiotika, zur Selektion transformierter Zellen, wurden die Zellen über Nacht bei 37 °C kultiviert.

2.2.4 Kultivierung von Expressionsklonen

Zur Gewinnung von rekombinantem Protein aus Expressionsklonen wurde je 1 l LB-Medium mit 50 ml einer Übernachtskultur des Expressionsklons inokuliert und bei der gewünschten Temperatur bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,5 bis 0,7 schüttelnd inkubiert. Durch Zugabe von IPTG-Lösung (1:1 000-Verdünnung, 1 mM Endkonzentration) wurde die Expression induziert. Nach 4 h Kultivierung erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation (10 min, 6 000 min^{-1} , 4 °C, SLA-3000-Rotor) und anschließend die Lagerung des Zellpellets bei –20 °C.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA

Nach Inokulation von 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie von LB-Agarplatten und 16 h Kultivierung bei 37 °C erfolgte die Präparation der Plasmid-DNA mit GenElute™ HP Plasmid-Maxipräparations-Kit oder GenElute™ Plasmid-Minipräparations-Kit nach Herstellervorgabe.

2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA wurde PCR an einem Eppendorf Mastercycler mit Phusion™ DNA-Polymerase von Finnzymes oder *Pfu*-DNA-Polymerase von Fermentas nach Herstellervorgabe durchgeführt.

Kolonie-PCR erfolgte durch direkte Suspension von Einzelkolonien von LB-Agarplatten in PCR-Ansätze.

2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese mit 1–2%igen Agarose-Gelen (1–2 % w/v Agarose; 0,005 % v/v SYBR® Safe in TAE-Puffer) mit TAE-Puffer als Laufpuffer bei einer Spannung von 90 V. Die Proben wurden durch Zugabe von 5×-DNA-Probenpuffer vorbereitet. Die Detektion von DNA-Banden im Gel erfolgte durch Anregung im UV-Bereich, was eine Fluoreszenz-Emission von in DNA interkaliertem SYBR® Safe im sichtbaren Bereich nach sich zog.

2.3.4 Klonierung

Zur Klonierung von Expressionsvektoren wurde zunächst die Ziel-DNA von einer Matrize durch PCR mit den entsprechenden Klonierungsprimern (Tab. 2.6) amplifiziert und nach Auftrennung durch Agarose-Gelelektrophorese aus dem Agarose-Gel mit dem Biozym Easypure® Gel-Reinigungs-Kit nach Herstellervorgabe isoliert. Anschließend wurde sowohl das Ziel-DNA-PCR-Produkt als auch der Ziel-Vektor durch Restriktionsendonukleasen von New England Biolabs in den empfohlenen Puffern nach Herstellervorgabe geschnitten. Die Aufreinigung des linearisierten Ziel-Vektors erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung aus dem Agarose-Gel, die Aufreinigung des geschnittenen Ziel-DNA-Fragments durch Invitex Invisorb® Fragment-Aufreinigung nach Herstellervorgabe. Durch Fermentas T4-DNA-Ligase erfolgte nach Herstellervorgabe die Ligation beider Komponenten. Der Ligationsansatz wurde in DH5α-Zellen transformiert. Durch Kolonie-PCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese wurden Klone mit insertierter Ziel-DNA identifiziert. Nach der Präparation von Plasmid-DNA wurde der Erfolg der Klonierung durch Sequenzierung (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) überprüft. Tabelle 2.8 zeigt alle für diese Arbeit klonierten Vektoren mit den verwendeten Restriktionsschnittstellen und Primern.

2.3.5 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese erfolgte durch *Quickchange*-Mutagenese. Dabei wurde mit der Matrize und den entsprechenden Mutagenese-Primern (Tab. 2.12) durch PCR (*Pfu*-DNA-Polymerase) der gesamte Vektor mit der gewünschten Mutation amplifiziert. Durch die Restriktionsendonuklease *DpnI* von New England Biolabs (Verwendung nach Herstellervorgabe) wurde die methylierte DNA degradiert. Anschließend erfolgte eine Transformation in DH5α-Zellen. Nach der Präparation der Plasmid-DNA wurde der Erfolg der Mutagenese durch Sequenzierung (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) überprüft.

Tab. 2.12: Ortsspezifische Mutagenese. Durch *Quickchange*-Mutagenese und anschließender Expression generierte Cyp58-Varianten und die dafür verwendeten Matrizen und Primer.

Variante	Matrize	Primer
His ₆ -Cyp58- <i>StreptII</i> ^{R323A}	pET-28a-Cyp58- <i>StreptII</i>	19/20
His ₆ -SUMO-Cyp58 ^{K3A}	pE-SUMO-Cyp58	21/22
His ₆ -SUMO-Cyp58 ^{K230A}	pE-SUMO-Cyp58	23/24
His ₆ -SUMO-Cyp58 ^{K232A}	pE-SUMO-Cyp58	25/26
His ₆ -SUMO-Cyp58 ^{K490A}	pE-SUMO-Cyp58	27/28
His ₆ -SUMO-Cyp58 ^{K3/230/232/490A}	pE-SUMO-Cyp58 ^{K3A}	29/30 & 27/28
FLAG-Cyp58 ^{ERKT→AAAA}	pCMV-Cyp58	31/32
FLAG-Cyp58 ^{ETKV→AAAA}	pCMV-Cyp58	33/34

2.4 Präparative Methoden

2.4.1 *E. coli*-Zellaufschluss für die Proteinreinigung

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die geernteten *E. coli*-Zellen im Laufpuffer der ersten Chromatographie-Säule resuspendiert und einem Hochdruckzellaufschlussgerät TS 0.75 zugeführt. Der Zellaufschluss erfolgte durch dreimalige Hochdruckentspannung von 2,5 kBar bei 4 °C. Nach Zugabe von Benzonase[®]-Nuklease zum Lysat wurde durch Ultrazentrifugation (45 min, 35 000 min⁻¹, 4 °C, T-647.5-/45 Ti-Rotor) die lösliche Fraktion von der unlöslichen separiert. Je nach Vorliegen des Zielproteins wurde der lösliche Überstand oder das Pellet weiterverwendet.

2.4.2 Proteinreinigung

Die Proteinreinigung erfolgte bei 4 °C durch Gravitationsäulen, durch Chromatographiesäulen an einer Pharmacia Peristaltikpumpe P1 mit Uvicord-Detektor oder durch ein GE Healthcare ÄKTAprime-plus-System. Der Erfolg der einzelnen Reinigungsschritte wurde durch SDS-PAGE überprüft. Alle Säulen wurden nach der Benutzung nach Herstellerangabe regeneriert.

Anionenaustauschchromatographie

Die Anionenaustauschchromatographie erfolgte auf einer Fractogel EMD-DEAE-650(M)-Säule. Nachdem die Säule mit dem angegebenen Laufpuffer äquilibriert wurde, erfolgte die Auftragung der das Zielprotein enthaltenden Proteinlösung. Nach dem Waschen der Säule mit Laufpuffer wurde, je nachdem wo sich das Zielprotein befand, entweder der Durchlauf direkt weiterverwendet oder es erfolgte eine Elution der Säule mit einem linearen 0–1 M NaCl-Gradienten in Laufpuffer. Das Eluat wurde fraktioniert aufgefangen.

Ni²⁺-Nitrilotriessigsäure-Affinitätschromatographie

Die Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie erfolgte auf einer Säule aus Sigma His-Select[®] Nickel-Affinitätsgel. Die Säule wurde mit Laufpuffer äquilibriert und nach Auftragung der das Zielprotein enthaltenden Proteinlösung mit Laufpuffer gewaschen. Durch Zugabe von 10 mM Imidazol zum Laufpuffer wurden unspezifisch gebundene Proteine eluiert. Die Elution des gebundenen His₆-tag-Proteins erfolgte mit 100 mM Imidazol in Laufpuffer.

***Strep*-Tactin[®]-Affinitätschromatographie**

Die *Strep*-Tactin[®]-Affinitätschromatographie erfolgte auf einer IBA *Strep*-Tactin[®]-Sepharose-Säule. Nachdem die Säule mit Laufpuffer äquilibriert wurde, erfolgte das Auftragen der das Zielprotein enthaltenden Proteinlösung. Nach dem Waschen der Säule mit Laufpuffer erfolgte die Elution mit 2,5 mM D-Desthiobiotin in Laufpuffer.

Glutathion-Affinitätschromatographie

Die Glutathion-Affinitätschromatographie erfolgte auf einer GE Glutathion-Sepharose-4B-Säule. Die Säule wurde mit Laufpuffer äquilibriert und anschließend die Zielprotein enthaltende Proteinlösung aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit Laufpuffer erfolgte die Elution mit 10 mM L-Glutathion in Laufpuffer.

Größenausschluss-Chromatographie

Die Größenausschluss-Chromatographie erfolgte an einem ÄKTAprime-plus-System mit einer GE HiLoad[™] 16/60 Superdex[™] 75- oder einer GE HiLoad[™] 16/60 Superdex[™] 200-Säule bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die Säule wurde mit Laufpuffer äquilibriert und anschließend 2 ml Proteinlösung aufgetragen. Der Durchlauf wurde fraktioniert aufgefangen.

2.4.3 Dialyse

Der Pufferaustausch von Proteinlösungen erfolgte durch Dialyse. Dabei wurde die Proteinlösung in einem SERVAPOR[®]-Dialyseschlauch dreimal mindestens 2 h gegen 3 l Zielpuffer dialysiert.

2.4.4 Proteinkonzentrierung

Die Konzentrierung von Proteinlösungen erfolgte mit Millipore Amicon[®] Ultra-15 Zentrifugeneinheiten (10 kDa Ausschlussvolumen) durch Zentrifugation ($4\,000\text{ min}^{-1}$, 4 °C) an einer Heraeus Multifuge-Zentrifuge 3SR.

2.4.5 Trichloressigsäure-Fällung

Die quantitative Fällung von Proteinen aus Proteinlösungen erfolgte mit Trichloressigsäure (TCA). Dazu wurde 1 Volumen eiskalter 35 % w/v TCA-Lösung zur Proteinlösung gegeben und nach 20 min Inkubation auf Eis eine Zentrifugation (15 min, $16\,000 \times g$, 4 °C) durchgeführt. Das erhaltene Pellet wurde mit eiskaltem Aceton gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Trocknung des Pellets erfolgte eine Resuspendierung in SDS-Probenpuffer.

2.4.6 Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie

Zur präparativen Trennung von Proteingemischen und zur Entsalzung von Proteinen für anschließende massenspektrometrische Analysen diente die Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (RP-HPLC). Es wurde eine Shimadzu Class-LC10-Anlage mit Grace Vydac[®] 208TP C8-Säule (4,6 mm × 250 mm; 5 μm) verwendet. Die Probearbeitung erfolgte durch die

Zugabe einer 1:4-Verdünnung von 50 % v/v Essigsäure. Das Probenaufgabevolumen betrug 20 μl . Die Chromatographie erfolgte bei 40 °C mit Laufmittel A, entgastem H_2O (0,1 % v/v TFA), und Laufmittel B, ACN (0,1 % v/v TFA), bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die Absorption der Elution wurde mit einem Diodenarray-Detektor bei 220 nm und 280 nm verfolgt. Die erhaltenen Peaks wurden fraktioniert gesammelt.

Die Entsalzung von Proteinen für die Massenspektrometrie erfolgte bei einem Lineargradient von 5–100 % B in 30 min. Die chromatographische Trennung der limitierten Proteolyse von His₆-Cyp58-*StrepII* (Abschn. 2.5.9) erfolgte bei einem Lineargradient von 30–65 % B in 30 min.

2.4.7 Spot-Synthese

Die *Spot*-Synthese wurde freundlicherweise von Dr. M. MALEŠEVIĆ (MPF, Halle) durchgeführt. Dabei wurde mithilfe der Festphasenpeptidsynthese nach MERRIFIELD [175] mit Fmoc/Bu^t-Schutzgruppen-Taktik eine Peptid-Bibliothek von sich überlappenden Protein-abgeleiteten Peptiden auf eine Cellulose-Membran nach FRANK [176] synthetisiert. Diese Peptide wurden an definierten Positionen, so genannten *Spots*, mit einem ($\beta\text{-Ala}$)₂-Spacer vom C-Terminus aus mit einem Abimed Auto-Spot-Roboter ASP 222 an die Membran synthetisiert. Es wurden Cellulose-Membranen von Cyp58 und 14-3-3-Protein β synthetisiert, welche die Proteinsequenzen als 13-mere mit 2 Aminosäuren Verschiebung enthielten.

2.5 Analytische Methoden

2.5.1 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen erfolgte spektrophotometrisch an einem Paqlab Nanodrop[®] ND-1000. Die Grundlage dafür ist das Lambert-Beersche Gesetz (Gleichung 2.1), der lineare Zusammenhang zwischen Absorption A und Konzentration c :

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d \quad (2.1)$$

ε_λ molarer Extinktionskoeffizient, d Schichtdicke der Messküvette

Für DNA-Lösungen gilt, dass eine Absorption von $A = 1$ bei 260 nm und 1 cm Schichtdicke einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA entspricht. Die Konzentration von homogenen Protein-Lösungen wurde über die Absorption bei 280 nm (Referenz: 340 nm) bestimmt. Die Berechnung der Extinktionskoeffizienten erfolgte nach GILL & VON HIPPEL [177].

2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer molekularen Masse erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [178] mit 12,5 %igen bzw. 15 %igen SDS-PA-Gelen (Tab. 2.13) in einer Biometra Minigel-Twin PAGE-Apparatur mit SDS-Laufpuffer bei einer Stromstärke von 15–30 mA. Die Probenvorbereitung erfolgte durch Zugabe von SDS-Probenpuffer im 1:1-Verhältnis und 5 min Erhitzen bei 95 °C. Der Nachweis von Proteinbanden in SDS-PA-Gelen erfolgte durch Coomassie-Färbung oder Western-Blot-Analyse.

Tab. 2.13: Pipettierschema für Polyacrylamid-Gele.

Puffer/Lösung	SDS-PAGE			BN-PAGE	
	Sammelgel (5 %)	Trenngel (12,5 %)	Trenngel (15 %)	Sammelgel (4 %)	Trenngel (10 %)
H ₂ O	1,80 ml	2,63 ml	2,00 ml	2,13 ml	5,17 ml
Rotiphorese [®] Gel 30 (37,5:1)	0,40 ml	3,13 ml	3,75 ml	0,44 ml	4,13 ml
Rotiphorese [®] Gel 40 (19:1)	–	–	–	0,07 ml	0,65 ml
Sammelgel-Puffer	0,25 ml	–	–	–	–
Trenngel-Puffer	–	1,50 ml	–	–	–
BN-Gelpuffer	–	–	–	1,33 ml	5,00 ml
SDS-Lösung	25 μ l	75 μ l	–	–	–
TEMED	2,5 μ l	4 μ l	–	8 μ l	14 μ l
APS-Lösung	15 μ l	25 μ l	–	21 μ l	40 μ l

2.5.3 Blaue Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer molekularen Masse unter nativen Bedingungen erfolgte durch Blaue Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) mit homogenen 10 %igen PA-Gelen (Tab. 2.13) in einer Biometra Minigel-Twin PAGE-Apparatur bei einer Spannung von 100–180 V. Die Probenvorbereitung erfolgte durch Dialyse (20 mM Bis-Tris/HCl pH 7,0; 500 mM ϵ -Aminocaprinsäure) und Zugabe von BN-Probenpuffer in einer 1:5-Verdünnung. Die PAGE-Apparatur wurde oben mit BN-Kathodenpuffer und unten mit BN-Anodenpuffer befüllt. Der Nachweis von Proteinbanden in PA-Gelen erfolgte durch Coomassie-Färbung.

2.5.4 Coomassie-Färbung

Die PA-Gele wurden mindestens 1 h in Coomassie-Färbelösung und anschließend in Coomassie-Entfärbelösung bis zu einer guten Sichtbarkeit der Banden schüttelnd inkubiert.

2.5.5 Western-Blot-Analyse

Die Proteine wurden zunächst aus einem SDS-PA-Gel mit einer Biometra Fastblot B43 Elektro-Blot-Apparatur im *Semi-Dry*-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Dazu wurden drei Lagen Whatman[®]-Papier, die Nitrocellulose-Membran, das SDS-Gel und drei weitere Lagen Whatman[®]-Papier, welche alle zuvor mit Transferpuffer getränkt wurden, in der Apparatur geschichtet. Der Elektrotransfer erfolgte 40 min bei 200 mA Stromstärke. Zur Kontrolle des erfolgreichen Transfers wurde im Anschluss die Membran kurz mit Ponceau-S-Färbelösung inkubiert und durch H₂O wieder entfärbt.

Alle Schritte zum Nachweis der gebundenen Proteine erfolgten bei 25 °C. Die Nitrocellulose-Membran wurde 2 h mit Blockierungspuffer 1 blockiert und anschließend 2 h mit dem primären Antikörper (1:1 000-Verdünnung) in Blockierungspuffer 1 inkubiert. Nach dreimal 10 min Waschen mit TBST-Puffer wurde die Membran 1 h mit HRP-konjugiertem sekundären Antikörper (1:1 000-Verdünnung) in Blockierungspuffer 1 inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Membran 10 min mit TBST-Puffer erfolgte die Signaldetektion durch Chemilumineszenz mit GE ECL[™] Western-Blot-Detektionsreagenz oder Thermo Scientific SuperSignal[®] Chemilumineszenz-Substrat an einer Peqlab CCD-Kamera Chemi-Smart 5000.

Für die Western-Blot-Analyse gegen Streptavidin-HRP wurde Blockierungspuffer 2 verwendet. Die Membran wurde nach dem Blockieren 1 h mit Streptavidin-HRP (1:1 000-Verdünnung) in Blockierungspuffer 2 inkubiert.

2.5.6 Circular dichroismus-Spektroskopie

Die CD-spektroskopischen Untersuchungen erfolgten an einem temperierbaren Jasco J-710 CD-Spektropolarimeter in Quarzglas-Küvetten mit 1 mm Schichtdicke. Die Probenvorbereitung erfolgte durch Verdünnung der Proteinlösung in CD-Messpuffer.

Die Fern-UV-CD-Spektren wurden im Wellenlängenbereich von 190–250 nm (100 nm/min) bei 20 °C aufgenommen. Es wurden jeweils 50 Spektren akkumuliert. Als Referenz diente das jeweilige Pufferspektrum. Die Berechnung der mittleren molaren Elliptizität pro Peptidbindung $[\theta]_{\lambda,MRW}$ erfolgte über Gleichung 2.2:

$$[\theta]_{\lambda,MRW} = \frac{\theta_{\lambda} \cdot M}{10 \cdot c \cdot d \cdot n} \left(\frac{\text{deg} \cdot \text{cm}^2}{\text{dmol}} \right) \quad (2.2)$$

θ_{λ} (mdeg) Elliptizität, M (g/mol) molare Masse, c (mg/ml) Massenkonzentration, d (cm) Schichtdicke der Messküvette, n Anzahl der Peptidbindungen

Für die Untersuchung der Temperaturstabilität von Proteinen wurde die Temperatur von 20 °C bis 80 °C kontinuierlich mit 60 K/h erhöht und die Elliptizität bei der jeweiligen Wellenlänge mit der größten Differenz zwischen nativem und denaturiertem Proteinspektrum (205 nm bzw. 222 nm) verfolgt. Zur besseren Visualisierung erfolgte eine Normierung der Amplituden der Signaländerung auf 100 %.

2.5.7 PPIase-Aktivitätstest

Die Bestimmung der PPIase-Aktivität von Cyp58-Proteinen und Cyp58-Fragmenten erfolgte entweder an einem Hewlett Packard Diodenarray-Spektrophotometer HP 8452A oder einem Hitachi Fluoreszenz-Spektrophotometer F-3010 in Quarzküvetten mit 10 mm Schichtdicke. Es wurden verschiedene PPIase-Aktivitätstests verwendet, die alle auf dem Protease-gekoppelten PPIase-Test von FISCHER *et al.* [8] beruhen. Zur Verbesserung der Signalamplitude wurde ein Lösungsmittelsprung nach KOFRON *et al.* [46] durchgeführt. Dazu wurde das Tetrapeptid-Substrat in über Molsieb getrocknetes Trifluorethanol (TFE) mit 0,5 M LiCl angelöst. Diese Substratlösung mit erhöhtem *cis*-Prolyl-Gehalt wurde direkt vor dem Start der Messung in die Pufferlösung verdünnt.

Eine Messung erfolgte mit 1,5 ml (1 ml am F-3010) Gesamtvolumen unter kontinuierlichem Rühren in PPIase-Messpuffer 1 bzw. PPIase-Messpuffer 2 bei 10 °C. Der vollständige Messansatz, mit Ausnahme des Substrats, wurde 5 min (8 min am F-3010) im Gerät vorinkubiert und die Messung nach Zugabe der Substrat-Lösung (1:500-Verdünnung) gestartet. Das Messsignal wurde durch die Aufnahme von Messpunkten aller 0,5 s kontinuierlich verfolgt.

Die Auswertung der Kinetiken erfolgte, nach Ausklammerung der Mischphase (<20 s), durch nichtlineare Anpassung an die Exponentialfunktion einer Reaktion erster Ordnung. Die ermittelte apparente Geschwindigkeitskonstante k_{app} ist die Summe der Geschwindigkeitskonstanten

für die unkatalysierte Reaktion k_{unkat} und die enzymkatalysierte Reaktion k_{enz} (Gleichung 2.3):

$$k_{\text{enz}} = k_{\text{app}} - k_{\text{unkat}} \quad (2.3)$$

Als Maß für die PPIase-Aktivität diene die Spezifitätskonstante $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$, die auch als katalytische Effizienz bezeichnet wird. Unter den verwendeten Messbedingungen ($[S] \ll K_{\text{m}}$) lässt sich die Michaelis-Menten-Gleichung mithilfe der Geschwindigkeitsgleichung für eine Reaktion erster Ordnung zu Gleichung 2.4 vereinfachen. $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ entspricht dem linearen Anstieg einer Auftragung der berechneten Geschwindigkeitskonstanten der enzymkatalysierten Reaktion k_{enz} in Abhängigkeit von der PPIase-Konzentration im Messansatz $[E]$.

$$\frac{k_{\text{cat}}}{K_{\text{m}}} = \frac{k_{\text{enz}}}{[E]} \quad (2.4)$$

k_{cat} Wechselzahl, K_{m} Michaelis-Konstante, $[E]$ Enzymkonzentration

Die angegebenen Messwerte sind Mittelwerte einer Doppel- bis Vierfachbestimmung. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Protease-gekoppelter PPIase-Test

Die isomerspezifische Proteolyse [8] erfolgte mit 0,5 mg/ml α -Chymotrypsin bzw. 60 $\mu\text{g/ml}$ Trypsin im Messpuffer. Als Substrat-Lösung diene 25 mM Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA bzw. Suc-Ala-Ala-Pro-Arg-pNA in 0,5 M LiCl/TFE (Xaa = Ala, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Phe) mit einer Endkonzentration von 50 μM im Messansatz. Die Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung wurde nach Lösungsmittelsprung indirekt, durch die proteolytische Freisetzung von *p*-Nitroanilin, über die Absorption bei 390 nm (Referenz: 510 nm) verfolgt. Wenn nicht anders vermerkt, erfolgte die Messung mit α -Chymotrypsin als isomerspezifische Protease.

Protease-freier PPIase-Test

Der Protease-freie PPIase-Test erfolgte nach JANOWSKI *et al.* [179]. Zur Unterbindung von Proteinadsorption an die Küvettenwand wurde dem Messpuffer 1 μM BSA zugesetzt. Als Substrat-Lösung diene 25 mM Suc-Ala-Ala-Pro-Yaa-pNA in 0,5 M LiCl/TFE (Yaa = Arg, Phe) mit 50 μM Endkonzentration im Messansatz. Die Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung wurde nach Lösungsmittelsprung direkt, durch Ausnutzung des geringen Unterschieds der Extinktionskoeffizienten von *cis*- und *trans*-Isomer, über die Absorptionsänderung bei 330 nm (Referenz: 510 nm) verfolgt.

Fluoreszenz-basierter Protease-freier PPIase-Test

Der Fluoreszenz-basierte Protease-freie PPIase-Test erfolgte nach GARCÍA-ECHEVERRÍA *et al.* [180]. Analog zum Protease-freien PPIase-Test wurde dem Messpuffer 1 μM BSA zugesetzt. Als Substrat-Lösung diene 500 μM Abz-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA in 0,5 M LiCl/TFE mit 1 μM Endkonzentration im Messansatz. Die Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung wurde nach Lösungsmittelsprung direkt, aufgrund einer Verringerung der Substrat-internen Fluoreszenzlöschung beim Übergang

vom *cis*- zum *trans*-Zustand, über die Zunahme der Fluoreszenz bei 420 nm (Anregung: 320 nm; Spaltbreiten: 5 nm/5 nm) verfolgt.

Einfluss von Proteinen und Inhibitoren auf die PPIase-Aktivität

Partnerproteine bzw. Inhibitoren wurden zusammen mit Cyp58 bzw. Cyp58-Fragmenten im Messansatz vorinkubiert. Partnerproteine wurden direkt aus ihren Stammlösungen in den Messansatz verdünnt. CsA und CsA-Derivate wurden in DMSO angelöst und anschließend in den Messansatz verdünnt, wobei DMSO immer mit 1 % v/v Endkonzentration vorlag.

Zur Auswertung wurde der Mittelwert der PPIase-Aktivität der Kontrollmessungen auf 100 % gesetzt und die Aktivität in Gegenwart von Protein bzw. Inhibitor relativ dazu aufgetragen. Die PPIase-Aktivität von Cyp58 bzw. Cyp58-Fragmenten im Gemisch mit Partnerproteinen wurde durch Abzug der durch Verunreinigungen der Partnerproteine eingebrachten PPIase-Aktivität korrigiert.

Die Auswertung der CsA-Inhibitionskurven erfolgte nach halblogarithmischer Auftragung durch nichtlineare Anpassung (Gleichung 2.5) und Extrapolation auf 0 % PPIase-Aktivität.

$$y = \frac{max - min}{1 + (x/IC_{50})^{-n_H}} \quad (2.5)$$

max maximaler Wert, *min* minimaler Wert, IC_{50} mittlere inhibitorische Konzentration, n_H Hill-Koeffizient

2.5.8 Ubiquitin-Protein-Ligase-Aktivitätstest

Die Bestimmung der E2-Präferenz von Cyp58 erfolgte mit dem ENZO Ubiquitylierungs-Kit nach Herstellervorgabe. Alle Komponenten des Ubiquitylierungssystems außer Cyp58 lagen darin als \times -fache Lösungen vor. Die finalen Konzentrationen im Ansatz waren 100 nM His₆-UBE1, 2,5 μ M His₆-E2 (UbcH1, UbcH2, UbcH3, UbcH5a, UbcH5b, UbcH5c, UbcH6, UbcH7, UbcH8, UbcH10 oder UbcH13), 2,5 μ M biotinyliertes Ubiquitin (Bt-Ub), 2 μ M Cyp58, 1 mM DTT und 5 mM ATP (5 mM EDTA in Ansätzen ohne ATP). Die Reaktion erfolgte in bereitgestelltem Puffer 2 h bei 30 °C.

Zur Untersuchung der Aktivität von His₆-UBE1 und His₆-UbcH3 erfolgte eine Analyse zur Ausbildung von Ubiquitin-Thioester-Konjugaten nach PTAK *et al.* [181]. Dabei wurden 2,5 μ g/ml Bt-Ub mit 37,5 nM His₆-UBE1 allein bzw. zusammen mit 300 nM His₆-UbcH3 in Ab- und Anwesenheit von 5 mM ATP 10 min bei 30 °C in Ubiquitylierungspuffer inkubiert. Durch Zugabe von EDTA (50 mM Endkonzentration) wurde die Reaktion gestoppt. Die Probenvorbereitung für die SDS-PAGE erfolgte durch Zugabe von SDS-Probenpuffer ohne β -Mercaptoethanol und ohne Erhitzen. Einem Teil der Proben wurde DTT (100 mM Endkonzentration) zugesetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt.

Die Autoubiquitylierung von 2,5–10 μ M Cyp58-Protein erfolgte in Ubiquitylierungspuffer mit 37,5 nM His₆-UBE1, 300 nM His₆-UbcH3, Bt-Ub/Ubiquitin und 5 mM ATP durch 2 h Inkubation bei 30 °C. Die Experimente wurden sowohl mit 2,5 μ g/ml Bt-Ub allein als auch im Gemisch mit 25 μ g/ml Ubiquitin durchgeführt. Als einziger Unterschied zeigte sich eine gerin-

gere Signalintensität in den Experimente mit Bt-Ub/Ubiquitin-Gemisch. Durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und 5 min Erhitzen bei 95 °C wurde die Reaktion abgestoppt.

Die Untersuchung aller Proben erfolgte durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse gegen Streptavidin-HRP zur Detektion von Bt-Ub.

2.5.9 Limitierte Proteolyse

Stabilität von Cyp58 im Protease-gekoppelten PPIase-Test

8 μM His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ bzw. Cyp58 wurden in PPIase-Messpuffer 2 mit 0,5 mg/ml α -Chymotrypsin bei 10 °C inkubiert und die Proteolyse nach 10 min durch Zugabe von PMSF-Lösung (1:100-Verdünnung, 2 mM Endkonzentration) abgestoppt. Im Anschluss erfolgte SDS-PAGE und Coomassie-Färbung.

Limitierte Proteolyse von Cyp58

5 μM His₆-Cyp58-*StrepII* wurden in Proteolyse-Puffer 1 mit 4 U/ml Trypsin bei 25 °C proteolysiert. Dabei wurden dem Ansatz nach verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und die Proteolyse durch Zugabe von PMSF-Lösung (1:100-Verdünnung, 2 mM Endkonzentration) abgestoppt. Im Anschluss erfolgte SDS-PAGE und Coomassie-Färbung.

Zur Isolierung der His₆-Cyp58-*StrepII*-Fragmente durch RP-HPLC wurden 30 μM His₆-Cyp58-*StrepII* mit 24 U/ml Trypsin bei 25 °C proteolysiert und die Reaktion nach 90 min abgestoppt.

Limitierte Proteolyse von SET-Protein

3 μM His₆-SET-Protein wurden in Proteolyse-Puffer 2 mit 200 nM GzmA proteolysiert. Dabei wurde je ein Ansatz mit und ohne 12 μM His₆-Cyp58-*StrepII* bei 37 °C inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen. Durch Zugabe von PMSF-Lösung (1:100-Verdünnung, 2 mM Endkonzentration) zu den Proben wurde die Proteolyse abgestoppt. Im Anschluss erfolgte SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse gegen Anti-SET-AK.

2.5.10 Pulldown-Experimente

StrepII-Pulldown-Experiment

Zur Identifizierung von Interaktionspartnern von Cyp58 wurden *StrepII*-Pulldown-Experimente bei 4 °C durchgeführt. His₆-Cyp58-*StrepII* wurde durch Pellet-Solubilisierung, Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen und Säulen-Rückfaltung vorgereinigt (Abschn. 3.2). Nach der Immobilisierung von His₆-Cyp58-*StrepII* an einer *Strep*-Tactin[®]-Sephacrose-Säule wurde zunächst mit Pulldown-Puffer gewaschen. Im Anschluss folgte die Inkubation der Säule mit 5 ml Benzonase[®]-Nuklease-behandeltem HeLa-Zellysat in Lyse-Puffer. Einem weiteren Waschschrift mit Pulldown-Puffer folgte die Elution durch 2,5 mM D-Desthiobiotin in Pulldown-Puffer. Die komplette Elution wurde einer TCA-Fällung unterzogen, das Pellet in 50 μl SDS-Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95 °C erhitzt und einer SDS-PAGE zugeführt.

Nach Coomassie-Färbung wurden Proteinbanden ober- und unterhalb der His₆-Cyp58-*StrepII*-Bande aus dem SDS-PA-Gel ausgeschnitten und durch In-Gel-Verdau, Nano-LC-ESI-MS/MS und MASCOT 2.2 untersucht (Abschn. 2.5.15).

GST-Pulldown-Experiment

Für *in vitro*-Interaktionsstudien wurden GST-Pulldown-Experimente bei 10 °C durchgeführt. Dazu wurden 50 µl Glutathion-Sepharose-4B-Suspension mit 500 µl *E. coli*-Zellysate mit exprimiertem GST bzw. GST-Fusionsprotein (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 150 mM NaCl) 1 h schüttelnd inkubiert (1 000 min⁻¹). Nach zweimal 10 min Waschen mit Pulldown-Puffer wurde die Glutathion-Sepharose 4B mit 300 µl HeLa-Zellysate in Lyse-Puffer 1 h schüttelnd inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Glutathion-Sepharose 4B zweimal 10 min mit Pulldown-Puffer gewaschen und abschließend mit 50 µl SDS-Probenpuffer 5 min bei 95 °C erhitzt. Die Untersuchung der Proben erfolgte durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse.

Für das GST-Pulldown-Experiment zur Untersuchung des Einflusses von Cyp58 auf die Histon-Bindung von SET-Protein wurden abweichende Bedingungen verwendet. Es wurde bei 25 °C gearbeitet und als Puffer diente Histon-Pulldown-Puffer nach KARETSOU *et al.* [182]. Anstatt HeLa-Zellysate wurden 0,33 mg/ml Gesamt-Histon in Histon-Pulldown-Puffer in Ab- und Anwesenheit von 30 µM Cyp58 eingesetzt. Im Anschluss wurde viermal mit Histon-Pulldown-Puffer gewaschen.

2.5.11 Bindungsstudien mit Peptid-Bibliotheken

Für die Bindungsstudien wurde die durch *Spot*-Synthese (Abschn. 2.4.7) generierte Cellulose-Membran zunächst je dreimal 10 min mit Methanol, H₂O und Membran-Bindpuffer äquilibriert. Anschließend erfolgte die Inkubation 3 h mit 10 µM 14-3-3-Protein β, 10 µM His₆-Cyp58-*StrepII*, 2,5 µM GST-SET-Protein oder 1,5 µM His₆-SET-Protein in Membran-Bindpuffer bei 25 °C. Ungebundenes Protein wurde durch kurzes Waschen mit Membran-Bindpuffer entfernt.

Der Nachweis der gebundenen Proteine erfolgte durch Western-Blot-Analyse. Der Transfer erfolgte dabei mit 80 mA Stromstärke zunächst für 30 min, zur Entfernung unspezifisch gebundenem Proteins, und im Anschluss noch einmal für 90 min.

Zur Regeneration der Membran wurde je dreimal 10 min mit H₂O, Strip-Lösung A und Strip-Lösung B inkubiert.

2.5.12 Analytische Größenausschluss-Chromatographie

Die analytische Größenausschluss-Chromatographie (20 mM HEPES pH 7,4; 500 mM NaCl; 1 mM DTT) erfolgte an einem ÄKTApriime-plus-System mittels GE HiLoadTM 16/60 SuperdexTM 200-Säule mit einer Flussrate von 0,8 ml/min bei 4 °C. Nach Äquilibrierung der Säule mit Laufpuffer wurden 2 ml 40 µM His₆-Cyp58-*StrepII* bzw. eine Lösung eines Eichproteinmix (Boehringer Combithek) aufgetragen.

Die Auswertung erfolgte durch Auftragung der Elutionsvolumen der Eichproteine gegen den dekadischen Logarithmus ihrer molekularen Massen. Nach linearer Anpassung wurde mittels der Geradengleichung die apparente molekulare Masse von His₆-Cyp58-*StrepII* bestimmt.

2.5.13 Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation wurde freundlicherweise von Dr. H. LILIE (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt. Die Messungen erfolgten an einer Beckman Optima XL-A Ultrazentrifuge mit An-50 Ti-Rotor und Doppelsektorzellen bei 20 °C. 5 μM His₆-Cyp58-*Strep*II in AUZ-Puffer wurden in einem Sedimentationsgleichgewichtsexperiment über 90 h bei einer Drehzahl von 6 000 min^{-1} untersucht. Die Anpassung der Daten erfolgte nach der Svedberg-Gleichung.

2.5.14 Phosphatase-Aktivitätstest und Inhibition von PP2A

Abbildung 2.1 zeigt eine schematische Darstellung der Phosphatase-Aktivitätsbestimmung.

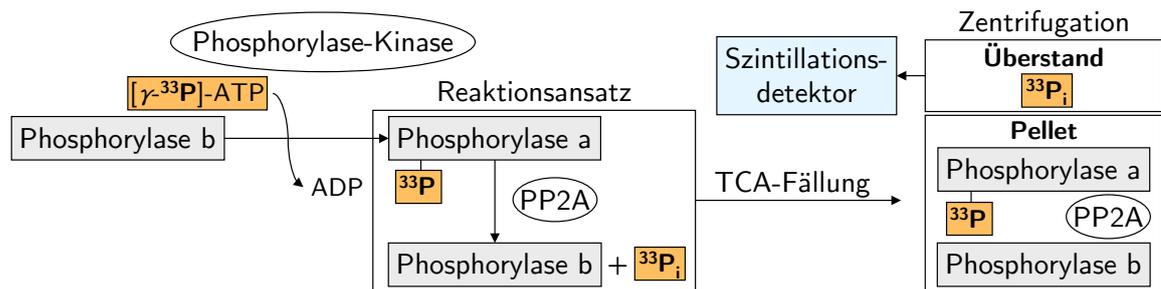


Abb. 2.1: Prinzip der Bestimmung der Phosphatase-Aktivität. PP2A, Protein-Phosphatase 2A; TCA, Trichloressigsäure; $^{33}\text{P}_i$, ^{33}P -markiertes anorganisches Phosphat.

Präparation von [^{33}P]-Phosphorylase a

12,5 mg/ml Phosphorylase b wurden in Phosphorylierungspuffer mit 0,3 mM ATP und 85 μCi $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ durch 0,5 mg/ml Phosphorylase-Kinase in 2 h bei 30 °C zu [^{33}P]-Phosphorylase a phosphoryliert. Durch Zugabe des zweifachen Volumens an eiskalter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (50 % Sättigung) wurde die Reaktion abgestoppt und die Proteine damit reversibel gefällt. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugation (15 min, 16 000 $\times g$, 4 °C). Das Proteinpräzipitat wurde in Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,2; 1 mM DTT) aufgenommen und gegen selbigen dialysiert. Die Lagerung der [^{33}P]-Phosphorylase-a-Lösung erfolgte bei 4 °C.

Dephosphorylierungstest

Je Reaktionsansatz wurden 10 μl [^{33}P]-Phosphorylase-a-Lösung zu 10 μl Phosphatasepuffer mit 10 mg/ml BSA und 100 nM Protein-Phosphatase 2A (PP2A) gegeben. Nach Inkubation bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 Volumen 35 % w/v TCA-Lösung gestoppt. Anschließend erfolgte 10 min Inkubation auf Eis und Zentrifugation (15 min, 16 000 $\times g$, 4 °C). Der Zentrifugationsüberstand wurde mit 1 ml Rotiszint[®] eco plus Szintillationscocktail versetzt und nach 30 min Inkubation im Dunkeln durch einen Perkin Elmer Szintillationsdetektor Tri-Carb[®] 2100TR untersucht.

Die Inhibition der PP2A-Aktivität erfolgte durch Zugabe von 100 nM Okadasäure bzw. 1 μM His₆-SET-Protein zum Dephosphorylierungsansatz und Abstoppen der Reaktion nach 60 min.

2.5.15 Massenspektrometrische Analyse

Die massenspektrometrischen Analysen wurden freundlicherweise durch Dr. A. SCHIERHORN (MPF, Halle) durchgeführt. Die durch molekulare Massenbestimmung bzw. Sequenzierung zu untersuchenden Proteine wurden zuvor durch RP-HPLC gereinigt und entsalzt (Abschn. 2.4.6).

Molekulare Massenbestimmung der Proteine

Die Protein-Spektren wurden mit einem ESI-Q-TOF2-Massenspektrometer (Waters, Manchester, UK), ausgestattet mit einer NanoSpray[®]-Quelle, aufgenommen. Die Proben wurden über einen PicoTip[®] (New Objective, Cambridge, MA, USA) mit einer Spritzenpumpe (Harvard Apparatus, MA, USA) mit einer Flussrate von 300 nl/min injiziert. Die Dekonvolution der mehrfachgeladenen Ionen zum einfach geladenen Zustand erfolgte durch den Software-Algorithmus MaxEnt1 (Waters, Manchester, UK).

Sequenzierung mit *In-Source Decay* (ISD)

Die *N*-terminale Sequenzierung der Proteine mittels ISD erfolgte am Ultraflex-II TOF/TOF-Massenspektrometer (Bruker Daltonik, Bremen). 1 μ l der Proteinlösung wurde mit 1 μ l 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB-Matrix, 7 mg gelöst in 100 μ l Methanol) gemischt und auf den Probenträger aufgebracht. Für die Steuerung des Instruments und die Datenanalyse wurden die Programme Flex Control 2.4, Flex Analysis 2.4 und Biotools 3.0 eingesetzt. Für die externe Kalibrierung wurde eine Peptid-Kalibrier-Mischung (Bruker Daltonik, Bremen) verwendet.

Proteinidentifizierung mit Nano-LC-ESI-MS/MS

Die Proteinidentifizierung aus SDS-PA-Gelen erfolgte durch In-Gel-Verdau, Nano-HPLC, MS/MS-Analyse und anschließender Datenverarbeitung.

Die Proteinbanden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, dreimal mit H₂O, zweimal mit 10 mM NH₄HCO₃ und final mit 10 mM NH₄HCO₃ in 50 % v/v ACN gewaschen. Die Gelstücke wurden unter einem sanften Stickstoffstrom getrocknet, wieder in 20 μ l 10 mM NH₄HCO₃ gequollen und anschließend mit Trypsin (Promega, Madison, WI, USA) über Nacht bei 37 °C proteolysiert.

Die tryptischen Peptide wurden aus den Gelstücken extrahiert und in eine CapLC (Micro-mass, Manchester, UK), ausgestattet mit Autosampler und Hilfspumpe, injiziert. 4 μ l wurden über „*microliter pickup*“-Modus injiziert und durch eine Symmetry 300[™] (350 μ m \times 5 mm) C18-*trap*-Säule (Waters, Milford, MA, USA) on-line entsalzt. Die Peptide wurden auf einer Atlantis NanoEase[™] (75 μ m \times 15 cm; 3 μ m) dC18-Säule (Waters, Milford, MA, USA) bei einem Lineargradient von 5–60 % B in 30 min getrennt. Danach wurde das Verhältnis innerhalb von 10 min auf 95 % B gewechselt. Dieses Verhältnis wurde 4 min aufrecht erhalten und anschließend zu den Ursprungsbedingungen zurückgekehrt. A: 5 % v/v ACN/H₂O (0,1 % v/v Ameisensäure); B: 95 % v/v ACN/H₂O (0,1 % v/v Ameisensäure)

Datenabhängige MS/MS-Experimente wurden an einem Q-TOF2-Massenspektrometer (Waters, Manchester, UK), ausgestattet mit einer modifizierten nano-ESI-Quelle zum Halten eines PicoTip[®] (New Objective, Cambridge, MA, USA), durchgeführt. Die Kollisionsenergie wurde

während der Messung entsprechend dem Masse zu Ladungsverhältnis der Ionen variiert. Nur zweifach- und dreifach-geladene Ionen wurden fragmentiert. Die Daten wurden im MS-Modus mit 1 s/Scan und im MS/MS-Modus mit 3 s/Scan aufgenommen. Die Messdaten wurden prozessiert und die erstellte Peakliste mittels der Suchmaschine MASCOT 2.2¹ (Matrix Science, London, UK) gegen die MSDB Proteinsequenz-Datenbank gesucht.

2.6 Zellkultur

2.6.1 Kultivierung von HeLa-Zellen

Die Kultivierung von HeLa-Zellen erfolgte nach den Vorgaben der ATCC (Manassas, VA, USA) im CO₂-Inkubator (8,5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit, 37 °C) in DMEM (10 % v/v FBS) als Kulturmedium. Das Passagieren der Zellen erfolgte durch Ablösen mit PAA Trypsin-EDTA.

2.6.2 HeLa-Zellernte und Erstellen von HeLa-Zelllysaten

Die Zellernte von HeLa-Zellen erfolgte entweder durch direktes Lysieren der Zellen auf der Zellkulturplatte oder durch Ablösen der Zellen mit Trypsin-EDTA.

Im ersten Fall wurden nahezu konfluent gewachsene HeLa-Zellen (ca. 1×10^6) eines Wells einer 6-Well-Zellkulturplatte zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und die Zellen durch Zugabe von 100 μ l Lysepuffer lysiert. Für 75 cm²-Zellkulturflaschen wurden 500 μ l, für 24-Well-Zellkulturplatten 40 μ l und für 96-Well-Zellkulturplatten 20 μ l Lysepuffer verwendet. Nach der Zellernte mit einem Zellschaber erfolgte die Klärung des Lysats durch Zentrifugation (15 min, $16\,000 \times g$, 4 °C). Der Überstand wurde als HeLa-Zelllysate verwendet oder für die SDS-PAGE mit SDS-Probenpuffer versetzt.

Im zweiten Fall wurden nahezu konfluent gewachsene HeLa-Zellen (ca. 1×10^6) zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend durch PAA Trypsin-EDTA (5 min, 37 °C) abgelöst. Nach Zugabe von frischem Kulturmedium erfolgte eine Zentrifugation (5 min, $300 \times g$, 25 °C) der Zellen und die Resuspendierung im gewünschten Puffer.

2.6.3 Transfektion von HeLa-Zellen

Die transiente Transfektion von HeLa-Zellen erfolgte durch Calciumphosphat-Methode nach JORDAN & WURM [183]. Dabei wurden für die Transfektion eines Wells einer 6-Well-Zellkulturplatte 8 μ g Plasmid-DNA in 87,5 μ l H₂O mit 12,5 μ l CaCl₂-Lösung versetzt. Durch Zugabe von 100 μ l Präzipitationspuffer erfolgte die Fällung des DNA-Calciumphosphat-Komplexes. Nach 15 min Inkubation bei 25 °C wurde das Präzipitat tropfenweise zu 50–70 %-konfluenten HeLa-Zellen (ca. 7×10^5) in 2 ml Kulturmedium gegeben und die Zellkulturplatte für 18 h kultiviert. Anschließend wurde zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und neues Medium zugegeben. Nach weiteren 30 h Kultivierung erfolgte die Zellernte. Für die Transfektion von 75 cm²-Zellkulturflaschen wurden das 7,5-fache, für 24-Well-Zellkulturplatten das 0,25-fache und für 96-Well-Zellkulturplatten das 0,05-fache der Mengen und Volumina eingesetzt.

¹<http://www.matrixscience.com/>

2.6.4 Induktion von RNAi in HeLa-Zellen

Die RNAi in HeLa-Zellen wurde durch siRNA induziert [184]. Dabei wurden 50–70 %-konfluente HeLa-Zellen mit dem OriGene Trilancer-27-siRNA-Kit gegen Cyp58 (Tab. 2.14) und PAA Nanofectin siRNA nach Herstellervorgabe transient transfiziert. Für die Transfektion eines Wells einer 6-Well-Zellkulturplatte wurden zunächst 5 μl Nanofectin in 120 μl DMEM (serumfrei) mit 5 μl siRNA-Lösung in 160 μl DMEM (serumfrei) vereinigt. Der Nanofectin/siRNA-Mix wurde 20 min bei 25 °C inkubiert und anschließend tropfenweise zu den Zellen (ca. 7×10^5) in 2 ml Kulturmedium gegeben (Endkonzentration: 50 nM siRNA-Duplex). Nach 4 h Kultivierung wurde zweimal mit PBS-Puffer gewaschen, neues Medium zugegeben und weitere 44 h kultiviert. Für die Transfektion von 24-Well-Zellkulturplatten wurde das 0,25-fache und für 96-Well-Zellkulturplatten das 0,05-fache der Volumina eingesetzt.

Tab. 2.14: Sequenzen der siRNA-Duplexe gegen Cyp58. Aus OriGene Trilancer-27-siRNA-Kit.

Bezeichnung	Sequenz
siRNA ₁	5'-rGrGrArArCrArGrCrUrArArArUrArUrCrArArGrGrCrCrAAG-3'
siRNA ₂	5'-rUrCrArUrGrCrUrArArGrArArCrArArGrArArCrUrGrCrGCC-3'
siRNA ₃	5'-rGrGrCrArGrUrArArCrUrGrGrCrUrUrGrUrArArGrArGrGCT-3'
siRNA _{scr}	universeller <i>scrambled</i> -siRNA-Duplex als Negativ-Kontrolle

2.6.5 Untersuchung des Proteinabbaus

HeLa-Zellen (ca. $1,2 \times 10^5$) in 24-Well-Zellkulturplatten wurden entweder mit pCMV-Cyp58 (Abschn. 2.6.3) oder mit OriGene Trilancer-27-siRNA-Kit gegen Cyp58 (Abschn. 2.6.4) transient transfiziert (jeweils fünf Wells). 48 h nach der Transfektion wurde das Kulturmedium gegen frisches Kulturmedium mit 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cycloheximid (CHX) ausgetauscht. Nach 0 h, 2 h, 4 h, 8 h und 16 h weiterer Kultivierung in Gegenwart von CHX wurde je ein Well geerntet. Die Proben wurden durch SDS-PAGE separiert und durch Western-Blot-Analyse gegen Anti-Cyp58-AK, Anti- α -Tubulin-AK, Anti-SET-AK, Anti-pan14-3-3-AK, Anti-Histon-H3-AK, Anti-Histon-H2B-AK, Anti- β -Aktin-AK und Anti-GAPDH-AK untersucht.

2.6.6 Untersuchung des Proteingehalts im Verlauf des Zellzyklus

Synchronisation der HeLa-Zellen, Zellernte und Durchflusszytometrie wurden freundlicherweise von M. SCHUMANN (MPF, Halle) durchgeführt.

HeLa-Zellen (ca. 7×10^5) in 6-Well-Zellkulturplatten wurden zu Beginn der S-Phase arretiert, indem das Kulturmedium gegen Kulturmedium mit 2 mM Thymidin ausgetauscht wurde. Kontroll-Zellen erhielten frisches Medium ohne Thymidin. Nach 24 h Kultivierung wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen, frisches Kulturmedium zugegeben und weiter kultiviert. Die Zellernte von synchronisierten Zellen erfolgte nach verschiedenen Zeitpunkten, von nicht synchronisierten Kontroll-Zellen nach 9 h. Dabei wurde zu jedem Zeitpunkt ein Well durch Ablösen mit Trypsin-EDTA und ein Well mit Lysepuffer geerntet.

Die mit Trypsin-EDTA geernteten Zellen wurden in PBS-Puffer resuspendiert, zentrifugiert (5 min, $300 \times g$, 25 °C) und durch Resuspendierung in eiskaltem 80 % v/v Ethanol fixiert. Nach

mindestens 10 min Inkubation wurde zentrifugiert, die Zellen in FACS-Messpuffer resuspendiert und wieder 30 min inkubiert. Die anschließenden durchflusszytometrischen Untersuchungen erfolgten an einem BD FACSort.

Die mit Lysepuffer geernteten Zellen wurde durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse gegen Anti-Cyp58-AK, Anti-SET-AK und Anti- β -Aktin-AK untersucht.

2.6.7 MTT-Test

HeLa-Zellen (ca. 2×10^4) in einer 96-Well-Zellkulturplatte wurden entweder mit pCMV-Cyp58 (Abschn. 2.6.3) oder mit OriGene Trilancer-27-siRNA-Kit gegen Cyp58 (Abschn. 2.6.4) transient transfiziert (jeweils fünf Wells). Fünf weitere Wells wurden nicht transfiziert, aber ansonsten gleich behandelt wie die transfizierten Wells. 48 h nach Transfektion wurden in je einem der fünf Wells die Zellen geerntet (Abschn. 2.6.2). In die verbliebenen Wells wurden je 20 μ l MTT-Lösung gegeben und die Zellkulturplatte 2 h weiter kultiviert. Nach vorsichtigem Absaugen des Mediums wurden zur Solubilisierung des Farbstoffs je 100 μ l MTT-Lyse-Lösung zugegeben und die Zellkulturplatte 10 min leicht schüttelnd inkubiert. Die Quantifizierung des gebildeten Farbstoffs erfolgte photometrisch an einem Molecular Devices Mikroplatten-Lesegerät VersaMax bei 570 nm (Referenz: 660 nm). Die angegebenen Messwerte sind Mittelwerte einer Vierfachbestimmung. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Die geernteten Zellen wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse gegen Anti-Cyp58-AK auf ihren Cyp58-Proteingehalt hin untersucht.

2.6.8 Konfokale Mikroskopie

HeLa-Zellen (ca. 7×10^5) in 6-Well-Zellkulturplatten wurden entweder mit pEGFP-Cyp58 (Abschn. 2.6.3) oder mit OriGene Trilancer-27-siRNA-Kit gegen Cyp58 (Abschn. 2.6.4) transient transfiziert. 42 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit PAA Trypsin-EDTA abgelöst, in Ibidi μ -slide-8-Wells überführt und weitere 6 h kultiviert. Entweder wurden die Zellen im Anschluss daran lebend untersucht oder zur Beobachtung von indirekter Immunfluoreszenz weiter behandelt. Nicht transfizierte HeLa-Zellen wurden ebenfalls spätestens 6 h vor der weiteren Behandlung in Ibidi μ -slide-8-Wells überführt. Alle folgenden Schritte erfolgten bei 25 °C. Die Zellen wurden zweimal mit PBS-Puffer gewaschen, 10 min mit 4 % w/v Paraformaldehyd in PBS-Puffer fixiert und erneut zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 2 min mit Methanol permeabilisiert, mit PBS-Puffer gewaschen, 5 min mit 2 % w/v Glycin in PBS-Puffer inkubiert, mit PBS-Puffer gewaschen und 1 h mit Blockierungspuffer 3 blockiert. Nach 30 min Inkubation mit primärem Antikörper (1:150-Verdünnung) in Blockierungspuffer 3 folgten drei Waschstapfen mit Blockierungspuffer 3 und anschließend 30 min Inkubation mit Chemicon DAPI-Lösung (1:750-Verdünnung) und Fluorophor-gekoppeltem sekundären Antikörper (1:150-Verdünnung) in Blockierungspuffer 3. Abschließend wurde noch dreimal mit Blockierungspuffer 3 gewaschen und die Zellen mit PBS-Puffer überschichtet.

Die Konfokalmikroskopie erfolgte an einem Nikon Konfokalmikroskop C1 mit drei separaten Lasern (404 nm, 488 nm, 561 nm; Melles Griot, Albuquerque, NM, USA) und dem Objektiv PL APO 60 \times (Oil) mit numerischer Apertur von 1,4.

3 Ergebnisse

3.1 Sequenzanalyse von Cyp58

Für Cyp58 sind eine U-Box-Domäne und eine PPIase-Domäne vorhergesagt (Abb. 1.3). Deshalb wurde die Primärstruktur von Cyp58 mithilfe des Programms ClustalW2¹ sowohl mit vier weiteren U-Box-Domänen-Proteinen als auch mit dem prototypischen Cyp18 verglichen.

Der Vergleich der U-Box-Domänen zeigte eine relativ geringe Sequenzhomologie von Cyp58 zu den anderen U-Box-Domänen-Proteinen (Abb. 3.1A). Die U-Box-Domäne von Cyp58 besitzt 23 % Identität mit CHIP, 14 % mit Ube4A, 19 % mit Ube4B und 21 % mit Prp19.

Beim Vergleich der PPIase-Domäne von Cyp58 mit Cyp18 (Abb. 3.1B) zeigte sich eine Sequenzidentität von 44 %. An der PPIase-Aktivität von Cyp18 beteiligte Reste [115, 185] sind mit Ausnahme von Trp¹²¹ alle auch in Cyp58 vorhanden.

A	CHIP	225	RDIPDYLCGKISFELMREPCITPSG -ITYDRKDIEEHLQRVGHFDPVTRSPLTQE	278
	Ube4A	986	ADACDEFDLPIMSTLMCDPVVLPSSRVTVDRSTIARHLLSD-QTDPFNRSPLTMD	1039
	Ube4B	1226	SDAPDEFRDPLMDTLMTDPVRLPSG-TIMDRSII LRHLLNS-PTDPFNRTLTES	1278
	Prp19	1	---MSLICS- ISNEVEHPCVSPVSNHVYERRLIEKYIAEN -GTDPINNQPLSEE	50
	Cyp58	35	RRLPFDHCS-LSLQPFVY PVCTPDG -IVFDLLNIVPWLKKY-GTNPSNGEKLDGR	86
			. : * * . : * : : * . . *	
	CHIP	279	QLIPN LAMKEVIDAFISENGWVE	301
	Ube4A	1040	QIRP NTELKEKIQRWLAERKQOK	1062
	Ube4B	1279	MLEP VPELKEQIQAWMRE-KQNS	1300
	Prp19	51	QLID -IKVAHPIRPKPPSATSIP	72
	Cyp58	87	SLIK -LNFSKNSEGKYHCPVLFT	108
			: . .	
B	Cyp18	4	PTVFFDIAVDGEPLGRVS FELFADKVPKTAENFRALSTGEKGFYKGS FHR IIP	58
	Cyp58	278	KKGYVRLHTNK--- GDLNLELHCDLTPKTCENFIRLCK -- KHY-YDGTIFHRSIR	326
			. . . : . : * : : * . . * . * . * . * . * . * : * . * : * * * *	
	Cyp18	59	GFMCQGGDF TRHNGTGGKSIYGEKFEDE-NFILKHTGPGILSMANAGPNTNGS QF	112
	Cyp58	327	NFVIQGGDPTG -TGTGGESYWGKPFKDEFNPNSHTGRGILSMANS GPNSR SQF	380
			. * : * * * * * . * * * * : * : * * * * . * * * * * * * * * * * * * * *	
	Cyp18	113	FICTAKTEWLDGKHVVFGKVKEGMNIVEAMERFGS --RNGKTSKK IT IADCGQ	163
	Cyp58	381	FITFRSCAYLDK HTIFGRVVGDFDLTAMENVESDPKTD RPK EEIRIDATTV	433
			** . : ** ** . : * * * * * * : : : * * * . . * : : * *	

Abb. 3.1: Proteinsequenzvergleich von Cyp58 mit humanen U-Box-Domänen-Proteinen und Cyp18. Erstellt mit dem Programm ClustalW2. **A** Sequenzvergleich der U-Box-Domänen von CHIP, Ube4A, Ube4B, Prp19 und Cyp58. Mindestens drei identische Reste in einer Position sind *fett* hervorgehoben. **B** Sequenzvergleich von Cyp18 mit der PPIase-Domäne von Cyp58. Identische Reste sind *fett* hervorgehoben und an der PPIase-Aktivität von Cyp18 beteiligte Reste [115, 185] sind *farbig* unterlegt (*rot*, identisch; *blau*, verschieden).

¹<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

3.2 Expression und Reinigung von Cyp58 und Cyp58-Fragmenten

Zur Untersuchung der proteinchemischen Eigenschaften von Cyp58 sollte das Protein rekombinant gewonnen werden. Dazu wurde das offene Leseraster (ORF) von Cyp58 Isoform 1 aus einer kommerziellen humanen Hippocampus-cDNA in die Vektoren pET28a und pE-SUMO zur Verwendung im Expressionssystem *E. coli* kloniert (Tab. 2.8). Die Überprüfung der DNA-Sequenz zeigte eine natürliche Varianz (nach UniProt-Datenbank), die zu einem Austausch von Val⁴⁵⁵ gegen Ile in Cyp58 führt. Für die Proteinreinigung wurden Fusionssysteme verwendet, die auf der Affinität zu Poly-His, Poly-His-SUMO bzw. *StrepII-tag* basieren.

Weitere funktionale Untersuchungen wurden durch die Klonierung einzelner Cyp58-Fragmente in die Vektoren pET28a und pE-SUMO (Tab. 2.8), Expression in *E. coli* und anschließender Reinigung realisiert. Die Domänengrenzen wurden zuvor durch limitierte Proteolyse ermittelt (Abschn. 3.6). Abbildung 3.2 gibt einen Überblick über die exprimierten Cyp58-Proteine und Cyp58-Fragmente.

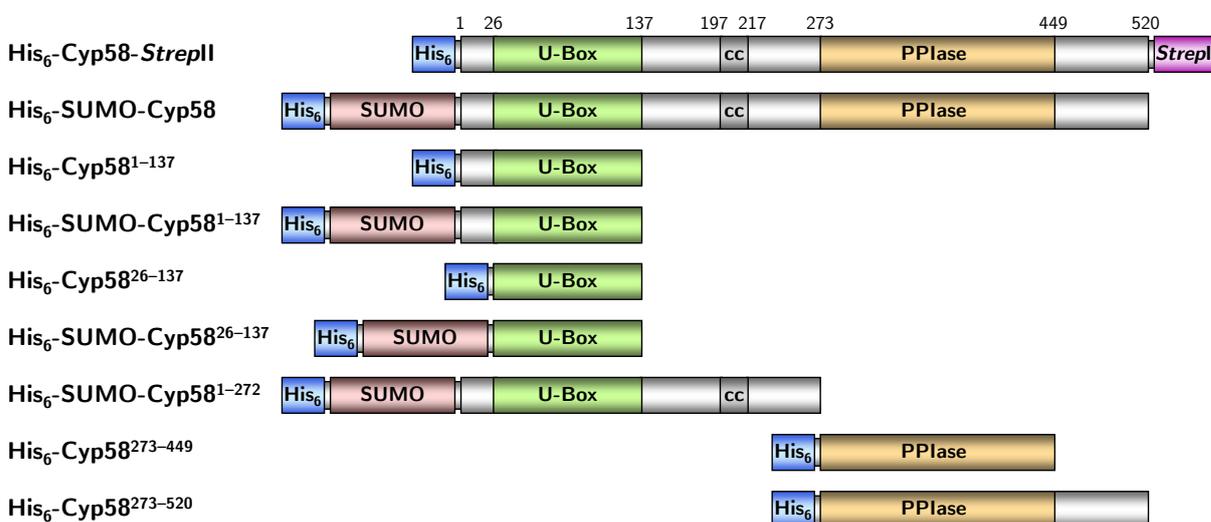


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der exprimierten Cyp58-Proteine und Cyp58-Fragmente. Domänengrenzen der U-Box-Domäne (U-Box) und der Cyclophilin-ähnlichen PPIase-Domäne (PPIase) ermittelt durch limitierte Proteolyse, Regionengrenzen der potentiellen *coiled coil*-Region (cc) entsprechend UniProt-Datenbank. His₆, Hexa-Histidin-tag; *StrepII*, *StrepII-tag*; SUMO, SUMO-Fusionsprotein.

Die Reinigung der rekombinanten Cyp58-Proteine erfolgte über drei Wege. Abbildung 3.3 zeigt eine schematische Darstellung der verschiedenen Reinigungsstrategien.

Reinigung von His₆-Cyp58-*StrepII*

Cyp58 wurde als His₆-Cyp58-*StrepII* bei 37 °C in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Die Reinigung erfolgte nach Zellaufschluss (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM NaCl) und Ultrazentrifugation aus dem unlöslichen Pellet. Das Pellet wurde unter denaturierenden Bedingungen solubilisiert (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM NaCl; 2 M Harnstoff) und erneut ultrazentrifugiert. Das sich nun im Überstand befindliche Protein wurde unter diesen Bedingungen an eine Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie-Säule (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM NaCl; 2 M Harnstoff) gebunden und auf der Säule, durch kontinuierliches Entfernen des Harnstoffs, zurückgefalten. Durch eine

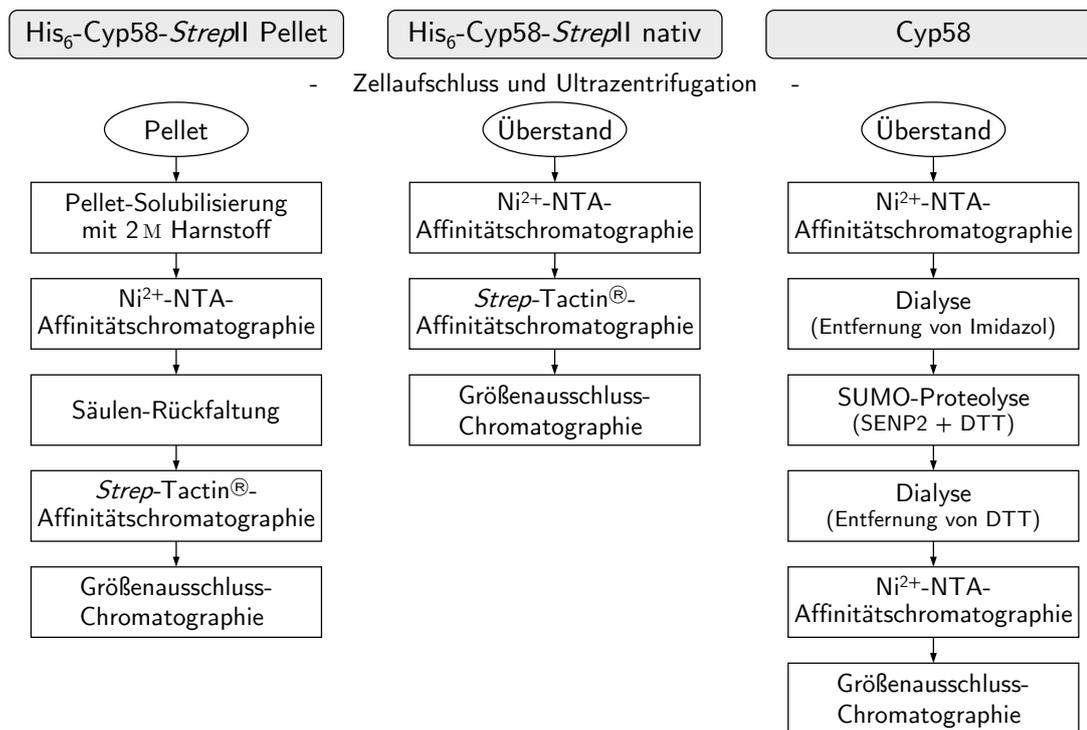


Abb. 3.3: Reinigungsschemata für Cyp58-Proteine. Cyp58 wurde als His₆-Cyp58-*StrepII* oder mit nativem N-/C-Terminus nach Expression als His₆-SUMO-Cyp58 gereinigt. SENP2, His₆-Sentrin-spezifische Protease 2.

anschließende *Strep-Tactin*[®]-Affinitätschromatographie (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 500 mM NaCl) wurden *C*-terminale Abbauprodukte abgetrennt und nur das Vollängenprotein erhalten. Als letzter Schritt erfolgte eine Größenausschluss-Chromatographie mittels Superdex[™] 200-Säule (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 500 mM NaCl; 1 mM DTT). Das finale SDS-PA-Gel (Abb. 3.4A) zeigte für das gereinigte His₆-Cyp58-*StrepII* eine apparente molekulare Masse von ca. 67 kDa. Mit dieser Reinigungsstrategie lag die Ausbeute bei ca. 50 µg His₆-Cyp58-*StrepII* pro Gramm Biomasse.

Alternativ wurde His₆-Cyp58-*StrepII* bei 30 °C in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und nach Zellaufschluss und Ultrazentrifugation aus dem löslichen Überstand gereinigt. Die Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 M NaCl) erfolgte dementsprechend unter nativen Bedingungen. Es folgten *Strep-Tactin*[®]-Affinitätschromatographie (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 1 M NaCl) und Größenausschluss-Chromatographie mittels Superdex[™] 200-Säule (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 1 M NaCl; 1 mM DTT). Das so gereinigte His₆-Cyp58-*StrepII* (Abb. 3.4B) zeigte deutlich mehr Verunreinigungen als das aus dem Pellet gereinigte Protein.

Reinigung von Cyp58

Zur Erhöhung der Expressionsrate und der Löslichkeit wurde Cyp58 zusätzlich mit einer N-terminalen His₆-SUMO-Fusion bei 30 °C in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Die Reinigung erfolgte nach Zellaufschluss und Ultrazentrifugation aus dem löslichen Überstand. Zunächst wurde eine Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 M NaCl) durchgeführt. Nach einer Dialyse (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM NaCl) zur Entfernung von Imidazol erfolgte die

Proteolyse der His₆-SUMO-Fusion vom Zielprotein durch Zugabe von 1,2 nmol His₆-Sentrin-spezifische Protease 2 (SEN2) und DTT (2 mM Endkonzentration) über Nacht bei 4 °C. Einer weiteren Dialyse zur Entfernung des zuvor eingesetzten DTT folgte erneut eine Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 M NaCl). Dabei sollte sich das freie Cyp58 im Durchfluss der Säule befinden, wohingegen proteolytisch nicht gespaltenes Protein und freies His₆-SUMO an die Säule binden sollten. Es zeigte sich jedoch eine schwache Bindung des freien Cyp58 an die Ni²⁺-NTA-Affinitätsmatrix. Dieses konnte durch 2 mM Imidazol im entsprechenden Puffer gezielt eluiert werden, wohingegen die His₆-tag-haltigen Proteine erst ab ca. 20 mM Imidazol eluierten. Abschließend erfolgte eine Größenausschluss-Chromatographie mittels Superdex™ 200-Säule (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 500 mM NaCl; 1 mM DTT). Das finale SDS-PA-Gel (Abb. 3.4C) zeigte für das gereinigte Cyp58 eine apparente molekulare Masse von ca. 65 kDa.

Diese Reinigungsstrategie ermöglichte eine Ausbeute von ca. 750 µg Cyp58 pro Gramm Biomasse. Neben der 15-fachen Erhöhung der Ausbeute gegenüber His₆-Cyp58-*StrepII* war ein weiterer Vorteil dieser Reinigungsstrategie die Gewinnung von Cyp58 mit nativem N- und C-Terminus ohne zusätzliche Aminosäure-Überhänge.

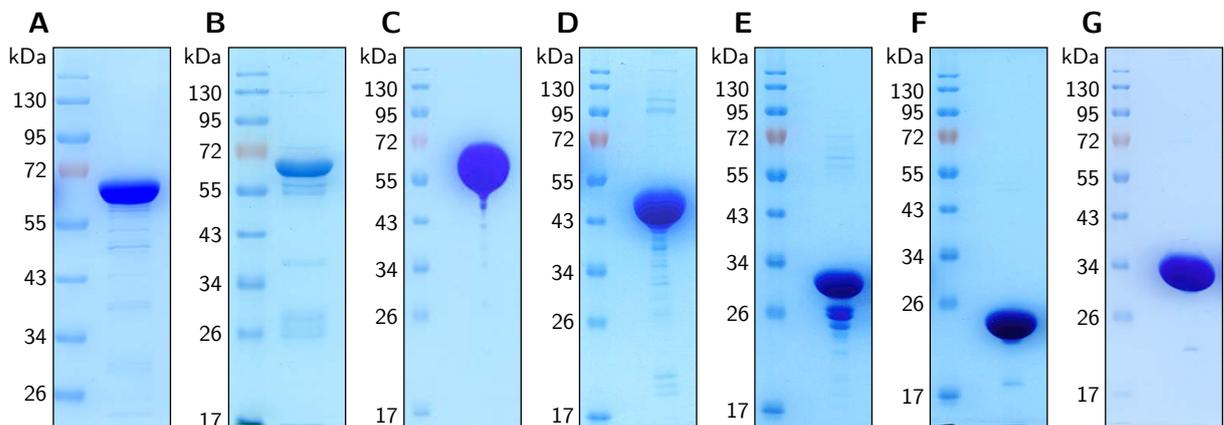


Abb. 3.4: Gereinigte rekombinante Cyp58-Proteine und Cyp58-Fragmente. Coomassie-gefärbte 10 %ige SDS-PA-Gele. **A** His₆-Cyp58-*StrepII* aus Pellet gereinigt, **B** His₆-Cyp58-*StrepII* aus Überstand gereinigt, **C** Cyp58, **D** SUMO-Cyp58¹⁻²⁷², **E** Cyp58¹⁻²⁷², **F** His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹, **G** His₆-Cyp58²⁷³⁻⁵²⁰.

Reinigung von Cyp58-Fragmenten

Die Cyp58-Fragmente wurden bei 30 °C in *E. coli* BL21(DE3) löslich exprimiert.

Die Reinigung der isolierten U-Box-Domäne von Cyp58, repräsentiert durch die Proteine His₆-Cyp58¹⁻¹³⁷, His₆-SUMO-Cyp58¹⁻¹³⁷, His₆-Cyp58²⁶⁻¹³⁷ und His₆-SUMO-Cyp58²⁶⁻¹³⁷, war aufgrund der Degradation der Proteine während der Expression weder in löslicher Form noch durch Rückfaltung aus Einschlusskörpern möglich.

Die Reinigung von Cyp58¹⁻²⁷² erfolgte analog zur Reinigung von Cyp58 mit N-terminaler His₆-SUMO-Fusion. Nach Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM NaCl), Dialyse, SEN2-Proteolyse und erneuter Dialyse erfolgte Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM NaCl) mit Elution durch 2 mM Imidazol in Lauffpuffer. Abschließend wurde eine Größenausschluss-Chromatographie mittels Superdex™ 75-Säule

(20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 500 mM NaCl; 1 mM DTT) durchgeführt. Für die Reinigung von His₆-SUMO-Cyp58¹⁻²⁷² erfolgte die Größenausschluss-Chromatographie direkt nach der ersten Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie. Die finalen SDS-PA-Gele zeigten für die gereinigten His₆-SUMO-Cyp58¹⁻²⁷² (Abb. 3.4D) und Cyp58¹⁻²⁷² (Abb. 3.4E) apparente molekulare Massen von ca. 50 kDa und 32 kDa.

Die Reinigung der isolierte PPIase-Domäne von Cyp58, His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹, erfolgte zunächst durch DEAE-Anionenaustauschchromatographie (10 mM Tris/HCl pH 7,5). Dabei passierte His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ entsprechend des theoretischen pI von 8,6 die Säule, während ein großer Teil des *E. coli*-Lysats an die Säule gebunden wurde. Anschließend erfolgten Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM NaCl) und Größenausschluss-Chromatographie mittels Superdex[™] 75-Säule (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 50 mM NaCl; 1 mM DTT). Das finale SDS-PA-Gel (Abb. 3.4F) zeigte für das gereinigte His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ eine apparente molekulare Masse von ca. 24 kDa.

His₆-Cyp58²⁷³⁻⁵²⁰ wurde durch Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM NaCl) und Größenausschluss-Chromatographie mithilfe Superdex[™] 75-Säule (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 500 mM NaCl; 1 mM DTT) gereinigt. Das finale SDS-PA-Gel (Abb. 3.4G) zeigte für das gereinigte His₆-Cyp58²⁷³⁻⁵²⁰ eine apparente molekulare Masse von ca. 34 kDa.

Molekulare Massenbestimmung der gereinigten Proteine

Zur Bestätigung der Identität der gereinigten Cyp58-Proteine und Cyp58-Fragmente wurden durch RP-HPLC/ESI-MS die molekularen Massen bestimmt (Tab. 3.1).

Ebenfalls bestimmt wurden die molekularen Massen der für funktionale Untersuchungen gereinigten Cyp58-Varianten und His₆-UbcH3 (Abschn. 3.5) sowie der im Rahmen der Suche nach Cyp58-Interaktionspartnern gereinigten Proteine (Abschn. 3.9 & 3.10).

Protein	molekulare Masse (Da)	
	theoretisch	experimentell
His ₆ -Cyp58- <i>Strept</i> II	62 519,4 [#]	62 519,0
His ₆ -Cyp58- <i>Strept</i> II ^{R323A}	62 434,3 [#]	62 450,0
Cyp58	58 837,4	58 837,0
Cyp58 ^{K3/230/232/490A}	58 609,1	58 610,0
Cyp58 ¹⁻²⁷²	31 088,2	31 088,0
His ₆ -Cyp58 ²⁷³⁻⁴⁴⁹	22 324,8 [#]	22 325,0
His ₆ -Cyp58 ²⁷³⁻⁵²⁰	29 930,5 [#]	29 929,0
GST-14-3-3-Protein β	54 374,9	54 390,0
GST-14-3-3-Protein γ	54 968,5	54 968,0
His ₆ -14-3-3-Protein ζ	32 492,2	32 480,0
GST-SET-Protein	58 308,4	58 273,0
His ₆ -SET-Protein	34 135,1 [#]	34 138,0
His ₆ -UbcH3	28 267,4	28 285,0

Tab. 3.1: Theoretische und experimentell bestimmte molekulare Massen der gereinigten rekombinanten Proteine. Die experimentelle molekulare Masse wurde durch RP-HPLC/ESI-MS bestimmt.

[#] ohne N-terminales Methionin

3.3 Sekundärstruktur und Temperaturstabilität von Cyp58

Die rekombinant gewonnenen Proteine wurden im Anschluss an die Reinigung mithilfe der Fern-UV-CD-Spektroskopie auf das Vorhandensein von Sekundärstrukturelementen untersucht.

Die Spektren der gereinigten Cyp58-Proteine und Cyp58-Fragmente (Abb. 3.5A) weisen die typischen Absorptionseigenschaften für Proteine mit den Sekundärstrukturelementen α -Helix und β -Faltblatt auf. His₆-Cyp58-*StrepII* und Cyp58 zeigen nahezu identische Spektren mit einem Maximum der molaren Elliptizität bei 195 nm und Minima bei 208 nm und 221 nm. Das Cyp58¹⁻²⁷²-Spektrum zeigt im Vergleich zu Cyp58 bei 195 nm kein Maximum, ein absolutes Minimum bei 205 nm und eine Schulter bei ca. 223 nm. Die Spektren von His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ und His₆-Cyp58²⁷³⁻⁵²⁰ besitzen beide ein Maximum der molaren Elliptizität bei 197 nm, ein absolutes Minimum bei 223 nm bzw. 222 nm und eine Schulter bei ca. 210 nm. Die algebraische Addition der individuellen Spektren von Cyp58¹⁻²⁷² und His₆-Cyp58²⁷³⁻⁵²⁰ resultierte in einem dem Cyp58 sehr ähnlichen Spektrum. Das weist darauf hin, dass beide Fragmente eine ähnliche Struktur wie die gleichen Abschnitte im Vollängenprotein besitzen.

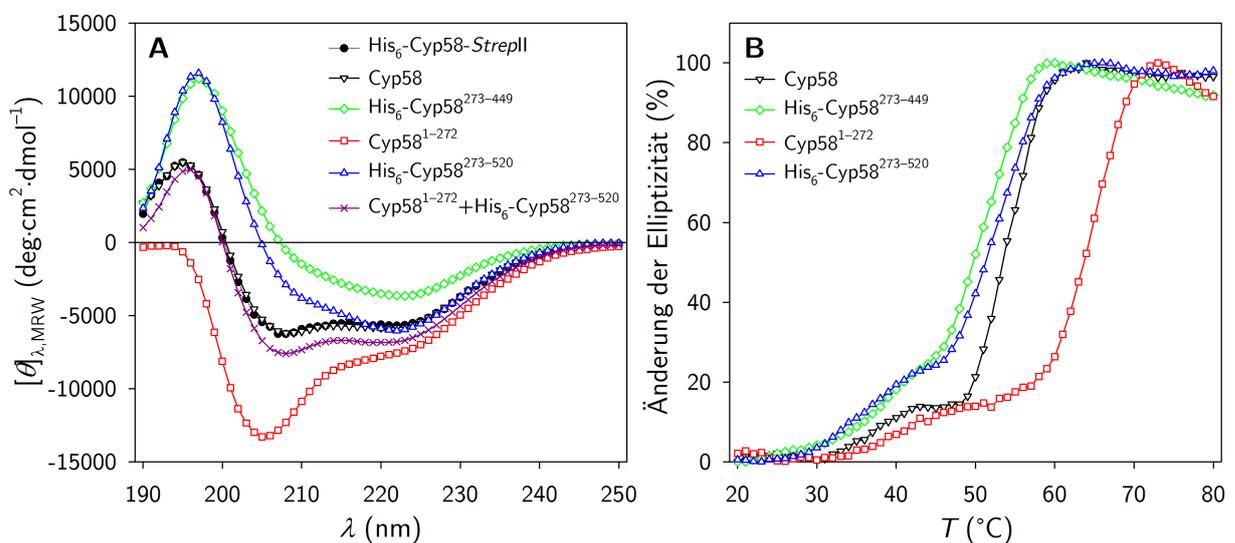


Abb. 3.5: Sekundärstruktur und Temperaturstabilität von Cyp58-Proteinen und Cyp58-Fragmenten. **A** Fern-UV-CD-Spektren von 1,3–6 μ M Protein (5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4) aufgenommen in Quarzküvetten mit 1 mm Schichtdicke bei 20 °C. Es wurden jeweils 50 Spektren akkumuliert. Zur Korrektur wurde ein Pufferspektrum subtrahiert. **B** Thermische Entfaltung. Die Elliptizität wurde für Cyp58, His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ und His₆-Cyp58²⁷³⁻⁵²⁰ bei 222 nm sowie für Cyp58¹⁻²⁷² bei 205 nm verfolgt. Die Amplituden der Signaländerung wurden auf 100 % normiert. Die Heizrate betrug 60 K/h.

Die Untersuchung der thermischen Stabilität von Cyp58 und Cyp58-Fragmenten erfolgte ebenfalls durch Fern-UV-CD-Spektroskopie. Dazu wurde die Temperatur von 20 °C auf 80 °C kontinuierlich erhöht und die Elliptizität der Proteine bei der jeweiligen Wellenlänge mit der größten Differenz zwischen nativem und denaturiertem Proteinspektrum verfolgt.

Der Temperaturverlauf (Abb.3.5B) zeigte bei allen Proteinen ab 30 °C eine leichte Signaländerung. Ein deutlicher Übergang von nativem zu denaturiertem Protein erfolgte für His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ und His₆-Cyp58²⁷³⁻⁵²⁰ ab ca. 46 °C sowie für Cyp58 ab ca. 49 °C. Cyp58¹⁻²⁷² zeigte mit einem Übergang ab ca. 57 °C im Vergleich dazu eine deutlich höhere thermische Stabilität. Die thermische Denaturierung von Cyp58 und Cyp58-Fragmenten war irreversibel.

3.4 PPIase-Aktivität von Cyp58

3.4.1 PPIase-Aktivität von Cyp58 und Cyp58-Fragmenten

Aufgrund der Zugehörigkeit zur Enzymklasse der PPIasen wurden die enzymatischen Eigenschaften von Cyp58 untersucht. Dazu wurde die PPIase-Aktivität von Cyp58-Proteinen und Cyp58-Fragmenten mithilfe des Protease-gekoppelten, Protease-freien und Fluoreszenz-basierten Protease-freien PPIase-Tests untersucht. Die Bestimmung der Spezifitätskonstante $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ (katalytische Effizienz) erfolgte durch lineare Anpassung der Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten der enzymkatalysierten Reaktion (k_{enz}) in Abhängigkeit von der Cyp58-Konzentration.

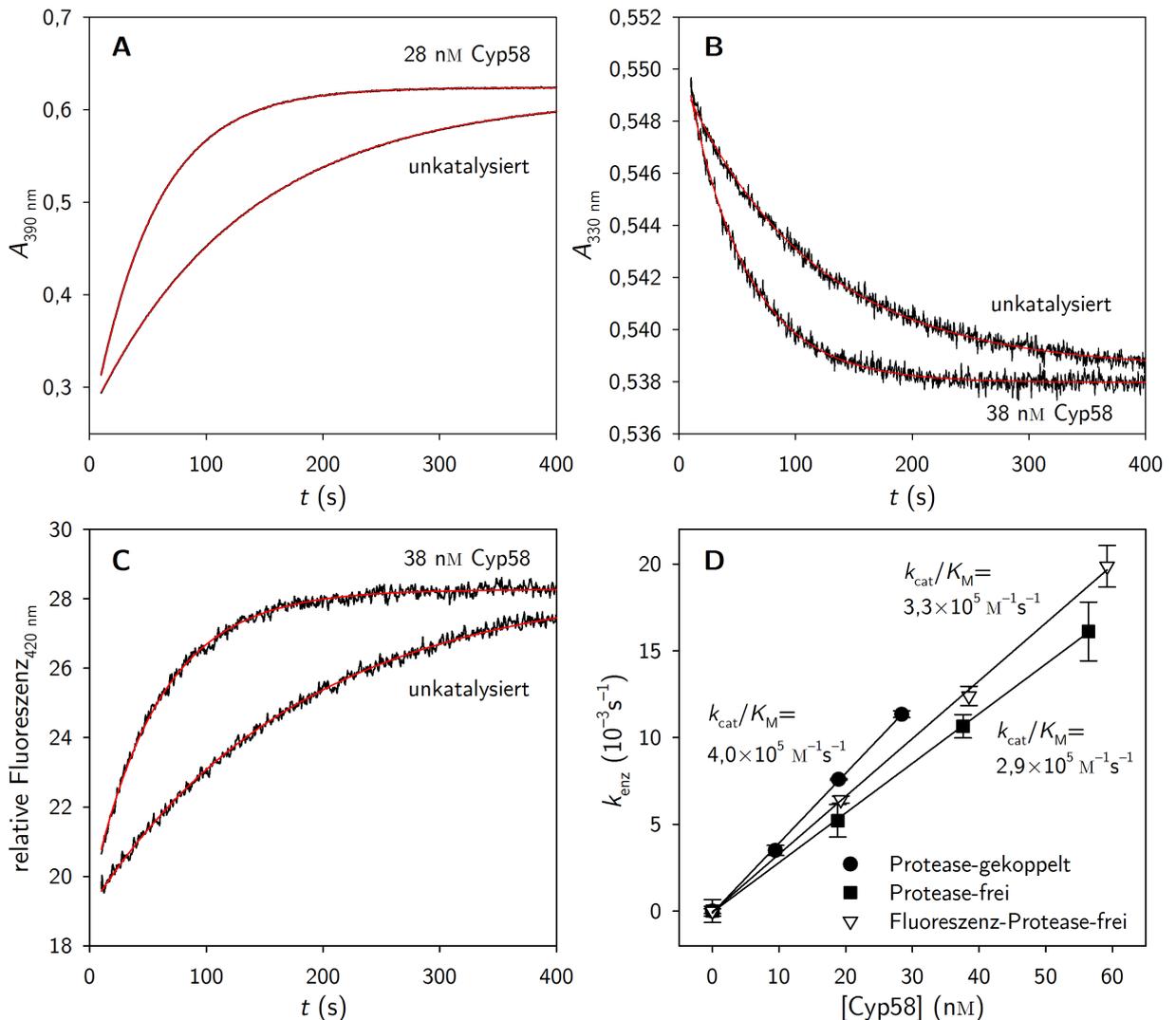


Abb. 3.6: PPIase-Aktivität von Cyp58. Kinetiken für die Isomerisierung von Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA im Protease-gekoppelten (A) und Protease-freien PPIase-Test (B) sowie von Abz-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA im Fluoreszenz-basierten Protease-freien PPIase-Test (C) in An- oder Abwesenheit von Cyp58 bei 10 °C (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 500 mM NaCl). Die anschließenden nichtlinearen Anpassungen nach einer Reaktion erster Ordnung sind rot dargestellt. D Bestimmung der Spezifitätskonstanten $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ für die verschiedenen Aktivitätstests. $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ entspricht dem Anstieg der Geraden nach linearer Anpassung.

Die Abbildungen 3.6A–C zeigen typische Kurvenverläufe für die drei Methoden zur Analyse der PPIase-Aktivität. In allen drei Untersuchungsmethoden konnte eine Katalyse der *cis/trans*-

Isomerisierung der Prolyl-Bindung in Tetrapeptid-Substraten durch Cyp58 nachgewiesen werden. Cyp58 zeigte im Protease-gekoppelten und im Protease-freien Test gegenüber dem Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA Spezifitätskonstanten von $4,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $2,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Im Fluoreszenz-basierten Protease-freien PPIase-Test zeigte Cyp58 gegenüber dem Substrat Abz-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA eine Spezifitätskonstante von $3,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Abb. 3.6D).

His₆-Cyp58-*StreptII* und die Fragmente Cyp58¹⁻²⁷², His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ und His₆-Cyp58²⁷³⁻⁵²⁰ wurden ebenfalls auf ihre PPIase-Aktivität hin untersucht. Tabelle 3.2 gibt einen Überblick über die enzymatische Aktivität von Cyp58-Proteinen und Cyp58-Fragmenten in den verschiedenen verwendeten PPIase-Aktivitätstests.

Tab. 3.2: PPIase-Aktivität von Cyp58-Proteinen und Cyp58-Fragmenten. Die Aktivität wurde im Protease-gekoppelten, Protease-freien und Fluoreszenz-basierten Protease-freien PPIase-Test (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 500 mM NaCl) gegenüber Substraten vom Typ Suc-Ala-Ala-Pro-Yaa-pNA bzw. Abz-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA bei 10 °C bestimmt.

Protein	-Yaa-	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)		
		Protease-gekoppelt	Protease-frei	Fluoreszenz-basiert
His ₆ -Cyp58- <i>StreptII</i> Pellet	-Phe-	$(3,9 \pm 0,1) \times 10^5$	$(3,1 \pm 0,3) \times 10^5$	$(3,5 \pm 0,1) \times 10^5$
His ₆ -Cyp58- <i>StreptII</i> nativ	-Phe-	$(3,6 \pm 0,1) \times 10^5$	$(2,9 \pm 0,1) \times 10^5$	
Cyp58	-Phe-	$(4,0 \pm 0,1) \times 10^5$	$(2,9 \pm 0,1) \times 10^5$	$(3,3 \pm 0,1) \times 10^5$
	-Arg-	$(5,0 \pm 0,1) \times 10^5$ [#]	$(4,2 \pm 0,2) \times 10^5$	
Cyp58 ¹⁻²⁷²	-Phe-		$< 5 \times 10^3$	$< 5 \times 10^3$
His ₆ -Cyp58 ²⁷³⁻⁴⁴⁹	-Phe-	$(3,9 \pm 0,1) \times 10^5$	$(3,3 \pm 0,2) \times 10^5$	$(3,2 \pm 0,3) \times 10^5$
His ₆ -Cyp58 ²⁷³⁻⁵²⁰	-Phe-	$(4,2 \pm 0,1) \times 10^5$	$(3,3 \pm 0,3) \times 10^5$	$(3,6 \pm 0,2) \times 10^5$

[#] Trypsin als isomerspezifische Protease

Alle Proteine, die eine PPIase-Domäne enthalten, zeigten im jeweiligen PPIase-Test gegenüber den Substraten mit Phenylalanyl-Rest C-terminal zum Prolyl-Rest eine sehr ähnliche Aktivität. Das deutet darauf hin, dass die zusätzlichen N- und C-terminale Bereiche der PPIase-Domäne keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität von Cyp58 haben. Im Protease-gekoppelten Test resultierten Spezifitätskonstanten von ca. $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, im Protease-freien Test von ca. $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und im Fluoreszenz-basierten Test von ca. $3,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Damit konnte im Protease-freien Test nur ca. 75 % der Aktivität und im Fluoreszenz-basierten Protease-freien PPIase-Test nur ca. 85 % der Aktivität des entsprechenden Protease-gekoppelten Tests beobachtet werden. Gegenüber dem Substrat mit Suc-Ala-Ala-Pro-Arg-pNA stellte sich eine um 25–46 % erhöhte PPIase-Aktivität von Cyp58 im Vergleich zu Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA ein. Cyp58¹⁻²⁷², dem die PPIase-Domäne fehlt, zeigte nur eine sehr geringe PPIase-Aktivität, die wahrscheinlich auf Verunreinigungen zurückzuführen ist.

Zur Bestimmung der optimalen Messbedingungen für die PPIase-Aktivitätsmessungen wurde die Abhängigkeit der Aktivität von His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ von der NaCl-Konzentration durch den Protease-gekoppelten und den Protease-freien PPIase-Test ermittelt.

Im Protease-freien Test zeigte die PPIase-Aktivität von His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ eine deutliche Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration im Messansatz (Abb. 3.7). Die PPIase-Aktivität nahm bis zu einer NaCl-Konzentration von ca. 500 mM kontinuierlich zu und veränderte sich bei wei-

terer NaCl-Zugabe nur noch geringfügig. Bei KCl zeigten sich ähnliche Effekte wie bei NaCl, weshalb eine Abhängigkeit der PPIase-Aktivität von der Ionenstärke unabhängig von der Art des verwendeten Kations angenommen werden kann. Im Protease-gekoppelten PPIase-Test zeigte sich diese Abhängigkeit hingegen nicht.

His₆-Cyp58-*StrepII*, Cyp58 und His₆-Cyp58²⁷³⁻⁵²⁰ zeigten in allen drei Untersuchungsmethoden eine ähnliche Abhängigkeit der PPIase-Aktivität von der Ionenstärke wie His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ im Protease-freien Test (nicht gezeigt). Deshalb erfolgten die Aktivitätsmessungen für diese Proteine immer in Puffer mit 500 mM NaCl. His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ wurde sowohl in Puffer mit 500 mM NaCl als auch in Puffer ohne zusätzliches NaCl (nur Protease-gekoppelter Test) untersucht.

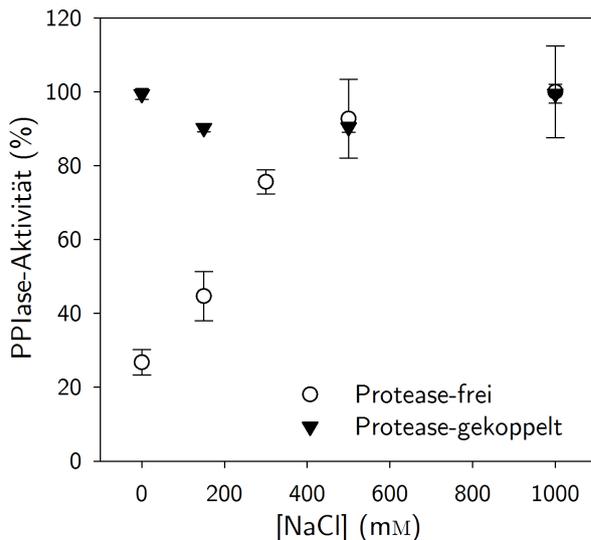


Abb. 3.7: Abhängigkeit der PPIase-Aktivität von His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ von der NaCl-Konzentration. Aktivität bestimmt im Protease-gekoppelten und im Protease-freien PPIase-Test gegenüber dem Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (20 mM HEPES/KOH pH 7,4) bei 10 °C.

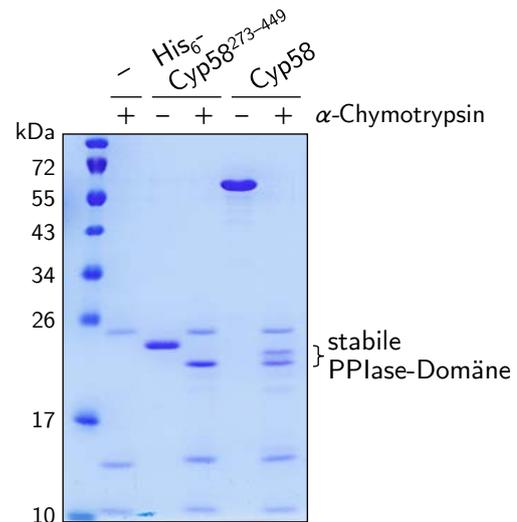


Abb. 3.8: Stabilität von His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ und Cyp58 im Protease-gekoppelten PPIase-Test. Proteolyse von 8 μ M His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ bzw. Cyp58 durch 0,5 mg/ml α -Chymotrypsin bei 10 °C (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 500 mM NaCl). Abgestoppt nach 10 min mit PMSF (2 mM Endkonz.). Nach SDS-PAGE (12,5 %) erfolgte Coomassie-Färbung.

Zur Untersuchung der Stabilität von Cyp58 im Protease-gekoppelten PPIase-Test wurde eine limitierte Proteolyse von His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ und Cyp58 durch α -Chymotrypsin unter Messbedingungen durchgeführt. Die Analyse der Proben erfolgte durch SDS-PAGE.

Die limitierte Proteolyse zeigte für His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ und Cyp58 einen Abbau durch α -Chymotrypsin (Abb. 3.8). His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ wurde um ca. 2 kDa verkürzt. Die Proteolyse von Cyp58 resultierte in zwei Hauptfragmenten, die etwa die gleiche apparente molekulare Masse zeigen wie das verkürzte His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹. Da der proteolytische Abbau von Cyp58 im Protease-gekoppelten Test zu keiner Verringerung der PPIase-Aktivität im Vergleich zu den Protease-freien Tests führte (Tab. 3.2), kann eine Protease-stabile PPIase-Domäne angenommen werden.

3.4.2 Substratspezifität von Cyp58

Die Substratspezifität von PPIasen wird vornehmlich durch den Aminosäurerest *N*-terminal der Prolyl-Bindung (P1-Position; Nomenklatur nach SCHECHTER & BERGER [186]) determiniert

[187]. Zur Ermittlung der Substratspezifität von Cyp58 wurde die Aktivität von His₆-Cyp58-*StrepII* gegenüber sieben repräsentativen Tetrapeptid-Substraten vom Typ Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA im Protease-gekoppelten PPIase-Test bestimmt.

In Tabelle 3.3 ist die ermittelte PPIase-Aktivität von His₆-Cyp58-*StrepII* gegenüber den sieben untersuchten Tetrapeptid-Substraten angegeben. His₆-Cyp58-*StrepII* zeigte die höchste Aktivität gegenüber Substraten mit ungeladenem aliphatischem Alanyl- (100 % rel. Aktivität) oder Leucyl-Rest (84,7 % rel. Aktivität) in P1-Position. Die geringste Aktivität wurde gegenüber dem Substrat mit negativ geladenem Glutamyl-Rest (9,7 % rel. Aktivität) ermittelt. Gegenüber dem Substrat mit positiv geladenem Lysyl-Rest in P1-Position zeigte His₆-Cyp58-*StrepII* hingegen mit 63,3 % eine vergleichsweise hohe relative Aktivität.

Beim Vergleich von Cyp58 mit Cyp18 zeigt sich eine sehr ähnliche Spezifität gegenüber Substraten mit ungeladenen aliphatischen und aromatischen Aminosäureresten in P1-Position. Gegenüber Substraten mit geladenem Rest wird jedoch eine diametrale Spezifität sichtbar. Während Cyp58 eine Präferenz für den positiv geladenen Lysyl-Rest in P1-Position über den negativ geladenen Glutamyl-Rest zeigt, bevorzugt Cyp18 den negativen Rest über den positiven.

Tab. 3.3: Substratspezifität von Cyp58. Absolute und relative PPIase-Aktivität von His₆-Cyp58-*StrepII* gegenüber Substraten vom Typ Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA bestimmt im Protease-gekoppelten PPIase-Test (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 500 mM NaCl) bei 10 °C. Vergleich zu Cyp18 [188].

-Xaa-	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)	rel. Aktivität (%)	
		Cyp58	Cyp18
-Ala-	$(3,9 \pm 0,1) \times 10^5$	100,0	100,0
-Leu-	$(3,3 \pm 0,1) \times 10^5$	84,7	84,9
-Phe-	$(1,8 \pm 0,1) \times 10^5$	44,6	43,7
-His-	$(5,8 \pm 0,4) \times 10^4$	14,7	18,9
-Gly-	$(6,6 \pm 0,5) \times 10^4$	16,8	37,4
-Lys-	$(2,5 \pm 0,1) \times 10^5$	63,3	28,9
-Glu-	$(3,8 \pm 0,1) \times 10^4$	9,7	67,3

3.4.3 Inhibition von Cyp58 durch CsA

Ein Charakteristikum der Proteinfamilie der Cyclophiline ist die Inhibition der PPIase-Aktivität durch Cyclosporin A (CsA). Zur Untersuchung, ob die enzymatische Aktivität von Cyp58 durch CsA inhibiert werden kann, wurde die Aktivität von His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ in Gegenwart von CsA im Protease-gekoppelte PPIase-Test bestimmt. Zusätzlich wurde durch die Untersuchung von His₆-Cyp58-*StrepII* und His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ im Fluoreszenz-basierten Protease-freien PPIase-Test ermittelt, ob Unterschiede in der CsA-Bindung zwischen dem Volllängenprotein und der isolierten PPIase-Domäne bestehen. Aufgrund der begrenzten Löslichkeit von CsA in den verwendeten Messpuffern wurden nur Inhibitor-Konzentrationen bis 50 μM bzw. 20 μM analysiert.

Mit zunehmender Konzentration an CsA zeigte sich eine Abnahme der PPIase-Aktivität von His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ (Abb. 3.9A) und His₆-Cyp58-*StrepII* (Abb. 3.9B). Durch nichtlineare Anpassung und Extrapolation wurde für His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ im Protease-gekoppelten PPIase-Test eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von 26,7 μM bestimmt. Das ist im Vergleich zu Cyp18, das eine Inhibitionskonstante für CsA im einstelligen nanomolaren Bereich aufweist

[13], eine sehr schwache Inhibition. Im Protease-freien Test wurden für His₆-Cyp58-*StrepII* und His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ IC₅₀-Werte von 11,4 μM bzw. 10,2 μM bestimmt. Somit haben die zusätzlichen *N*- und *C*-terminalen Bereiche der PPIase-Domäne von Cyp58 keinen Einfluss auf die CsA-Inhibition der PPIase-Aktivität. Aufgrund der unterschiedlichen Pufferzusammensetzung in den beiden Untersuchungsmethoden deutet der Unterschied in den ermittelten IC₅₀-Werten auf eine Abhängigkeit der Cyp58/CsA-Interaktion von der Ionenstärke hin. Durch Erhöhung der Ionenstärke wird die Bindung von CsA an Cyp58 verstärkt.

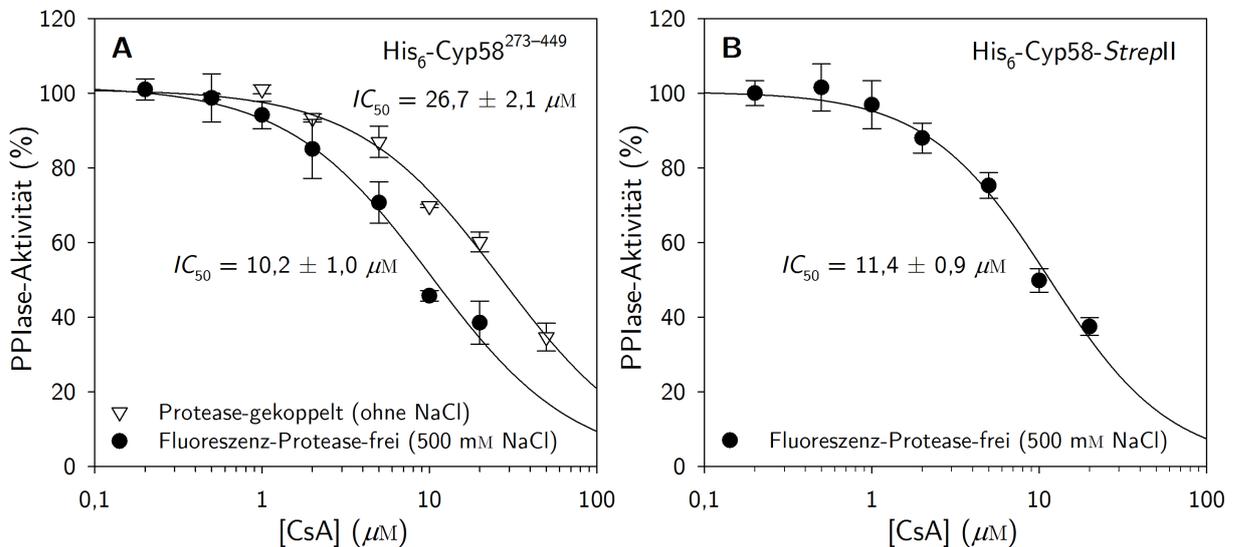


Abb. 3.9: Inhibition der PPIase-Aktivität von His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ (A) und His₆-Cyp58-*StrepII* (B) durch CsA. Aktivität bestimmt im Protease-gekoppelten PPIase-Test (35 mM HEPES/KOH pH 7,8; 1 % v/v DMSO) gegenüber dem Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA bzw. im Fluoreszenz-basierten Protease-freien PPIase-Test (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 500 mM NaCl; 1 % v/v DMSO) gegenüber dem Substrat Abz-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA in Gegenwart verschiedener CsA-Konzentrationen bei 10 °C. Nach halblogarithmischer Auftragung erfolgte eine nichtlineare Anpassung und Extrapolation auf 0 % PPIase-Aktivität.

3.4.4 Suche nach Cyp58-Inhibitoren

Ein wichtiges Werkzeug zur Untersuchung von PPIasen *in vitro* und *in vivo* ist die Inhibition durch einen hochaffinen Inhibitor. Zur Identifizierung eines potenten Inhibitors für Cyp58 wurde eine Bibliothek von 138 CsA-Derivaten, modifiziert an Position 1 von CsA (Abb. 3.10), auf die Fähigkeit hin getestet, die PPIase-Aktivität von His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ im Protease-gekoppelten Test zu inhibieren.

Keines der untersuchten CsA-Derivate hatte bis zu einer Konzentration von 10 μM einen Einfluss auf die enzymatische Aktivität von His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹.

Zusätzlich wurden weitere CsA-Derivate analysiert, die an den Positionen 1, 3 und 4 von CsA (Abb. 3.10) modifiziert sind und sich in Untersuchungen gegenüber Cyp18 als stärkere Inhibitoren als CsA erwiesen haben (persönliche Mitteilung von Dr.

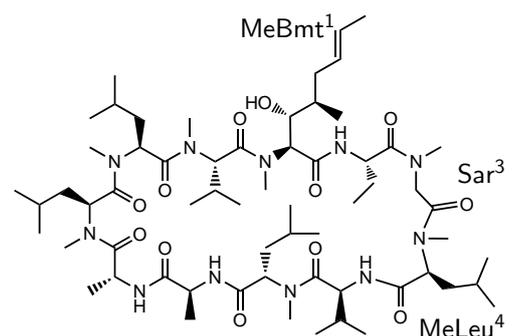


Abb. 3.10: Cyclosporin A und seine Modifizierungspositionen. MeBmt, *N*-Methyl-4-(*E*-2-butenyl)-4-methyl-threonin; Sar, Sarcosin; MeLeu, *N*-Methyl-leucin.

M. MALEŠEVIĆ [189, 190]. Es wurden die kommerziell erhältlichen Derivate NIM811 ([MeIle]⁴-CsA), Debio-025 ([D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA) und SCY635 ([R- α -N,N-Dimethylaminoethylthio-Sar]³-[γ -HydroxyMeLeu]⁴-CsA) sowie die Derivate VK-61 [191], MM-258, MM-284 [192] und MM-494 untersucht (Abb. A.3 Anhang).

Alle untersuchten CsA-Derivate zeigten bei einer Konzentration von 10 μ M eine Inhibition der PPIase-Aktivität von His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ (Abb. 3.11). Dabei waren alle diese Derivate mit Ausnahme von MM-258 stärkere Inhibitoren als CsA. Die stärkste Inhibition von His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ zeigten MM-494 und Debio-025 mit 27,0 % bzw. 36,6 % PPIase-Restaktivität. Aus diesen Daten kann abgeschätzt werden, dass die *IC*₅₀-Werte aller untersuchten Inhibitoren immer noch im mikromolaren Bereich liegen. Damit eignen sich Cyclosporine wahrscheinlich nicht zur selektiven Inhibition von Cyp58 in zellulären Untersuchungen.

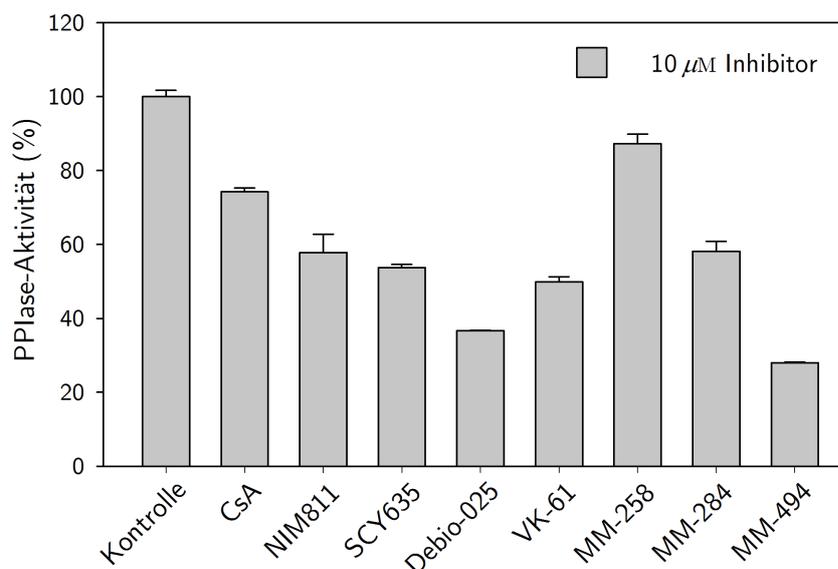


Abb. 3.11: Inhibition der PPIase-Aktivität von His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ durch CsA-Derivate. Aktivität bestimmt im Protease-gekoppelten PPIase-Test (35 mM HEPES/KOH pH 7,8; 1 % v/v DMSO) gegenüber dem Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA in Ab- oder Anwesenheit von 10 μ M CsA bzw. CsA-Derivat bei 10 °C.

3.4.5 Einfluss der U-Box-Domäne auf die Aktivität der PPIase-Domäne von Cyp58

Parallel zu den Untersuchungen von Cyp58-Fragmenten mit unterschiedlicher Domänen-Zusammensetzung (Tab. 3.2) wurde untersucht, ob die isolierte U-Box-Domäne einen Einfluss auf die PPIase-Aktivität von Cyp58 hat. Dazu wurde die PPIase-Aktivität der beiden die PPIase-Domäne von Cyp58 enthaltenden Fragmente His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ und His₆-Cyp58²⁷³⁻⁵²⁰ in Ab- und Anwesenheit des die U-Box-Domäne enthaltenden Fragments Cyp58¹⁻²⁷² bestimmt. Es wurde der Fluoreszenz-basierte Protease-freie PPIase-Test verwendet, da der Protease-freie PPIase-Test sehr empfindlich gegenüber hohen Proteinkonzentrationen im Messansatz ist. Die PPIase-Aktivität von His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ bzw. His₆-Cyp58²⁷³⁻⁵²⁰ im Gemisch mit Cyp58¹⁻²⁷² wurde durch Abzug der durch Verunreinigungen von Cyp58¹⁻²⁷² eingebrachten PPIase-Aktivität korrigiert.

Die Untersuchung zeigte, dass die Aktivität von His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ und His₆-Cyp58²⁷³⁻⁵²⁰

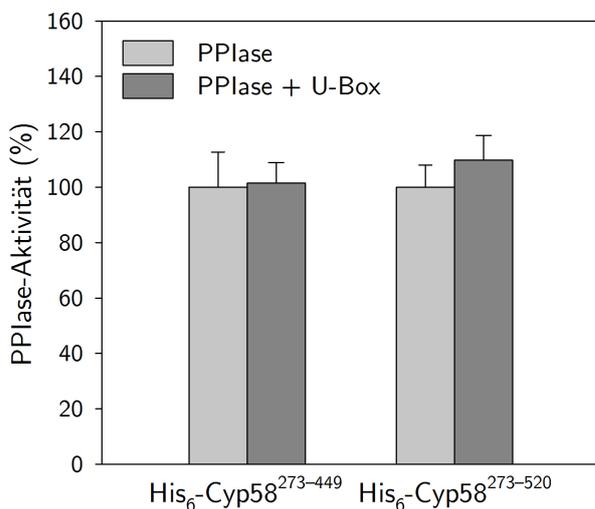


Abb. 3.12: Einfluss der U-Box-Domäne auf die Aktivität der PPlase-Domäne von Cyp58. Aktivität von 30 nM His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹/His₆-Cyp58²⁷³⁻⁵²⁰ (PPlase) bestimmt im Fluoreszenz-basierten Protease-freien PPlase-Test (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 500 mM NaCl) gegenüber dem Substrat Abz-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA in Ab- oder Anwesenheit von 3 μM Cyp58¹⁻²⁷² (U-Box) bei 10 °C. Die PPlase-Aktivität in Gegenwart von Cyp58¹⁻²⁷² wurde um die durch dessen Verunreinigungen eingebrachte PPlase-Aktivität korrigiert.

durch Zugabe eines 100-fachen Überschusses an Cyp58¹⁻²⁷² gegenüber diesen beiden Fragmenten kaum beeinflusst wird (Abb. 3.12). Somit hat die U-Box-Domäne wahrscheinlich keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der PPlase-Domäne von Cyp58.

3.5 Ubiquitin-Protein-Ligase-Aktivität von Cyp58

Für Cyp58 ist gezeigt worden, dass es eine Ubiquitin-Protein-Ligase (E3)-Aktivität gegenüber *E. coli*-Proteinen besitzt [118]. Um die E3-Aktivität von Cyp58 näher zu untersuchen, wurde rekombinant gewonnenes Cyp58 mithilfe eines kommerziellen Ubiquitylierungs-Kits hinsichtlich dieser Aktivität analysiert und die Spezifität für Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2) bestimmt. Für weitere Experimente wurde die Autoubiquitylierung als ein Modellsystem für die Untersuchung der E3-Aktivität von Cyp58 etabliert.

3.5.1 Autoubiquitylierung und E2-Präferenz von Cyp58

Eine häufig beschriebene Eigenschaft von E3 ist die Fähigkeit, ihre eigene Ubiquitylierung zu fördern. Diese Autoubiquitylierung wird als wichtiger Hinweis für potentielle E3-Aktivität *in vitro* angesehen [193]. Deshalb wurde mithilfe eines kommerziellen Ubiquitylierungs-Kits untersucht, ob rekombinant gewonnenes Cyp58 in Gegenwart aller Komponenten des Ubiquitylierungssystems autoubiquityliert wird. Parallel dazu wurde die Spezifität von Cyp58 für elf verschiedene E2 untersucht: UbcH1, UbcH2, UbcH3, UbcH5a, UbcH5b, UbcH5c, UbcH6, UbcH7, UbcH8, UbcH10 und UbcH13. Für jedes E2 wurden je eine Ubiquitylierungsreaktion und zwei Kontrollen durchgeführt. Die Ubiquitylierungsreaktion beinhaltete E1 (Ubiquitin-aktivierendes Enzym), E2, Cyp58, biotinyliertes Ubiquitin (Bt-Ub) und ATP. Als Kontrollen wurden entsprechende Reaktionen ohne ATP (mit EDTA) und ohne Cyp58 durchgeführt. Die Untersuchung der Proben erfolgte durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse gegen Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP) zur Detektion von Bt-Ub.

Die Western-Blot-Analyse der Ubiquitylierungsreaktionen (Abb. 3.13) zeigte gegenüber allen E2 in Anwesenheit aller Komponenten des Ubiquitylierungssystems zusätzliche Banden

mit größerer molekularer Masse als Cyp58, wobei zwei Banden dominant hervortraten. In Abwesenheit von ATP waren diese zusätzlichen Banden über Cyp58 nicht zu beobachten. Damit zeigte Cyp58 Autoubiquitylierung und ist ein aktives E3. Die Aktivität war besonders hoch gegenüber UbcH3, UbcH5a, UbcH5b, UbcH5c, UbcH6 und UbcH10. In Abwesenheit von Cyp58 zeigten sich für UbcH5a, UbcH5b, UbcH5c und UbcH6 schwache Banden von ubiquitylierten Proteinen. Diese sind wahrscheinlich auf E3-unabhängige Ubiquitylierung von Verunreinigungen zurückzuführen.

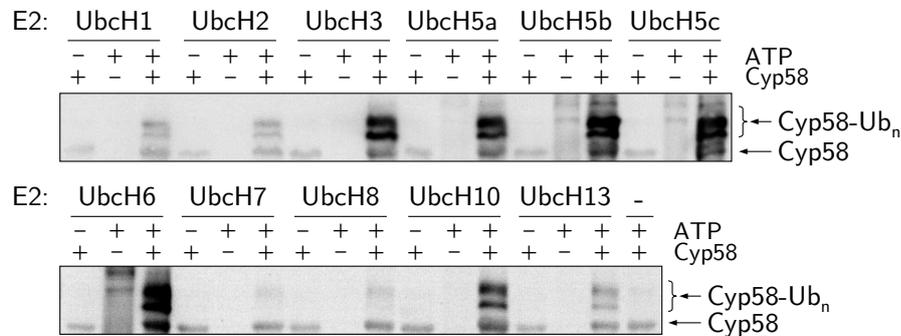


Abb. 3.13: Autoubiquitylierung von Cyp58 zur Bestimmung der E2-Präferenz. 100 nM His₆-UBE1, 2,5 μM His₆-E2, 2,5 μM Bt-Ub und 5 mM ATP (5 mM EDTA in Ansätzen ohne ATP) aus ENZO Ubiquitylierungs-Kit wurden mit 2 μM Cyp58 in bereitgestelltem Puffer (1 mM DTT) 2 h bei 30 °C inkubiert. Nach SDS-PAGE (10 %) erfolgte Western-Blot-Analyse gegen Streptavidin-HRP.

3.5.2 Expression und Reinigung von UbcH3

Neben UbcH5, UbcH6 und UbcH10 wurde UbcH3 von Cyp58 bevorzugt. Für dieses E2 war außerdem keine E3-unabhängige Ubiquitylierung detektierbar. In der Literatur ist ebenfalls eine Präferenz von Cyp58 für UbcH3 beschrieben [118]. Deshalb wurde UbcH3 für folgende Experimente rekombinant gewonnen.

UbcH3 wurde mit *N*-terminalem His₆-tag bei 30 °C in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Die Reinigung erfolgte durch Bindung an eine DEAE-Anionenaustauschchromatographie-Säule (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 mM DTT [181]) entsprechend des theoretischen pI von 4,68 und einer Elution durch einen linearen 0–1 M NaCl-Gradienten in Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA). His₆-UbcH3 eluierte bei ca. 500 mM NaCl von der Säule. Anschließend erfolgten Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM NaCl) und Größenausschluss-Chromatographie mittels SuperdexTM 75-Säule (10 mM HEPES/KOH pH 7,8; 150 mM KCl; 5 % v/v Glycerin; 1 mM DTT). Das finale SDS-PA-Gel (Abb. 3.14) zeigte eine apparente molekulare Masse des gereinigten Proteins von ca. 34 kDa. Die theoretische molekulare Masse von His₆-UbcH3 wurde durch RP-HPLC/ESI-MS (Tab. 3.1) und die Ausbildung von Sekundärstrukturelementen durch Fern-UV-CD-Spektroskopie bestätigt (Abb. A.2B Anhang).

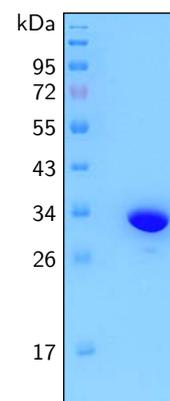


Abb. 3.14: Gereinigtes rekombinantes His₆-UbcH3. Coomassiegefärbtes 12,5 %iges SDS-PA-Gel.

3.5.3 Aktivität von rekombinantem UbchH3

Als Aktivitätstest für gereinigtes His₆-UbchH3 und kommerzielles His₆-UBE1 (E1) diente eine Analyse zur Ausbildung von Thioester-Konjugaten. Dabei wurde die Fähigkeit von His₆-UbchH3 und His₆-UBE1 untersucht, in Gegenwart von ATP eine Thioester-Bindung zu Bt-Ub auszubilden (Abb. 1.5). Diese Bindung sollte durch einen Überschuss an Thiolgruppen wieder spaltbar sein. Es wurde eine kurze Reaktionszeit gewählt, um die Thioester-Bildung zu begünstigen und die Ubiquitin-Konjugation gering zu halten [181]. Zur Untersuchung der Proben erfolgte SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen und Western-Blot-Analyse gegen Streptavidin-HRP zur Detektion von Bt-Ub.

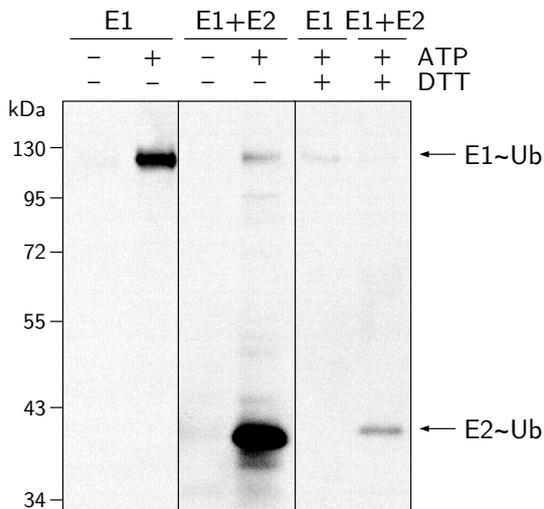


Abb. 3.15: Ausbildung von Ubiquitin-Thioester-Konjugaten von His₆-UBE1 und His₆-UbchH3. 37,5 nM His₆-UBE1 (E1) wurden mit 2,5 µg/ml Bt-Ub, 300 nM His₆-UbchH3 (E2) und 5 mM ATP 10 min bei 30 °C inkubiert (50 mM HEPES/KOH pH 7,5; 40 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 0,5 mM DTT) und die Reaktion durch Zugabe von EDTA (50 mM Endkonz.) abgestoppt. Ein Teil der +ATP-Proben wurde durch DTT (100 mM Endkonz.) reduziert. Nach SDS-PAGE (10 %) unter nichtreduzierenden Bedingungen erfolgte Western-Blot-Analyse gegen Streptavidin-HRP. E1~Ub, Bt-Ub-konjugiertes E1; E2~Ub, Bt-Ub-konjugiertes E2.

Der Aktivitätstest zeigte in der Western-Blot-Analyse (Abb. 3.15) nur in Gegenwart von ATP starke Signale, die ihren apparenten molekularen Massen nach Bt-Ub-konjugiertem His₆-UBE1 und Bt-Ub-konjugiertem His₆-UbchH3 entsprechen. Durch Zugabe von DTT verschwanden diese Signale fast vollständig, was das Vorhandensein einer thiolempfindlichen Thioester-Bindung in den entsprechenden ursprünglichen Proteinkonjugaten zeigt. Damit konnte für rekombinant gewonnenes His₆-UbchH3 und kommerzielles His₆-UBE1 katalytische Aktivität gezeigt werden.

3.5.4 Verifizierung der Autoubiquitylierung von Cyp58

Um die beobachtete Autoubiquitylierung von Cyp58 zu verifizieren, wurde die Fähigkeit von Cyp58 und dem die U-Box-Domäne enthaltenden Fragment His₆-SUMO-Cyp58¹⁻²⁷² untersucht, im verwendeten Modellsystem ihre eigene Ubiquitylierung zu katalysieren. Die Untersuchung der Proben erfolgte durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse gegen Streptavidin-HRP zur Detektion von Bt-Ub.

Die Western-Blot-Analyse der Ubiquitylierungsreaktionen (Abb. 3.16) zeigte nur in Anwesenheit von ATP zusätzliche Banden mit größerer molekularer Masse als Cyp58. Dabei dominierten analog zu Abschnitt 3.5.1 zwei Banden. Somit wurde die Fähigkeit von Cyp58 zur Autoubiquitylierung im verwendeten Modellsystem bestätigt. Die Autoubiquitylierung von His₆-SUMO-Cyp58¹⁻²⁷² war im Vergleich zu Cyp58 deutlich schwächer, führte aber ebenfalls zu zwei distinkten Produkten.

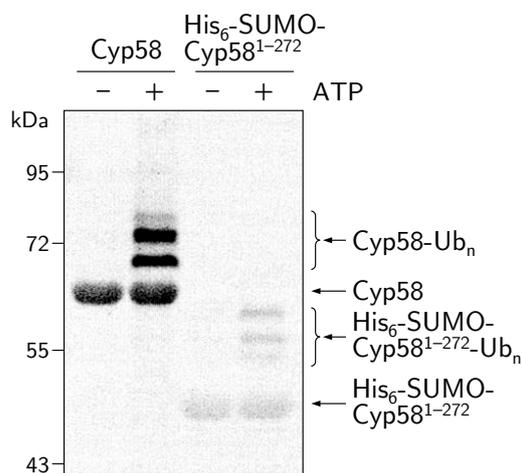


Abb. 3.16: Autoubiquitinylierung von Cyp58 und His₆-SUMO-Cyp58¹⁻²⁷². 5 μ M Cyp58 bzw. His₆-SUMO-Cyp58¹⁻²⁷² wurden mit 37,5 nM His₆-UBE1, 300 nM His₆-UbcH3, 2,5 μ g/ml Bt-Ub und 5 mM ATP 2 h bei 30 °C inkubiert (50 mM HEPES/KOH pH 7,5; 40 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 0,5 mM DTT). Nach SDS-PAGE (10 %) erfolgte Western-Blot-Analyse gegen Streptavidin-HRP.

3.5.5 Identifizierung der Autoubiquitinylierungspositionen

Zur Identifizierung der Autoubiquitinylierungspositionen von Cyp58 wurde zunächst das Programm BDM-PUB² genutzt, um aus den 49 Lysyl-Resten von Cyp58 jene mit der höchsten Ubiquitinylierungswahrscheinlichkeit zu ermitteln (Tab. 3.4). Dabei zeigte sich die höchste Wahrscheinlichkeit bei den Resten Lys³, Lys²³⁰, Lys²³² und Lys⁴⁹⁰. Diese vier Reste von Cyp58 überschritten den Schwellenwert von 2,7 Punkten und erfüllten damit das Kriterium der Voraussage mit hoher Spezifität.

Tab. 3.4: Potentielle Ubiquitinylierungsstellen in Cyp58. Ermittelt mit BDM-PUB bei einem mittleren Schwellenwert (Punkte > 0,3). Für weitere Untersuchungen ausgewählte Positionen sind *fett* hervorgehoben.

Peptid	Position	Punkte	Peptid	Position	Punkte
MGKRQHQKD	3	4,81	AHYSTGKVSASFT	245	1,30
THFYGGKKPDLPQ	25	0,42	NFIRLCKKHYYDG	312	0,53
NPSNGEKLDGRSL	82	0,60	SCAYLDKKHTIFG	392	0,75
DGRSLIKLNFSKN	90	0,68	CAYLDKKHTIFGR	393	0,88
IKLNFSKNSEKGY	95	0,68	ERKTQLKIAPETK	454	1,12
VEQLNIKAKNFRD	137	0,75	KIAPETKVKSSQP	460	0,96
DPSYYLKNTNAET	198	1,22	APETKVKSSQPQA	462	0,83
ELYKEFKGDEILA	216	0,41	FRQGVGKYINPAA	482	0,50
ILAATMKAPEKKK	226	1,52	INPAAT KRAAE EE	490	3,15
TMKAPEKKKVDKL	230	3,12	ATVPMSKKKPSRG	507	2,23
MKAPEKKKVDKLN	231	2,01	TVPMSKKKPSRGF	508	1,61
KAPEKKKVDKLNA	232	3,27	VPMSKKKPSRGFG	509	0,48
EKKKVDKLNAAHY	235	1,84			

Durch ortsspezifische Mutagenese (Tab. 2.12) und anschließender Expression in *E. coli* wurden die Varianten Cyp58^{K3A}, Cyp58^{K230A}, Cyp58^{K232A}, Cyp58^{K490A} und die Vierfachvariante Cyp58^{K3/230/232/490A} mit N-terminaler His₆-SUMO-Fusion generiert und entsprechend Cyp58

²Prediction of Ubiquitination sites with Bayesian Discrimination Method, <http://bdmpub.biocuckoo.org/>

(Abschn. 3.2) gereinigt. Die theoretische molekulare Masse von Cyp58^{K3/230/232/490A} wurde durch RP-HPLC/ESI-MS bestätigt (Tab. 3.1).

Anschließend wurde die Autoubiquitylierung von Cyp58 und den Lys→Ala-Varianten vergleichend untersucht. Nach SDS-PAGE erfolgte Western-Blot-Analyse gegen Streptavidin-HRP zur Detektion von Bt-Ub.

Die Western-Blot-Analyse der Autoubiquitylierung (Abb. 3.17) zeigte für Cyp58 und alle Varianten in Gegenwart von ATP die beiden charakteristischen Banden mit größerer molekularer Masse als Cyp58. Beim Vergleich der verschiedenen Cyp58-Einzelvarianten mit dem Wildtyp zeigten sich kaum Unterschiede. Bei Cyp58^{K3/230/232/490A} zeigte sich jedoch eine deutliche Verringerung der Autoubiquitylierung im Vergleich zum Wildtyp, besonders bei der oberen der beiden Banden. Die vier untersuchten Lysyl-Reste werden also zumindest teilweise durch Autoubiquitylierung modifiziert. Da die Verringerung der Autoubiquitylierung von Cyp58^{K3/230/232/490A} im Vergleich zum Wildtyp nur gering ausfiel, dienen wahrscheinlich weitere Lysyl-Reste als die vier untersuchten als Ziele der Autoubiquitylierung von Cyp58.

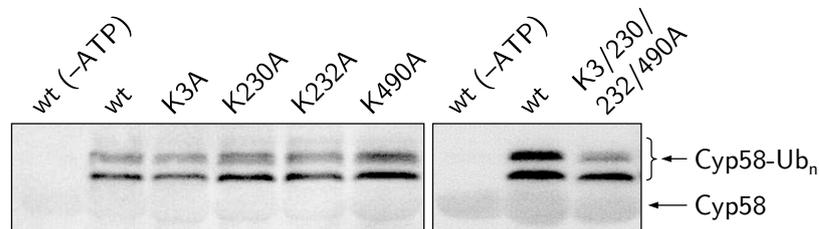


Abb. 3.17: Autoubiquitylierung von Cyp58 und Lys→Ala-Varianten. 10 μM Cyp58 bzw. Cyp58-Variante wurden mit 37,5 nM His₆-UBE1, 300 nM His₆-UbcH3, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Bt-Ub und 5 mM ATP 2 h bei 30 °C inkubiert (50 mM HEPES/KOH pH 7,5; 40 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 0,5 mM DTT). Nach SDS-PAGE (10 %) erfolgte Western-Blot-Analyse gegen Streptavidin-HRP.

3.5.6 Einfluss der PPIase-Aktivität auf die Autoubiquitylierung von Cyp58

Zur Untersuchung, ob eine funktionale Kopplung zwischen E3-Aktivität und PPIase-Aktivität von Cyp58 besteht, wurde der Einfluss der PPIase-Aktivität auf die Autoubiquitylierung von His₆-Cyp58-*StrepII* untersucht. Dazu wurde zunächst analog zur bekannten Cyp18-Variante mit stark verringerter PPIase-Aktivität (Cyp18^{R55A}) [115] durch ortsspezifische Mutagenese His₆-Cyp58-*StrepII* Arg³²³ gegen Ala ausgetauscht (Tab. 2.12). Anschließend erfolgte analog zu His₆-Cyp58-*StrepII* Expression und Reinigung aus dem löslichen Überstand (Abschn. 3.2). Durch RP-HPLC/ESI-MS wurde die theoretische molekulare Masse bestätigt (Tab. 3.1).

Die PPIase-Aktivität von His₆-Cyp58-*StrepII*^{R323A} wurde im Protease-freien PPIase-Test bestimmt und mit dem Wildtyp verglichen.

Tab. 3.5: PPIase-Aktivität von His₆-Cyp58-*StrepII*^{R323A}. Aktivität bestimmt im Protease-freien PPIase-Test gegenüber Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA bei 10 °C (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 500 mM NaCl).

Variante	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	relative Aktivität (%)
His ₆ -Cyp58- <i>StrepII</i>	$(2,9 \pm 0,1) \times 10^5$	100,0
His ₆ -Cyp58- <i>StrepII</i> ^{R323A}	$(8,4 \pm 0,6) \times 10^3$	2,9

His₆-Cyp58-*StreptII*^{R323A} zeigte mit einer Spezifitätskonstante von $8,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ eine sehr geringe PPIase-Aktivität. Dieser Wert entspricht 2,9% der Aktivität des Wildtyps von His₆-Cyp58-*StreptII* (Tab. 3.5).

Die Untersuchung des Einflusses der PPIase-Aktivität von Cyp58 auf seine Autoubiquitinylierung erfolgte durch einen Vergleich der Zeitverläufe der Autoubiquitinylierung von His₆-Cyp58-*StreptII* und His₆-Cyp58-*StreptII*^{R323A}. Nach SDS-PAGE wurde Western-Blot-Analyse gegen Streptavidin-HRP zur Detektion von Bt-Ub durchgeführt.

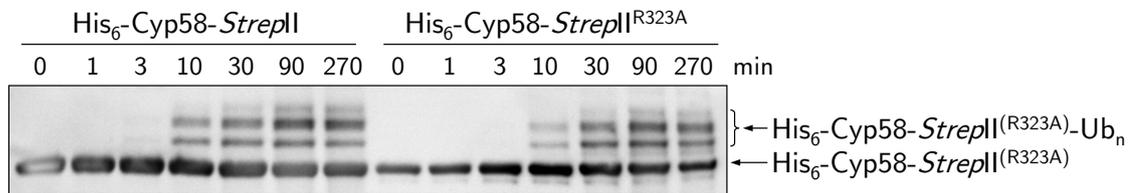


Abb. 3.18: Einfluss der PPIase-Aktivität auf die Autoubiquitinylierung von Cyp58. Zeitverläufe der Autoubiquitinylierung (50 mM HEPES/KOH pH 7,5; 40 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 0,5 mM DTT) von 2,5 μM His₆-Cyp58-*StreptII* wt bzw. R323A mit 37,5 nM His₆-UBE1, 300 nM His₆-UbcH3, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Bt-Ub und 5 mM ATP bei 30 °C. Nach SDS-PAGE (10%) erfolgte Western-Blot-Analyse gegen Streptavidin-HRP.

Die Western-Blot-Analyse der Zeitverläufe (Abb.3.18) zeigte die Entstehung zusätzlicher Banden mit höherer molekularer Masse als His₆-Cyp58-*StreptII* bis zu einer Inkubationszeit von 30 min. Bei längerer Inkubationszeit zeigten sich kaum noch Veränderungen. Zwischen His₆-Cyp58-*StreptII* und der Variante mit verringerter PPIase-Aktivität waren kaum Unterschiede im Zeitverlauf und im Muster der Autoubiquitinylierung zu verzeichnen. Somit hat die PPIase-Aktivität von Cyp58 wahrscheinlich keinen Einfluss auf seine Autoubiquitinylierung. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass eine geringe PPIase-Restaktivität schon ausreicht, um die E3-Aktivität von Cyp58 aufrecht zu erhalten.

3.6 Analyse der Domänenstruktur von Cyp58

Die in der UniProt-Datenbank angegebenen Domänengrenzen von Cyp58 wurden anhand von Sequenzhomologien aus der Aminosäuresequenz von Cyp58 abgeleitet. Zur experimentellen Analyse der Domänenstruktur von Cyp58 wurde eine limitierte Proteolyse von His₆-Cyp58-*StreptII* mit Trypsin durchgeführt. Der zeitliche Verlauf der Proteolyse wurde mithilfe von SDS-PAGE verfolgt.

Der Zeitverlauf der Proteolyse (Abb. 3.19A) zeigte schon nach 1 Minute Reaktionszeit den vollständigen Abbau von His₆-Cyp58-*StreptII* in viele verschieden große Fragmente. Im weiteren Verlauf der Proteolyse verringerte sich die Anzahl der Fragmente, bis nach 90 Minuten Reaktionszeit nur noch zwei stabile Fragmente verblieben. Diese beiden Fragmente zeigten apparente molekulare Masse von ca. 22 kDa (Fragment 1) und 13 kDa (Fragment 2).

Die Identifizierung der stabilen Fragmente erfolgte durch präparative Trennung mittels RP-HPLC und anschließender massenspektrometrischer Analyse. Durch ESI-MS wurden die Gesamtmassen der beiden Fragmente bestimmt und mittels *In-Source Decay* (ISD) die Fragmente N-terminal sequenziert. Dadurch konnte die Identität beider Fragmente eindeutig bestimmt werden.

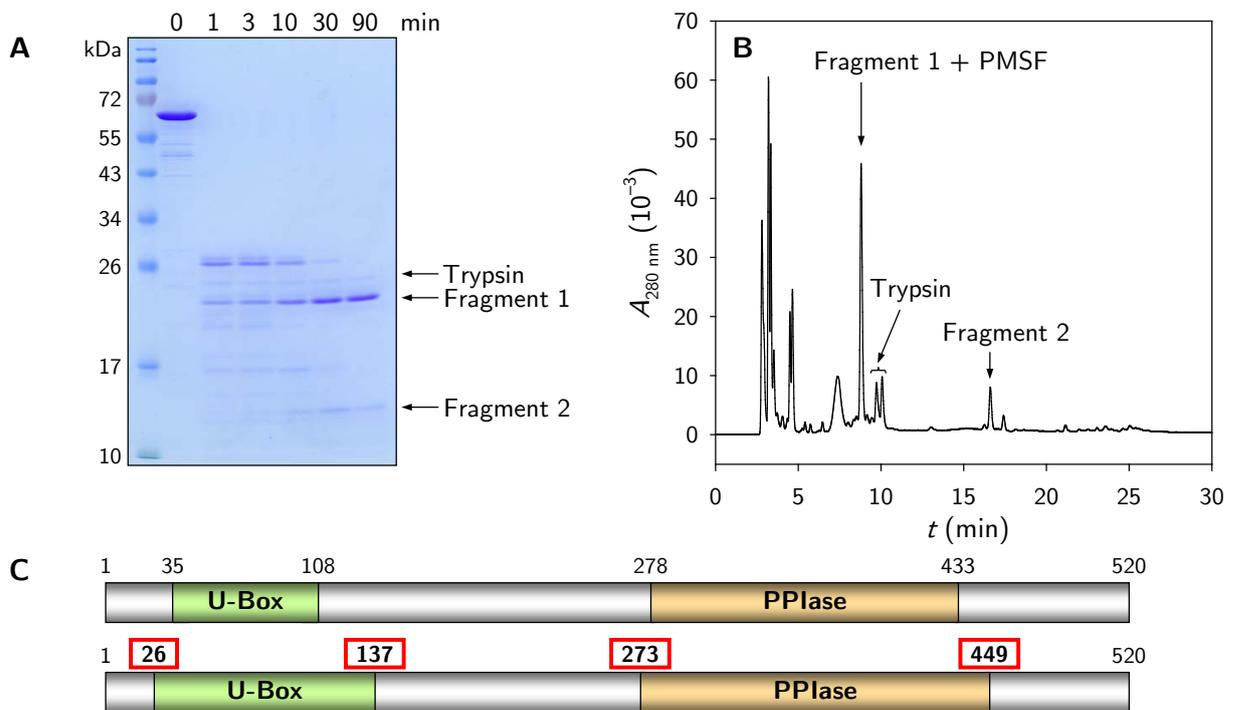


Abb. 3.19: Ermittlung der Domänenstruktur von Cyp58. **A** Limitierte Proteolyse von His₆-Cyp58-StreptII. 5 μ M His₆-Cyp58-StreptII wurden mit 4 U/ml Trypsin bei 25 °C inkubiert (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 150 mM NaCl) und nach verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen. Die Reaktion wurde mit PMSF (2 mM Endkonzentration) abgestoppt. Nach SDS-PAGE (12,5 %) erfolgte Coomassie-Färbung. **B** RP-HPLC-Chromatogramm der tryptischen Hydrolyse von His₆-Cyp58-StreptII. Die Proteolyse von 30 μ M His₆-Cyp58-StreptII mit 24 U/ml Trypsin wurde nach 90 min abgestoppt und mit RP-HPLC aufgetrennt. Säule: Grace Vydac® 208TP C8 (4,6 mm \times 250 mm; 5 μ m); A: H₂O (0,1 % v/v TFA); B: ACN (0,1 % v/v TFA); Lineargradient 30–65 % B in 30 min; Flussrate: 1 ml/min; $T = 40$ °C. **C** In UniProt-Datenbank angegebene Domänengrenzen (*oben*) und experimentell bestimmte Domänengrenzen (*unten*) von Cyp58. Ermittelt durch molekulare Massenbestimmung mittels RP-HPLC/ESI-MS und *N*-terminale Sequenzierung mittels ISD.

Die chromatographische Trennung der Proteolyse (Abb. 3.19B) resultierte in mehreren Peaks. Durch SDS-PAGE (nicht gezeigt) konnte dem Peak bei der Retentionszeit von 8,8 min Fragment 1, den Peaks bei 9,7 min und 10,1 min Trypsin und dem Peak bei 16,6 min Fragment 2 zugeordnet werden.

Für Fragment 1 wurde durch Massenspektrometrie eine molekulare Masse von 20 162 Da und die *N*-terminale Aminosäuresequenz YQFVKKKGYVRLHTNKGDLNL bestimmt. Somit entspricht Fragment 1 den Aminosäuren 273 bis 449 (theoretische Masse: 20 161,6 Da) und damit der PPIase-Domäne von Cyp58. Für Fragment 2 wurde eine Gesamtmasse von 12 714 Da und die *N*-terminale Aminosäuresequenz KPDLQPQTNFRRLPFDHCS bestimmt. Somit entspricht Fragment 2 den Aminosäuren 26 bis 137 (theoretische Masse: 12 714,6 Da) und damit der U-Box-Domäne von Cyp58 (Abb. 3.19C).

3.7 Untersuchung des oligomeren Zustands von Cyp58

U-Box- und RING-Domänen-Proteine sind bekannt dafür, Dimere zu bilden. Diese Dimere können sich sowohl direkt über die U-Box- bzw. RING-Domänen als auch über zusätzliche *coiled*

coil-Regionen ausbilden [194]. Cyp58 verfügt über zwei potentielle Dimerisierungsregionen, die U-Box-Domäne und eine potentielle *coiled coil*-Region (Abb. 1.3). Deshalb wurde untersucht, ob Cyp58 Homodimere oder Homooligomere ausbilden kann.

Untersuchung mittels Größenausschluss-Chromatographie

Zur Bestimmung des oligomeren Zustands von Cyp58 wurde zunächst das Migrationsverhalten von His₆-Cyp58-*StrepII* in einer analytischen Größenausschluss-Chromatographie untersucht. Die apparente molekulare Masse von His₆-Cyp58-*StrepII* wurde anschließend mithilfe einer Eichgerade ermittelt.

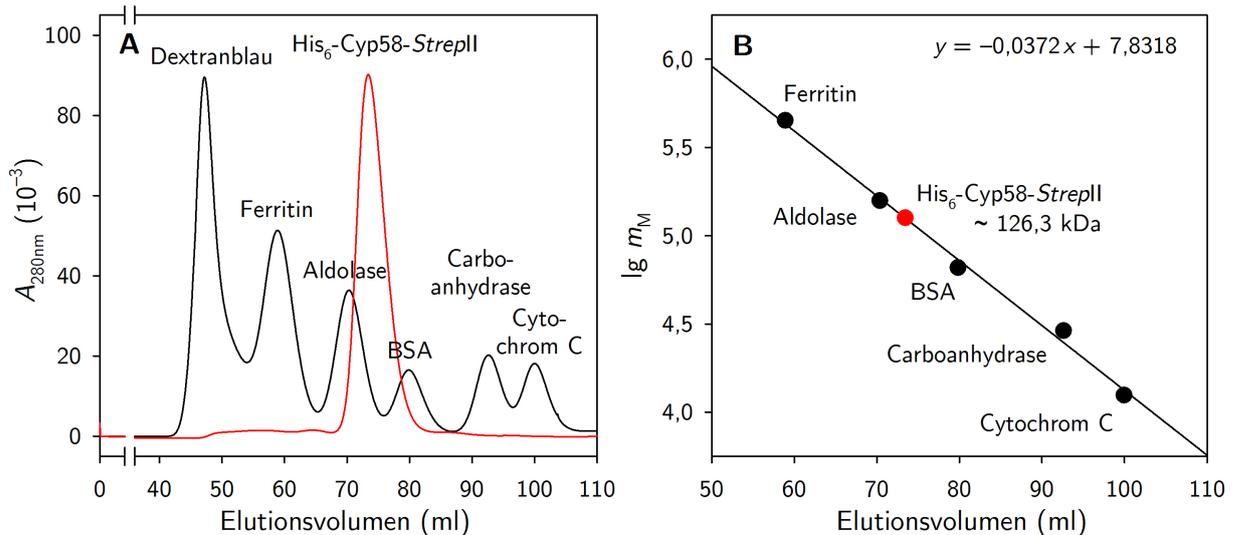


Abb. 3.20: Migrationsverhalten von Cyp58 in der analytischen Größenausschluss-Chromatographie. **A** Chromatographie von 5 mg (40 μ M) His₆-Cyp58-*StrepII* (rot) bzw. eines Eichproteinmix (schwarz) erfolgte mithilfe einer Superdex™ 200-Säule bei 4 °C (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 500 mM NaCl; 1 mM DTT). Flussrate: 0,8 ml/min. Detektion: 280 nm. **B** Eichgerade für Superdex™ 200-Säule. Erstellt durch lineare Anpassung der Auftragung der Elutionsvolumen von Eichproteinen (schwarz) gegen den dekadischen Logarithmus ihrer molekularen Massen. Die Geradengleichung wurde genutzt um das Elutionsvolumen von His₆-Cyp58-*StrepII* (rot) nachträglich zu ergänzen.

Die Trennung von His₆-Cyp58-*StrepII* mittels analytischer Größenausschluss-Chromatographie zeigte einen einzelnen Peak bei einem Elutionsvolumen von 73,4 min (Abb. 3.20A). Damit enthielt die Protein-Präparation keine Aggregate und es traten auch keine unterschiedlichen oligomeren Zustände auf. Die durch lineare Anpassung der halblogarithmischen Auftragung der Elutionsvolumina der Eichproteine gegen ihre molekularen Massen ermittelte Geradengleichung bestimmte für das Elutionsvolumen von His₆-Cyp58-*StrepII* eine apparente molekulare Masse von 126,3 kDa (Abb. 3.20B). Das entspricht bei der Masse des monomeren Proteins von 62,5 kDa einem dimeren Zustand von Cyp58.

Untersuchung mittels Blauer Nativ-PAGE

Zusätzlich erfolgte eine Untersuchung von His₆-Cyp58-*StrepII* durch Blaue Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE), in der oligomere Zustände von Proteinen erhalten bleiben. Als Molekulargewichtsmarker dienten BSA und Aldolase.

Das Coomassie-gefärbte PA-Gel (Abb. 3.21A) zeigte ein Laufverhalten von His₆-Cyp58-*StrepII* zwischen den beiden Markerproteinen. Das entspricht einer deutlich höheren apparenten molekularen Masse als ein His₆-Cyp58-*StrepII*-Monomer (62,5 kDa) besitzen würde.

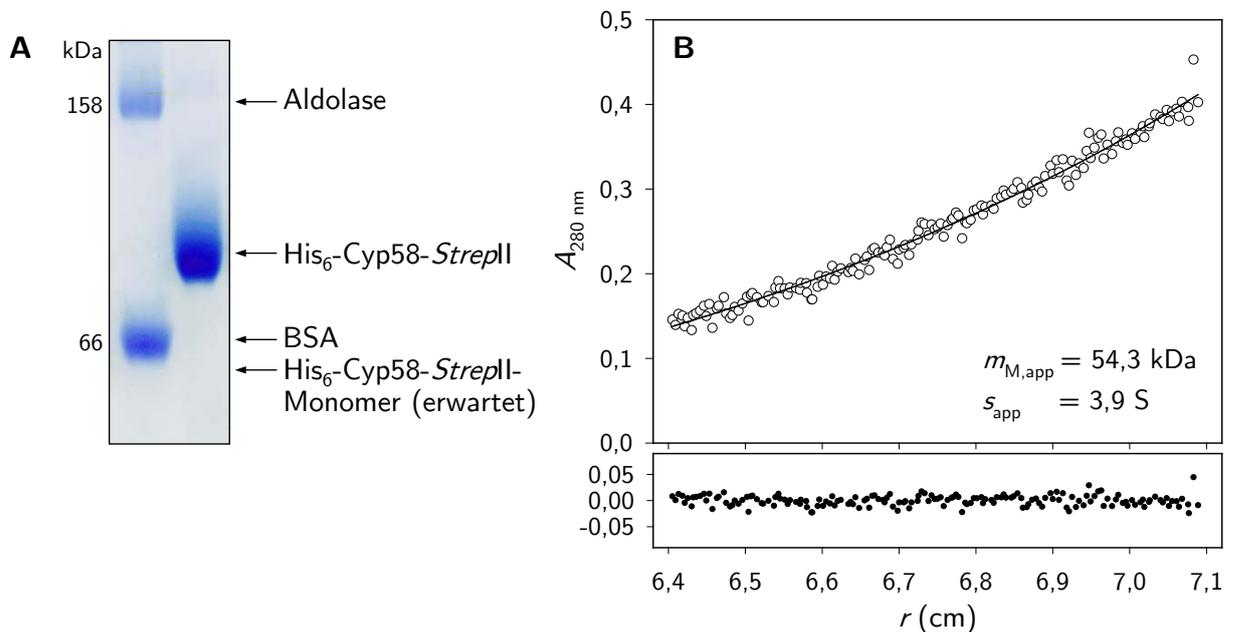


Abb. 3.21: Bestimmung des oligomeren Zustands von Cyp58. **A** Homogene 10 %ige BN-PAGE von 6 μg (10 μM) His₆-Cyp58-*StrepII*. Aldolase und BSA dienten als Molekulargewichtsmarker. Coomassie-Färbung. **B** Sedimentationsgleichgewichtsexperiment in einer analytischen Ultrazentrifuge zur Bestimmung der molekularen Masse von 5 μM His₆-Cyp58-*StrepII*. Die Messung (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 150 mM NaCl) erfolgte über 90 h mit 6 000 min^{-1} bei 20 °C. Detektion: 280 nm. Die Auswertung erfolgte über die Svedberg-Gleichung.

Untersuchung mittels analytischer Ultrazentrifugation

Das Migrationsverhalten von Proteinen in Größenausschluss-Chromatographie und BN-PAGE wird durch ihren hydrodynamischen Radius bestimmt. Dieser korreliert mit der molekularen Masse nur unter der Voraussetzung einer den Eichproteinen ähnlichen, annähernd globulären Form des Proteins. Deshalb wurde der oligomere Zustand von His₆-Cyp58-*StrepII* zusätzlich durch ein Sedimentationsgleichgewichtsexperiment mittels analytischer Ultrazentrifuge untersucht. Diese Methode ist unabhängig von der Gestalt des Proteins.

Die Auftragung der Verteilung von His₆-Cyp58-*StrepII* im Zentrifugenröhrchen (3.21B) zeigte die für Sedimentationsgleichgewichtsexperimente charakteristische exponentielle Konzentrationsverteilung, die sich aus dem dynamischen Gleichgewicht zwischen Diffusion und Sedimentation ergibt. Durch Auswertung des Verteilungsprofils wurde für His₆-Cyp58-*StrepII* eine apparente molekulare Masse von 54,3 kDa und ein apparenter Sedimentationskoeffizient von 3,9 S bestimmt. Somit ist die ermittelte molekulare Masse etwas geringer als der theoretische Wert von 62,5 kDa für monomeres His₆-Cyp58-*StrepII*.

Diese Daten deuten auf einen monomeren Zustand von Cyp58 hin. Die Unterschiede in den verschiedenen Untersuchungsmethoden lassen eine nichtglobuläre Form von Cyp58 vermuten.

3.8 Identifizierung von Interaktionspartnern von Cyp58

Zur Identifizierung von Interaktionspartnern von Cyp58 wurden *StrepII*-Pull-down-Experimente durchgeführt. Dazu wurde eine *Strep*-Tactin[®]-Affinitätssäule mit His₆-Cyp58-*StrepII* beladen und mit HeLa-Zelllysatsat inkubiert. Nach Elution von His₆-Cyp58-*StrepII* inkl. gebundener Proteine erfolgte SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (Abb. 3.22). Es wurden Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten und mittels In-Gel-Verdau, Nano-LC-ESI-MS/MS und anschließender Datenanalyse mittels MASCOT 2.2 potentielle Interaktionspartner identifiziert. Dieses Experiment wurde mehrmals wiederholt.

Tabelle 3.6 gibt eine Übersicht über die ermittelten potentiellen Interaktionspartner von Cyp58 und ihre bekannte Funktion. Viele dieser Proteine sind nukleäre oder Signaltransduktionsproteine. Die meisten identifizierten Peptide entfielen dabei auf 14-3-3-Proteine, SET-Protein, Tubuline, α -Aktinin, Hitzeschockproteine und Histon H2B. Es wurden fünf von sieben humanen 14-3-3-Protein-Isoformen (β , γ , ζ , η , θ) spezifisch identifiziert (Abb. A.1 Anhang).

Tab. 3.6: Potentielle Interaktionspartner von Cyp58 und ihre bekannte Funktion. Ermittelt durch *StrepII*-Pull-down-Experimente, SDS-PAGE, In-Gel-Verdau, Nano-LC-ESI-MS/MS und Datenanalyse mittels MASCOT 2.2. Reihenfolge nach abgeschätzter Häufigkeit (abfallend).

Identifizierte Proteine	Funktion
14-3-3-Proteine	Regulation von zellulären Prozessen
SET-Protein	multifunktionales nukleäres Protein
α/β -Tubulin	Mitose, Cytokinese, Transport
α -Aktinin	Cytoskelett
Hitzeschockproteine Hsp70, Hsc70, Hsp90	Faltungshelfer
Histon H2B	DNA-Verpackung, Genregulierung
Spleißfaktoren (Pro/Gln-reich, Arg/Ser-reich 3, SF2 P32)	Spleißen
hnRNP A1, A2, A3, B0, B1, D0, U	Spleißen, Bindung prä-mRNA
<i>acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32</i> (pp32)	SET-Protein-Interaktionspartner
Importin 7	Proteintransport in den Zellkern
Nucleolin	Ribosomen-Synthese und -Reifung
Proteinphosphatase 2A, katalytische Untereinheit	multifunktionales zelluläres Protein
Guaninnukleotid-bindendes Protein	Signaltransduktion
Parathymosin	möglicherweise Immunantwort
UbcH3	Ubiquitynylierung, Proteinabbau
Ubiquitin-Protein-Ligase SHPRH	Ubiquitynylierung, DNA-Reparatur

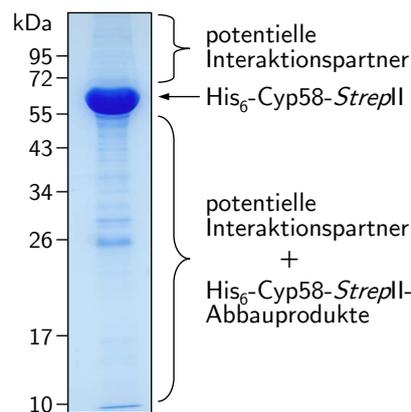


Abb. 3.22: Elution des *StrepII*-Pull-down-Experiments von His₆-Cyp58-*StrepII*. Vorgereinigtes His₆-Cyp58-*StrepII* wurde an einer *Strep*-Tactin[®]-Sephacrose-Säule immobilisiert und mit HeLa-Zelllysatsat bei 4 °C inkubiert. Nach Elution erfolgte SDS-PAGE (12,5 %) und Coomassie-Färbung.

3.9 Interaktion von Cyp58 mit 14-3-3-Proteinen

14-3-3-Proteine sind in Eukaryoten konservierte regulatorische Proteine, die für die Bindung einer Vielzahl an Signalproteinen bekannt sind. Die Ligandbindung von 14-3-3-Proteinen erfolgt bevorzugt über Phosphopeptide, in geringerem Maße ist aber auch die Bindung von nicht-phosphorylierten Liganden beschrieben [195].

14-3-3-Proteine werden in Pulldown- und anderen Interaktionsstudien häufig als falsch-positive Interaktionspartner identifiziert [195, 196]. Deshalb wurde die Interaktion von Cyp58 mit 14-3-3-Proteinen zunächst durch Western-Blot-Analyse der Elution des *StrepII*-Pulldown-Experiments (Abschn. 3.8) gegen Anti-pan14-3-3-Antikörper (AK) bestätigt. Als Kontrolle wurde ein *StrepII*-Pulldown-Experiment mit *StrepII*-Cyp18 unter den entsprechenden Bedingungen durchgeführt.

Die Western-Blot-Analyse der Elutionen der beiden Pulldown-Experimente (Abb. 3.23) zeigte eine deutliche Bindung von 14-3-3-Proteinen an His₆-Cyp58-*StrepII*, wohingegen keine Bindung an *StrepII*-Cyp18 erfolgte.



Abb. 3.23: Bindung von 14-3-3-Proteinen an His₆-Cyp58-*StrepII*. Elutionen der *StrepII*-Pulldown-Experimente von His₆-Cyp58-*StrepII* und *StrepII*-Cyp18 wurden durch SDS-PAGE (12,5%) und Western-Blot-Analyse gegen Anti-pan14-3-3-AK untersucht. *StrepII*-Cyp18 wurde bei 37 °C in *E. coli* M15[pREP4] exprimiert und das resultierende geklärte *E. coli*-Lysat direkt auf die *Strep*-Tactin[®]-Sephrose-Säule aufgetragen.

3.9.1 Expression und Reinigung von 14-3-3-Protein-Isoformen

Zur weiteren Untersuchung der Interaktion zwischen Cyp58 und 14-3-3-Proteinen wurden die 14-3-3-Protein-Isoformen beta (β), gamma (γ), epsilon (ϵ) und zeta (ζ) mit *N*-terminaler Glutathion-*S*-Transferase (GST)-Fusion in *E. coli* DH5 α und 14-3-3-Protein ζ zusätzlich mit *N*-terminalem His₆-tag in *E. coli* BL21(DE3) bei 30 °C exprimiert.

Die Reinigung von GST-14-3-3-Protein β und GST-14-3-3-Protein γ erfolgte durch GSH-Sephrose-Affinitätschromatographie (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 150 mM NaCl) und Größenausschluss-Chromatographie mithilfe Superdex[™] 200-Säule (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM DTT). Das finale SDS-PA-Gel (Abb. 3.24) zeigte für die gereinigten GST-14-3-3-Protein β und GST-14-3-3-Protein γ apparente molekulare Massen von ca. 54 und 55 kDa.

Die Reinigung von His₆-14-3-3-Protein ζ erfolgte durch Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM NaCl) und Größenausschluss-Chromatographie mittels Superdex[™] 75-Säule (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM DTT). Das finale SDS-PA-Gel (Abb. 3.24) zeigte für das gereinigte Protein eine apparente molekulare Masse von ca. 32 kDa.

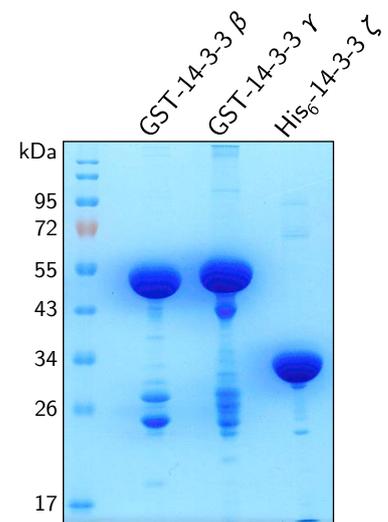


Abb. 3.24: Gereinigte rekombinante 14-3-3-Protein-Isoformen. Coomassie-gefärbtes 10%iges SDS-PA-Gel.

Die theoretischen molekularen Massen der gereinigten 14-3-3-Protein-Isoformen wurden durch RP-HPLC/ESI-MS (Tab. 3.1) und die Ausbildung von Sekundärstrukturelementen durch Fern-UV-CD-Spektroskopie bestätigt (Abb. A.2A Anhang).

3.9.2 Isoformspezifität der Cyp58/14-3-3-Protein-Interaktion

Zwischen den sieben verschiedenen humanen 14-3-3-Protein-Isoformen liegen Sequenzidentitäten von 58,9 bis 87,7% vor (Abb. A.1 Anhang). Um die Interaktion zwischen His₆-Cyp58-*StrepII* und 14-3-3-Proteinen zu bestätigen und zu bestimmen, ob trotz der hohen Sequenzidentitäten zwischen den 14-3-3-Protein-Isoformen eine Isoformspezifität der Cyp58/14-3-3-Protein-Interaktion vorliegt, wurde ein reziprokes GST-Pulldown-Experiment mit den rekombinant in *E. coli* hergestellten GST-Fusionen der 14-3-3-Proteine durchgeführt. Dazu wurden direkt die *E. coli*-Lysate mit den exprimierten GST-14-3-3-Protein-Isoformen β , γ , ε und ζ und dem als Kontrolle verwendeten GST in das Pulldown-Experiment eingesetzt. Immobilisiertes GST, GST-14-3-3-Protein β , γ , ε bzw. ζ wurde mit Zelllysate von FLAG-Cyp58 exprimierenden HeLa-Zellen (Abschn. 3.13) inkubiert. Die Untersuchung auf Bindung von FLAG-Cyp58 an GST-14-3-3-Protein-Isoformen erfolgte durch SDS-PAGE und anschließender Western-Blot-Analyse gegen Anti-FLAG-AK.

Das GST-Pulldown-Experiment zeigte in der Western-Blot-Analyse (Abb. 3.25) eine Bindung von FLAG-Cyp58 an alle untersuchten GST-14-3-3-Protein-Isoformen, nicht aber an GST. Somit wurde die Bindung von Cyp58 an 14-3-3-Proteine bestätigt. Zwischen den Isoformen waren nur geringe Unterschiede in der Bindung zu verzeichnen. Cyp58 diskriminiert also nur wenig zwischen verschiedenen Isoformen. Die stärkste Bindung zeigte FLAG-Cyp58 an GST-14-3-3-Protein γ und β . Diese 14-3-3-Protein-Isoformen wurden in folgenden Experimenten bevorzugt verwendet.

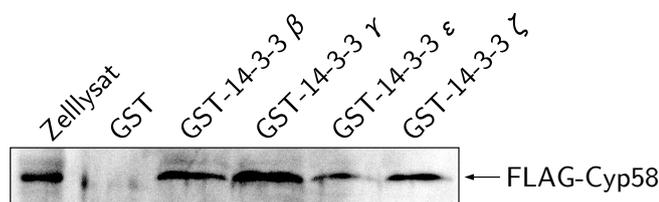


Abb. 3.25: Isoformspezifität der Cyp58/14-3-3-Protein-Interaktion. GST-Pulldown-Experiment. GST bzw. GST-14-3-3-Proteine wurden an GSH-Sepharose 4B immobilisiert und mit Zelllysate von FLAG-Cyp58 exprimierenden HeLa-Zellen inkubiert. Nach SDS-PAGE (10%) erfolgte Western-Blot-Analyse gegen Anti-FLAG-AK. GST wurde bei 37 °C in *E. coli* DH5 α exprimiert.

3.9.3 Identifizierung der Interaktionsstellen zwischen Cyp58 und 14-3-3-Proteinen

Um Hinweise darüber zu erhalten, welche Proteinbereiche von Cyp58 bei der Interaktion mit 14-3-3-Proteinen und welche Bereiche von 14-3-3-Proteinen bei der Interaktion mit Cyp58 von Bedeutung sind, wurden sowohl GST-Pulldown-Experimente als auch Bindungsstudien mit Peptid-Bibliotheken durchgeführt.

Identifizierung der Cyp58-Interaktionsstelle mit 14-3-3-Proteinen durch Pulldown-Analyse

Zur Ermittlung der Interaktionsstelle von Cyp58 mit 14-3-3-Proteinen wurden zunächst neben Cyp58 (Abschn. 3.13) verschiedene Cyp58-Fragmente in pCMV-Tag 2B kloniert (Tab. 2.8) und

mit *N*-terminalem FLAG-*tag* in HeLa-Zellen exprimiert. In einem GST-Pulldown-Experiment wurden anschließend immobilisiertes GST bzw. GST-14-3-3-Protein γ mit Zellysate von FLAG-Cyp58 exprimierenden bzw. FLAG-Cyp58-Fragmente exprimierenden HeLa-Zellen (Abb. 3.26A) inkubiert. Durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse gegen Anti-FLAG-AK wurde die Bindung von Cyp58 und der Cyp58-Fragmente an GST-14-3-3-Protein γ untersucht.

Die Western-Blot-Analyse der eingesetzten Zellysate (Abb. 3.26B) zeigte die Expression von FLAG-Cyp58 und den FLAG-Cyp58-Fragmenten. Die Expression von FLAG-Cyp58¹⁻²⁷² war dabei im Vergleich zu den anderen FLAG-Proteinen relativ schwach. Die Analyse des Pulldown-Experiments zeigte eine deutliche Bindung von FLAG-Cyp58²⁷³⁻⁵²⁰ und FLAG-Cyp58 an GST-14-3-3-Protein γ , nicht aber von FLAG-Cyp58¹⁻²⁷² oder FLAG-Cyp58¹³⁸⁻⁴⁴⁹. An GST erfolgt ebenfalls keine Bindung. Somit erweist sich die *C*-terminale Erweiterung der PPIase-Domäne (Cyp58⁴⁵⁰⁻⁵²⁰) als entscheidend für die Bindung von Cyp58 an GST-14-3-3-Protein γ .

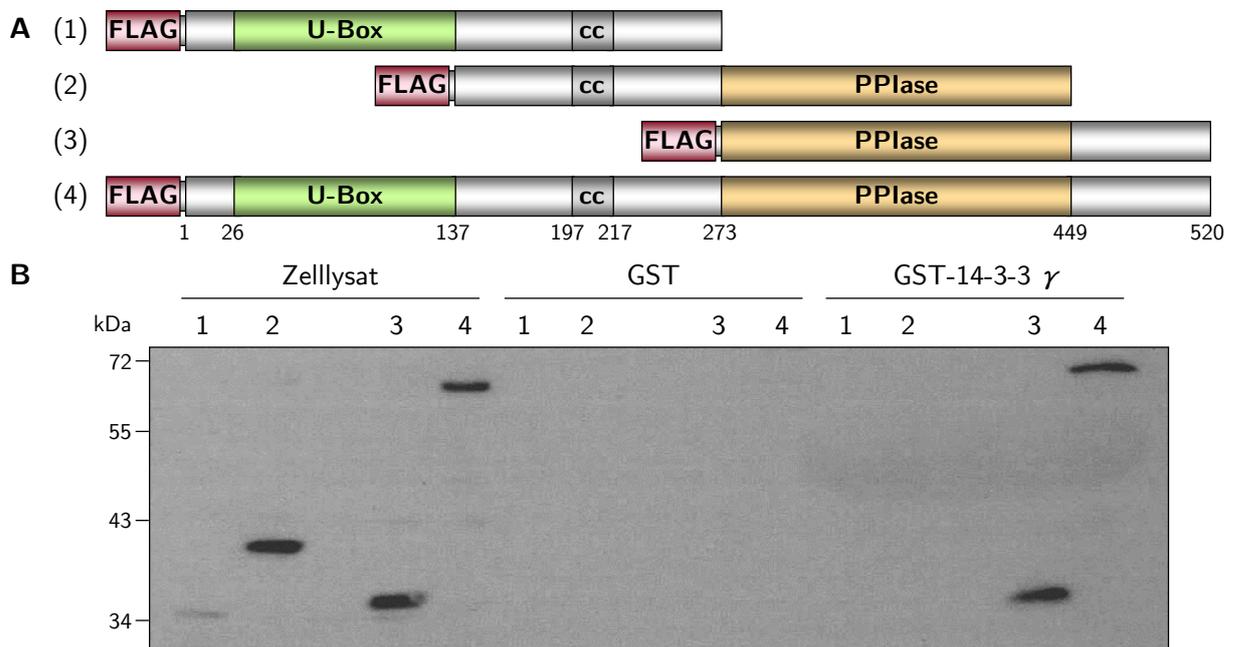


Abb. 3.26: Identifizierung der Cyp58-Interaktionsstelle mit 14-3-3-Protein γ . **A** FLAG-Cyp58-Fragmente: FLAG-Cyp58¹⁻²⁷² (1), FLAG-Cyp58¹³⁸⁻⁴⁴⁹ (2), FLAG-Cyp58²⁷³⁻⁵²⁰ (3), Cyp58 (4). **B** GST-Pulldown-Experiment. GST bzw. GST-14-3-3-Protein γ wurde an GSH-Sepharose 4B immobilisiert und mit HeLa-Zellysate, in welchem FLAG-Cyp58 bzw. FLAG-Cyp58-Fragmente exprimiert vorlagen, inkubiert. Nach SDS-PAGE (10%) erfolgte Western-Blot-Analyse gegen Anti-FLAG-AK.

Identifizierung der Cyp58-Interaktionsstelle mit 14-3-3 durch Peptid-Bibliothek-Analyse

Als ergänzende Methode zur Identifizierung von Bereichen der Aminosäuresequenz von Cyp58, die für die Interaktion mit 14-3-3-Proteinen wichtig sind, erfolgten Bindungsstudien mit einer Peptid-Bibliothek. Durch *Spot*-Synthese wurde eine Cellulose-gebundene Anordnung von sich überlappenden von Cyp58 abgeleiteten Peptiden (13-mer, 2 Aminosäuren Verschiebung) erstellt. Diese Cellulose-Membran wurde mit GST-14-3-3-Protein β inkubiert und durch anschließende Western-Blot-Analyse gegen Anti-GST-AK die Bindung von GST-14-3-3-Protein β an die von Cyp58 abgeleiteten Peptide untersucht.

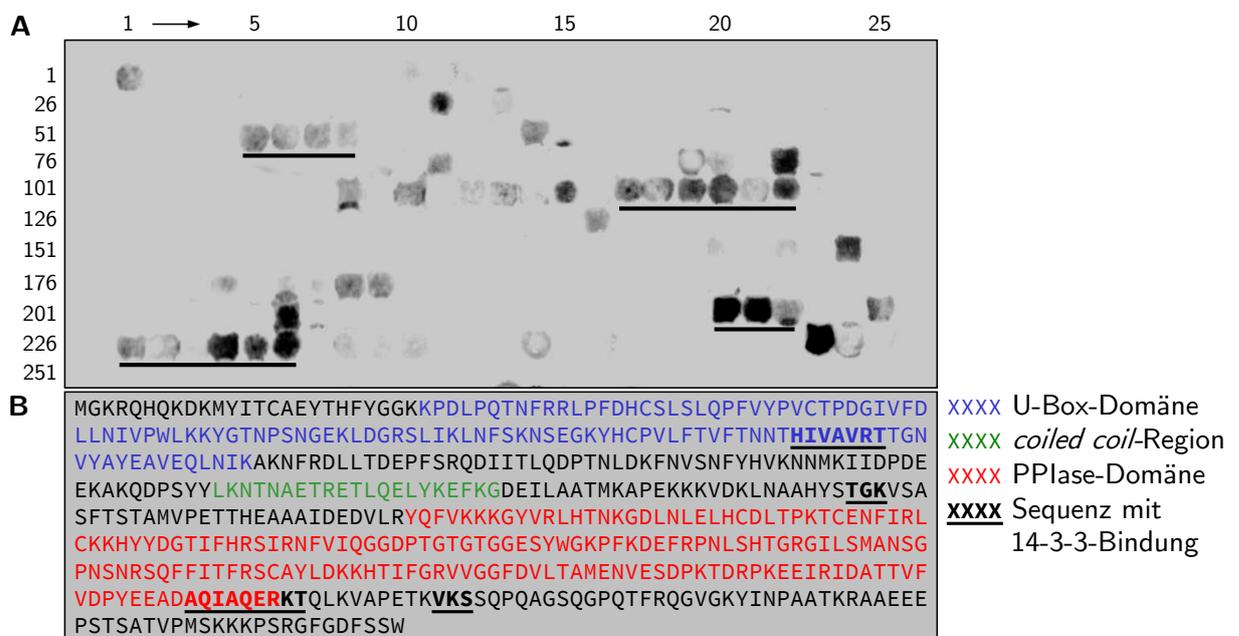


Abb. 3.27: Identifizierung der Cyp58-Interaktionsstelle mit 14-3-3-Protein β . **A** Durch *Spot*-Synthese generierte Cellulose-gebundene Anordnung von sich überlappenden von Cyp58 abgeleiteten Peptiden (13-mer, 2 Aminosäuren Verschiebung) wurde mit $10 \mu\text{M}$ GST-14-3-3-Protein β inkubiert (10 mM Tris/HCl pH 7,8) und anschließend durch Western-Blot-Analyse gegen Anti-GST-AK untersucht. Mindestens drei aufeinander folgende interagierende Peptide sind *unterstrichen*. **B** Primärstruktur von Cyp58 mit *farbig* markierten Domänen. Die bestimmten Interaktionsstellen mit GST-14-3-3-Protein β sind *fett* und *unterstrichen*.

Die Western-Blot-Analyse der Cellulose-Membran (Abb. 3.27A) zeigte, dass viele Peptide in der Lage sind mit GST-14-3-3-Protein β zu interagieren. Aufgrund der überlappenden Sequenzen der Peptide wird davon ausgegangen, dass nur mehrere aufeinander folgende mit 14-3-3-Protein β interagierende Peptide Hinweise auf mögliche Interaktionsstellen geben. Mindestens drei aufeinander folgende interagierende Peptide zeigten sich in den Positionen 55–58, 117–122, 220–222 und 226–231 auf der Cellulose-Membran. Diese vier Bereiche besitzen als überlappende Peptidsequenzen H¹¹⁵IVAVRT¹²¹, T²⁴³GK²⁴⁵, A⁴⁴³QIAQERKT⁴⁵¹ und V⁴⁶¹KS⁴⁶³ von Cyp58 (Abb. 3.27B). Der Sequenzbereich H¹¹⁵IVAVRT¹²¹ befindet sich im C-terminalen Bereich der ermittelten U-Box-Domäne, T²⁴³GK²⁴⁵ zwischen der potentiellen *coiled coil*-Region und der PPIase-Domäne, A⁴⁴³QIAQERKT⁴⁵¹ entsprechend der bekannten Strukturbereiche [56] in der Helix C-terminal der PPIase-Domäne und der Sequenzbereich V⁴⁶¹KS⁴⁶³ ebenfalls innerhalb der C-terminalen Erweiterung der PPIase-Domäne von Cyp58.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus dem GST-Pulldown-Experiment sind die Sequenzbereiche A⁴⁴³QIAQERKT⁴⁵¹ und V⁴⁶¹KS⁴⁶³ von Cyp58 die wahrscheinlichsten Interaktionsstellen mit 14-3-3-Proteinen.

Identifizierung der 14-3-3-Interaktionsstelle mit Cyp58 durch Peptid-Bibliothek-Analyse

Die Identifizierung von Bereichen in der Aminosäuresequenz von 14-3-3-Protein, die für die Interaktion mit Cyp58 wichtig sind, erfolgte ebenfalls durch Bindungsstudien mit einer Peptid-Bibliothek. Durch *Spot*-Synthese wurde eine Cellulose-gebundene Anordnung von sich überlappenden von 14-3-3-Protein β abgeleiteten Peptiden (13-mer, 2 Aminosäuren Verschiebung)

erstellt. Nach Inkubation der Cellulose-Membran mit His₆-Cyp58-*StrepII* wurde durch Western-Blot-Analyse gegen Anti-Penta-His-AK die Bindung von His₆-Cyp58-*StrepII* an die von 14-3-3-Protein β abgeleiteten Peptide untersucht.

Die Western-Blot-Analyse der Cellulose-Membran (Abb. 3.28A) zeigte viele Peptide, die mit His₆-Cyp58-*StrepII* interagieren können. Mindestens drei aufeinander folgende interagierende Peptide zeigten sich in den Positionen 1–3, 20–25, 26–28, 33–38, 58–61 und 82–85 der Cellulose-Membran. Diese sechs Bereiche besitzen die überlappenden Peptidsequenzen K⁵SELVQKAK¹³, A⁴⁹YK⁵¹, G⁵⁵ARRSSWRV⁶³, E⁷⁵KK⁷⁷, L¹²¹KMKGDY¹²⁷ und R¹⁶⁹LGLALN¹⁷⁵ von 14-3-3-Protein β (Abb. 3.28B). In der Kristallstruktur von 14-3-3-Protein β [197] befinden sich diese als potentielle Interaktionsstellen mit Cyp58 ermittelten Sequenzbereiche entweder in Nachbarschaft oder direkt in der Ligandbindetasche [198] von 14-3-3-Protein β (Abb. 3.28C).

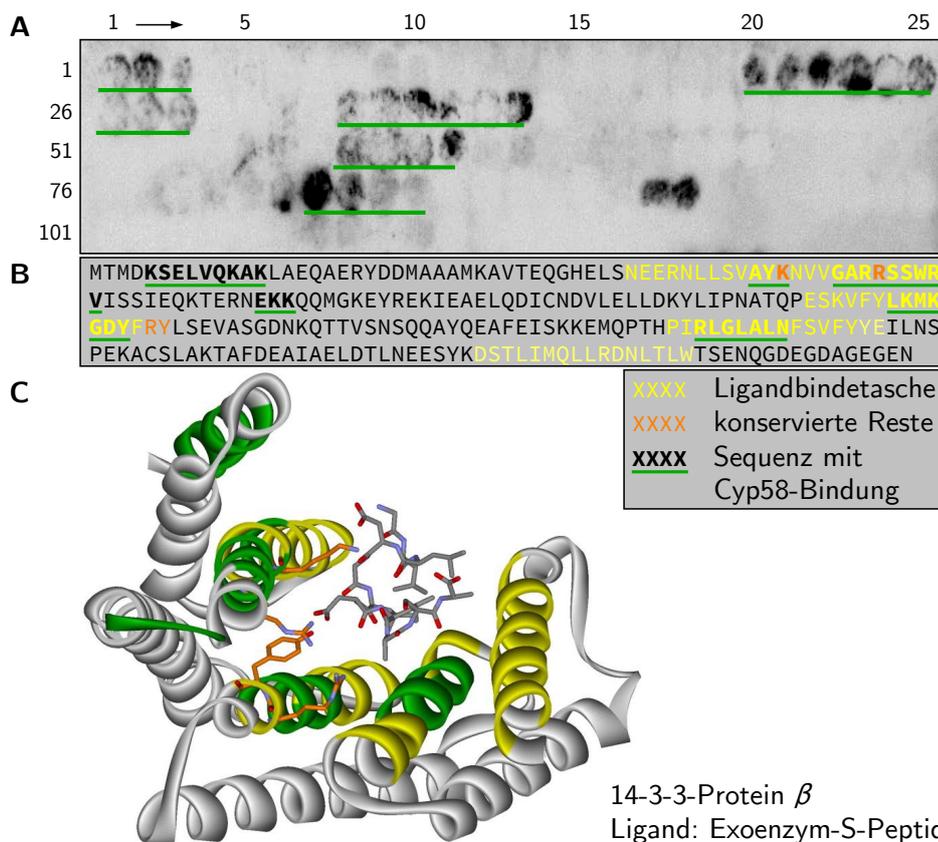


Abb. 3.28: Identifizierung der 14-3-3-Protein-Interaktionsstelle mit Cyp58. **A** Durch Spot-Synthese generierte Cellulose-gebundene Anordnung von sich überlappenden von 14-3-3-Protein β abgeleiteten Peptiden (13-mer, 2 Aminosäuren Verschiebung) wurde mit 10 μ M His₆-Cyp58-*StrepII* inkubiert (10 mM Tris/HCl pH 7,8) und anschließend durch Western-Blot-Analyse gegen Anti-Penta-His-AK untersucht. Mindestens drei aufeinander folgende interagierende Peptide sind grün unterstrichen. **B** Primärstruktur von 14-3-3-Protein β mit Ligandbindetasche [198] (gelb) und hoch konservierten Resten [199] (orange). Die bestimmten Interaktionsstellen mit His₆-Cyp58-*StrepII* sind fett und grün unterstrichen. **C** Kristallstruktur von 14-3-3-Protein β mit gebundenem *Pseudomonas aeruginosa* Exoenzym-S-Peptid [197]. PDB: 2C23. Farbschema wie in B.

3.10 Interaktion von Cyp58 mit SET-Protein

SET-Protein ist ein multifunktionales Protein, das mit vielen zellulären Prozessen in Verbindung gebracht wird. Es existieren zwei Isoformen von SET-Protein, die sich in einer kurzen *N*-terminalen Region unterscheiden. Isoform 1 (TAF-I α) besteht aus 290 Aminosäuren (33,5 kDa) und Isoform 2 (TAF-I β) aus 277 Aminosäuren (32,1 kDa).

Zur Verifizierung der Interaktion zwischen Cyp58 und SET-Protein, die bei der Pulldown-Analyse von immobilisiertem His₆-Cyp58-*Strep*II (Abschn. 3.8) nachgewiesen wurde, erfolgte ein reziprokes Experiment. In einem GST-Pulldown-Experiment wurden GST bzw. GST-SET-Protein immobilisiert und mit HeLa-Zellysat inkubiert. Zur Immobilisierung wurden direkt die *E. coli*-Lysate mit exprimiertem GST bzw. GST-SET-Protein eingesetzt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE und anschließender Western-Blot-Analyse gegen Anti-Cyp58-AK auf Bindung von endogenem Cyp58 an GST-SET-Protein untersucht.

Das GST-Pulldown-Experiment zeigte in der Western-Blot-Analyse (Abb. 3.29) eine deutliche Bindung von Cyp58 an GST-SET-Protein, nicht aber an GST. Damit wurde die Interaktion zwischen Cyp58 und SET-Protein bestätigt.

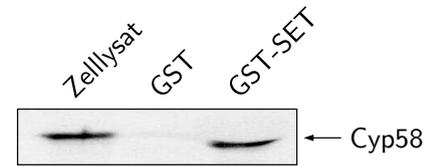


Abb. 3.29: Interaktion von Cyp58 mit SET-Protein im GST-Pulldown-Experiment. GST bzw. GST-SET-Protein wurde an GSH-Sepharose 4B immobilisiert und mit HeLa-Zellysat inkubiert. Nach SDS-PAGE (10 %) erfolgte Western-Blot-Analyse gegen Anti-Cyp58-AK.

3.10.1 Expression und Reinigung von SET-Protein

Der ORF für SET-Protein Isoform 2 (TAF-I β) wurde aus einer kommerziellen humanen embryonalen Hodenkarzinom-cDNA in pET28a und pGEX-4T-1 kloniert (Tab. 2.8). Die Expression von His₆-SET-Protein und GST-SET-Protein erfolgte in *E. coli* Rosetta(DE3) bei 30 °C.

Die Reinigung von His₆-SET-Protein erfolgte durch Bindung an eine DEAE-Anionenaustauschchromatographie-Säule (20 mM Tris/HCl pH 7,5) entsprechend des theoretischen pI von 4,27 und einer Elution durch einen linearen 0–1 M NaCl-Gradienten im entsprechenden Puffer. His₆-SET-Protein eluierte bei ca. 500 mM NaCl von der Säule. Anschließend erfolgten Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM NaCl) und Größenausschluss-Chromatographie mittels SuperdexTM 75-Säule (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 150 mM NaCl). Das finale SDS-PA-Gel (Abb. 3.30) zeigte für His₆-SET-Protein eine apparente molekulare Masse von ca. 45 kDa.

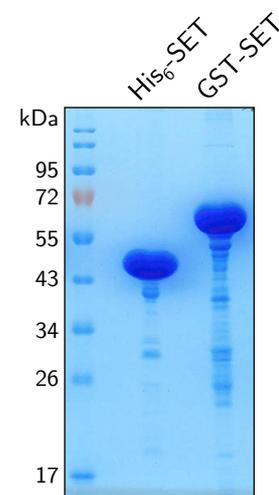


Abb. 3.30: Gereinigte rekombinante SET-Proteine. Coomassie-gefärbtes 10%iges SDS-PA-Gel.

GST-SET-Protein wurde durch GSH-Sepharose-Affinitätschromatographie (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 150 mM NaCl) und anschließender Größenausschluss-Chromatographie mittels Su-

perdexTM 75-Säule (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 150 mM NaCl) gereinigt. Das finale SDS-PA-Gel (Abb. 3.30) zeigte für GST-SET-Protein eine apparente molekulare Masse von ca. 65 kDa.

Die theoretischen molekularen Massen von His₆-SET-Protein und GST-SET-Protein wurden durch RP-HPLC/ESI-MS (Tab. 3.1) und die Ausbildung von Sekundärstrukturelementen durch Fern-UV-CD-Spektroskopie bestätigt (Abb. A.2B Anhang).

3.10.2 Identifizierung der Interaktionsstellen zwischen Cyp58 und SET-Protein

Zur Ermittlung der Proteinbereiche von Cyp58, welche bei der Interaktion mit SET-Protein von Bedeutung sind, wurden GST-Pulldown-Experimente und Bindungsstudien mit Peptid-Bibliotheken durchgeführt.

Identifizierung der Cyp58-Interaktionsstelle mit SET-Protein durch Pulldown-Analyse

Um die Interaktionsstelle von Cyp58 mit SET-Protein zu ermitteln, wurde analog zu Abschnitt 3.9.3 ein GST-Pulldown-Experiment durchgeführt. Dazu wurde immobilisiertes GST bzw. GST-SET-Protein mit Zelllysate von FLAG-Cyp58-Fragmente exprimierenden HeLa-Zellen (Abb. 3.31A) inkubiert. Durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse gegen Anti-FLAG-AK wurde die Bindung der Cyp58-Fragmente an GST-SET-Protein untersucht.

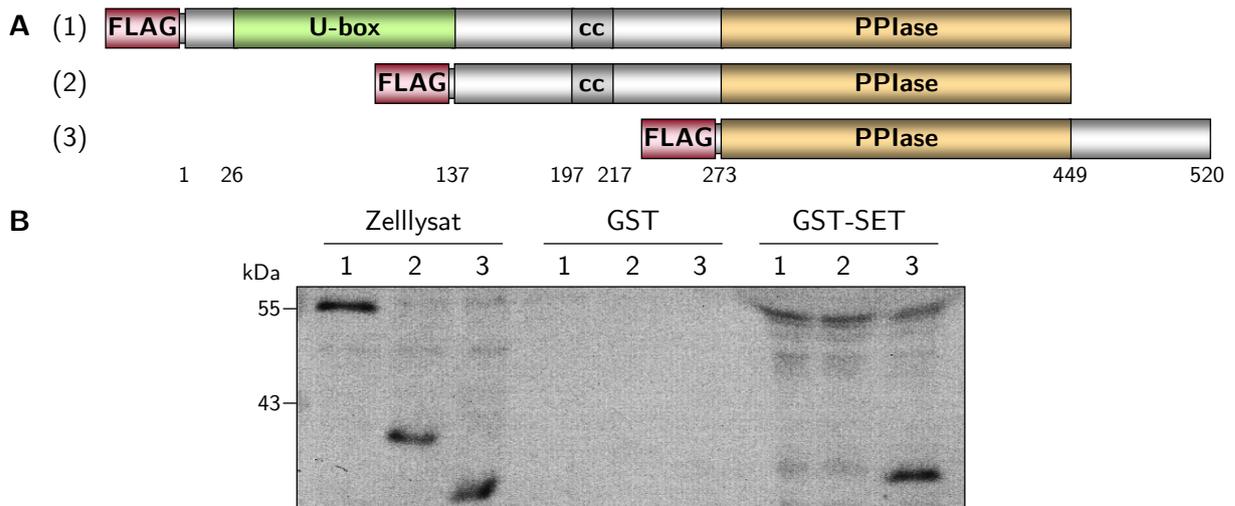


Abb. 3.31: Identifizierung der Cyp58-Interaktionsstelle mit SET-Protein durch Pulldown-Analyse. **A** FLAG-Cyp58-Fragmente: FLAG-Cyp58¹⁻⁴⁴⁹ (1), FLAG-Cyp58¹³⁸⁻⁴⁴⁹ (2), FLAG-Cyp58²⁷³⁻⁵²⁰ (3). **B** GST-Pulldown-Experiment. GST bzw. GST-SET-Protein wurde an GSH-Sepharose 4B immobilisiert und mit HeLa-Zelllysate, in welchem FLAG-Cyp58-Fragmente exprimiert vorlagen, inkubiert. Nach SDS-PAGE (10 %) erfolgte Western-Blot-Analyse gegen Anti-FLAG-AK.

Die Western-Blot-Analyse der eingesetzten Zelllysate (Abb. 3.31B) zeigte die Expression der FLAG-Cyp58-Fragmente. In der Analyse des Pulldown-Experiments wurde eine deutliche Bindung von FLAG-Cyp58²⁷³⁻⁵²⁰ an GST-SET-Protein sichtbar, nicht aber von FLAG-Cyp58¹⁻⁴⁴⁹ oder FLAG-Cyp58¹³⁸⁻⁴⁴⁹. An GST erfolgte ebenfalls keine Bindung. Damit erweist sich, analog zur Bindung von Cyp58 an GST-14-3-3-Protein γ , die C-terminale Erweiterung der PPIase-Domäne (Cyp58⁴⁵⁰⁻⁵²⁰) als entscheidend für die Bindung von Cyp58 an GST-SET-Protein.

Identifizierung der Cyp58-Interaktionsstelle mit SET durch Peptid-Bibliothek-Analyse

Als zusätzliche Methode zur Identifizierung von Bereichen der Aminosäuresequenz von Cyp58, die für die Interaktion mit SET-Protein wichtig sind, erfolgten Bindungsstudien mit einer Cyp58-Peptid-Bibliothek analog zu Abschnitt 3.9.3. Die Cellulose-Membran wurde sowohl mit GST-SET-Protein als auch mit His₆-SET-Protein inkubiert und durch Western-Blot-Analyse gegen Anti-GST-AK bzw. Anti-Penta-His-AK auf eine Bindung von SET-Protein an die von Cyp58 abgeleiteten Peptide untersucht.

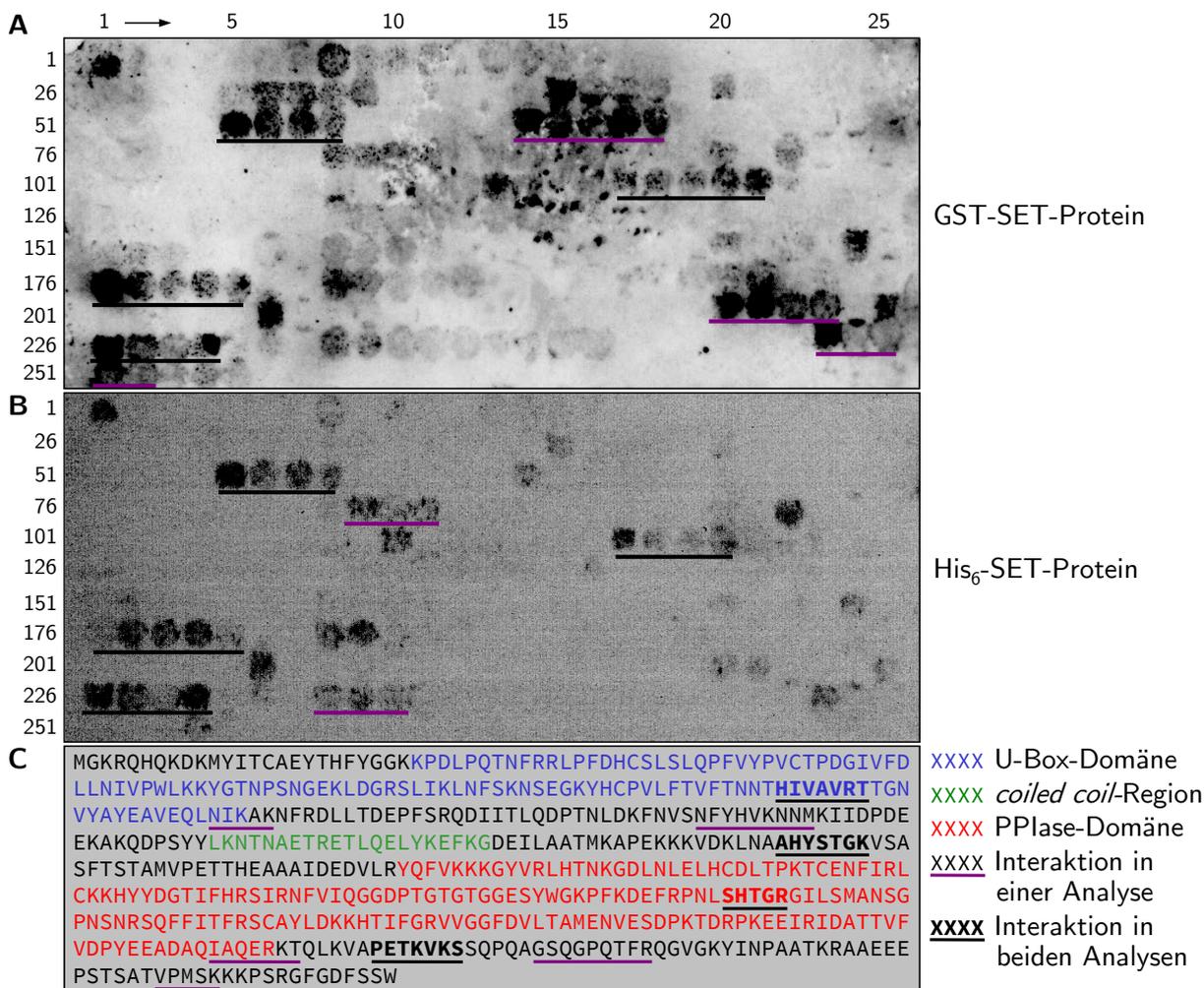


Abb. 3.32: Identifizierung der Cyp58-Interaktionsstelle mit SET-Protein durch Peptid-Bibliothek-Analyse. Durch *Spot*-Synthese generierte Cellulose-gebundene Anordnung von sich überlappenden von Cyp58 abgeleiteten Peptiden (13-mer, 2 Aminosäuren Verschiebung) wurde sowohl **A** mit 2,5 μ M GST-SET-Protein inkubiert (10 mM Tris/HCl pH 7,8) und durch Western-Blot-Analyse gegen Anti-GST-AK untersucht als auch **B** mit 1,5 μ M His₆-SET-Protein inkubiert (10 mM Tris/HCl pH 7,8) und durch Western-Blot-Analyse gegen Anti-Penta-His-AK untersucht. Mindestens drei aufeinander folgende interagierende Peptide sind *unterstrichen*. **C** Primärstruktur von Cyp58 mit *farbig* markierten Domänen. Die in nur einer der beiden Analysen bestimmten Cyp58-Interaktionsstellen mit SET-Protein sind *violett unterstrichen*. Die in beiden Analysen bestimmten Interaktionsstellen sind *fett* dargestellt und *schwarz unterstrichen*.

Die Western-Blot-Analyse der mit GST-SET-Protein inkubierten Cellulose-Membran (Abb. 3.32A) zeigte mindestens drei aufeinander folgende interagierende Peptide in den Positionen 55–58, 64–68, 117–121, 176–180, 220–223, 226–229 und 248–252. Diese sieben Bereiche besitzen die

überlappenden Peptidsequenzen H¹¹⁵IVAVRT¹²¹, N¹³⁵IKAK¹³⁹, Y²⁴¹STGK²⁴⁵, S³⁵⁹HTGR³⁶³, I⁴⁴⁵AQERKT⁴⁵¹, P⁴⁵⁷ETKVKS⁴⁶³ und V⁵⁰³PMSK⁵⁰⁷ von Cyp58 (Abb. 3.32C).

Die Western-Blot-Analyse der mit His₆-SET-Protein inkubierten Cellulose-Membran (Abb. 3.32B) zeigte mindestens drei aufeinander folgende interagierende Peptide in den Positionen 55–58, 84–86, 117–120, 176–180, 226–229 und 233–235. Diese sechs Bereiche besitzen die überlappenden Peptidsequenzen H¹¹⁵IVAVRT¹²¹, N¹⁷¹FYHVKNM¹⁷⁹, A²³⁹HYSTGK²⁴⁵, S³⁵⁹HTGR³⁶³, P⁴⁵⁷ETKVKS⁴⁶³ und G⁴⁶⁹SQGPQTFR⁴⁷⁷ von Cyp58 (Abb. 3.32C).

Die Sequenzbereiche H¹¹⁵IVAVRT¹²¹, Y²⁴¹STGK²⁴⁵, S³⁵⁹HTGR³⁶³ und P⁴⁵⁷ETKVKS⁴⁶³ von Cyp58 zeigten in beiden Analysen eine Bindung von SET-Protein. Diese Bereiche befinden sich im C-terminalen Bereich der ermittelten U-Box-Domäne, zwischen der potentiellen *coiled coil*-Region und der PPIase-Domäne, innerhalb der PPIase-Domäne bzw. innerhalb der C-terminalen Erweiterung der PPIase-Domäne. P⁴⁵⁷ETKVKS⁴⁶³ ist unter Berücksichtigung der Ergebnisse des GST-Pulldown-Experiments die wahrscheinlichste Interaktionsstelle von Cyp58 mit SET-Protein. Die nur in jeweils einem der beiden Analysen identifizierten, in der C-terminalen Erweiterung der PPIase-Domäne von Cyp58 befindlichen Sequenzbereiche I⁴⁴⁵AQERKT⁴⁵¹, G⁴⁶⁹SQGPQTFR⁴⁷⁷ und V⁵⁰³PMSK⁵⁰⁷ sind ebenfalls mögliche Interaktionsstellen mit SET-Protein.

Evaluierung der potentiellen Cyp58-Interaktionsstellen mit SET-Protein

Zur Untersuchung der Bedeutung dieser potentiellen Interaktionsstellen für die Bindung von SET-Protein an Cyp58 wurden zwei Sequenzbereiche ausgewählt: P⁴⁵⁷ETKVKS⁴⁶³, als wahrscheinlichste Cyp58-Interaktionsstelle mit SET-Protein, und I⁴⁴⁵AQERKT⁴⁵¹, das ebenfalls im C-terminalen Bereich von Cyp58 vorliegt und in beiden Bindungsstudien, mit SET-Protein und GST-14-3-3-Protein β , eine Interaktion zeigte.

Es wurden jeweils die vier Aminosäurereste E⁴⁵⁸TKV⁴⁶¹ und E⁴⁴⁸RKT⁴⁵¹ in FLAG-Cyp58 durch ortsspezifische Mutagenese gegen AAAA substituiert (Tab. 2.12) und anschließend vergleichende GST-Pulldown-Experimente durchgeführt. Immobilisiertes GST bzw. GST-SET-Protein wurde mit Zellysate von FLAG-Cyp58 exprimierenden bzw. FLAG-Cyp58-Varianten exprimierenden HeLa-Zellen inkubiert. Durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse gegen Anti-FLAG-AK wurde die Bindung an GST-SET-Protein untersucht.

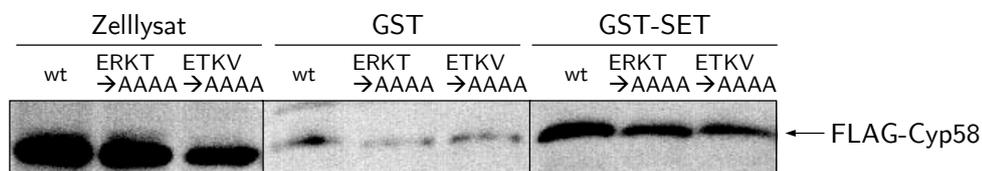


Abb. 3.33: Evaluierung von potentiellen Interaktionsstellen von Cyp58 mit SET-Protein. GST-Pulldown-Experiment. GST bzw. GST-SET-Protein wurde an GSH-Sepharose 4B immobilisiert und mit HeLa-Zellysate, in welchem FLAG-Cyp58 und FLAG-Cyp58-Varianten exprimiert vorlagen, inkubiert. Anschließend wurde die Matrix 4 h mit 1 U Thrombin, zur Spaltung von GST-SET-Protein, inkubiert. Nach SDS-PAGE (10 %) erfolgte Western-Blot-Analyse gegen Anti-FLAG-AK.

Die Western-Blot-Analyse der eingesetzten Zellysate (Abb. 3.33) zeigte die Expression von FLAG-Cyp58 und den FLAG-Cyp58-Varianten. In der Analyse des Pulldown-Experiments wur-

de eine Bindung aller FLAG-Proteine an GST-SET-Protein sichtbar. Zwischen der Bindung von FLAG-Cyp58^{ERKT→AAAA}, FLAG-Cyp58^{ETKV→AAAA} und dem Wildtyp waren dabei kaum Unterschiede zu verzeichnen. Somit sind diese beiden Proteinbereiche nicht entscheidend an der Bindung von SET-Protein an Cyp58 beteiligt.

3.10.3 Einfluss von Cyp58 auf die Histon-Bindung von SET-Protein

SET-Protein wurde in der Literatur mehrfach als Histon-Bindeprotein beschrieben [182, 200–203]. Deshalb wurde der Einfluss von Cyp58 auf die Histon-Bindung von SET-Protein untersucht. In einem GST-Pulldown-Experiment wurde GST bzw. GST-SET-Protein in Ab- oder Anwesenheit von Cyp58 mit Histonen inkubiert. Durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse gegen Anti-Histon-H3-AK und Anti-Histon-H2B-AK wurden die Proben miteinander verglichen.

Das Pulldown-Experiment zeigte in der Western-Blot-Analyse (Abb. 3.34) eine Bindung von Histon H3 und Histon H2B an GST-SET-Protein. An GST erfolgte kaum Bindung. Die Stärke der Histon-Bindung war dabei in Ab- und Anwesenheit von Cyp58 etwa gleich. Somit hat Cyp58 wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Histon-Bindung von SET-Protein.

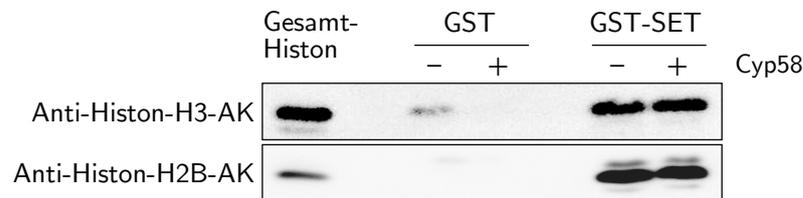


Abb. 3.34: Einfluss von Cyp58 auf die Bindung der Histone H3 und H2B an SET-Protein. GST-Pulldown-Experiment. GST bzw. GST-SET-Protein wurde an GSH-Sepharose 4B immobilisiert und mit 0,33 mg/ml Gesamt-Histon in Ab- oder Anwesenheit von 30 μ M Cyp58 inkubiert. Nach SDS-PAGE (12,5 %) erfolgte Western-Blot-Analyse gegen Anti-Histon-H3-AK und Anti-Histon-H2B-AK.

3.10.4 Einfluss von Cyp58 auf die PP2A-Inhibition durch SET-Protein

SET-Protein (I_2^{PP2A}) wurde als spezifischer, nicht-kompetitiver und potenter Inhibitor der Protein-Phosphatase 2A (PP2A) beschrieben [204, 205]. Deshalb sollte der Einfluss von Cyp58 auf die Inhibition der Phosphatase-Aktivität von PP2A durch SET-Protein untersucht werden. Dazu wurde ein Dephosphorylierungstest etabliert, um die enzymatische Aktivität von PP2A zu verfolgen. Als Substrat für PP2A diente ^{33}P -markierte Phosphorylase ($[^{33}\text{P}]$ -Phosphorylase a), die durch die Phosphorylase-Kinase-katalysierte Reaktion von Phosphorylase b mit γ - ^{33}P -markiertem ATP gewonnen wurde.

Zunächst wurde eine Kinetik der Dephosphorylierung von $[^{33}\text{P}]$ -Phosphorylase a durch PP2A erstellt. Die Dephosphorylierungsreaktion wurde nach verschiedenen Zeitpunkten durch TCA-Fällung abgestoppt und nach Zentrifugation das freigesetzte $[^{33}\text{P}]$ -Phosphat im Zentrifugationsüberstand durch einen Scintillationsdetektor quantifiziert (Abb. 2.1).

Die Kinetik der Dephosphorylierungsreaktion (Abb. 3.35A) zeigte eine annähernd lineare Zunahme des freien $[^{33}\text{P}]$ -Phosphat mit fortschreitender Reaktionszeit. Somit war die verwendete PP2A eine aktive Phosphatase und zeigte im verwendeten Konzentrationsbereich und Zeitfenster

eine lineare Abhängigkeit zwischen Zeit und Produktbildung, Voraussetzung für anschließende Inhibitionsmessungen.

Im nächsten Schritt sollte die PP2A-Aktivität durch His₆-SET-Protein inhibiert werden. Als Positiv-Kontrolle für die Inhibition diente der hochaffine nicht-kompetitive PP2A-Inhibitor Okadasäure (OA) [206]. Die Dephosphorylierungsreaktionen in Ab- oder Anwesenheit von His₆-SET-Protein bzw. OA wurden nach 60 min Reaktionszeit vergleichend untersucht.

Abbildung 3.35B zeigt die Produktfreisetzung von PP2A in Gegenwart von His₆-SET-Protein bzw. OA. Dabei war keinerlei Inhibition der Phosphatase-Aktivität von PP2A durch 1 μ M His₆-SET-Protein zu verzeichnen. 100 nM OA führten hingegen zu einer vollständigen Inhibition der Phosphatase-Aktivität von PP2A. Die Inhibition durch OA bestätigte, dass die beobachtete Phosphatase-Aktivität auf PP2A zurückzuführen war und nicht durch Phosphatase-Verunreinigungen zustande kam.

Da His₆-SET-Protein unter den verwendeten Messbedingungen keinen Einfluss auf die Phosphatase-Aktivität von PP2A zeigte, konnte auch kein Einfluss von Cyp58 auf diese in der Literatur beschriebene Inhibition untersucht werden.

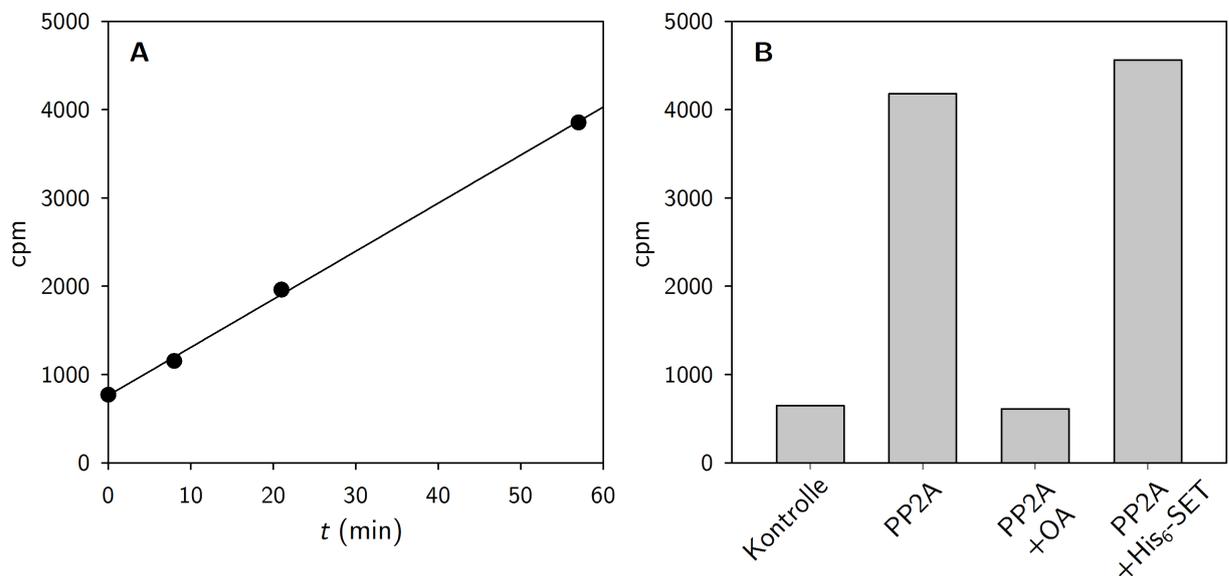


Abb. 3.35: Phosphatase-Aktivität und Inhibition von PP2A. **A** Kinetik der Dephosphorylierung von $[^{33}\text{P}]$ -Phosphorylase a durch PP2A. $[^{33}\text{P}]$ -Phosphorylase a wurde bei 30 °C mit 50 nM PP2A inkubiert und die Reaktion nach verschiedenen Zeitpunkten durch TCA-Fällung abgestoppt. Nach Zentrifugation wurde die Radioaktivität des Überstandes durch Szintillationsmessung bestimmt. Lineare Anpassung. **B** Dephosphorylierung von $[^{33}\text{P}]$ -Phosphorylase a durch PP2A in Ab- oder Anwesenheit von 100 nM Okadasäure (OA) bzw. 1 μ M His₆-SET-Protein nach 60 min Reaktionszeit.

3.10.5 Einfluss von Cyp58 auf die Proteolyse von SET-Protein durch Granzym A

SET-Protein wurde bei Untersuchungen zum Mechanismus des Caspase-unabhängigen Zelltods als Substrat der Serinprotease Granzym A (GzmA) identifiziert [207–209]. Deshalb wurde untersucht, ob Cyp58 einen Einfluss auf die Proteolyse von SET-Protein durch GzmA hat. Dazu erfolgte eine limitierte Proteolyse von His₆-SET-Protein mit GzmA in An- und Abwesenheit von Cyp58. Mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse gegen Anti-SET-AK wurden die Zeitver-

läufe der limitierten Proteolysen miteinander verglichen.

Die limitierte Proteolyse zeigte in der Western-Blot-Analyse (Abb. 3.36) mit zunehmender Reaktionszeit eine Degradation von His₆-SET-Protein in definierte Fragmente. Nach 6 h Reaktionszeit war His₆-SET-Protein fast vollständig abgebaut. Die entstandenen drei Hauptfragmente zeigten apparente molekulare Massen von 22 bis 28 kDa. Zwischen An- und Abwesenheit von His₆-Cyp58-*StreptII* im Reaktionsansatz waren keine Unterschiede im Zeitverlauf und in der Größe der entstandenen Fragmente zu verzeichnen. Damit hat Cyp58 keinen Einfluss auf die Proteolyse von SET-Protein durch GzmA.

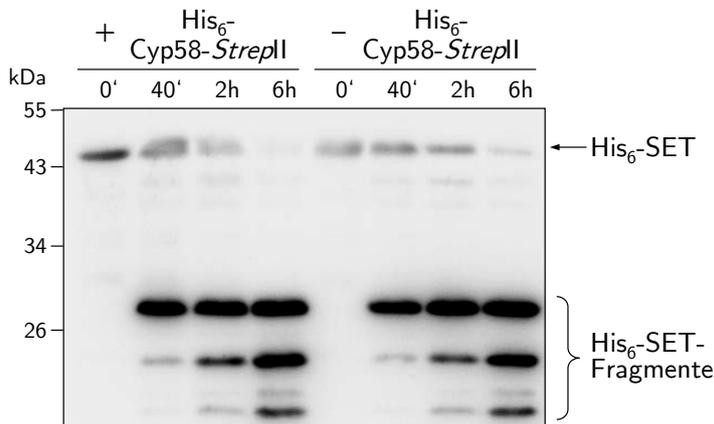


Abb. 3.36: Einfluss von Cyp58 auf die GzmA-Proteolyse von SET-Protein. Limitierte Proteolyse von 3 μ M His₆-SET-Protein durch 200 nM GzmA in An- oder Abwesenheit von 12 μ M His₆-Cyp58-*StreptII* bei 37 °C (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 100 mM NaCl; 1 mM CaCl₂). Die Reaktion wurde nach verschiedenen Zeitpunkten mit PMSF (2 mM Endkonz.) abgestoppt. Nach SDS-PAGE (10 %) erfolgte Western-Blot-Analyse gegen Anti-SET-AK.

3.11 Ubiquitylierung in Cyp58/Interaktionspartner-Kombinationen

Cyp58 ist als Ubiquitin-Protein-Ligase für die Substratspezifität der Ubiquitylierungskaskade verantwortlich. Somit sind Cyp58-Interaktionspartner auch potentielle Ubiquitylierungssubstrate von Cyp58. Zur Untersuchung, ob die identifizierten Cyp58-Interaktionspartner durch Cyp58 ubiquityliert werden, wurden diese in Ab- und Anwesenheit von Cyp58 mit allen Komponenten des Ubiquitylierungssystems inkubiert. Die Analyse der Proben erfolgte durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse gegen Streptavidin-HRP zur Detektion von Bt-Ub. Gleichzeitig gab dieses Experiment eine Aussage über den Einfluss der Interaktionspartner auf die Autoubiquitylierung von Cyp58.

In der Western-Blot-Analyse der Ubiquitylierungsreaktionen (Abb. 3.37) zeigten sich in Anwesenheit von Cyp58 die für die Autoubiquitylierung charakteristischen Banden mit größerer molekularer Masse als Cyp58 (Abschn. 3.5.4). Diese waren in Gegenwart aller Interaktionspartner vorhanden, auch wenn sie unterschiedlich stark ausfielen. Die Interaktionspartner von Cyp58 hatten damit keinen signifikanten Einfluss auf seine Autoubiquitylierung.

Beim Blick auf die Cyp58-Interaktionspartner zeigten sich in Gegenwart von His₆-SET-Protein und His₆-14-3-3-Protein ζ (Abb. 3.37A) keine auf deren Ubiquitylierung zurückzuführende zusätzliche Banden. In den Proben mit GST-14-3-3-Protein β und GST-14-3-3-Protein γ zeigten sich jedoch zusätzliche Banden (Abb. 3.37A */#). Diese Banden würden, dem Laufverhalten im SDS-Gel nach, einer Monoubiquitylierung beider Proteine entsprechen. Diese zusätzlichen Banden waren aber sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Cyp58 zu beobachten und damit nicht auf die E3-Aktivität von Cyp58 zurückzuführen. In Gegenwart von Gesamt-Histon (Abb.

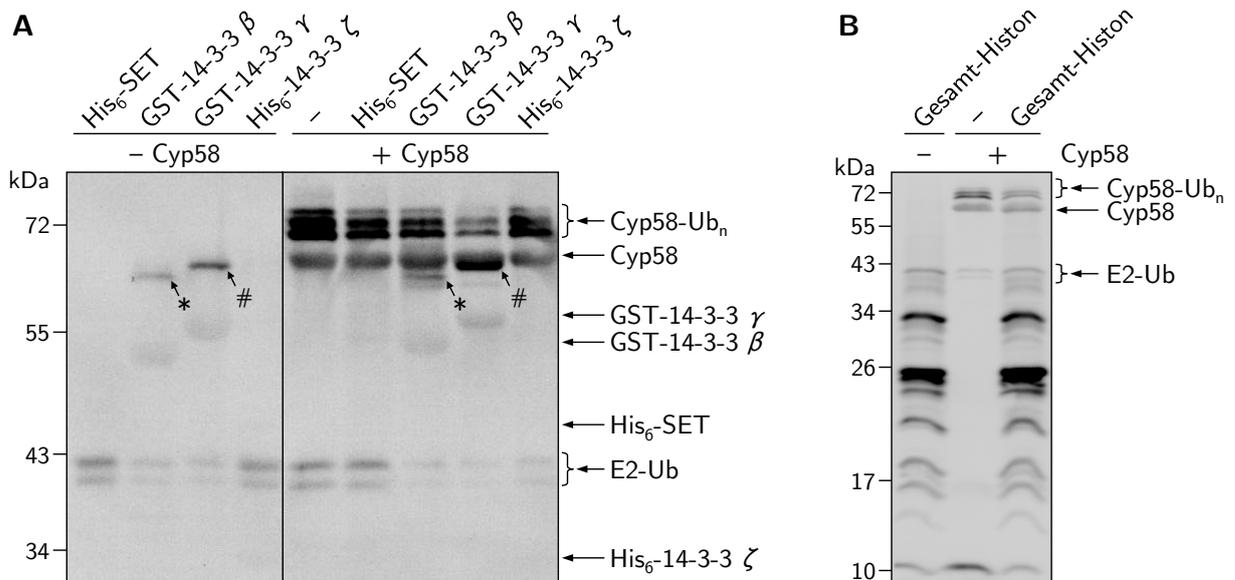


Abb. 3.37: Ubiquitinylierung in Cyp58/Interaktionspartner-Kombinationen. **A** Ubiquitinylierung von je 10 μM His₆-SET-Protein, GST-14-3-3-Protein β , GST-14-3-3-Protein γ bzw. His₆-14-3-3-Protein ζ (10%iges SDS-PA-Gel). **B** Ubiquitinylierung von 1 mg/ml Gesamt-Histon (12,5%iges SDS-PA-Gel). Die Proteine wurden in Ab- oder Anwesenheit von 5 μM Cyp58 mit 37,5 nM His₆-UBE1, 300 nM His₆-UbCH3, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Bt-Ub und 5 mM ATP 2 h bei 30 °C inkubiert (50 mM HEPES/KOH pH 7,5; 40 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 0,5 mM DTT). Nach SDS-PAGE erfolgte Western-Blot-Analyse gegen Streptavidin-HRP. * zusätzliche Bande über GST-14-3-3-Protein β ; # zusätzliche Bande über GST-14-3-3-Protein γ .

3.37B) waren sehr viele auf Ubiquitinylierung zurückzuführende zusätzliche Banden sichtbar. Diese zeigten sich aber ebenfalls in An- und Abwesenheit von Cyp58. Somit war für keines der untersuchten Cyp58-Interaktionspartner eine Ubiquitinylierung durch Cyp58 nachweisbar.

3.12 Einfluss der Interaktionspartner auf die Cyp58-PPIase-Aktivität

Es wurde untersucht, ob die ermittelten Cyp58-Interaktionspartner einen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der PPIase-Domäne von Cyp58 haben. Dazu wurde die PPIase-Aktivität von Cyp58 in Gegenwart von GST-14-3-3-Protein β , GST-14-3-3-Protein γ , His₆-14-3-3-Protein ζ und His₆-SET-Protein bestimmt. Als Kontrolle wurde die PPIase-Aktivität von Cyp58 in Gegenwart von BSA als nicht interagierendes Protein bestimmt. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte mit dem Fluoreszenz-basierten Protease-freien PPIase-Test, da der Protease-freie PPIase-Test sehr empfindlich gegenüber hohen Proteinkonzentrationen im Messansatz ist. Die PPIase-Aktivität von Cyp58 im Gemisch mit den Partnerproteinen wurde durch Abzug der durch Verunreinigungen der Partnerproteine eingebrachten PPIase-Aktivität korrigiert.

Abbildung 3.38 zeigt die relative PPIase-Aktivität von Cyp58 in Anwesenheit von 3 μM des jeweiligen Interaktionspartners. In Gegenwart von BSA, GST-14-3-3-Protein β , GST-14-3-3-Protein γ und His₆-SET-Protein war kaum ein Einfluss auf die Aktivität von Cyp58 zu verzeichnen. Die Anwesenheit von His₆-14-3-3-Protein ζ führte zu einer leichten Erhöhung der PPIase-Aktivität um 28%.

Der Einsatz hoher Proteinkonzentrationen in diesem Messsystem kann jedoch in Abhängig-

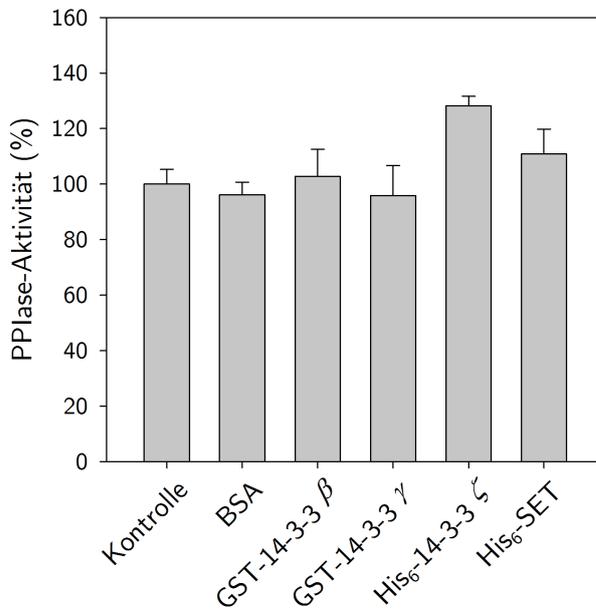


Abb. 3.38: Einfluss der Cyp58-Interaktionspartner auf die PPIase-Aktivität von Cyp58. Aktivität von 20 nM Cyp58 bestimmt im Fluoreszenz-basierten Protease-freien PPIase-Test (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 500 mM NaCl) gegenüber dem Substrat Abz-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA in Ab- oder Anwesenheit von 3 μ M BSA, GST-14-3-3-Protein β , GST-14-3-3-Protein γ , His₆-14-3-3-Protein ζ bzw. His₆-SET-Protein bei 10 °C. Die PPIase-Aktivität in Gegenwart der Partnerproteine wurde um die durch deren Verunreinigungen eingebrachte PPIase-Aktivität korrigiert.

keit des eingesetzten Proteins durch die Beeinflussung von Absorptions- und Aggregationsverhalten die beobachtete Aktivität beeinflussen. Deshalb haben die untersuchten 14-3-3-Protein-Isoformen und SET-Protein wahrscheinlich keinen Einfluss auf die PPIase-Aktivität von Cyp58. Ein geringer Einfluss von His₆-14-3-3-Protein ζ kann aber nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

3.13 Untersuchung von Cyp58 in humanen HeLa-Zellen

Zur Untersuchung von Cyp58 in seiner zellulären Umgebung wurde sowohl endogenes Cyp58 analysiert als auch exogenes Cyp58 in HeLa-Zellen exprimiert. Dazu wurde der ORF von Cyp58 Isoform 1 in die eukaryotischen Expressionsvektoren pCMV-Tag 2B und pEGFP-C1 kloniert (Tab. 2.8) und Cyp58 als FLAG-Cyp58 und eGFP-Cyp58 in HeLa-Zellen transient exprimiert.

Zur Ermittlung des besten Zeitpunktes für die Zellernte nach transienter Transfektion von HeLa-Zellen wurde der Zeitverlauf der Expression von FLAG-Cyp58 bestimmt. Nach Zellernte wurden die Lysate durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse gegen Anti-Cyp58-AK untersucht.

Die Western-Blot-Analyse (Abb. 3.39A) zeigte zu allen Zeitpunkten eine Expression von FLAG-Cyp58, mit der stärksten Expression nach 48 h. Die Expression von FLAG-Cyp58 war deutlich stärker als von endogenem Cyp58 und führte dabei scheinbar zu einer Verringerung des Gehalts an endogenem Cyp58 in HeLa-Zellen.

Außerdem wurde der Cyp58-Proteingehalt in HeLa-Zellen durch RNA-Interferenz (RNAi) verringert. Dazu wurden HeLa-Zellen mit drei verschiedenen siRNA-Duplexen gegen Cyp58 und einem *scrambled*-siRNA-Duplex (siRNA_{scr}) als Negativ-Kontrolle transient transfiziert. 48 h

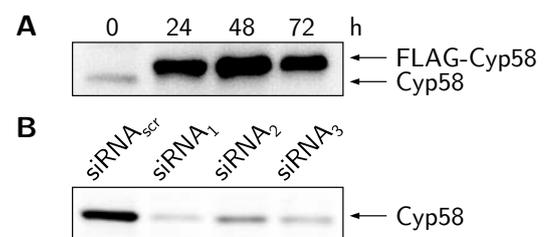


Abb. 3.39: Expression von FLAG-Cyp58 und Depletion von Cyp58 in HeLa-Zellen. **A** Zellen wurden mit Calciumphosphat-Methode transient transfiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet. **B** Zellen wurden mit Nanofectin siRNA mit je 50 nM siRNA-Duplex gegen Cyp58 transient transfiziert und nach 48 h geerntet. Lysate wurden durch SDS-PAGE (10%) und Western-Blot-Analyse gegen Anti-Cyp58-AK untersucht.

nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und der Cyp58-Gehalt der Zelllysate durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse gegen Anti-Cyp58-AK untersucht.

Die Western-Blot-Analyse (Abb. 3.39B) zeigte eine deutliche Verringerung des Cyp58-Protein-gehalts in HeLa-Zellen durch die siRNA-Duplexe 1, 2 und 3 im Vergleich zur siRNA_{scr}-Kontrolle.

3.13.1 Einfluss der Cyp58-Depletion auf Proteingehalte von Interaktionspartnern

Um zu untersuchen, ob die Verringerung des Cyp58-Gehalts in HeLa-Zellen einen Einfluss auf den Proteingehalt von Cyp58-Interaktionspartnern hat, wurden SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse der RNAi-Proben gegen Anti-SET-AK und Anti-pan14-3-3-AK durchgeführt.

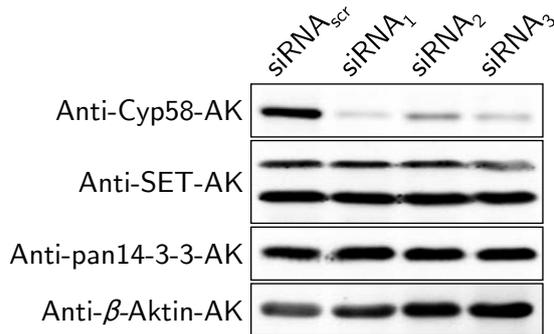


Abb. 3.40: Einfluss der Cyp58-Depletion auf Proteingehalte von Interaktionspartner. HeLa-Zellen wurden mit Nanofectin siRNA mit je 50 nM siRNA-Duplex gegen Cyp58 transient transfiziert und nach 48 h geerntet. Ly-sate wurden durch SDS-PAGE (10 %) und Western-Blot-Analyse gegen die angegebenen Antikörper untersucht.

Die Western-Blot-Analyse der Zelllysate (Abb. 3.40) zeigte, dass die Verringerung des Cyp58-Protein-gehalts in HeLa-Zellen weder einen Einfluss auf den Proteingehalt von 14-3-3-Proteinen noch von SET-Protein hat. In der Analyse gegen Anti-SET-AK wurden zwei Banden sichtbar, die den beiden Isoformen TAF-I α (obere Bande) und TAF-I β (untere Bande) entsprechen [210].

3.13.2 Proteingehalt von Cyp58 und SET-Protein während des Zellzyklus

Zur Untersuchung des Proteingehalts von Cyp58 und SET-Protein im Verlauf des Zellzyklus erfolgte zunächst die Synchronisation von HeLa-Zellen zu Beginn der S-Phase (Abb. 3.41C) durch einen Thymidin-Block. Nach Entlassung in den Zellzyklus wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und die Zelllysate durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse gegen Anti-Cyp58-AK, Anti-SET-AK und Anti- β -Aktin-AK untersucht. Parallel dazu wurden die verschiedenen Zellzyklusphasen der Zellen durch Durchflusszytometrie bestimmt. Dafür wurden die Zellen in Ethanol fixiert und ihre DNA anschließend mit Propidiumiodid gefärbt.

Die Analyse mit Durchflusszytometrie (Abb. 3.41A) zeigte den DNA-Gehalt der geernteten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Entlassung in den Zellzyklus. 2 h nach Entlassung hatten die Zellen einen DNA-Gehalt, der zwischen dem doppelten und dem vierfachen Chromosomensatz lag, charakteristisch für die S-Phase des Zellzyklus. Nach 9 h wies der überwiegende Teil der Zellen einen vierfachen Chromosomensatz auf. Damit befanden sich die meisten dieser Zellen in der G2/M-Phase. 16 h nach Entlassung in den Zellzyklus hatten nahezu alle Zellen einen doppelten Chromosomensatz und befanden sich somit in der G1-Phase. Die nicht synchronisierten Zellen zeigten zum überwiegenden Teil einen doppelten Chromosomensatz und befanden sich damit vorwiegend in der G1-Phase.

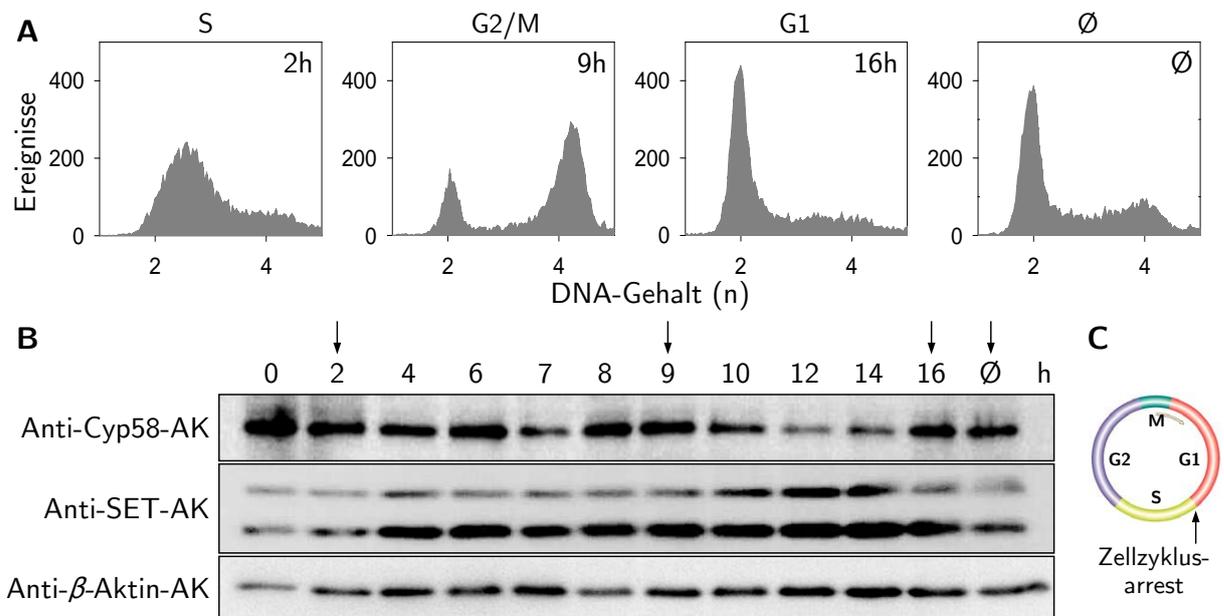


Abb. 3.41: Cyp58- und SET-Proteingehalt während des Zellzyklus. HeLa-Zellen wurden durch Thymidin-Block zu Beginn der S-Phase arretiert und nach 24 h der Zellzyklus synchron gestartet. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Zellen geerntet und sowohl die Lysate durch SDS-PAGE (10 %) und Western-Blot-Analyse untersucht als auch für die Durchflusszytometrie mit 80 % v/v Ethanol fixiert und die DNA mit Propidiumiodid gefärbt. **A** Histogramme mit dem DNA-Gehalt von synchronisierten (2, 9 und 16 h nach Entlassung) und nicht synchronisierten Zellen (Ø) sowie ihre entsprechende Zellzyklus-Phase. **B** Western-Blot-Analyse gegen Anti-Cyp58-AK, Anti-SET-AK und Anti- β -Aktin-AK. **C** Schema des Zellzyklus mit Zeitpunkt des Arrests.

Die zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aufhebung der Zellzyklusblockade entnommenen Proben zeigten in der Western-Blot-Analyse (Abb. 3.41B) einen leicht schwankenden Proteingehalt von Cyp58 im Verlauf des Zellzyklus. Im besonderen Maße war ein hoher Gehalt unmittelbar nach Aufhebung des Thymidin-Blocks und in der G2/M-Phase zu verzeichnen. Vor und nach der G2/M-Phase zeigte sich ein verringerter Cyp58-Gehalt. Der SET-Proteingehalt zeigte beim Fortschreiten im Zellzyklus eine leichte Zunahme mit dem höchsten Gehalt im Anschluss an die G2/M-Phase. Das Verhältnis der beiden Isoformen von SET-Protein blieb dabei in etwa gleich. Somit fielen der Zeitpunkt des niedrigsten Cyp58-Proteingehalts mit dem Zeitpunkt des höchsten SET-Proteingehalts zusammen. Die Western-Blot-Analyse gegen Anti-Aktin-AK zeigte eine relativ gleichmäßige Beladung des Gels mit geringen Schwankungen zwischen den Proben.

3.13.3 Einfluss von Cyp58 auf den Abbau von Interaktionspartnern

Cyp58 ist mit seiner U-Box-Domäne potentiell in den Stoffwechselweg des Proteinabbaus involviert. Deshalb wurde der Einfluss von Cyp58 auf den intrazellulären Abbau von Interaktionspartnern untersucht. Dazu wurden HeLa-Zellen sowohl mit pCMV-Cyp58 für eine zusätzliche Cyp58-Expression als auch mit siRNA-Duplexen zur Cyp58-Depletion transient transfiziert. Als Negativ-Kontrolle wurden Zellen mit siRNA_{scr} transfiziert. 48 h nach Transfektion erfolgte die Inhibition der Proteinbiosynthese durch Zugabe von Cycloheximid (CHX). Anschließend wurden die Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet und die Lysate durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse auf ihren Gehalt an Cyp58, α -Tubulin, SET-Protein, 14-3-3-Proteinen,

Histon H3, Histon H2B, β -Aktin und GAPDH untersucht (Abb. 3.42).

Durch die Western-Blot-Analyse gegen Anti-Cyp58-AK wurde sowohl die Expression von FLAG-Cyp58 als auch der verringerte Cyp58-Gehalt in den mit siRNA-Duplexen gegen Cyp58 behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen bestätigt. FLAG-Cyp58 war in diesem Experiment nur geringfügig stärker exprimiert als endogenes Cyp58. Im Verlauf der Inkubation mit CHX war eine Abnahme des Cyp58-Gehalts in HeLa-Zellen zu verzeichnen.

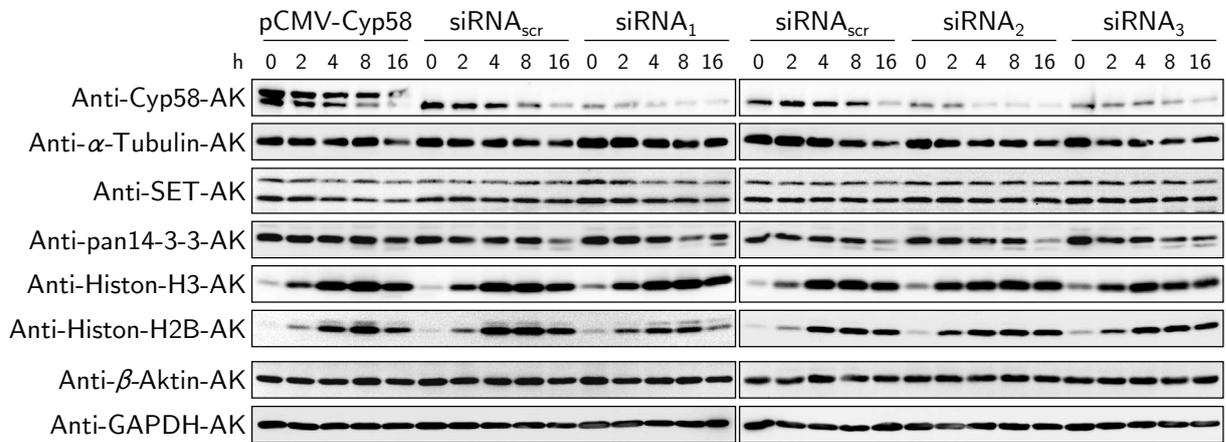


Abb. 3.42: Einfluss von Cyp58 auf den Abbau von Interaktionspartnern. HeLa-Zellen wurden mit pCMV-Cyp58 bzw. siRNA-Duplexen gegen Cyp58 transient transfiziert und nach 48 h mit 200 μ g/ml CHX behandelt. Die Zellen wurden nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet und die Lysate durch SDS-PAGE (10 %; Anti-Histon-AK: 12,5 %) und Western-Blot-Analyse gegen die angegebenen Antikörper untersucht.

Die Analysen von α -Tubulin, SET-Protein und 14-3-3-Proteinen zeigten eine hohe Stabilität dieser Proteine gegenüber proteolytischem Abbau nach Blockierung der Protein-Neusynthese durch CHX. Zwischen Zellen mit unterschiedlichem Cyp58-Gehalt waren kaum Unterschiede im Gehalt dieser Proteine zu verzeichnen. In den Analysen von Histon H3 und Histon H2B war für beide Proteine der gleiche Trend zu beobachten. Histon H3 und Histon H2B waren vor der Behandlung mit CHX nur sehr wenig präsent, der Proteingehalt nahm dann bis zur 8 h-Probe kontinuierlich zu und ab 16 h Inkubation wieder ab. Die Zunahme des Histon-Gehalts in den untersuchten Proben wird verständlich durch die Tatsache, dass bei der Probenvorbereitung das Zelllysate vorwiegend die löslichen Bestandteile der Zelle enthält, Chromatin wird zum großen Teil nicht mit analysiert, da es mit den unlöslichen Zellbestandteilen abgetrennt wird. Histone sind deshalb stark unterrepräsentiert. Da CHX Apoptose von Zellen auslöst, werden in deren Verlauf die Histone aus den Nukleosomen freigesetzt [211] und somit im Lysat sichtbar. Auch hier zeigten sich keine deutlichen Unterschiede zwischen Zellen mit unterschiedlichem Gehalt an Cyp58. Die Analysen von β -Aktin und GAPDH als Ladekontrollen zeigten vergleichbare Proteinmengen innerhalb der verwendeten Proben.

Damit konnte in diesen Experimenten kein erkennbarer Einfluss von Cyp58 auf den Abbau der untersuchten Interaktionspartner festgestellt werden.

3.13.4 Einfluss von Cyp58 auf die Zellebensfähigkeit

Der Einfluss von Cyp58 auf das Wachstum und die Lebensfähigkeit von HeLa-Zellen wurde mithilfe eines MTT-Tests untersucht. Dazu wurde sowohl zusätzliches FLAG-Cyp58 in HeLa-Zellen

transient exprimiert als auch der Cyp58-Gehalt von HeLa-Zellen durch RNAi verringert. 48 h nach Transfektion erfolgte der MTT-Test. Der Test beruht auf dem Umsatz des zugesetzten Farbstoffs MTT in lebenden Zellen zu Formazan. Die Formazan-Bildung ist über die Absorptionsänderung bei 570 nm quantifizierbar und ein Maß für die Lebensfähigkeit von behandelten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen. Parallel wurden Zellen geerntet und durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse gegen Anti-Cyp58-AK der Cyp58-Proteingehalt der Zelllysate überprüft.

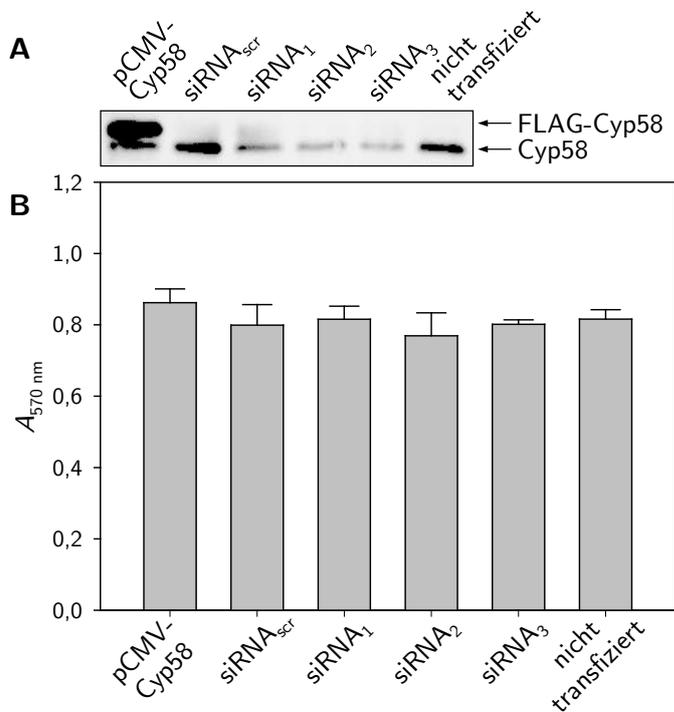


Abb. 3.43: Einfluss von Cyp58 auf die Lebensfähigkeit von HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden mit pCMV-Cyp58 bzw. siRNA-Duplexen gegen Cyp58 transient transfiziert und nach 48 h untersucht. **A** Cyp58-Proteingehalt der HeLa-Zellen. Zelllysate wurden durch SDS-PAGE (10 %) und Western-Blot-Analyse gegen Anti-Cyp58-AK untersucht. **B** MTT-Test zur Bestimmung der Zellebensfähigkeit. Vierfachbestimmung.

Die Western-Blot-Analyse der Zelllysate (Abb. 3.43A) bestätigte sowohl die Expression von FLAG-Cyp58 als auch die Verringerung des Cyp58-Gehalts in HeLa-Zellen durch RNAi. Im MTT-Test (Abb. 3.43B) war für Zellen mit zusätzlichem FLAG-Cyp58 und Zellen mit verringertem Cyp58-Gehalt im Vergleich zu Kontrollzellen etwa die gleiche Farbstoffbildung zu beobachten. Somit hat Cyp58 wahrscheinlich keinen Einfluss auf das Wachstum und die Lebensfähigkeit von HeLa-Zellen. Durch RNAi konnte jedoch keine vollständige Cyp58-Depletion erreicht werden. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein geringer Cyp58-Gehalt in HeLa-Zellen schon ausreicht, um die Lebensfähigkeit der Zellen zu gewährleisten.

3.13.5 Subzelluläre Lokalisation von Cyp58 während des Zellzyklus

Für exogen exprimiertes Cyp58 in transfizierten Zellen wurde sowohl eine bevorzugte Lokalisation im Zellkern [113, 118] als auch eine fast gleichmäßige Verteilung zwischen Zellkern und Cytoplasma beschrieben [121]. Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Cyp58 in HeLa-Zellen während des Zellzyklus wurde eine *N*-terminale Fusion mit *enhanced* grün fluoreszierendem Protein (eGFP) verwendet. Eine Bestimmung der Lokalisation von endogenem Cyp58 durch indirekte Immunfluoreszenz war aufgrund einer zu geringer Spezifität des Anti-Cyp58-AK nicht möglich.

Subzelluläre Lokalisation von Cyp58 während der Interphase

Zur Untersuchung der Lokalisation von Cyp58 während der Interphase wurde eGFP-Cyp58 in HeLa-Zellen transient exprimiert und anschließend konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie durchgeführt. Die korrekte Expression von eGFP-Cyp58 wurde durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse gegen Anti-eGFP-AK untersucht.

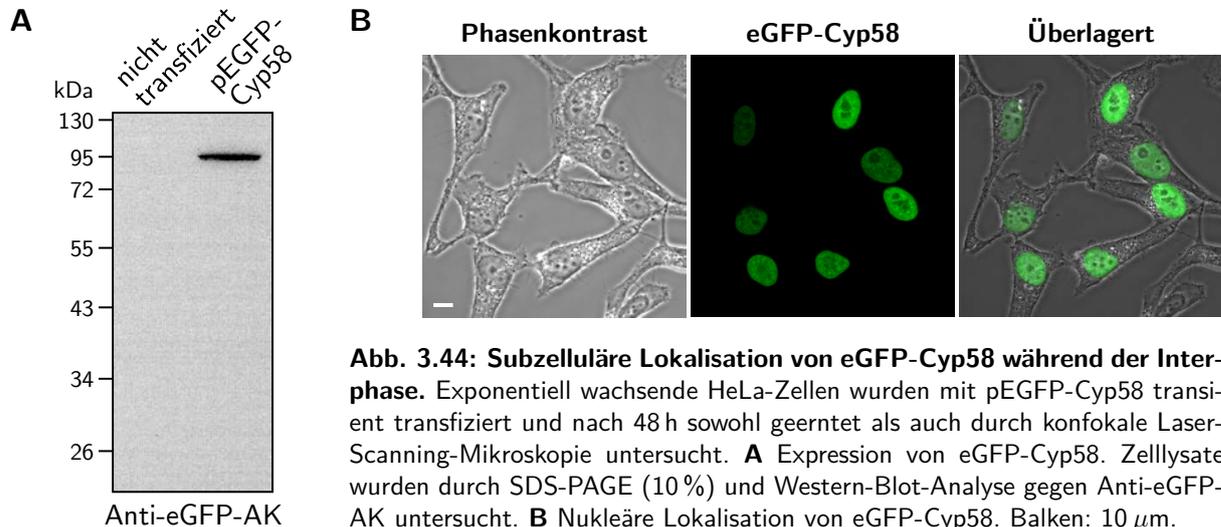


Abb. 3.44: Subzelluläre Lokalisation von eGFP-Cyp58 während der Interphase. Exponentiell wachsende HeLa-Zellen wurden mit pEGFP-Cyp58 transient transfiziert und nach 48 h sowohl geerntet als auch durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. **A** Expression von eGFP-Cyp58. Zellysate wurden durch SDS-PAGE (10 %) und Western-Blot-Analyse gegen Anti-eGFP-AK untersucht. **B** Nukleäre Lokalisation von eGFP-Cyp58. Balken: 10 μm .

Die Western-Blot-Analyse des Lysats von transfizierten Zellen (Abb. 3.44A) zeigte eine einzelne Bande bei ca. 95 kDa. Damit wurde die Expression von eGFP-Cyp58 ohne intrazellulären Abbau bestätigt (theoretische molekulare Masse: ca. 87 kDa). Die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von eGFP-Cyp58 in Interphase-Zellen zeigte eine diffuse Lokalisation im Zellkern (Abb. 3.44B). In den Nucleoli trat eGFP-Cyp58 nicht auf.

Subzelluläre Lokalisation von Cyp58 während der Mitose und der Cytokinese

Zur Untersuchung der Lokalisation von Cyp58 während Mitose und Cytokinese wurde eGFP-Cyp58 transient in HeLa-Zellen exprimiert. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurde die DNA durch DAPI-Färbung sichtbar gemacht sowie β -Tubulin und weitere spezifische Markerproteine durch indirekte Immunfluoreszenz gefärbt. Anschließend erfolgte die Untersuchung durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.

Die subzelluläre Lokalisation von eGFP-Cyp58 in Mitose und Cytokinese war abhängig von der jeweiligen Phase (Abb. 3.45). In Meta-, Ana- und Telophase zeigte eGFP-Cyp58 aufgrund der aufgelösten Kernmembran eine diffuse Verteilung im gesamten Cytoplasma. Zusätzlich war es in Meta- und Anaphase am sich ausbildenden Spindelapparat zu beobachten, sichtbar durch eine Kollokalisierung von eGFP-Cyp58 mit β -Tubulin. Am Chromatin zeigte sich hingegen ein stark verringerter Gehalt an eGFP-Cyp58. Beim Vergleich der Lokalisation von eGFP-Cyp58 mit dem Centrosom-Markerprotein *Polo-like kinase 1* (PLK1) in der Metaphase wurde eine Kollokalisierung beider Proteine an den Centrosomen sichtbar (Abb. 3.46A). In der Telophase zeigte eGFP-Cyp58 eine bevorzugte Lokalisation im Verbindungsbereich der sich teilenden Zellen, noch immer kollokalisiert mit dem β -Tubulin des Spindelapparats.

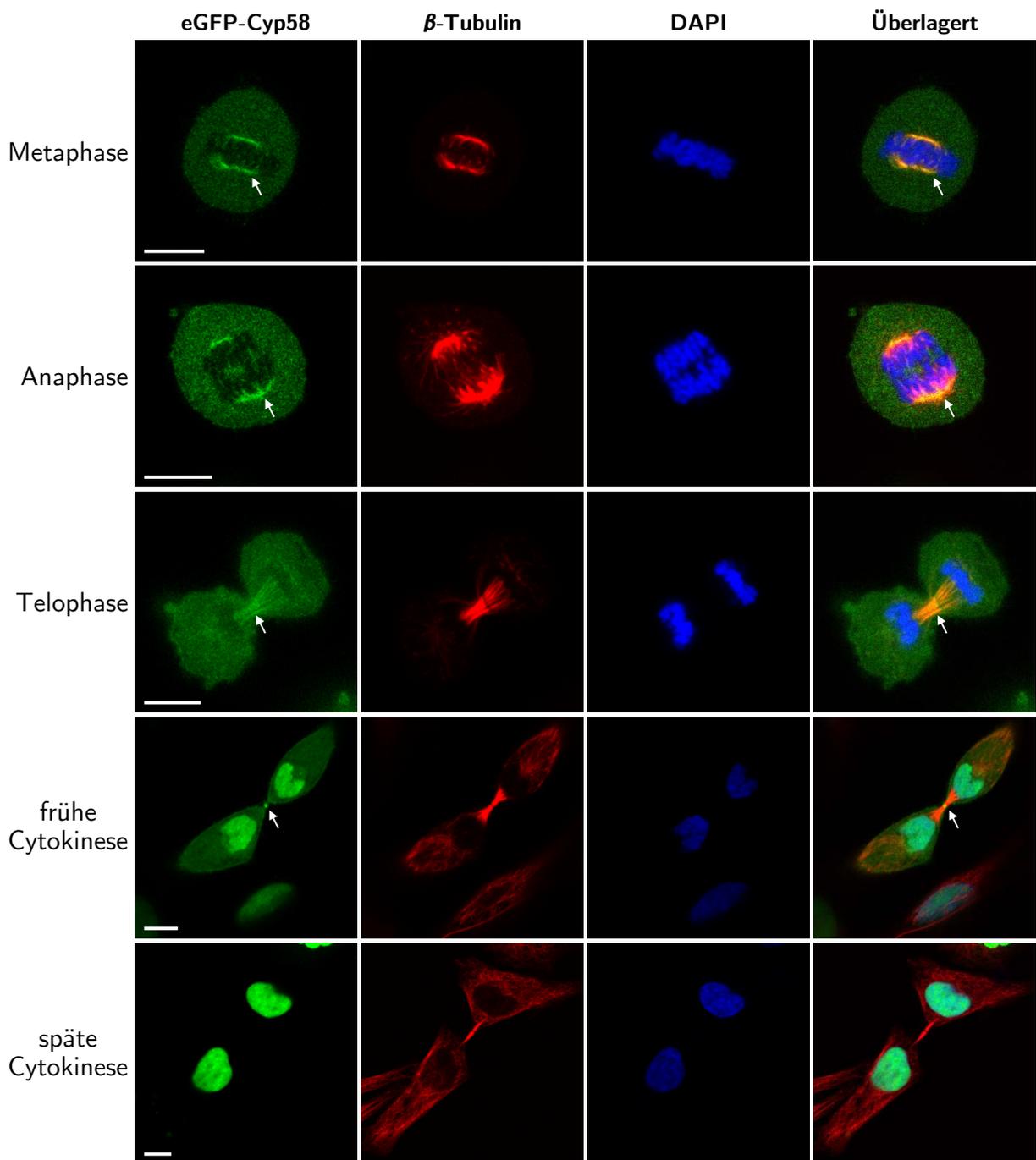


Abb. 3.45: Subzelluläre Lokalisation von eGFP-Cyp58 während Mitose und Cytokinese. Exponentiell wachsende eGFP-Cyp58 exprimierende HeLa-Zellen wurden mit 4 % w/v Paraformaldehyd fixiert und mit Methanol permeabilisiert. DNA wurde mit DAPI, β -Tubulin mit Anti- β -Tubulin-AK und Rhodamine RedTM-X-konjugiertem Anti-Kaninchen-IgG-AK gefärbt. Die Untersuchung erfolgte durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie. Weiße Pfeile markieren die bevorzugte Lokalisation von eGFP-Cyp58 in den verschiedenen Phasen. Balken: 10 μ m.

In der frühen Cytokinese lokalisierte eGFP-Cyp58 bevorzugt in den sich neu bildenden Zellkernen, zusammen mit dem dekondensierten Chromatin. Die Kolokalisation von eGFP-Cyp58 mit β -Tubulin war aufgehoben, obwohl der Spindelapparat zwischen den beiden vor der Trennung stehenden Zellen noch intakt war. Ein Teil von eGFP-Cyp58 konzentrierte sich jedoch an der Position genau zwischen den beiden Zellen, an der sich der Midbody (Flemming-Körper) befindet. Der Vergleich der Lokalisation von eGFP-Cyp58 mit dem Midbody-Markerprotein *mitotic kinesin-like protein 1* (MKLP1) in der frühen Cytokinese zeigte eine Kolokalisation beider Proteine am Midbody (Abb. 3.46B). In der späten Cytokinese war eGFP-Cyp58 vollständig in den neuen Zellkernen lokalisiert, vom cytoplasmatischen β -Tubulin separiert. Eine Lokalisation im Verbindungsstück der beiden Tochterzellen war nicht mehr nachweisbar.

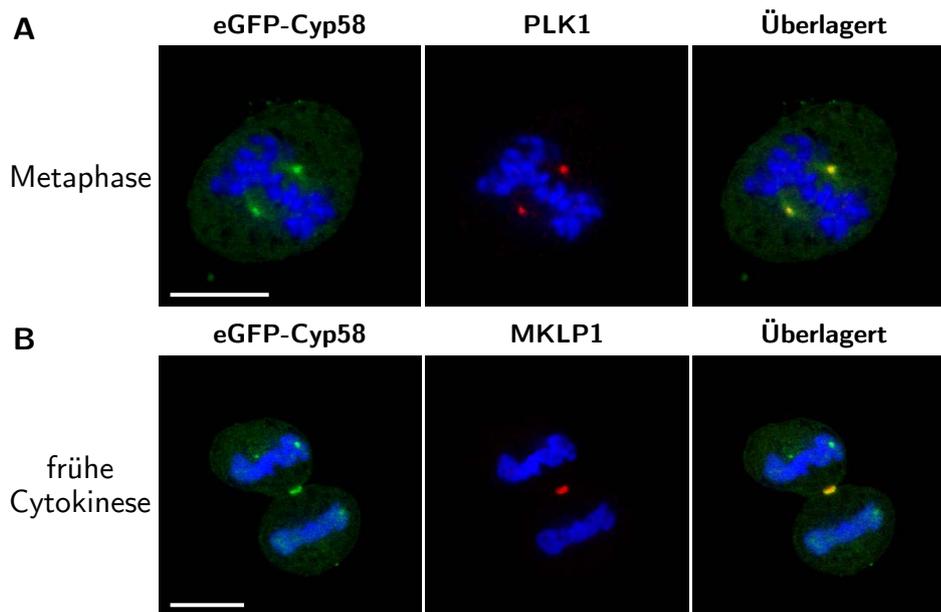


Abb. 3.46: Kolokalisation von eGFP-Cyp58 mit Markerproteinen. **A** Kolokalisation von eGFP-Cyp58 mit PLK1 an den Centrosomen. **B** Kolokalisation von eGFP-Cyp58 mit MKLP1 am Midbody. Exponentiell wachsende eGFP-Cyp58 exprimierende HeLa-Zellen wurden mit 4% w/v Paraformaldehyd fixiert und mit Methanol permeabilisiert. Die Färbung von DNA erfolgte mit DAPI, von PLK1 mit Anti-PLK1-AK und Rhodamine RedTM-X-konjugiertem Anti-Kaninchen-IgG-AK sowie von MKLP1 mit Anti-MKLP1-AK und Rhodamine RedTM-X-konjugiertem Anti-Kaninchen-IgG-AK. Die Untersuchung erfolgte durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie. Balken: 10 μ m.

3.13.6 Subzelluläre Lokalisation von Cyp58-Interaktionspartnern

Damit eine Interaktion von Cyp58 mit seinen Interaktionspartnern möglich ist, ist die räumliche Nähe der Proteine innerhalb der Zelle erforderlich. Deshalb wurde die subzelluläre Lokalisation von 14-3-3-Proteinen und SET-Protein bestimmt. Zur Untersuchung der Lokalisation von 14-3-3-Proteinen wurden HeLa-Zellen fixiert und permeabilisiert, die DNA durch DAPI-Färbung sichtbar gemacht und 14-3-3-Proteine durch indirekte Immunfluoreszenz gefärbt. Die Untersuchung der Lokalisation von SET-Protein erfolgte zusammen mit Cyp58 im Verlauf des Zellzyklus. Es wurde eGFP-Cyp58 in HeLa-Zellen transient exprimiert und nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen die DNA durch DAPI-Färbung sichtbar gemacht und SET-Protein

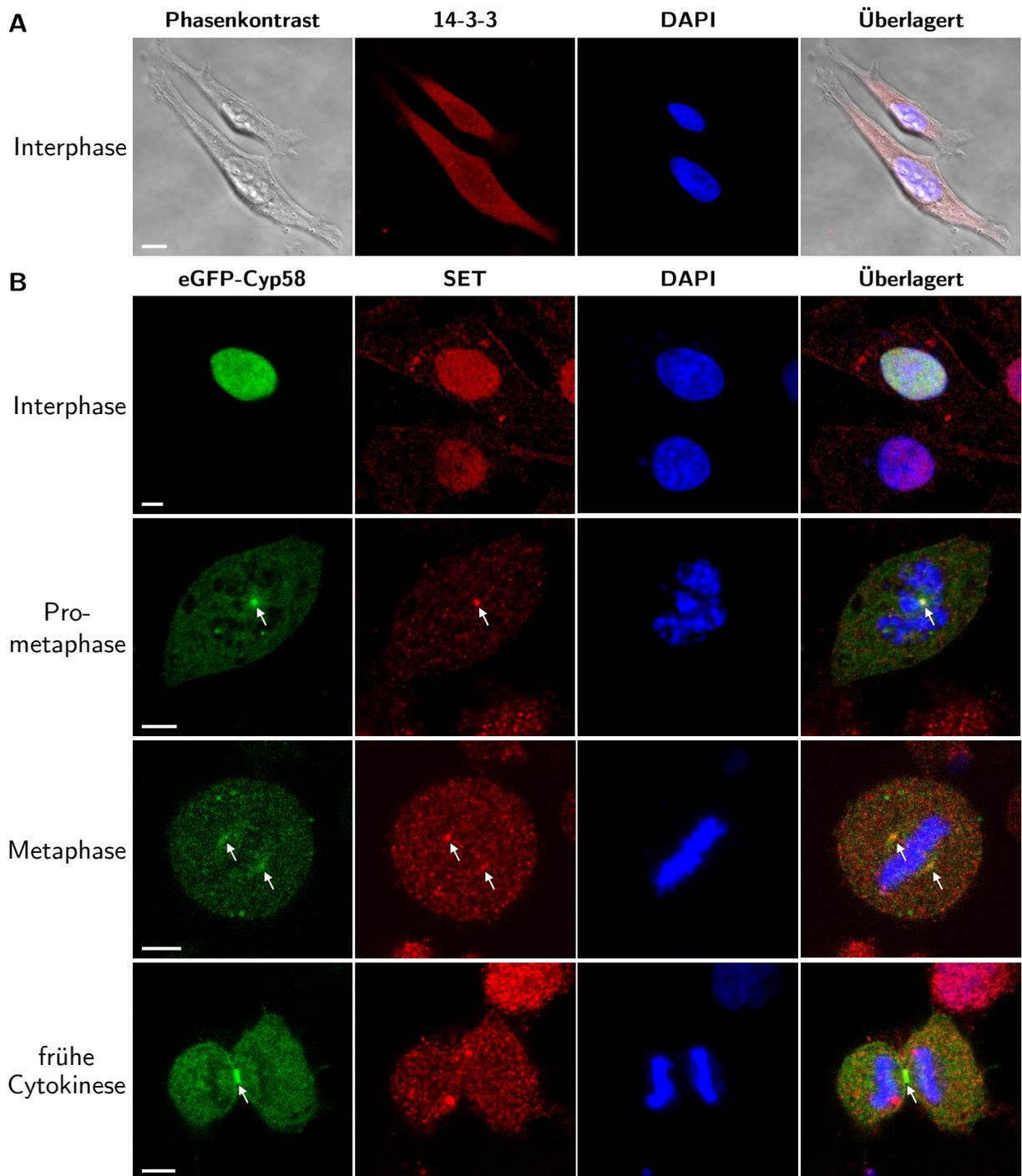


Abb. 3.47: Subzelluläre Lokalisation von 14-3-3-Proteinen (A) sowie von eGFP-Cyp58 und SET-Protein während des Zellzyklus (B). **A** Exponentiell wachsende HeLa-Zellen wurden mit 4 % w/v Paraformaldehyd fixiert und mit Methanol permeabilisiert. DNA wurde mit DAPI, 14-3-3-Proteine mit Anti-pan14-3-3-AK und TRITC-konjugiertem Anti-Maus-IgG-AK gefärbt. **B** Exponentiell wachsende eGFP-Cyp58 exprimierende HeLa-Zellen wurden mit 4 % w/v Paraformaldehyd fixiert und mit Methanol permeabilisiert. DNA wurde mit DAPI, SET-Protein mit Anti-SET-AK und Rhodamine Red™-X-konjugierten Anti-Kaninchen-IgG-AK gefärbt. Die Untersuchung erfolgte durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie. Weiße Pfeile markieren die bevorzugte Lokalisation von eGFP-Cyp58 und SET-Protein in den verschiedenen Phasen. Balken: 10 μm .

durch indirekte Immunfluoreszenz gefärbt. Die Untersuchung der Zellen erfolgte durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.

14-3-3-Proteine zeigten während der Interphase eine Verteilung innerhalb der gesamten Zelle mit einem verringerten Gehalt im Zellkern (Abb. 3.47A). Damit ist eine intrazelluläre Interaktion von kernlokalisierten 14-3-3-Proteinen mit nukleärem Cyp58 möglich.

Die subzelluläre Lokalisation von SET-Protein zeigte sich im Verlauf des Zellzyklus wenig veränderlich (Abb. 3.47B). In der Interphase war SET-Protein vornehmlich diffus im Zellkern lokalisiert. Während Prometaphase, Metaphase und früher Cytokinese war für den überwiegenden Teil von SET-Protein eine diffuse Verteilung im Cytoplasma zu beobachten, im Gegensatz zu eGFP-Cyp58 aber unabhängig von der Chromatin-Lokalisation. Zusätzlich zeigte sich in Prometa- und Metaphase eine deutliche Kolo-kalisation von SET-Protein mit eGFP-Cyp58 am Centrosom. Eine Midbody-Lokalisation, wie sie in der frühen Cytokinese für eGFP-Cyp58 auftrat, war für SET-Protein hingegen nicht zu beobachten. Damit liegt während des gesamten Zellzyklus eine räumliche Nähe von SET-Protein zu Cyp58 innerhalb der Zelle vor, wodurch eine intrazelluläre Interaktion beider Proteine ermöglicht wird.

3.13.7 Einfluss der Cyp58-Depletion auf die Lokalisation von SET-Protein

SET-Protein lokalisiert vornehmlich im Zellkern, kann aber unter bestimmten Bedingungen auch ins Cytoplasma migrieren [212]. Deshalb wurde untersucht, ob die Verringerung des Cyp58-Proteingehalts in HeLa-Zellen einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von SET-Protein hat. Zur Cyp58-Depletion wurden die Zellen mit drei verschiedenen siRNA-Duplexen gegen Cyp58 und siRNA_{scr} als Negativ-Kontrolle transient transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, die DNA durch DAPI-Färbung sichtbar gemacht und SET-Protein durch indirekte Immunfluoreszenz gefärbt. Die Untersuchung der Zellen erfolgte durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie. Parallel dazu wurde die Verringerung des Cyp58-Proteingehalts der HeLa-Zellen durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse gegen Anti-Cyp58-AK überprüft.

Die Western-Blot-Analyse der Zelllysate (Abb. 3.48A) bestätigte die Verringerung des Cyp58-Gehalts in den mit siRNA-Duplexen gegen Cyp58 behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen.

In Abbildung 3.48B ist die subzelluläre Lokalisation von SET-Protein in den mit den vier verschiedenen siRNA-Duplexen transfizierten HeLa-Zellen in jeweils zwei repräsentativen Ausschnitten wiedergegeben. In allen untersuchten Zellen lokalisierte SET-Protein überwiegend im Zellkern, nur ein geringer Teil lag im Cytoplasma vor. Zwischen den verschiedenen transfizierten Zellen waren kaum Unterschiede in der Verteilung von SET-Protein zwischen Zellkern und Cytoplasma auszumachen. Tendenziell war in den Zellen mit reduziertem Cyp58-Gehalt die Verteilung im Vergleich zu den Kontrollzellen leicht in Richtung Cytoplasma verschoben. Deshalb kann ein Einfluss von Cyp58 auf die subzelluläre Lokalisation von SET-Protein nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

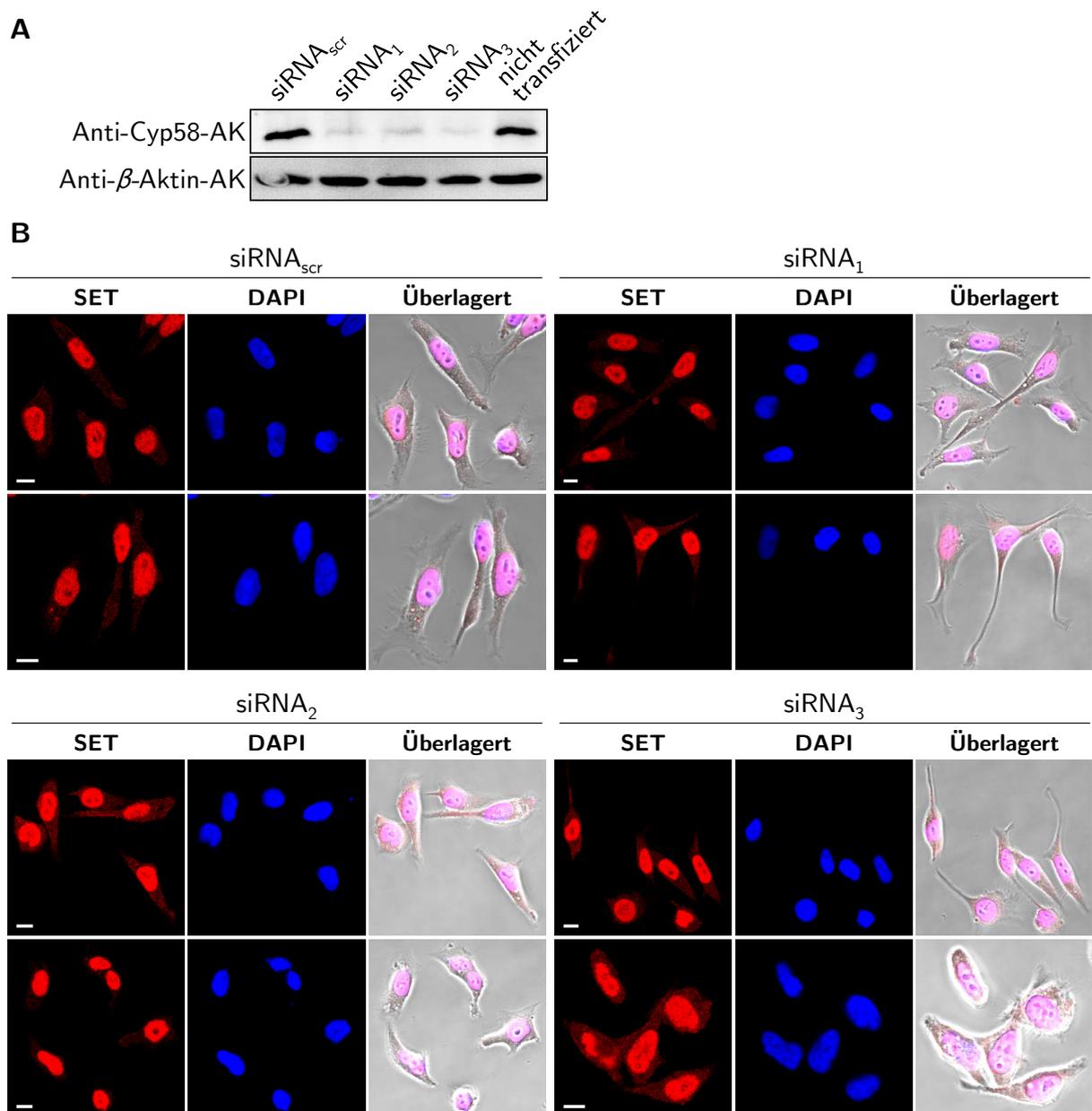


Abb. 3.48: Einfluss der Cyp58-Depletion auf die subzelluläre Lokalisation von SET-Protein. Exponentiell wachsende HeLa-Zellen wurden mit siRNA-Duplexen gegen Cyp58 transient transfiziert und nach 48 h sowohl geerntet als auch mit 4 % w/v Paraformaldehyd fixiert und mit Methanol permeabilisiert. **A** Cyp58-Proteingehalt der HeLa-Zellen. Zellysate wurden durch SDS-PAGE (10 %) und Western-Blot-Analyse gegen Anti-Cyp58-AK und Anti- β -Aktin-AK untersucht. **B** Jeweils zwei repräsentative Ausschnitte fixierter HeLa-Zellen. DNA wurde mit DAPI, SET-Protein mit Anti-SET-AK und Rhodamine RedTM-X-konjugierten Anti-Kaninchen-IgG-AK gefärbt. Die Untersuchung erfolgte durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie. Überlagert wurden Phasenkontrastbild (nicht gezeigt), SET-Immunfluoreszenz und DAPI-Färbung. Balken: 10 μ m.

4 Diskussion

Cyp58 ist ein Multidomänen-Cyclophilin, das über seine U-Box-Domäne E3-Aktivität aufweist [118]. Da Cyp58 bisher noch wenig charakterisiert ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit die proteinchemischen Eigenschaften von Cyp58 analysiert. Dabei konnte erstmals eine PPIase-Aktivität von Cyp58 gezeigt werden. Somit ist Cyp58 nach dem gegenwärtigen Wissensstand neben Cyp358 die einzige humane PPIase, die zwei katalytische Aktivitäten beherbergt. Für die beiden katalytischen Domänen wurde gezeigt, dass sie unabhängig voneinander arbeiten und sich gegenseitig nicht beeinflussen. Ein weiterer Fokus dieser Arbeit war die Identifizierung von Proteinen, die mit Cyp58 wechselwirken. Dabei konnten 14-3-3-Proteine und SET-Protein als Interaktionspartner von Cyp58 identifiziert werden. Als entscheidend für die Interaktion mit beiden Proteinen wurde die *C*-terminale Erweiterung der PPIase-Domäne von Cyp58 bestimmt.

4.1 Charakterisierung der Proteineigenschaften von Cyp58

Zur Analyse der Eigenschaften von Cyp58 wurde die in der Literatur beschriebene und nach UniProt-Datenbank als kanonisch angegebene Isoform des Enzyms kloniert [113, 118, 120, 121]. Die verwendete Isoform 1 unterscheidet sich in ihren *C*-terminalen 31 Aminosäuren von der um sieben Aminosäuren größeren Isoform 2. Die Reinigung von in *E. coli* exprimiertem, rekombinantem Cyp58 erfolgte unter Anwendung verschiedener Fusionssysteme und chromatographischer Trennverfahren. Durch die Verwendung einer His₆-SUMO-Fusion und von Puffern mit hoher Ionenstärke konnte die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen mit anschließender Rückfaltung vermieden und die Ausbeute an gereinigtem Protein deutlich gesteigert werden. Puffer mit hoher Ionenstärke wirkten sich positiv auf Löslichkeit und Ausbeute von Cyp58 aus. Außerdem konnte Cyp58 über das His₆-SUMO-Fusionssystem mit nativem *N*- und *C*-Terminus erhalten werden.

Zur Klärung der Domänenstruktur von Cyp58 wurde eine limitierte Proteolyse durchgeführt. Limitierte Proteolyse ist ein wichtiges Werkzeug zur Identifizierung von stabilen Strukturen innerhalb von Proteinen, wie sie Domänen darstellen. Dabei wird die erhöhte proteolytische Stabilität dieser kompakten Strukturelemente im Vergleich zu flexibleren, weniger strukturierten Bereichen genutzt [213]. Die limitierte Proteolyse von Cyp58 durch Trypsin resultierte in genau zwei definierten Fragmenten (Abb. 3.19A). Nach chromatographischer Trennung wurden diese beiden Fragmente mittels ESI-MS und ISD als U-Box- (Cyp58²⁶⁻¹³⁷) und PPIase-Domäne (Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹) von Cyp58 identifiziert. Die ermittelten Grenzen beider Domänen weichen deutlich von den in der UniProt-Datenbank angegebenen Domänengrenzen für U-Box- (Cyp58³⁵⁻¹⁰⁸) und PPIase-Domäne (Cyp58²⁷⁸⁻⁴³³) ab (Abb. 3.19C), beide durch limitierte Proteolyse identifizierte Domänen enthalten zusätzliche Aminosäuren. Die möglichen Schnittstellen für das für

Lysyl- bzw. Arginyl-Reste spezifische Trypsin sind unregelmäßig über die Cyp58-Sequenz verteilt. Dennoch befinden sich mehrere potentielle Schnittstellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu den in UniProt angegebenen Domänengrenzen. Am *N*-Terminus der in UniProt angegebenen U-Box-Domäne befinden sich Lys²⁶, Arg³⁵ und Arg³⁶ sowie am *C*-Terminus Arg¹²⁰ als Trypsin-sensitive Reste. Am *N*-Terminus der in UniProt angegebenen PPIase-Domäne befinden sich die Reste Lys²⁷⁷, Lys²⁷⁸ und Lys²⁷⁹ als potentielle Schnittstellen, am *C*-Terminus liegen keine weiteren basischen Schnittstellen vor. Das deutet darauf hin, dass *N*- und *C*-terminal der in UniProt angegebenen U-Box- und *N*-terminal der PPIase-Domäne weitere Aminosäurereste an der Ausbildung stabiler Domänenstrukturen beteiligt sind. Unter Verwendung der ermittelten Domänengrenzen wurden zur weiteren funktionalen Untersuchung der individuellen Domänen verschiedene Cyp58-Fragmente kloniert, exprimiert und gereinigt.

Für alle gereinigten Cyp58-Proteine und Cyp58-Fragmente wurde durch Fern-UV-CD-Spektroskopie die Ausbildung von Sekundärstrukturelementen bestätigt (Abb. 3.5A). Das Spektrum der PPIase-Domäne von Cyp58, His₆-Cyp58^{273–449}, zeigt nach Form und Signalintensität eine sehr hohe Ähnlichkeit zum Spektrum von Cyp18 [214, 215]. Da die PPIase-Domänen von Cyclophilinen alle sehr ähnliche dreidimensionale Strukturen besitzen, zeigt sich durch die vergleichbare Präsenz von Sekundärstrukturelementen die korrekte Faltung der PPIase-Domäne von Cyp58. Das Spektrum des Volllängenproteins unterscheidet sich hingegen deutlich vom Spektrum des Multidomänen-Cyclophilins Cyp40 [215]. Dieser Unterschied erklärt sich durch das Vorhandensein unterschiedlicher zusätzlicher *N*- und *C*-terminaler Bereiche, unter anderem der U-Box-Domäne von Cyp58 und den TPR-Motiven von Cyp40, die unterschiedliche Sekundärstrukturen ausbilden. Das Spektrum des U-Box-Domäne enthaltenden Fragments Cyp58^{1–272} zeigt mit seinem Minimum bei 205 nm deutliche Ähnlichkeit zu einem Fragment von ScPrp19 (Aminosäuren 1–133), das eine U-Box-Domäne enthält [216]. Daher kann auch für die U-Box-Domäne eine korrekte Faltung angenommen werden. Die algebraische Addition der Spektren des *N*- und des *C*-terminalen Fragments von Cyp58 resultiert in einem dem Volllängenprotein sehr ähnlichen Spektrum. Deshalb ist anzunehmen, dass beide Teile von Cyp58 unabhängige Domänen bilden, die ihre Sekundärstrukturzusammensetzung gegenseitig kaum beeinflussen.

Zusätzlich wurde die thermische Stabilität von Cyp58 und Cyp58-Fragmenten durch Fern-UV-CD-Spektroskopie untersucht (Abb. 3.5B). Cyp58^{1–272} zeigte mit einem Beginn der Denaturierung ab ca. 57 °C die höchste Stabilität verglichen mit ca. 49 °C für das Volllängenprotein sowie ca. 46 °C für His₆-Cyp58^{273–449} und His₆-Cyp58^{273–520}. Die für das Volllängenprotein und die PPIase-Domäne bestimmten Werte sind in guter Übereinstimmung mit der von DAVIS *et al.* für die PPIase-Domäne von Cyp58 bestimmten Stabilität bis 50,9 °C [56]. Durch die ermittelten thermischen Stabilitäten wurde der Erhalt der strukturellen Integrität der Proteine in allen in dieser Arbeit durchgeführten funktionalen Untersuchungen bestätigt.

Cyp58 als aktive PPIase

Cyclophiline zeichnen sich durch die Fähigkeit zur Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung von Prolyl-Bindungen aus. Eine PPIase-Aktivität wurde bisher für die Cyp58-Orthologen *CeCyp-4*, *DiCyp-3* und *AtCyp65* gezeigt [217–219]. DAVIS *et al.* konnten für die PPIase-Domäne von

Cyp58 in einer NMR-basierten Analyse keine enzymatische Aktivität nachweisen [56]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für Cyp58 eine PPIase-Aktivität mit einer katalytischen Effizienz von $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ gegenüber dem Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA bestimmt.

Die in den verschiedenen Untersuchungsmethoden ermittelten PPIase-Aktivitäten von Cyp58 unterscheiden sich voneinander (Tab. 3.2). Im Protease-freien PPIase-Test konnte gegenüber dem gleichen Substrat nur ca. 75 % der Aktivität des Protease-gekoppelten Tests erreicht werden. Beide Test-Systeme unterscheiden sich aufgrund der Gegenwart bzw. Abwesenheit hoher Konzentrationen an α -Chymotrypsin deutlich. Ein weiterer Unterschied besteht in der beobachteten Reaktion. Im Protease-gekoppelten PPIase-Test wird aufgrund der proteolytischen Spaltung des *trans*-Isomers nur die *cis*→*trans*-Isomerisierung beobachtet. Im Protease-freien Test wird hingegen als Geschwindigkeitskonstante die Summe der *cis*→*trans*- und der *trans*→*cis*-Isomerisierung beobachtet. JANOWSKI *et al.* haben für Cyp18 in beiden Untersuchungsmethoden ähnliche Spezifitätskonstanten, mit leicht höherer Aktivität im Protease-freien Test, ermittelt [179]. Eine mögliche Ursache der Unterschiede in den Aktivitätstests ist die proteolytische Freisetzung der PPIase-Domäne von Cyp58 durch α -Chymotrypsin im Protease-gekoppelten Test (Abb. 3.8), wenn diese eine höhere katalytische Effizienz als das Ursprungprotein besitzen würde. Allerdings zeigten sich die Aktivitätsunterschiede auch bei der Analyse der katalytischen Aktivität der PPIase-Domäne unter Verwendung von Trypsin als Hilfsprotease. Da Trypsin auch zur Festlegung der Domänengrenzen genutzt wurde, ist in diesem Experiment keine proteolytische Verkürzung der PPIase-Domäne zu erwarten. Deshalb ist die wahrscheinlichste Ursache für die Unterschiede in den Aktivitätstests, dass die Gegenwart hoher Konzentrationen eines zusätzlichen Proteins im Protease-gekoppelten Test die Aggregation von Cyp58 oder seine Adsorption an die Gefäßwände verhindert.

Der Unterschied zwischen der Aktivität im Protease-freien und der Aktivität im Fluoreszenzbasierten Protease-freien PPIase-Test beruht wahrscheinlich auf den verschiedenen, für diese Untersuchungsmethoden verwendeten Substraten. Diese unterscheiden sich in ihrem *N*-terminalen anionischen Succinyl- bzw. aromatischen 2-Aminobenzoyl-Rest. Das kann zu unterschiedlichen Affinitäten zu Cyp58 führen und damit die Spezifitätskonstante $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ beeinflussen.

Ob die ermittelte PPIase-Aktivität von Cyp58 der tatsächlichen Aktivität entspricht oder ob nur ein Teil des eingesetzten Cyp58 enzymatisch aktiv ist, konnte nicht bestimmt werden, da aufgrund der schwachen Bindung von CsA an Cyp58 (Abb. 3.9) eine Titration des aktiven Zentrums zur Bestimmung des Anteils an aktivem Enzym nicht möglich war.

Für Cyp58 und seine Fragmente wurde sowohl im Protease-gekoppelten als auch im Protease-freien Test eine Zunahme der PPIase-Aktivität mit steigender NaCl-Konzentration im Messansatz beobachtet. Eine Ausnahme zu dieser beobachteten Ionenstärke-Abhängigkeit bildet die PPIase-Aktivität von His₆-Cyp58²⁷³⁻⁴⁴⁹ im Protease-gekoppelten Test. Hier ist die PPIase-Aktivität völlig unabhängig von der Ionenstärke (Abb. 3.7). Damit ist die Ionenstärke-Abhängigkeit von Cyp58 höchstwahrscheinlich nicht auf nötige ionische Interaktionen, sondern auf Adsorptionseffekte in der Messküvette zurückzuführen. Hohe Ionenstärken verhindern die Adsorption von Cyp58 an die Gefäßwände. Das im Protease-gekoppelten Test eingesetzte α -Chymotrypsin, dessen Beitrag zur Ionenstärke im Messansatz zu vernachlässigen ist, verhindert ebenfalls die Adsorption, aber in geringerem Maße. Für das kleinste PPIase-Domänen-Fragment

His₆-Cyp58^{273–449} ist die Gegenwart von α -Chymotrypsin schon ausreichend auch ohne zusätzliches NaCl die Adsorption zu unterbinden und volle Aktivität zu zeigen. Für größere Fragmente ist die Anwesenheit von NaCl im Messansatz hingegen unverzichtbar.

Zur Einordnung der ermittelten enzymatischen Aktivität von Cyp58 ist in Tabelle 4.1 ein Vergleich mit bekannten Spezifitätskonstanten weiterer Cyclophiline angegeben. Cyp58 hat eine Aktivität in der gleichen Größenordnung wie andere Multidomänen-Cyclophiline. Cyp40, Cyp88, Cyp165 und Cyp358 zeigen katalytische Effizienzen im Bereich von 10^5 bis $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [58, 88, 96, 108]. Demgegenüber hat das prototypische Cyp18 mit einer katalytischen Effizienz von $1,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ eine 35-fach höhere Aktivität als Cyp58 [48]. Das Orthologe *Di*Cyp-3 zeigt eine sehr ähnliche Aktivität wie Cyp58 [218], während das Orthologe *Ce*Cyp-4 nur 5 % der Aktivität von Cyp58 aufweist [217].

Protein	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	rel. Aktivität (%)	Ref.
Cyp58	$4,0 \times 10^5$	100	
<i>Ce</i> Cyp-4	$1,9 \times 10^4$	5	[217]
<i>Di</i> Cyp-3	$3,9 \times 10^5$	98	[218]
Cyp40	$1,9 \times 10^6$	475	[58]
Cyp88	$1,0 \times 10^6$	250	[88]
Cyp165	$7,4 \times 10^5$	185	[108]
Cyp358	$8,3 \times 10^4$	21	[96]
Cyp18	$1,4 \times 10^7$	3500	[48]

Tab. 4.1: Vergleich der PPIase-Aktivität von Cyp58 mit seinen Orthologen, anderen humanen Multidomänen-Cyclophilinen und Cyp18. Bekannte Spezifitätskonstanten von rekombinanten Cyclophilinen oder deren PPIase-Domänen, bestimmt im Protease-gekoppelten PPIase-Test gegenüber dem Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA.

Cyp58 besitzt alle Aminosäurereste, die für Cyp18 als für die PPIase-Aktivität wichtig beschrieben wurden, mit Ausnahme von Trp¹²¹ [115, 185]. Dieser Rest ist in Cyp58 gegen einen Tyrosyl-Rest (Tyr³⁸⁹) ausgetauscht (Abb. 3.1). DAVIS *et al.* konnten durch den Austausch von Tyr³⁸⁹ gegen Trp in einer NMR-basierten Analyse eine enzymatische Aktivität der PPIase-Domäne von Cyp58 detektieren, was ihnen mit dem Wildtyp nicht möglich war [56]. Dieses Resultat unterstützt die Hypothese, dass dieser Rest einen großen Anteil an der deutlich verringerten Aktivität von Cyp58 im Vergleich zu Cyp18 hat. Bei Cyp18 führt der Austausch von Trp¹²¹ gegen Ala zu einer Reduktion der Aktivität auf 9 % [116].

In Cyp18 ist das Vorhandensein von Arg⁵⁵ entscheidend für die PPIase-Aktivität. Zur Erzeugung einer Cyp58-Variante mit verringerter PPIase-Aktivität wurde durch ortsspezifische Mutagenese Arg³²³ gegen Ala ausgetauscht. Für His₆-Cyp58-*Strep*II^{R323A} wurde eine Restaktivität von 3 % im Vergleich zum Wildtyp bestimmt (Tab. 3.5). In der Literatur ist für diesen Austausch in Cyp18 (Arg55Ala) eine Verringerung der PPIase-Aktivität auf 0,1 % beschrieben [115]. Diese im Vergleich zu Cyp18^{R55A} hohe Restaktivität von His₆-Cyp58-*Strep*II^{R323A} erklärt sich möglicherweise durch Kontaminationen aufgrund der Präparation aus *E. coli*. Cyp58 hat eine deutlich geringere Aktivität als Cyp18 und Kontaminationen damit einen verhältnismäßig größeren Anteil an der Gesamtaktivität. Für Cyp18^{R55A} wurde gezeigt, dass die Restaktivität von 0,1 % zum großen Teil auf Verunreinigungen durch *E. coli* CypA zurückzuführen ist und tatsächlich nur < 0,02 % Aktivität im Vergleich zu Cyp18^{wt} vorliegt [185].

Evaluierung der Substratspezifität von Cyp58

Die Substratspezifität von PPIasen wird in erster Linie durch den der Prolyl-Bindung vorausgehenden Aminosäurerest (P1-Position [186]) bestimmt [187]. Cyp58 bevorzugt Substrate, die ungeladene aliphatische Reste, wie Alanyl- oder Leucyl-Reste, in P1-Position aufweisen. Eine Präferenz für Alanyl-Prolyl-Bindungen ist auch für zahlreiche weitere Cyclophiline beschrieben [220, 221]. Substrate mit ungeladenem Glycyl- oder aromatischem Phenylalanyl- bzw. Histidyl-Rest werden durch Cyp58 deutlich schlechter umgesetzt als Substrate mit aliphatischem Rest in P1-Position. Zusätzlich zeigt Cyp58 eine Präferenz für den positiv geladenen Lysyl-Rest *N*-terminal zur Prolyl-Bindung. Das Substrat mit negativ geladenem Glutamyl-Rest wird hingegen von allen getesteten Substraten am schwächsten umgesetzt.

In Abbildung 4.1 ist die Substratspezifität von Cyp58 im Vergleich mit dem Orthologen *DiCyp-3* [218] und dem prototypischen Cyp18 [188] dargestellt. Cyp58 und Cyp18 zeigen eine nahezu identische Spezifität gegenüber Substraten mit ungeladenen aliphatischen und aromatischen Resten in P1-Position. *DiCyp-3* zeigt gegenüber diesen Substraten eine ähnliche Spezifität, Substrate mit aromatischen Resten in P1-Position werden von Cyp58 aber besser umgesetzt. Gegenüber Substraten mit geladenen Resten in P1-Position zeigt *DiCyp-3* eine ähnlich Präferenz wie Cyp58, aber in geringerem Maße. Im Gegensatz dazu zeigt Cyp18 eine diametrale Präferenz für diese Substrate. Cyp18 bevorzugt den negativ geladenen Glutamyl-Rest in P1-Position gegenüber dem positiv geladenen Lysyl-Rest.

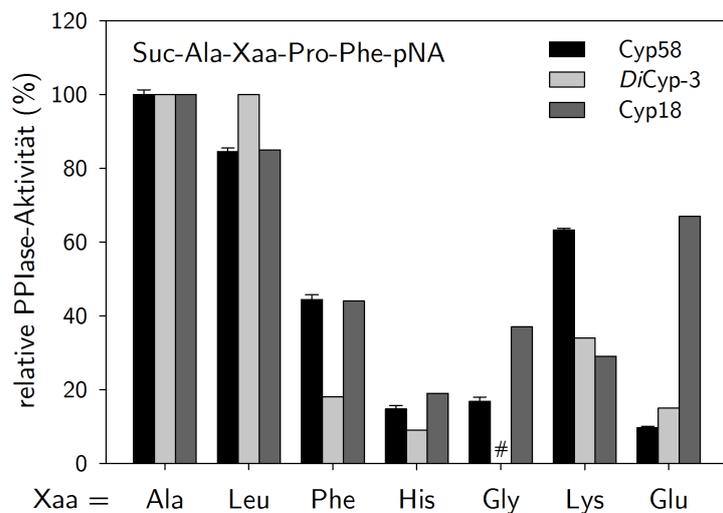


Abb. 4.1: Vergleich der Substratspezifitäten von Cyp58, *DiCyp-3* und Cyp18. Relative Aktivität im Proteasegekoppelten PPIase-Test gegenüber Substraten vom Typ Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA [188, 218]. # nicht bestimmt.

Im Gegensatz zum Aminosäurerest in P1-Position hat der Rest *C*-terminal zum Prolyl-Rest (P2'-Position) einen deutlich geringeren Einfluss auf die Aktivität von PPIasen [187]. Zusätzlich zu den Substraten mit aromatischem Phenylalanyl-Rest in P2'-Position wurde die Aktivität von Cyp58 gegenüber einem Substrat mit positiv geladenem Arginyl-Rest in dieser Position untersucht (Tab. 3.2). Dabei wurde eine Präferenz von Cyp58 für den Arginyl-Rest in P2'-Position festgestellt. Das ist in Übereinstimmung mit der für Cyp18 gemachten Beobachtung von SCHMIDPETER *et al.*, dass ähnliche Aminosäure-Austausche vor und nach dem Prolyl-Rest ähnliche Auswirkungen auf die Aktivität haben. Cyp18 bevorzugt Substrate mit Phenylalanyl-Rest in P2'- und P1-Position gegenüber Substraten mit Arginyl-Rest in diesen Positionen [187].

Aufgrund der Präferenz für Substrate mit Lysyl-Rest in P1-Position besitzt die PPIase-Aktivität von Cyp58 möglicherweise eine Funktion für die Aufrechterhaltung der korrekten Konformation von Prolyl-Bindungen in Zielsequenzen für die Ubiquitinylierung, die an Lysyl-Resten stattfindet. XU *et al.* haben in einer globalen Analyse von Ubiquitinylierungsstellen ein erhöhtes Auftreten von Lysin-Ubiquitinylierungen in Regionen festgestellt, die mit kleinen hydrophoben Resten, wie Ala, Leu, Gly, Pro und Val, angereichert sind [222]. Gegenüber Alanyl-, Leucyl- und Lysyl-Prolyl-Bindungen zeigte Cyp58 die höchste katalytische Effizienz.

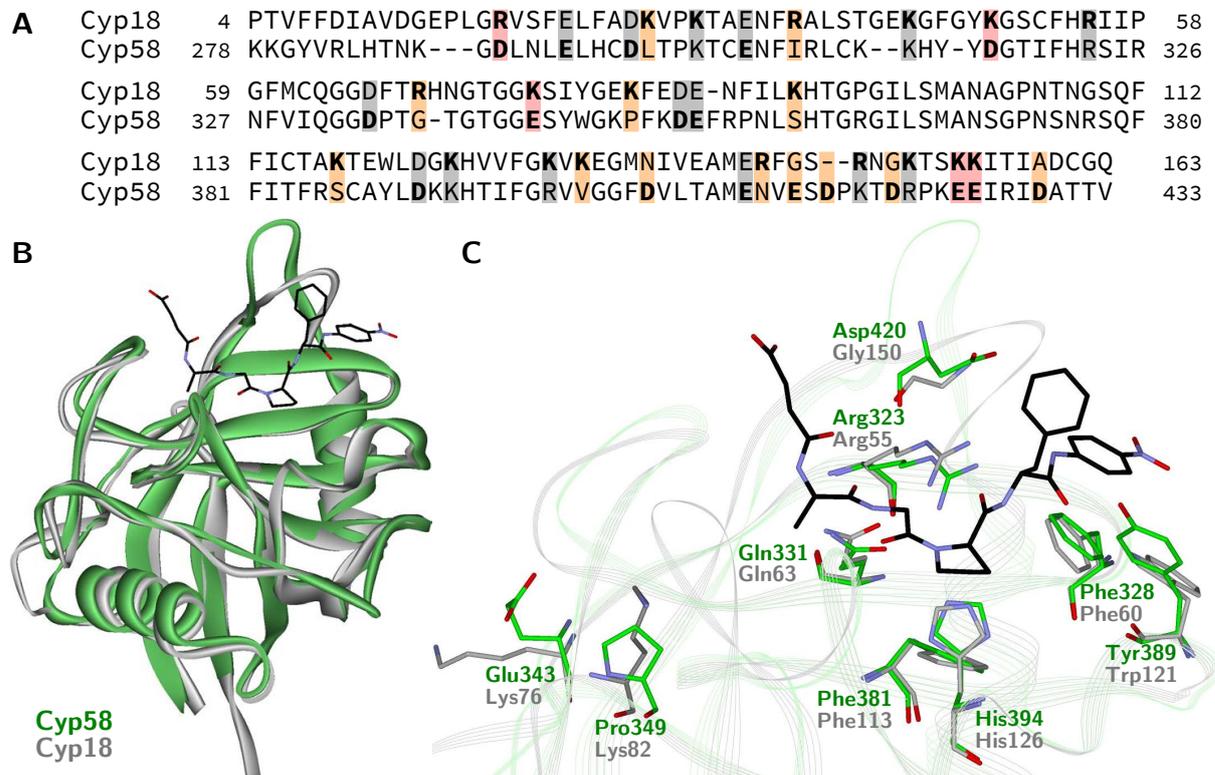


Abb. 4.2: Evaluierung der Substratspezifität von Cyp58. **A** Proteinsequenzvergleich von Cyp18 mit der PPIase-Domäne von Cyp58. Erstellt mit dem Programm ClustalW2. Positiv geladene Reste in Cyp18 und negativ geladene Reste in Cyp58 sind *fett* hervorgehoben. Austausch von positiven Resten in Cyp18 gegen negative in Cyp58 sind in *rot*, von positiven in Cyp18 gegen neutrale in Cyp58 oder negativen in Cyp58 gegen neutrale in Cyp18 in *orange*, kein Austausch der geladenen Reste oder Beibehaltung der Ladung in *grau* dargestellt. **B** Überlagerung der Kristallstrukturen von Cyp58^{280–435} in *grün* (PDB: 1ZKC) [56] und Cyp18 in *grau* mit gebundenem Substrat Suc-Ala-Gly-Pro-Phe-pNA in *schwarz* (PDB: 1ZKF). C_α- und C_β-Atome der Reste im aktiven Zentrum von Cyp18 (Arg⁵⁵, Phe⁶⁰, Gln⁶³, Phe¹¹³, Trp¹²¹, His¹²⁶) wurden manuell den C_α- und C_β-Atomen der Reste im aktiven Zentrum von Cyp58 (Arg³²³, Phe³²⁸, Gln³³¹, Phe³⁸¹, Tyr³⁸⁹, His³⁹⁴) angeglichen. **C** Aktives Zentrum von Cyp18 (*grau*) und Cyp58 (*grün*) mit gebundenem Substrat (*schwarz*). Dargestellt sind die überlagerten Reste des aktiven Zentrums und Positionen mit geladenen Resten im Bereich von 16 Å vom Gly-C_α-Atom in P1-Position (Glu³⁴³/Lys⁷⁶, Pro³⁴⁹/Lys⁸², Asp⁴²⁰/Gly¹⁵⁰).

Als strukturelle Ursache der diametralen Präferenzen von Cyp58 und Cyp18 für geladene Reste in P1-Position des Substrats können Unterschiede in der Ladungsverteilung im aktiven Zentrum der beiden Enzyme vermutet werden. Dabei ist sowohl ein direkter Austausch eines positiv geladenen Rests im aktiven Zentrum von Cyp18 gegen einen negativ geladenen in Cyp58, aber auch nur der Verlust eines positiv geladenen Rests in Cyp18 oder ein zusätzlicher negativ geladener Rest in Cyp58 denkbar. Der Proteinsequenzvergleich beider Proteine (Abb. 4.2A) zeigt

fünf positiv geladene Reste von Cyp18, die in Cyp58 gegen negativ geladene Reste ausgetauscht sind. Acht weitere positive Reste von Cyp18 liegen in Cyp58 als neutrale Reste vor. Cyp58 besitzt vier positiv geladene Reste, die in Cyp18 durch neutrale Reste ersetzt sind, und einen zusätzlichen positiven Rest.

Bei der Überlagerung der Kristallstrukturen von Cyp18 mit gebundenem Substrat Suc-Ala-Gly-Pro-Phe-pNA und der PPIase-Domäne von Cyp58 [56] (Abb. 4.2B&C) zeigen sich drei Aminosäurepositionen, die sich in der Nähe des aktiven Zentrums befinden und sich für die verschiedenen Präferenzen von Cyp58 und Cyp18 verantwortlich zeigen könnten: Glu³⁴³/Lys⁷⁶, Pro³⁴⁹/Lys⁸² und Asp⁴²⁰/Gly¹⁵⁰ (Cyp58/Cyp18). Die beiden erstgenannten Positionen haben mit mindestens 15 Å einen relativ großen Abstand zum C_α-Atom des Glycyl-Rests in P1-Position. Für den senkrecht zu P1 stehenden Rest Asp⁴²⁰ von Cyp58 beträgt dieser Abstand nur ca. 10 Å. Damit ist Asp⁴²⁰ die wahrscheinlichste Ursache für die Präferenz von Cyp58 für einen Lysyl-Rest in P1. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass *Di*Cyp-3 und Cyp18 in dieser Aminosäureposition einen Glycyl-Rest (Gly⁴²⁰/Gly¹⁵⁰) besitzen und beide eine sehr ähnliche Spezifität für Substrate mit einem Lysyl-Rest in P1 zeigen (Abb. 4.1). Bei der Diskussion der Ausrichtung und Abstände der Aminosäurereste muss jedoch beachtet werden, dass die Kristallstrukturen nur den Grundzustand von Protein und gebundenem Substrat wiedergeben. Ob während der Katalyse eine Konformationsänderung des aktiven Zentrums stattfindet und welche Konformation der Enzym/Substrat-Komplex im Übergangszustand annimmt, ist nicht bekannt.

Cyp58 als Cyclophilin mit schwacher CsA-Bindung

Cyclophiline verdanken ihren Namen der Bindung von CsA, die zur Inhibition ihrer PPIase-Aktivität führt [12–14]. Für die Inhibition der PPIase-Aktivität von Cyp58 durch CsA wurde im Protease-gekoppelten Test ein *IC*₅₀-Wert von 26,7 μM bestimmt. Im Fluoreszenz-basierten Protease-freien Test wurde mit *IC*₅₀-Werten von 10,2 und 11,4 μM für PPIase-Domäne bzw. Vollängenprotein hingegen eine 2,5-fach stärkere Inhibition gefunden (Abb. 3.9). In der Literatur sind für beide Untersuchungsmethoden ähnliche Konstanten für die Inhibition von Cyclophilinen durch CsA beschrieben [179]. Deshalb ist der Unterschied wahrscheinlich auf die verschiedenen Ionenstärken in den verwendeten Messpuffern zurückzuführen. Eine Erhöhung der Ionenstärke verstärkt die inhibitorische Kraft von CsA gegenüber Cyp58.

Tabelle 4.2 gibt einen Überblick über die inhibitorische Wirkung von CsA auf die enzymatische Aktivität von verschiedenen Cyclophilinen. Im Vergleich zu anderen Cyclophilinen wird die PPIase-Aktivität von Cyp58 nur sehr schwach durch CsA inhibiert. Tatsächlich zeigt Cyp58 unter den bisher charakterisierten humanen Cyclophilinen die geringste Empfindlichkeit gegenüber CsA. Die Inhibitionskonstante liegt vier Größenordnungen über der von Cyp18 [55]. Für das Orthologe *Di*Cyp-3 ist mit einer Inhibitionskonstante größer 100 μM eine noch schwächere Bindung von CsA beschrieben [218].

Als Ursache für die schwache Bindung von CsA können Aminosäure-Austausche im aktiven Zentrum von Cyp58 vermutet werden. PFLÜGL *et al.* identifizierten 13 Reste im aktiven Zentrum von Cyp18, die an der Bindung von CsA beteiligt sind [224]. Zehn dieser Reste sind in Cyp58 konserviert. Unter den drei in Cyp58 nicht konservierten Resten von Cyp18 (Met⁶¹, Ala¹⁰³, Trp¹²¹)

Protein	IC_{50}/K_d (nM)	homol. Position zu Cyp18 Trp ¹²¹	Ref.
Cyp58	$2,7 \times 10^4$	Tyr ³⁸⁹	
<i>Di</i> Cyp-3	$> 1 \times 10^5$	Tyr ³⁹⁰	[218]
Cyp18	2,9	Trp ¹²¹	[55]
Cyp18.1	$1,4 \times 10^4$	His ¹¹⁰	§
Cyp18.2a	9,8	Trp ¹²¹	[55]
Cyp19.2	91	Trp ¹³³	[55]
Cyp22	6,7	Trp ¹⁶³	[55]
Cyp22a	7,7	Trp ¹⁵⁵	[55]
Cyp23	8,4	Trp ¹⁶¹	[55]
Cyp33	37,3	Trp ²⁵⁷	[223]
Cyp40	247	His ¹⁴¹	§
Cyp73	168 [#]	Trp ⁶⁰¹	[56]
Cyp88	220	His ¹³³	[88]
Cyp165	770	His ¹³²	[108]

Tab. 4.2: Inhibition der PPIase-Aktivität von Cyclophilinen durch CsA. Bekannte Inhibitions- bzw. Bindekonstanten von CsA gegenüber rekombinanten Cyclophilinen oder deren PPIase-Domänen, bestimmt im Protease-gekoppelten bzw. Protease-freien PPIase-Test gegenüber dem Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA oder durch ITC.

§ persönl. Mitteilung von Dr. C. SCHIENE-FISCHER
bestimmt durch ITC

gilt Trp¹²¹ als kritischer Rest für die hochaffine Bindung von CsA an Cyp18. Für den Austausch von Cyp18 Trp¹²¹ zu Ala ist eine Erhöhung der Inhibitionskonstante um das 200-fache beschrieben [116]. Dieser Rest, der auch einen großen Einfluss auf die PPIase-Aktivität von Cyp18 hat, ist in Cyp58 durch einen Tyrosyl-Rest ersetzt. Auch in anderen Cyclophilinen ist Cyp18 Trp¹²¹ durch Tyrosyl- oder Histidyl-Reste ersetzt. Der Vergleich der Inhibitionskonstanten von CsA gegenüber verschiedenen Cyclophilinen zeigt in Bezug auf diese Aminosäureposition einen klaren Trend (Tab. 4.2). Ein Tryptophyl-Rest in dieser Position ist mit Inhibitionskonstanten im ein- und zweistelligen nanomolaren Bereich optimal für die CsA-Bindung. Ein Histidyl-Rest führt hingegen zu einer um ein bis zwei Größenordnungen schwächeren CsA-Bindung. Cyp58 und sein Orthologes *Di*Cyp-3 können mit ihrem Tyrosyl-Rest CsA nur noch sehr schwach binden. DAVIS *et al.* konnten für Cyp58 keine Bindung von CsA durch ITC nachweisen, nach Austausch von Tyr³⁸⁹ gegen His bzw. Trp aber eine Bindung im einstelligen mikromolaren Bereich (K_d von $6,6 \mu\text{M}$ bzw. $1,6 \mu\text{M}$) erzielen [56]. Diese Aminosäureposition ist also sehr wichtig für die CsA-Bindung von Cyclophilinen, die Einführung eines Tryptophyl-Rests in dieser Position ist aber allein nicht ausreichend für eine CsA-Bindung im nanomolaren Bereich. Andere Reste müssen ebenfalls einen wichtigen Beitrag leisten.

Aufgrund der schwachen Bindung von CsA an Cyp58 waren verschiedene funktionale Untersuchungen, wie die Titration des aktiven Zentrums oder die selektive Inhibition von Cyp58 im zellulären System, nicht durchführbar. Deshalb wurde nach einem potenten Inhibitor für Cyp58 gesucht. Die untersuchten CsA-Derivate, hochpotente Inhibitoren von Cyp18, zeigten zwar eine stärkere Bindung an Cyp58 als CsA, ein hochaffiner Inhibitor konnte aber nicht identifiziert werden (Abb. 3.11).

Cyp58 als aktive Ubiquitin-Protein-Ligase

Cyp58 verfügt neben seiner PPIase-Domäne über eine U-Box-Domäne. U-Box-Domänen-Proteine sind Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3), von denen einige zusätzlich als E4 die Polyubiquitinierung von bereits durch andere E3 ubiquitinylierte Proteine vermitteln können [118, 147]. HATAKEYAMA *et al.* und WIBORG *et al.* haben für Cyp58 und sein Orthologes *AtCyp65* bereits eine E3-Aktivität gezeigt. Dazu wurde ein *in vitro*-Aktivitätstest verwendet, der *E. coli*-Lysat als Ziel für die Ubiquitinierung nutzt [118, 219]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die E3-Aktivität von Cyp58 durch Autoubiquitinierung gezeigt. Die Eigenschaft von E3, ihre eigene Ubiquitinierung zu fördern, wird häufig genutzt, um E3-Aktivität *in vitro* zu zeigen, besonders wenn physiologische Substrate unbekannt sind [193].

HATAKEYAMA *et al.* haben für Cyp58 eine Präferenz für UbcH2B, UbcH3 und UbcH7 bestimmt [118]. Die Untersuchung der Autoubiquitinierung von Cyp58 (Abb. 3.13) zeigte ebenfalls eine hohe E3-Aktivität in Gegenwart von UbcH3, aber auch in Gegenwart von UbcH5a, UbcH5b, UbcH5c, UbcH6 und UbcH10. In Anwesenheit von UbcH1, UbcH2, UbcH7, UbcH8 und UbcH13 war hingegen nur eine geringe Autoubiquitinierung von Cyp58 zu beobachten.

Die Autoubiquitinierung erzeugte vornehmlich zwei Spezies mit größerer molekularer Masse als Cyp58. Die kleinere der beiden Spezies entspricht ihrer durch das Laufverhalten in der SDS-PAGE charakterisierten molekularen Masse nach einem monoubiquitinylierten Cyp58. Die größere Spezies entspricht entweder einem diubiquitinylierten oder einem di-monoubiquitinylierten Cyp58. Durch Monoubiquitinierung können viele zelluläre Prozesse, wie subzelluläre Lokalisation, DNA-Reparatur, Histon-Funktion, Genexpression oder Rezeptor-vermittelte Endozytose, regulieren werden [161, 225]. Mono- und Multi-Monoubiquitinierung kann aber auch zum proteasomalen Abbau von Proteinen führen [134]. Da bei der Autoubiquitinierung von Cyp58 höhermolekulare Spezies nur in geringem Maße auftreten, muss der Anbau von Ubiquitin an Cyp58 weitere Ubiquitinierungen blockieren.

Für das hier verwendete *in vitro*-Ubiquitinierungssystem wurde UbcH3 als E2 ausgewählt, da sowohl in den Autoubiquitinierungsexperimenten als auch in der Literatur eine hohe Präferenz von Cyp58 für UbcH3 gezeigt wurde [118]. Gestützt wird diese Wahl durch die Identifizierung von UbcH3 als potentiellen Interaktionspartner von Cyp58 (Tab. 3.6). UbcH3 ist bekannt dafür, in *S. cerevisiae* zusammen mit dem SCF-Komplex als E3 den Ubiquitin-abhängigen Abbau des Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitors Sic1 zu vermitteln, der essentiell für den Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus ist [226]. UbcH3 kann ausschließlich Lys⁴⁸-verknüpfte Ubiquitinketten erzeugen, wie sie für den proteasomalen Abbau von Zielproteinen notwendig sind [227]. Daher lässt sich für Cyp58 eine Funktion im intrazellulären Proteinabbau vermuten.

Zur Bestimmung der durch Autoubiquitinierung modifizierten Lysyl-Reste von Cyp58 wurde ein Alaninscan der vier wahrscheinlichsten Modifizierungspositionen durchgeführt (Abb. 3.17). Die vier Lys→Ala-Einzelvarianten zeigten jedoch keine Verringerung der Autoubiquitinierung von Cyp58. Das deutet darauf hin, dass die Modifizierung an Positionen stattfindet, für die eine geringe Wahrscheinlichkeit der Ubiquitinierung vorhergesagt wurde. Bei der Vierfachvariante konnte eine leichte Verringerung der Autoubiquitinierung beobachtet werden. Das lässt eine teilweise Ansteuerung dieser vier untersuchten Reste als Modifizierungspositionen vermuten. Es

können aber nur maximal zwei modifizierte Reste pro Cyp58-Molekül vorliegen, da die Auto-ubiquitylierung vornehmlich zu mono-, di-mono- oder diubiquityliertem Cyp58 führt. Somit kann angenommen werden, dass nicht ein einzelner Lysyl-Rest von Cyp58 das Ziel der Auto-ubiquitylierung ist, sondern mehrere Ubiquitylierungsstellen alternativ angesteuert werden können.

Analyse einer funktionalen intramolekularen Domäneninteraktion

Die in Cyp58 vorliegende Kombination von PPIase- und U-Box-Domäne auf einer Polypeptidkette lässt eine funktionale Kopplung beider Domänen vermuten. Deshalb wurde sowohl der Einfluss der U-Box-Domäne auf die PPIase-Aktivität als auch der Einfluss der PPIase-Aktivität auf die Autoubiquitylierung von Cyp58 untersucht.

Der Vergleich der PPIase-Aktivität von Cyp58-Fragmenten unterschiedlicher Domänen-Zusammensetzung (Tab. 3.2) zeigte kaum Unterschiede zwischen Proteinen mit und ohne zusätzlicher U-Box-Domäne. In parallelen Untersuchungen, in denen ein starker Überschuss an isolierter U-Box-Domäne gegenüber der isolierten PPIase-Domäne vorlag (Abb. 3.12), konnte ebenfalls kein Einfluss der U-Box-Domäne auf die enzymatische Aktivität der PPIase-Domäne von Cyp58 festgestellt werden. Auch die Inhibition der PPIase-Aktivität durch CsA wurde durch die Anwesenheit der U-Box-Domäne nicht beeinflusst, da für die isolierte PPIase-Domäne und das Volllängenprotein ähnliche Inhibitionskonstanten ermittelt wurden (Abb. 3.9).

Für die Untersuchung des Einflusses der PPIase-Aktivität auf die Autoubiquitylierung von Cyp58 wurde mit His₆-Cyp58-*StrepII*^{R323A} eine Variante generiert, deren PPIase-Aktivität stark verringert ist (Tab. 3.5). Beim Vergleich der Autoubiquitylierung von His₆-Cyp58-*StrepII*^{R323A} mit dem Wildtyp zeigten sich keine Unterschiede im Zeitverlauf und im Muster der Ubiquitylierung (Abb. 3.18). Somit konnte in diesem Experiment kein Einfluss der PPIase-Aktivität auf die Autoubiquitylierung von Cyp58 festgestellt werden. Aufgrund der vorhandenen PPIase-Restaktivität von His₆-Cyp58-*StrepII*^{R323A} von ca. 3% ist es aber möglich, dass diese Aktivität ausreichend ist, die E3-Aktivität von Cyp58 aufrecht zu erhalten. Zusätzlich wurde die Auto-ubiquitylierung von Cyp58 und einem Cyp58-Fragment, dem die PPIase-Domäne fehlt (His₆-SUMO-Cyp58¹⁻²⁷²), vergleichend untersucht (Abb. 3.16). Dabei war die Autoubiquitylierung von His₆-SUMO-Cyp58¹⁻²⁷² deutlich geringer als beim Volllängenprotein, führte aber ebenfalls zu zwei distinkten Produkten. Dies könnte einen Einfluss der PPIase-Aktivität auf die Auto-ubiquitylierung von Cyp58 vermuten lassen. His₆-SUMO-Cyp58¹⁻²⁷² stehen aber im Vergleich zu Cyp58 aufgrund der kürzeren Sequenz weniger mögliche Modifizierungspositionen zur Verfügung und wahrscheinlich unterscheiden sich auch die Stabilitäten beider Proteine. Deshalb können aus diesem Vergleich nur begrenzt Rückschlüsse auf den Einfluss der PPIase-Aktivität auf die Autoubiquitylierung von Cyp58 gezogen werden.

Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit keine gegenseitige Beeinflussung der funktionalen Domänen von Cyp58 nachgewiesen werden. Das deutet darauf hin, dass beide Domänen unabhängig voneinander arbeiten. Eventuelle synergistische Effekte könnten sich aber bei der Interaktion mit spezifischen Substraten ergeben.

Cyp58 als monomeres Protein

E3-Proteine sind bekannt dafür, Dimere zu bilden. Für RING-Domänen-Proteine sind sowohl Homodimere, wie das Rag1-Dimer, also auch Heterodimere, wie die Brca1/Bard1- oder Ring1b/Bmi1-Dimere, beschrieben [194]. Die U-Box-Domänen-Proteine CHIP und *ScPrp19* bilden Homodimere aus. Bei CHIP erfolgt die für die E3-Aktivität essentielle Dimerisierung über zwei verschiedene Segmente, die U-Box-Domäne und eine *coiled coil*-Region [228, 229]. *ScPrp19* dimerisiert ebenfalls über die U-Box-Domäne, bindet über eine *coiled coil*-Region aber ein weiteres *ScPrp19*-Dimer zu einem Tetramer [216]. Die U-Box-Domäne von Ube4B dimerisiert hingegen nicht [230, 231]. Für CHIP und *ScPrp19* gilt die *coiled coil*-Region als hauptsächliche Ursache für die Dimerisierung [228, 232]. Die Neigung der U-Box-Domänen zur Dimerisierung ist deutlich schwächer und wird erst durch *coiled coil*-Regionen-induzierte räumliche Nähe von U-Box-Paaren deutlich gesteigert [216].

Die Dimerisierung der U-Box-Domäne von *ScPrp19* basiert auf einer Gruppierung von vier langen hydrophoben Aminosäureresten (Leu¹⁵, Ile²², Val⁵¹, Ile⁵³) [216]. Cyp58 besitzt in diesen Positionen drei lange hydrophobe Reste und ein Cysteinyln-Rest (Cys⁵⁴, Val⁶⁰, Ile⁸⁹, Leu⁹¹) und damit eine potentielle Dimerisierungsoberfläche. Außerdem verfügt Cyp58 über eine potentielle *coiled coil*-Region als weitere Möglichkeit der Dimerisierung.

Initiale Untersuchungen zum oligomeren Zustand von Cyp58 durch Größenausschluss-Chromatographie und BN-PAGE (Abb. 3.20 & 3.21) ließen einen dimeren Zustand des Proteins vermuten. Diese beiden Methoden sind aber abhängig von der Gestalt des untersuchten Proteins. Deshalb erfolgte zusätzlich eine Untersuchung durch analytische Ultrazentrifugation (Abb. 3.21). Für Cyp58 wurde unter der verwendeten Konzentration (5 μ M) ein monomerer Zustand bestimmt. Der durch NIKOLAY *et al.* erbrachte Nachweis der Dimerisierung von CHIP über die *coiled coil*-Region fand im gleichen Konzentrationsbereich (2–8 μ M) statt [228]. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass Cyp58 als Monomer vorliegt. Das Migrationsverhalten von Cyp58 in Größenausschluss-Chromatographie und BN-PAGE deutet auf einen deutlich höheren hydrodynamischen Radius hin als für ein monomeres globuläres Protein dieser molekularen Masse zu erwarten wäre. Das legt eine gestreckte Form von Cyp58 nahe.

Cyp58 im zellulären System

Cyp58 ist ein in höheren Eukaryoten konserviertes Protein [39, 117], was auf eine wichtige biologische Funktion hindeutet. Das Fehlen eines Cyp58-Orthologen in *S. cerevisiae* lässt eine Funktion in einem Stoffwechselweg vermuten, der nicht in *S. cerevisiae* vorkommt. Damit ist Cyp58 wahrscheinlich keine essentielle Komponente des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS), da *S. cerevisiae* über ein solches verfügt [233]. Zur Untersuchung der Relevanz von Cyp58 für die Zelle wurde sowohl zusätzliches FLAG-Cyp58 in HeLa-Zellen exprimiert als auch der Cyp58-Gehalt durch RNAi erheblich reduziert. Dies hatte weder einen Einfluss auf die Lebensfähigkeit noch wurde das Wachstum der Zellen spürbar beeinflusst (Abb. 3.43). Ein Einfluss auf die Morphologie der Zellen konnte ebenfalls nicht festgestellt werden (Abb. 3.48). Diese Resultate sind in Übereinstimmung mit der in der Literatur beschriebenen funktionellen Redundanz von PPIasen. Die Gen-Deletionen aller zwölf Cyclophiline und FKBP in *S. cerevisiae* beeinflusste die

Lebensfähigkeit von Hefen kaum [32]. Einzig das verbliebene Pin1-Orthologe Ess1 ist essentiell in *S. cerevisiae* [234]. Der durch Gen-Deletion erzeugte Verlust von Ess1 konnte jedoch durch die Überexpression des Cyp18-Orthologen Cpr1 ausgeglichen werden [33]. Da die innerhalb dieser Arbeit durchgeführte Cyp58-Depletion durch RNAi nicht vollständig war, ist es aber möglich, dass der Restgehalt an Cyp58 ausreichend war, die zellulären Funktionen aufrecht zu erhalten. So wurde für Ess1 beschrieben, dass weniger als 400 Moleküle pro Zelle für das Wachstum von *S. cerevisiae* ausreichend sind [235].

Für Cyp58 wurde sowohl eine nukleäre Lokalisation als auch eine gleichmäßige Verteilung zwischen Zellkern und Cytoplasma beschrieben [113, 118, 121]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch die transiente Expression einer eGFP-Fusion in HeLa-Zellen die bevorzugte subzelluläre Lokalisation von Cyp58 im Zellkern bestätigt (Abb. 3.44).

Während Mitose und Cytokinese zeigt eGFP-Cyp58 eine veränderliche subzelluläre Lokalisation (Abb. 3.45). In Meta-, Ana- und Telophase lokalisierte eGFP-Cyp58 zusammen mit dem β -Tubulin des Spindelapparats. Diese Kolo-kalisation ist in Übereinstimmung mit der Identifizierung von Tubulinen als potentielle Cyp58-Interaktionspartner (Tab. 3.6). Außerdem lokalisierte eGFP-Cyp58 in der Metaphase an den Centrosomen (Abb. 3.46A). Centrosomen sind die wichtigsten Mikrotubuli-organisierenden Zentren in tierischen Zellen und spielen eine wichtige Rolle für die Funktion des Spindelapparats, die asymmetrische Zellteilung, die Cilienbildung und die Zellzyklus-Regulation. Das Centrosom besteht aus zwei Centriolen, die von einer dichten Proteinmatrix, dem pericentriolären Material (PCM), umgeben sind. Das PCM ist als eine aus *coiled coil*-Proteinen bestehende fibröse Struktur beschrieben, die zu Beginn der Mitose an Größe zunimmt (Centrosomen-Reifung) [236, 237]. Cyp58 enthält eine potentielle *coiled coil*-Region und tritt wahrscheinlich erst im Zuge der Centrosomen-Reifung zum PCM, da die Centrosomen-Lokalisation nur während der Mitose zu beobachten ist. Das PCM fungiert als Verankerung und Keim für die Mikrotubuli-Nukleation, bindet regulatorische Komponenten für diese und beeinflusst die Kontrolle der Centriolen-Zahl [236, 237]. Die Ubiquitin-Ligase-Aktivität von Cyp58 könnte ebenfalls eine Rolle bei der Centrosomen-Reifung spielen. Für das RING-E3 Brca1/Bard1 wurde die Ubiquitylierung von γ -Tubulin beschrieben, was zur Inhibition der Mikrotubuli-Nukleationsaktivität des Centrosoms führt [238].

Während der frühen Cytokinese fand eine Lokalisation von eGFP-Cyp58 am Midbody statt (Abb. 3.46B). Der Midbody ist die zentrale Region der interzellulären Brücke zwischen kurz vor der Teilung stehenden Zellen und beinhaltet Proteine, die unverzichtbar für Cytokinese, Zellteilung und Chromosomen-Segregation sind [239]. Am Midbody konzentrieren sich E1 und das Proteasom, was auf eine erhöhte Aktivität des UPS hindeutet [240, 241]. Das RING-E3 BRUCE lokalisiert ebenfalls am Midbody und wurde als wichtiger Regulator für die Abtrennung der Tochterzellen identifiziert [242].

BANNON *et al.* haben für Cyp18 eine dem eGFP-Cyp58 sehr ähnliche subzelluläre Lokalisation während Mitose und Cytokinese beschrieben. Cyp18 lokalisiert während der Metaphase und der frühen Anaphase an den Centrosomen und den Spindelpolen, migriert in der späten Anaphase zur Spindel-*midzone* und in der Telophase zum Midbody. Die PPIase-Aktivität von Cyp18 ist nicht notwendig für die Lokalisation an Centrosomen und Midbody, aber essentiell für den zeitlichen Abschluss der Cytokinese [243].

Die Analyse der subzellulären Lokalisation von endogenem Cyp58 war aufgrund zu geringer Spezifität des Anti-Cyp58-AK nicht möglich. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Zellzyklus-abhängige Lokalisation von Cyp58 auf die exogen exprimierte eGFP-Fusion zurückzuführen ist. Der Nachweis von centrosomaler bzw. Midbody-Lokalisation über eGFP-Fusionsproteine ist aber eine übliche Methode [242–244].

Bei der Untersuchung des Cyp58-Proteingehalts von HeLa-Zellen im Verlauf des Zellzyklus wurde besonders in der G2/M-Phase ein leicht erhöhter Gehalt beobachtet (Abb. 3.41). Im Anschluss an die G2/M-Phase war der Cyp58-Gehalt am geringsten. Der erhöhte Gehalt von Cyp58 während der G2/M-Phase ist in Übereinstimmung mit der veränderlichen subzellulären Lokalisation während Mitose und Cytokinese und lässt eine Funktion in dieser Zellzyklusphase vermuten. Nach der Zellteilung wird Cyp58 wahrscheinlich nicht mehr benötigt und abgebaut. RUSTICI *et al.* haben für das Cyp58-Orthologe *SpCyp8* einen kaum veränderten mRNA-Gehalt im Verlauf des mitotischen Zellzyklus gezeigt [233, 245]. Das lässt eine posttranslationale Regulation des Cyp58-Proteingehalts vermuten. Das bisher einzige beschriebene Zellzyklus-regulierte Cyclophilin ist Cyp88, das während der Mitose spezifisch phosphoryliert wird [246]. Hinweise auf eine Phosphorylierung von Cyp58 haben sich aber nicht ergeben. Ein verändertes Laufverhalten in der SDS-PAGE, das häufig als Indiz für Phosphorylierung zu finden ist, konnte für endogenes Cyp58 weder im Verlauf des Zellzyklus noch im Vergleich zu nicht phosphoryliertem rekombinantem Cyp58 beobachtet werden.

4.2 Protein-Protein-Interaktionen von Cyp58

Um weitere Hinweise auf die zelluläre Funktion von Cyp58 zu erhalten, war ein Ziel dieser Arbeit die Identifizierung von Proteinen, die mit Cyp58 wechselwirken. Durch Pulldown/MS-Experimente wurden nukleäre Proteine als auch Chaperone, Ubiquitylierungs-, Struktur- und Signaltransduktionsproteine als potentielle Interaktionspartner von Cyp58 identifiziert (Tab. 3.6). Die Identifizierung von nukleären Proteinen und einem Importin ist in Übereinstimmung mit der Kernlokalisation von Cyp58. Die identifizierten Ubiquitylierungsproteine, Spleißfaktoren und hnRNP stehen im Einklang mit der vermuteten Funktion von Cyp58 im UPS bzw. Spleißosom [76]. Für Cyp18 wurde ebenfalls eine Interaktion mit hnRNP A2 beschrieben [247]. Auch die Interaktion mit verschiedenen Hitzeschockproteinen, die häufig gemeinsam in Heterokomplexen aufgefunden werden, stimmt mit der bereits beschriebenen Interaktion von Cyp58 mit Hsp90 [120] überein. Die potentielle Interaktion mit Tubulinen wird gestützt durch die Koloalysierung von Cyp58 mit β -Tubulin während der Mitose (Abb. 3.45). Für die PPIasen FKBP52 und Par17 sind ebenfalls Interaktionen mit Tubulinen beschrieben [248, 249].

Die meisten durch Pulldown/MS-Experimente identifizierten Peptide entfielen auf 14-3-3-Proteine und SET-Protein. Diese wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt. 14-3-3-Proteine werden häufig in Protein-Protein-Interaktionsstudien als Bindepartner identifiziert [195, 196]. Deshalb wurde die Ausbildung dieser Komplexe durch verschiedene Interaktionsstudien bestätigt.

Interaktion von Cyp58 mit 14-3-3-Proteinen

14-3-3-Proteine sind eine Familie von ubiquitären eukaryotischen Proteinen mit einer sehr großen Anzahl an beschriebenen Bindepartnern. Viele Interaktionspartner von 14-3-3-Proteinen sind in Primärmetabolismus, Signaltransduktion, Transkription oder Transport involviert. Im Menschen gibt es sieben 14-3-3-Protein-Isoformen, die sowohl als Homodimere als auch als Heterodimere in spezifischen Kombinationen vorliegen. Für 14-3-3-Proteine sind drei Kategorien von zellulären Funktionen beschrieben: (1) Induktion von Konformationsänderungen in gebundenen Proteinen, zur Beeinflussung von deren Struktur und katalytischer Aktivität; (2) Maskierung von Signalsequenzen oder Interaktionsstellen gebundener Proteine, unter anderem zur Beeinflussung von deren subzellulärer Lokalisation; (3) Koordination von Protein-Protein-Interaktionen über die dimere Struktur von 14-3-3-Proteinen [195].

14-3-3-Proteine sind dafür bekannt, ihre Liganden über Phospho-Seryl- oder Phospho-Threonyl-Motive zu binden [250, 251]. Da das zur Detektion der Interaktion mit 14-3-3-Proteinen verwendete Cyp58 nach heterologer Expression in *E. coli* nicht phosphoryliert vorliegt (Tab. 3.1), muss diese Interaktion phosphorylierungsunabhängig sein. Eine solche Interaktion ist möglich, es wurden bereits zahlreiche nicht-phosphorylierte Bindepartner von 14-3-3-Proteinen beschrieben [252]. So bindet 14-3-3-Protein ζ phosphorylierungsunabhängig (Bindemotiv: DALDL) die ADP-Ribosyltransferase Exoenzym S (ExoS), ein durch *Pseudomonas aeruginosa* sekretiertes Cytotoxin [253, 254]. Die Aktivität von ExoS ist abhängig von der Bindung an 14-3-3-Proteine und führt zum Zelltod [255, 256]. Weitere Beispiele sind die Bindung von 14-3-3-Protein ζ am C-Terminus der GPIb α -Untereinheit des Thrombozyten-Membranrezeptor-Komplexes Glycoprotein Ib-IX-V (Bindemotiv: GHSL) [257, 258] sowie die Bindung und Aktivierung der 43-kDa-Inositol-polyphosphat-5-phosphatase durch 14-3-3-Protein ζ (Bindemotiv: RSESEE) [259].

Im zellulären Kontext sind 14-3-3-Proteine räumlich in der Lage, mit dem kernlokalisierten Cyp58 in Kontakt zu treten. Im Rahmen dieser Arbeit zeigten Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von 14-3-3-Proteinen eine Verteilung innerhalb der gesamten Zelle. Sie sind auch im Zellkern zu finden, jedoch in geringerem Maße als im Cytoplasma (Abb. 3.47A). Auch in der Literatur sind zahlreiche Interaktionen mit nukleären Proteinen belegt, obwohl eine überwiegend cytosolische Lokalisation von 14-3-3-Proteinen in Interphase-Zellen beschrieben ist [260]. DU *et al.* haben gezeigt, dass 14-3-3-Protein ζ in der Metaphase mit dem Spindelapparat assoziiert ist und sich während der Cytokinese am Midbody konzentriert [261]. Damit ist in Mitose und Cytokinese eine Interaktion mit dem an Centrosom und Midbody lokalisierten Cyp58 möglich.

Interaktion von Cyp58 mit SET-Protein

SET wurde erstmals als transloziertes putatives Onkogen in akuter undifferenzierter Leukämie identifiziert [262]. Seitdem wurden für SET-Protein zahlreiche zelluläre Funktionen beschrieben, verbunden mit verschiedenen alternativen Bezeichnungen. SET-Protein (TAF-I, *template activating factor I*) stimuliert als Wirtsfaktor, durch Interaktion mit viralen basischen Proteinen, die Initiation und die Elongation der DNA-Replikation von Adenoviren [263]. Als putativer cytoplasmatischer Ligand des MHC-Klasse-II-Rezeptors (PHAPII, *putative HLA class II associated protein II*) ist SET-Protein möglicherweise in die Signaltransduktion involviert [264].

Für SET-Protein sind zwei Isoformen beschrieben, die sich in einer kurzen *N*-terminalen Region unterscheiden. Zur näheren Untersuchung der Interaktion mit Cyp58 wurde Isoform 2 von SET-Protein (TAF-I β) gewählt, da diese in HeLa-Zellen eine stärkere Expression zeigte (Abb. 3.40) und besser untersucht ist als Isoform 1.

SET-Protein und das ebenfalls als potentieller Cyp58-Interaktionspartner identifizierte nukleäre Phosphoprotein pp32 (I $_1^{PP2A}$, PHAPI) sind Hauptkomponenten des nukleären *inhibitor of acetyltransferase* (INHAT)-Komplexes. INHAT bindet an Histone und blockiert so den Zugang für Histon-Acetyltransferasen. Dies verhindert die Dekondensation von Chromatin und führt zu Transkriptionsrepression [203]. Zusätzlich interagieren SET-Protein und pp32 mit Histon-Deacetylasen. In diesem Zusammenhang wird eine Funktion als Vermittler transkriptioneller Repression diskutiert [265]. SET-Protein wurde außerdem als Chromatin-Umgestaltungsfaktor identifiziert, der als Histon-Chaperon Histone zu nackter DNA transferieren kann [202, 266]. Im Gegensatz zur Funktion von INHAT wurde für SET-Protein auch eine Chromatin-Dekondensationsaktivität und eine Funktion als Aktivator der Transkription beschrieben [201, 267]. SET-Protein bindet bevorzugt an Histon H3, kann aber auch die anderen Kern-Histone binden [200]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Cyp58 auf die Bindung der Histone H3 und H2B an SET-Protein durch Pulldown-Analyse untersucht. Die SET/Histon-Interaktion wurde jedoch durch die Gegenwart von Cyp58 nicht beeinflusst (Abb. 3.34).

Bereits für mehrere PPIasen wurde gezeigt, dass sie eine Funktion bei der Chromatin-Umgestaltung und einen Einfluss auf die Genexpression haben. Das FKBP Fpr4 aus *S. cerevisiae* hat Histon-Chaperon-Aktivität und ist notwendig für die Genrepression am rDNA-Lokus. Beide Funktionen werden durch die PPIase-Domäne von ScFpr4 reguliert [268, 269]. ScFpr4 bindet die Histone H3 und H4 und katalysiert die Isomerisierung von Prolyl-Bindungen im *N*-Terminus von Histon H3. Diese Isomerisierung führt zur Inhibition der Histon-Methylierung eines benachbarten Lysyl-Rests und verhindert damit die Transkription [270]. *S. cerevisiae* CypA reguliert mithilfe seiner PPIase-Aktivität das meiotische Genprogramm, um eine effiziente Sporulation zu begünstigen. Dazu interagiert ScCypA mit den die Meiose kontrollierenden Histon-Deacetylase-Komplexen Sin3-Rpd3 und Set3C und reguliert deren Aktivität in Gen-Silencing [33, 271]. Das Cyp73-Orthologe in *A. thaliana*, AtCyp71, ist als Repressor für homöotische Gene essentiell für die Pflanzen-Organogenese. AtCyp71 interagiert mit Histon H3 und beeinflusst die Histon-Methylierung am Ziellokus [272]. Außerdem interagiert AtCyp71 mit LHP1 und CAF-1, wichtige Faktoren für Histon-Modifikation bzw. Chromatin-Assemblierung, und hilft diese zum Chromatin zu dirigieren [273]. Cyp33 reguliert über seine PPIase-Aktivität die Konformation der Histon-Methyltransferase MLL1, zur Ausbildung eines ternären Komplexes von Cyp33, MLL1 und methyliertem Histon H3. Dieser Komplex führt durch Rekrutierung von Histon-Deacetylasen zu einer Genrepression *in vivo* [83, 84]. Für Cyp358 wurde die SUMOylierung der Histon-Deacetylase 4 gezeigt, notwendig für volle Histon-Deacetylase- und Transkriptionsrepressionsaktivität [274]. Aufgrund dieser Beispiele ist für Cyp58 als Interaktionspartner von SET-Protein ebenfalls eine Funktion bei der Chromatin-Umgestaltung denkbar, auch weil sich Histon H2B unter den potentiellen Interaktionspartnern von Cyp58 befindet. Experimentelle Hinweise, wie die Beeinflussung des Zellwachstums, sind jedoch für eine solche Funktion nicht detektiert worden.

Als weitere Eigenschaft von SET-Protein (I_2^{PP2A}) ist eine spezifische, nicht-kompetitive Inhibition von PP2A ($IC_{50} = 2 \text{ nM}$) beschrieben [204, 205]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine Inhibition von PP2A durch SET-Protein erzielt werden (Abb. 3.35). Deshalb konnte auch nicht untersucht werden, ob Cyp58 SET-Protein bei dieser Inhibition beeinflussen kann. Mögliche Ursachen für die fehlende PP2A-Inhibition sind in den Eigenschaften der verwendeten Komponenten SET-Protein und PP2A zu suchen. Für SET-Protein ist keine enzymatische Aktivität beschrieben, die eine native Faltung für rekombinant gewonnenes His₆-SET-Protein bestätigen könnte. Es konnte aber die Ausbildung von Sekundärstrukturelementen gezeigt werden (Abb. A.2B Anhang). Der verwendete *N*-terminale His₆-tag für SET-Protein hat wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Inhibition [275], auch wenn eine *N*-terminale GST-Fusion zum Verlust der Inhibitor-Aktivität führt [276]. In der Literatur wurden ähnliche Reaktionsbedingungen und das gleiche Substrat für die PP2A-Inhibition verwendet [204]. Somit ist die verwendete PP2A die wahrscheinlichste Ursache für die fehlende Inhibition. PP2A wird durch verschiedene regulatorische Untereinheiten und post-translationale Modifikationen (Phosphorylierung, Methylierung) stark in ihrer Substratspezifität, subzellulären Lokalisation und katalytischen Aktivität reguliert [277]. Die verwendete PP2A entstammt aus Schweinehirn und hat damit eventuell eine andere Untereinheiten-Zusammensetzung oder einen anderen Modifizierungsstatus als die in der Literatur verwendete PP2A aus Rinderniere bzw. -herz [204, 275]. Die verschiedenen Ursprungsorganismen spielen wahrscheinlich keine Rolle, da PP2A hoch konserviert ist [277].

SET-Protein ist in den Stoffwechselweg des Caspase-unabhängigen Zelltods involviert. Beim Angriff von cytotoxischen T-Lymphozyten auf Zellen werden Granzyme, Serin-Proteasen aus intrazellulären Granula, in die Zielzelle injiziert. Eines der Ziele von Granzym A (GzmA) ist SET-Protein in einem cytosolischen Multiproteinkomplex (270–420 kDa), welcher auch die DNase GAAD (*Granzyme A-activated DNase*) enthält. GzmA hydrolysiert SET-Protein vornehmlich *C*-terminal des Rests Lys¹⁷⁶, was in *N*- und *C*-terminalen Spaltprodukten mit 21 und 13 kDa resultiert. Das 21-kDa-Fragment kann durch Spaltung nach Lys⁷ und Lys¹¹ weiter verkürzt werden. Die Spaltung von SET-Protein bewirkt die Wanderung von GAAD und einem Spaltprodukt von SET-Protein in den Zellkern und führt zu Einzelstrangbrüchen in chromosomaler DNA. Somit wirkt SET-Protein als DNase-Inhibitor [207–209]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Cyp58 einen Einfluss auf die Proteolyse von SET-Protein durch GzmA hat. Die Spaltung von His₆-SET-Protein führte dabei zu drei Fragmenten (apparente molekulare Massen: 22–28 kDa), die wahrscheinlich dem beschriebenen 21-kDa-Hauptfragment und seinen beiden Degradationsprodukten entsprechen. Die Gegenwart von Cyp58 hatte keinen Einfluss auf die entstehenden Produkte und den Zeitverlauf der Proteolyse von SET-Protein (Abb. 3.36).

SET-Protein ist ubiquitär in verschiedenen Geweben und Zelllinien exprimiert [278]. Innerhalb der Zelle ist für SET-Protein sowohl eine bevorzugt nukleäre Lokalisation als auch eine Lokalisation in der perinukleären Region des Cytoplasmas beschrieben [208, 278]. Im Rahmen dieser Arbeit war SET-Protein während der Interphase zum überwiegenden Teil im Kern lokalisiert, wodurch eine Interaktion mit nukleärem Cyp58 möglich ist. In der Metaphase wurde eine Kolokalisation von SET-Protein und eGFP-Cyp58 an den Centrosomen beobachtet (Abb. 3.47). SET-Protein verfügt wie Cyp58 über eine *coiled coil*-Region und könnte ebenfalls über diese mit dem pericentriolären Material in Kontakt treten.

Für SET-Protein ist neben der Migration vom Cytosol in den Zellkern nach dem Angriff von cytotoxischen T-Lymphozyten auf die Zelle [209] auch eine Wanderung vom Zellkern ins Cytoplasma beschrieben. Nach Aktivierung der Rho-GTPase Rac1 transloziert SET-Protein vom Kern zur Zellmembran, um die Rac1-induzierte Zellwanderung zu verstärken [212]. In der hier vorliegenden Arbeit hatte die Depletion von Cyp58 keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von SET-Protein in HeLa-Zellen (Abb. 3.48).

Die Untersuchung des SET-Proteingehalts im Verlauf des Zellzyklus zeigte einen leichten Anstieg des Gehalts vom Beginn der S-Phase bis zum Maximum beim Übergang zwischen G2/M- und G1-Phase (Abb. 3.41). Cyp58 zeigte zum gleichen Zeitpunkt den geringsten Gehalt in der Zelle. Das deutet auf einen möglichen funktionalen Zusammenhang beider Proteine, besonders im Hinblick auf die vermutete Funktion von Cyp58 im UPS. Das Verhältnis beider SET-Protein-Isoformen blieb im Verlauf des Zellzyklus unverändert. Unterschiede in der ermittelten Zellzyklus-Abhängigkeit des SET-Proteingehalts im Vergleich zu Daten aus der Literatur können mit abweichender Durchführung der Experimente erklärt werden [210].

Charakterisierung der Interaktionen von Cyp58 mit Partnerproteinen

Aufgrund der Mehrdomänen-Struktur von Cyp58 stellte sich die Frage, welche Domäne an der Interaktion mit SET-Protein und 14-3-3-Proteinen beteiligt ist. Durch Pulldown-Experimente wurde sowohl für SET-Protein als auch für 14-3-3-Protein γ die C-terminale Erweiterung der PPIase-Domäne von Cyp58 (Cyp58⁴⁵⁰⁻⁵²⁰) als entscheidend für die Bindung identifiziert (Abb. 3.31 & 3.26). Dieser Bereich beinhaltet keine bekannten Interaktionsmotive und ist wahrscheinlich relativ unstrukturiert, da sie keine Protease-stabile Einheit während der durchgeführten limitierten Proteolyse bildete (Abb. 3.19). Die einzige Strukturinformation aus diesem Bereich ist die Existenz einer ausgedehnten α -Helix (Cyp58⁴³⁹⁻⁴⁵⁵) direkt C-terminal des konservierten Bereiches der PPIase-Domäne in der Kristallstruktur von Cyp58²⁸⁰⁻⁴⁵⁷ (Abb. 1.4) [56].

Ergänzend zu den Pulldown-Experimenten wurden Bindungsstudien mit Oligopeptid-Bibliotheken durchgeführt. Dabei wurden zahlreiche, über die gesamte Sequenz von Cyp58 verteilte Bereiche als potentielle Interaktionsstellen mit SET-Protein und 14-3-3-Protein β identifiziert (Abb. 3.32 & 3.27). Aufgrund der Ergebnisse aus den Pulldown-Analysen sind die Sequenzbereiche aus der C-terminalen Erweiterung der PPIase-Domäne von Cyp58 die wahrscheinlichsten Interaktionsstellen. Eine Beteiligung der Bereiche im N-terminalen Bereich von Cyp58 an der Bindung von Interaktionspartnern ist aber ebenfalls möglich, da die potentiellen Interaktionsstellen im nativen Cyp58 in räumlicher Nähe zueinander stehen und eine gemeinsame Bindeoberfläche bilden könnten. Um eine solche Möglichkeit genauer einschätzen zu können, fehlt aber eine Struktur von Vollängen-Cyp58. Mehrere Sequenzbereiche von Cyp58 wurden sowohl als potentielle Interaktionsstelle mit SET-Protein als auch mit 14-3-3-Protein β identifiziert. Das könnte ein Hinweis auf ein allgemeines Protein-Bindemotiv in Cyp58 sein.

Bedingt durch die Methode können Bindungsstudien mit Peptid-Bibliotheken zu falsch-positiven Resultaten führen. Die ermittelten potentiellen Interaktionsstellen müssen deshalb durch weitere Methoden validiert werden. Zwei der potentiellen Interaktionsstellen mit SET-Protein im C-terminalen Bereich von Cyp58 wurden ausgewählt, um ihre Relevanz für die Cyp58/SET-

Interaktion näher zu untersuchen. Durch den Austausch der Aminosäurereste in den ermittelten Positionen durch Alanyl-Reste und anschließender vergleichender Pulldown-Analyse konnte für die beiden Sequenzbereiche E⁴⁴⁸RKT⁴⁵¹ und E⁴⁵⁸TKV⁴⁶¹ von Cyp58 kein bedeutender Beitrag zur Interaktion mit SET-Protein festgestellt werden (Abb. 3.33). Deshalb sind zur Identifizierung der Interaktionsstellen zwischen Cyp58 und seinen Interaktionspartnern weitere Untersuchungen erforderlich.

In den Pulldown/MS-Experimenten zur Identifizierung von Cyp58-Interaktionspartnern wurden fünf der sieben humanen 14-3-3-Protein-Isoformen (β , γ , ζ , η , θ) spezifisch identifiziert. Interaktionen mit den anderen beiden Isoformen (ε , σ) sind aber nicht ausgeschlossen, da durch MS auch viele Peptide identifiziert wurden, die in mehreren 14-3-3-Protein-Isoformen konserviert sind (Abb. A.1 Anhang). Dieser Befund lässt vermuten, dass Cyp58 zwischen verschiedenen Isoformen nur wenig diskriminiert. Durch vergleichende Pulldown-Analysen mit vier verschiedenen 14-3-3-Protein-Isoformen wurde für Cyp58 eine ähnlich gute Bindung der untersuchten Isoformen mit leichter Präferenz für 14-3-3-Protein γ und β beobachtet (Abb. 3.25).

Die Untersuchung der Interaktionsstelle von 14-3-3-Protein β mit Cyp58 identifizierte Sequenzbereiche, die sich vornehmlich in der Ligandbindetasche von 14-3-3-Protein β befinden (Abb. 3.28). Drei identifizierte Bereiche beinhalten bzw. befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu den vier für die Phosphatbindung von phosphorylierten Liganden verantwortlichen Resten von 14-3-3-Protein β (Lys⁵¹, Arg⁵⁸, Arg¹²⁹, Tyr¹³⁰) [199]. Die Ligandbindetasche von 14-3-3-Proteinen ist hoch konserviert zwischen den verschiedenen Isoformen [195], was die geringe Diskriminierung von Cyp58 gegenüber diesen erklärt. Liganden zeigen häufig ähnliche Affinitäten zu mehreren Isoformen, wenn auch nicht zu allen. So binden die Proteinkinasen A-Raf und C-Raf sowie das pro-apoptotische Protein BAD die sieben 14-3-3-Protein-Isoformen annähernd gleich [279]. Auch das Docking-Protein Cas zeigt ähnliche Affinitäten für die Isoformen β , η und ζ , jedoch kaum Bindung von 14-3-3-Protein σ [280]. Das apoptotische Protein A20 wiederum bevorzugt deutlich die Isoformen η und ε über die Isoformen β , γ und ζ [281].

Interaktionspartner von Cyp58 sind potentielle Zielproteine der E3-Aktivität. Jedoch konnte weder für SET-Protein noch für 14-3-3-Proteine eine Ubiquitynylierung durch Cyp58 nachgewiesen werden (Abb. 3.37A). Möglicherweise sind weitere Faktoren für eine Ubiquitynylierung notwendig. Die Stabilität von SET-Protein und 14-3-3-Proteinen in der Zelle wurde durch Cyp58 aber nicht beeinflusst (Abb. 3.40 & 3.42). Ubiquitynylierung ist eine gängige Histon-Modifikation, die mit der Veränderung der Nukleosomenstruktur in Verbindung gebracht wird [282]. Cyp58 zeigte keine Ubiquitynylierung von Histonen mit dem verwendeten E2 UbcH3 (Abb. 3.37B) und beeinflusste auch nicht die Stabilität der Histone H2B und H3 innerhalb der Zelle (Abb. 3.42). Die beobachtete Ubiquitynylierung von Histonen in Abwesenheit von Cyp58 begründet sich mit der beschriebenen Fähigkeit von UbcH3, Histone E3-unabhängig zu ubiquitynylieren [283].

Zusätzlich wurde untersucht, ob die Interaktionspartner von Cyp58 einen Einfluss auf dessen PPIase-Aktivität haben. Dabei konnte kein Einfluss von SET-Protein und 14-3-3-Proteinen auf die PPIase-Aktivität von Cyp58 gefunden werden (Abb. 3.38). Um proteolytischen Abbau im PPIase-Test auszuschließen, wurde eine Protease-freies Messsystem verwendet.

Cyp58 interagiert *in vitro* physikalisch mit SET-Protein und 14-3-3-Proteinen. Außerdem sind diese Interaktionen innerhalb der Zelle räumlich möglich. Ein funktionaler Zusammenhang zwi-

schen den Proteinen konnte aber nicht nachgewiesen werden. Für SET-Protein ist ein enormes Funktionsspektrum beschrieben, weshalb nur eine begrenzte Auswahl an Funktionen auf den Einfluss von Cyp58 untersucht werden konnte. 14-3-3-Proteine sind als Bindeproteine beschrieben, die Liganden in räumliche Nähe zueinander bringen können. Somit wäre eine Funktion von 14-3-3-Protein-Dimeren als Adaptoren zu PPIase-Substraten oder physiologischen Zielproteinen der E3-Aktivität von Cyp58 denkbar. Zur Bestimmung der physiologischen Relevanz dieser Protein-Interaktionen von Cyp58 sind weitere Studien erforderlich.

4.3 Cyp58 als Multidomänen-Protein

Mindestens zwei Drittel aller eukaryotischen Proteine sind Multidomänen-Proteine [284]. Diese haben gegenüber Einzeldomänen-Proteinen mehrere Besonderheiten. Durch die Vereinigung mehrerer Domänen auf einer Polypeptidkette wird eine funktionale Kopplung ermöglicht, die unter anderem zur allosterischen Regulation der katalytischen Aktivität beitragen kann. So wird die Aktivität der PPIase-Domäne von Cyp33 durch die Bindung von mRNA an sein RNA-Erkennungsmotiv stimuliert [82]. Die PPIase-Aktivität von FKBP38 wird wiederum erst durch die Komplexbildung mit Ca^{2+} /Calmodulin induziert [285]. Für Cyp58 wurde in der vorliegenden Arbeit keine gegenseitige Beeinflussung der beiden funktionalen Domänen festgestellt. Gegenüber spezifischen, noch unbekanntem Substraten könnte sich aber eine gegenseitige Beeinflussung der Ubiquitin-Protein-Ligase- und der PPIase-Aktivität ergeben.

Multidomänen-Proteine haben außerdem die Fähigkeit zur multivalenten Bindung von Liganden. Die Bindung von Partnerproteinen über mehrere Stellen in der Cyp58-Sequenz könnte eine vorteilhaftere Interaktion bewirken und die lokalen Konzentrationen beider Interaktionspartner erhöhen. Für das Zweidomänen-Parvulin Pin1 wurde von DAUM *et al.* eine stark erhöhte Ligandaffinität durch bivalente Bindung gezeigt [286]. So könnte neben der Häufigkeit des Zusammentreffens zwischen Substrat und PPIase-Domäne auch die Selektivität für Substrate erhöht und die katalytische Effizienz der PPIase-Domäne beeinflusst werden. Allerdings ist es nicht gelungen ein zelluläres Zielprotein als Substrat von Cyp58 zu identifizieren. Weder erfolgte eine Cyp58 vermittelte Ubiquitylierung der gefundenen Interaktionspartner noch konnte in ihrer Sequenz eine Prolyl-Bindung als Ziel der PPIase-Aktivität identifiziert werden. Daher konnte kein funktionales Zusammenspiel der Domänen von Cyp58 gegenüber Proteinsubstraten untersucht werden.

Ein weiterer Vorteil von Multidomänen-Proteinen ist die Möglichkeit, über Interaktionsdomänen Funktionen zu bestimmten Zellkompartimenten oder Signalwegen zu rekrutieren. Damit könnte für Cyp58 über die Interaktion der U-Box-Domäne mit E2-Proteinen eine Lokalisierung der PPIase-Aktivität zum UPS stattfinden. Dies würde sich mit der Beobachtung decken, dass Cyp58 eine breite Spezifität gegenüber verschiedenen E2-Proteinen zeigt. Genauso wäre auch der umgekehrte Fall möglich, dass eine Lokalisierung des UPS zu spezifischen Substraten der PPIase-Domäne von Cyp58 erfolgt. Die Identifizierung des C-terminalen Bereiches von Cyp58 als Vermittler der Bindung zu den Interaktionspartnern SET-Protein und 14-3-3-Proteinen deutet darauf hin, dass eine Verankerung von Cyp58 an bestimmten Zielproteinen unabhängig von den funktionalen Domänen erfolgen kann.

Zusammenfassung

Cyclophiline sind Faltungshelfer-Enzyme, die an einer Vielzahl zellulärer regulatorischer Prozesse beteiligt sind. Die Ubiquitin-Protein-Ligase Cyp58 ist ein in höheren Eukaryoten konserviertes Multidomänen-Cyclophilin, das aus einer *N*-terminalen U-Box-Domäne und einer *C*-terminalen PPIase-Domäne besteht. Das Ziel dieser Arbeit war eine proteinchemische Charakterisierung von Cyp58 sowie die Identifizierung von physiologischen Interaktionspartnern des Proteins.

- In der vorliegenden Arbeit wurde Cyp58 rekombinant in *E. coli* exprimiert und gereinigt.
- Für Cyp58 konnte erstmals eine PPIase-Aktivität mit einer katalytischen Effizienz von $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ gegenüber dem Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA gezeigt werden.
- Cyp58 bevorzugte sowohl Substrate mit ungeladenen aliphatischen als auch mit positiv geladenen Resten *N*-terminal zur Prolyl-Bindung.
- Die PPIase-Aktivität von Cyp58 konnte mit einem IC_{50} -Wert von $27 \mu\text{M}$ nur sehr schwach durch Cyclosporin A inhibiert werden.
- In einem Modellsystem für Ubiquitin-Protein-Ligase-Aktivität zeigte Cyp58 eine Auto-ubiquitylierung in Gegenwart aller Komponenten des Ubiquitylierungssystems.
- Nach Bestimmung der Domänengrenzen von Cyp58 durch limitierte Proteolyse wurden Cyp58-Fragmente, die die separate U-Box- und PPIase-Domäne enthalten, rekombinant in *E. coli* exprimiert und gereinigt.
- Cyp58 sowie seine beiden separaten Domänen wurden in Bezug auf eine funktionale Kopplung zwischen PPIase-Aktivität und Ubiquitin-Protein-Ligase-Aktivität analysiert. Dabei agierten beide Domänen unabhängig voneinander in den verwendeten Modell-Aktivitätstests. Weder hatte die PPIase-Aktivität einen Einfluss auf die Auto-ubiquitylierung von Cyp58 noch zeigte die U-Box-Domäne einen Einfluss auf die PPIase-Aktivität von Cyp58.
- Durch analytische Größenausschluss-Chromatographie, BN-PAGE und analytische Ultrazentrifugation wurde für Cyp58 ein monomerer Zustand mit einer gestreckten Form bestimmt.
- Mittels transienter Expression einer eGFP-Fusion in HeLa-Zellen wurde für Cyp58 in der Interphase eine diffuse Lokalisation im Zellkern mit Ausnahme der Nucleoli ermittelt. Während der Mitose wurde eGFP-Cyp58 im gesamten Cytoplasma vorgefunden mit einer teilweisen Kolokalisation mit den Centrosomen und dem β -Tubulin des Spindelapparats. Während der frühen Cytokinese lokalisierte eGFP-Cyp58 am Midbody.

- Die Untersuchung des Proteingehalts von Cyp58 im Verlauf des Zellzyklus zeigte eine leichte Erhöhung in der S-Phase unmittelbar nach Aufhebung des Thymidin-Blocks und in der G2/M-Phase. Der geringste Gehalt war im Anschluss an die G2/M-Phase zu beobachten.
- Das Wachstum und die Lebensfähigkeit von HeLa-Zellen wurde weder durch die zusätzliche Expression von FLAG-Cyp58 noch durch die Verringerung der Cyp58-Proteingehalts durch RNAi beeinflusst.
- Durch Pulldown/MS-Experimente wurden 14-3-3-Proteine und SET-Protein als Interaktionspartner von Cyp58 in HeLa-Zelllysat identifiziert.
- Cyp58 zeigte ähnliche Affinitäten zu verschiedenen 14-3-3-Protein-Isoformen.
- Die C-terminale Erweiterung der PPIase-Domäne von Cyp58 wurde als entscheidend für die Bindung von 14-3-3-Proteinen und SET-Protein identifiziert. Die Bindung von Cyp58 erfolgte über die Ligandbindetasche von 14-3-3-Proteinen.
- Weder für 14-3-3-Proteine noch für SET-Protein konnte ein Einfluss auf die PPIase-Aktivität von Cyp58 oder eine direkte Ubiquitinylierung durch Cyp58 beobachtet werden.
- Cyp58 hatte keinen Einfluss auf verschiedene Funktionen von SET-Protein, zeigte aber eine Kolokalisation mit SET-Protein an den Centrosomen während der Metaphase.

Literatur

1. BRANDTS, JF, HALVORSON, HR & BRENNAN, M. Consideration of the Possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. *Biochemistry* **14**, 4953–4963 (1975).
2. CRAVEUR, P, JOSEPH, AP, POULAIN, P, DE BREVERN, AG & REBEHMED, J. Cis-trans isomerization of omega dihedrals in proteins. *Amino Acids* **45**, 279–289 (2013).
3. STEIN, RL. Mechanism of enzymatic and nonenzymatic prolyl cis-trans isomerization. *Adv Protein Chem* **44**, 1–24 (1993).
4. SCHERER, G, KRAMER, ML, SCHUTKOWSKI, M, REIMER, U & FISCHER, G. Barriers to rotation of secondary amide peptide bonds. *J Am Chem Soc* **120**, 5568–5574 (1998).
5. FISCHER, G. Chemical aspects of peptide bond isomerisation. *Chem Soc Rev* **29**, 119–127 (2000).
6. WEISS, MS, JABS, A & HILGENFELD, R. Peptide bonds revisited. *Nat Struct Biol* **5**, 676 (1998).
7. JABS, A, WEISS, MS & HILGENFELD, R. Non-proline cis peptide bonds in proteins. *J Mol Biol* **286**, 291–304 (1999).
8. FISCHER, G, BANG, H & MECH, C. Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomed Biochim Acta* **43**, 1101–1111 (1984).
9. FISCHER, G & BANG, H. The refolding of urea-denatured ribonuclease A is catalyzed by peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *Biochim Biophys Acta* **828**, 39–42 (1985).
10. BÄCHINGER, HP. The influence of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase on the in vitro folding of type III collagen. *J Biol Chem* **262**, 17144–17148 (1987).
11. LANG, K, SCHMID, FX & FISCHER, G. Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature* **329**, 268–270 (1987).
12. HANDSCHUMACHER, RE, HARDING, MW, RICE, J, DRUGGE, RJ & SPEICHER, DW. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* **226**, 544–547 (1984).
13. FISCHER, G, WITTMANN-LIEBOLD, B, LANG, K, KIEFHABER, T & SCHMID, FX. Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* **337**, 476–478 (1989).
14. TAKAHASHI, N, HAYANO, T & SUZUKI, M. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* **337**, 473–475 (1989).
15. SIEKIERKA, JJ, HUNG, SH, POE, M, LIN, CS & SIGAL, NH. A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature* **341**, 755–757 (1989).
16. HARDING, MW, GALAT, A, UEHLING, DE & SCHREIBER, SL. A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* **341**, 758–760 (1989).
17. BIERER, BE, SOMERS, PK, WANDLESS, TJ, BURAKOFF, SJ & SCHREIBER, SL. Probing immunosuppressant action with a nonnatural immunophilin ligand. *Science* **250**, 556–559 (1990).
18. SIGAL, NH, DUMONT, F, DURETTE, P, SIEKIERKA, JJ, PETERSON, L, RICH, DH, DUNLAP, BE, STARUCH, MJ, MELINO, MR & KOPRAK, SL. Is cyclophilin involved in the immunosuppressive and nephrotoxic mechanism of action of cyclosporin A? *J Exp Med* **173**, 619–628 (1991).

19. LIU, J, FARMER, J Jr, LANE, WS, FRIEDMAN, J, WEISSMAN, I & SCHREIBER, SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**, 807–815 (1991).
20. O'KEEFE, SJ, TAMURA, J, KINCAID, RL, TOCCI, MJ & O'NEILL, EA. FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* **357**, 692–694 (1992).
21. CLIPSTONE, NA & CRABTREE, GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* **357**, 695–697 (1992).
22. BROWN, EJ, ALBERS, MW, SHIN, TB, ICHIKAWA, K, KEITH, CT, LANE, WS & SCHREIBER, SL. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* **369**, 756–758 (1994).
23. KOLETSKY, AJ, HARDING, MW & HANDSCHUMACHER, RE. Cyclophilin: distribution and variant properties in normal and neoplastic tissues. *J Immunol* **137**, 1054–1059 (1986).
24. SIEKIERKA, JJ, WIEDERRECHT, G, GREULICH, H, BOULTON, D, HUNG, SH, CRYAN, J, HODGES, PJ & SIGAL, NH. The cytosolic-binding protein for the immunosuppressant FK-506 is both a ubiquitous and highly conserved peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *J Biol Chem* **265**, 21011–21015 (1990).
25. FISCHER, G & AUMÜLLER, T. Regulation of peptide bond cis/trans isomerization by enzyme catalysis and its implication in physiological processes. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **148**, 105–150 (2003).
26. RAHFELD, JU, SCHIERHORN, A, MANN, K & FISCHER, G. A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **343**, 65–69 (1994).
27. HENNIG, L, CHRISTNER, C, KIPPING, M, SCHELBERT, B, RÜCKNAGEL, KP, GRABLEY, S, KÜLLERTZ, G & FISCHER, G. Selective inactivation of parvulin-like peptidyl-prolyl cis/trans isomerases by juglone. *Biochemistry* **37**, 5953–5960 (1998).
28. LU, KP, HANES, SD & HUNTER, T. A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* **380**, 544–547 (1996).
29. YAFFE, MB, SCHUTKOWSKI, M, SHEN, M, ZHOU, XZ, STUKENBERG, PT, RAHFELD, JU, XU, J, KUANG, J, KIRSCHNER, MW, FISCHER, G, CANTLEY, LC & LU, KP. Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science* **278**, 1957–1960 (1997).
30. ZHOU, XZ, KOPS, O, WERNER, A, LU, PJ, SHEN, M, STOLLER, G, KÜLLERTZ, G, STARK, M, FISCHER, G & LU, KP. Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Mol Cell* **6**, 873–883 (2000).
31. FISCHER, G. Peptidyl-prolyl cis/trans isomerases and their effectors. *Angew Chem Int Ed Engl* **33**, 1415–1436 (1994).
32. DOLINSKI, K, MUIR, S, CARDENAS, M & HEITMAN, J. All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13093–13098 (1997).
33. ARÉVALO-RODRÍGUEZ, M, CARDENAS, ME, WU, X, HANES, SD & HEITMAN, J. Cyclophilin A and Ess1 interact with and regulate silencing by the Sin3-Rpd3 histone deacetylase. *EMBO J* **19**, 3739–3749 (2000).
34. FUJIMORI, F, GUNJI, W, KIKUCHI, J, MOGI, T, OHASHI, Y, MAKINO, T, OYAMA, A, OKUHARA, K, UCHIDA, T & MURAKAMI, Y. Crosstalk of prolyl isomerases, Pin1/Ess1, and cyclophilin A. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 181–190 (2001).
35. COLGAN, J, ASMAL, M, NEAGU, M, YU, B, SCHNEIDKRAUT, J, LEE, Y, SOKOLSKAJA, E, ANDREOTTI, A & LUBAN, J. Cyclophilin A regulates TCR signal strength in CD4+ T cells via a proline-directed conformational switch in Itk. *Immunity* **21**, 189–201 (2004).
36. CHOI, JW, SUTOR, SL, LINDQUIST, L, EVANS, GL, MADDEN, BJ, BERGEN, HR 3rd, HEFFERAN, TE, YASZEMSKI, MJ & BRAM, RJ. Severe osteogenesis imperfecta in cyclophilin B-deficient mice. *PLoS Genet* **5**, e1000750 (2009).

37. SCHOLZ, C, SCHERER, G, MAYR, LM, SCHINDLER, T, FISCHER, G & SCHMID, FX. Prolyl isomerases do not catalyze isomerization of non-prolyl peptide bonds. *Biol Chem* **379**, 361–365 (1998).
38. SCHIENE-FISCHER, C, HABAZETTL, J, SCHMID, FX & FISCHER, G. The hsp70 chaperone DnaK is a secondary amide peptide bond cis-trans isomerase. *Nat Struct Biol* **9**, 419–424 (2002).
39. GALAT, A. Function-dependent clustering of orthologues and paralogues of cyclophilins. *Proteins* **56**, 808–820 (2004).
40. KUMARI, S, ROY, S, SINGH, P, SINGLA-PAREEK, SL & PAREEK, A. Cyclophilins: Proteins in search of function. *Plant Signal Behav* **8** (2012).
41. HARDING, MW, HANDSCHUMACHER, RE & SPEICHER, DW. Isolation and amino acid sequence of cyclophilin. *J Biol Chem* **261**, 8547–8555 (1986).
42. BRAZIN, KN, MALLIS, RJ, FULTON, DB & ANDREOTTI, AH. Regulation of the tyrosine kinase Itk by the peptidyl-prolyl isomerase cyclophilin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1899–1904 (2002).
43. YURCHENKO, V, ZYBARTH, G, O'CONNOR, M, DAI, WW, FRANCHIN, G, HAO, T, GUO, H, HUNG, HC, TOOLE, B, GALLAY, P, SHERRY, B & BUKRINSKY, M. Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. *J Biol Chem* **277**, 22959–22965 (2002).
44. DOYLE, V, VIRJI, S & CROMPTON, M. Evidence that cyclophilin-A protects cells against oxidative stress. *Biochem J* **341 (Pt 1)**, 127–132 (1999).
45. LEE, JP, PALFREY, HC, BINDOKAS, VP, GHADGE, GD, MA, L, MILLER, RJ & ROOS, RP. The role of immunophilins in mutant superoxide dismutase-1-linked familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3251–3256 (1999).
46. KOFRON, JL, KUZMIC, P, KISHORE, V, COLÓN-BONILLA, E & RICH, DH. Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl cis-trans isomerases by an improved spectrophotometric assay. *Biochemistry* **30**, 6127–6134 (1991).
47. WOLFENDEN, R & SNIDER, MJ. The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts. *Acc Chem Res* **34**, 938–945 (2001).
48. LIU, J, ALBERS, MW, CHEN, CM, SCHREIBER, SL & WALSH, CT. Cloning, expression, and purification of human cyclophilin in *Escherichia coli* and assessment of the catalytic role of cysteines by site-directed mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 2304–2308 (1990).
49. FANGHÄNEL, J & FISCHER, G. Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. *Front Biosci* **9**, 3453–3478 (2004).
50. COLGAN, J, ASMAL, M, YU, B & LUBAN, J. Cyclophilin A-deficient mice are resistant to immunosuppression by cyclosporine. *J Immunol* **174**, 6030–6038 (2005).
51. BOREL, JF, FEURER, C, GUBLER, HU & STÄHELIN, H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* **6**, 468–475 (1976).
52. FANGHÄNEL, J & FISCHER, G. Thermodynamic characterization of the interaction of human cyclophilin 18 with cyclosporin A. *Biophys Chem* **100**, 351–366 (2003).
53. SANGLIER, JJ, QUESNIAUX, V, FEHR, T, HOFMANN, H, MAHNKE, M, MEMMERT, K, SCHULER, W, ZENKE, G, GSCHWIND, L, MAURER, C & SCHILLING, W. Sanglifehrins A, B, C and D, novel cyclophilin-binding compounds isolated from *Streptomyces* sp. A92-308110. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)* **52**, 466–473 (1999).
54. ZENKE, G, STRITTMATTER, U, FUCHS, S, QUESNIAUX, VF, BRINKMANN, V, SCHULER, W, ZURINI, M, ENZ, A, BILLICH, A, SANGLIER, JJ & FEHR, T. Sanglifehrins A, a novel cyclophilin-binding compound showing immunosuppressive activity with a new mechanism of action. *J Immunol* **166**, 7165–7171 (2001).

55. DAUM, S, SCHUMANN, M, MATHEA, S, AUMÜLLER, T, BALSLEY, MA, CONSTANT, SL, DE LACROIX, BF, KRUSKA, F, BRAUN, M & SCHIENE-FISCHER, C. Isoform-specific inhibition of cyclophilins. *Biochemistry* **48**, 6268–6277 (2009).
56. DAVIS, TL, WALKER, JR, CAMPAGNA-SLATER, V, FINERTY, PJ, PARAMANATHAN, R, BERNSTEIN, G, MACKENZIE, F, TEMPEL, W, OUYANG, H, LEE, WH, EISENMESSER, EZ & DHE-PAGANON, S. Structural and biochemical characterization of the human cyclophilin family of peptidyl-prolyl isomerases. *PLoS Biol* **8**, e1000439 (2010).
57. TAYLOR, P, DORNAN, J, CARRELLO, A, MINCHIN, RF, RATAJCZAK, T & WALKINSHAW, MD. Two structures of cyclophilin 40: folding and fidelity in the TPR domains. *Structure* **9**, 431–438 (2001).
58. KIEFFER, LJ, THALHAMMER, T & HANDSCHUMACHER, RE. Isolation and characterization of a 40-kDa cyclophilin-related protein. *J Biol Chem* **267**, 5503–5507 (1992).
59. FREEMAN, BC, TOFT, DO & MORIMOTO, RI. Molecular chaperone machines: chaperone activities of the cyclophilin Cyp-40 and the steroid aporeceptor-associated protein p23. *Science* **274**, 1718–1720 (1996).
60. MOK, D, ALLAN, RK, CARRELLO, A, WANGOO, K, WALKINSHAW, MD & RATAJCZAK, T. The chaperone function of cyclophilin 40 maps to a cleft between the prolyl isomerase and tetratricopeptide repeat domains. *FEBS Lett* **580**, 2761–2768 (2006).
61. HOFFMANN, K & HANDSCHUMACHER, RE. Cyclophilin-40: evidence for a dimeric complex with hsp90. *Biochem J* **307** (Pt 1), 5–8 (1995).
62. CARRELLO, A, ALLAN, RK, MORGAN, SL, OWEN, BAL, MOK, D, WARD, BK, MINCHIN, RF, TOFT, DO & RATAJCZAK, T. Interaction of the Hsp90 cochaperone cyclophilin 40 with Hsc70. *Cell Stress Chaperones* **9**, 167–181 (2004).
63. RATAJCZAK, T, CARRELLO, A, MARK, PJ, WARNER, BJ, SIMPSON, RJ, MORITZ, RL & HOUSE, AK. The cyclophilin component of the unactivated estrogen receptor contains a tetratricopeptide repeat domain and shares identity with p59 (FKBP59). *J Biol Chem* **268**, 13187–13192 (1993).
64. RATAJCZAK, T & CARRELLO, A. 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**, 2961–2965 (1996).
65. PRATT, WB & TOFT, DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* **18**, 306–360 (1997).
66. OWENS-GRILLO, JK, HOFFMANN, K, HUTCHISON, KA, YEM, AW, DEIBEL, M Jr, HANDSCHUMACHER, RE & PRATT, WB. The cyclosporin A-binding immunophilin CyP-40 and the FK506-binding immunophilin hsp56 bind to a common site on hsp90 and exist in independent cytosolic heterocomplexes with the untransformed glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* **270**, 20479–20484 (1995).
67. GALIGNIANA, MD, HARRELL, JM, MURPHY, PJM, CHINKERS, M, RADANYI, C, RENOIR, JM, ZHANG, M & PRATT, WB. 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**, 13602–13610 (2002).
68. PERIYASAMY, S, WARRIER, M, TILLEKERATNE, MPM, SHOU, W & SANCHEZ, ER. The immunophilin ligands cyclosporin A and FK506 suppress prostate cancer cell growth by androgen receptor-dependent and -independent mechanisms. *Endocrinology* **148**, 4716–4726 (2007).
69. PERIYASAMY, S, HINDS, T Jr, SHEMSHEDINI, L, SHOU, W & SANCHEZ, ER. FKBP51 and Cyp40 are positive regulators of androgen-dependent prostate cancer cell growth and the targets of FK506 and cyclosporin A. *Oncogene* **29**, 1691–1701 (2010).
70. WARD, BK, MARK, PJ, INGRAM, DM, MINCHIN, RF & RATAJCZAK, T. Expression of the estrogen receptor-associated immunophilins, cyclophilin 40 and FKBP52, in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **58**, 267–280 (1999).

71. SHETTY, PV, WANG, X & CHAN, WK. CyP40, but not Hsp70, in rabbit reticulocyte lysate causes the aryl hydrocarbon receptor-DNA complex formation. *Arch Biochem Biophys* **429**, 42–49 (2004).
72. LUU, TC, BHATTACHARYA, P & CHAN, WK. Cyclophilin-40 has a cellular role in the aryl hydrocarbon receptor signaling. *FEBS Lett* **582**, 3167–3173 (2008).
73. RAPPILBER, J, RYDER, U, LAMOND, AI & MANN, M. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res* **12**, 1231–1245 (2002).
74. ZHOU, Z, LICKLIDER, LJ, GYGI, SP & REED, R. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* **419**, 182–185 (2002).
75. CHEN, YIG, MOORE, RE, GE, HY, YOUNG, MK, LEE, TD & STEVENS, SW. Proteomic analysis of in vivo-assembled pre-mRNA splicing complexes expands the catalog of participating factors. *Nucleic Acids Res* **35**, 3928–3944 (2007).
76. MESA, A, SOMARELLI, JA & HERRERA, RJ. Spliceosomal immunophilins. *FEBS Lett* **582**, 2345–2351 (2008).
77. JURICA, MS, LICKLIDER, LJ, GYGI, SR, GRIGORIEFF, N & MOORE, MJ. Purification and characterization of native spliceosomes suitable for three-dimensional structural analysis. *RNA* **8**, 426–439 (2002).
78. MAKAROV, EM, MAKAROVA, OV, URLAUB, H, GENTZEL, M, WILL, CL, WILM, M & LÜHRMANN, R. Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science* **298**, 2205–2208 (2002).
79. BESSONOV, S, ANOKHINA, M, WILL, CL, URLAUB, H & LÜHRMANN, R. Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature* **452**, 846–850 (2008).
80. MAKAROVA, OV, MAKAROV, EM, URLAUB, H, WILL, CL, GENTZEL, M, WILM, M & LÜHRMANN, R. A subset of human 35S U5 proteins, including Prp19, function prior to catalytic step 1 of splicing. *EMBO J* **23**, 2381–2391 (2004).
81. MI, H, KOPS, O, ZIMMERMANN, E, JÄSCHKE, A & TROPSCHUG, M. A nuclear RNA-binding cyclophilin in human T cells. *FEBS Lett* **398**, 201–205 (1996).
82. WANG, Y, HAN, RF, ZHANG, WQ, YUAN, YF, ZHANG, XB, LONG, Y & MI, HF. Human CyP33 binds specifically to mRNA and binding stimulates PPIase activity of hCyP33. *FEBS Lett* **582**, 835–839 (2008).
83. PARK, S, OSMERS, U, RAMAN, G, SCHWANTES, RH, DIAZ, MO & BUSHWELLER, JH. The PHD3 domain of MLL acts as a CYP33-regulated switch between MLL-mediated activation and repression. *Biochemistry* **49**, 6576–6586 (2010).
84. WANG, ZX, SONG, JK, MILNE, TA, WANG, GG, LI, HT, ALLIS, CD & PATEL, DJ. Pro isomerization in MLL1 PHD3-bromo cassette connects H3K4me readout to CyP33 and HDAC-mediated repression. *Cell* **141**, 1183–1194 (2010).
85. WANG, Z, LIU, X, ZHAO, Z, XU, C, ZHANG, K, CHEN, C, SUN, L, GAO, GF, YE, X & LIU, W. Cyclophilin E functions as a negative regulator to influenza virus replication by impairing the formation of the viral ribonucleoprotein complex. *PLoS One* **6**, e22625 (2011).
86. SCANLAN, MJ, CHEN, YT, WILLIAMSON, B, GURE, AO, STOCKERT, E, GORDAN, JD, TUERECI, O, SAHIN, U, PFREUNDSCHUH, M & OLD, LJ. Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies. *Int J Cancer* **76**, 652–658 (1998).
87. STIRNIMANN, CU, PETSALAKI, E, RUSSELL, RB & MÜLLER, CW. WD40 proteins propel cellular networks. *Trends Biochem Sci* **35**, 565–574 (2010).
88. MORTILLARO, MJ & BEREZNEY, R. Matrinxan CYP, an SR-rich cyclophilin that associates with the nuclear matrix and splicing factors. *J Biol Chem* **273**, 8183–8192 (1998).
89. NESTEL, FP, COLWILL, K, HARPER, S, PAWSON, T & ANDERSON, SK. RS cyclophilins: identification of an NK-TR1-related cyclophilin. *Gene* **180**, 151–155 (1996).

90. YURYEV, A, PATTURAJAN, M, LITINGTUNG, Y, JOSHI, RV, GENTILE, C, GEBARA, M & CORDEN, JL. The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II interacts with a novel set of serine/arginine-rich proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6975–6980 (1996).
91. BOURQUIN, JP, STAGLJAR, I, MEIER, P, MOOSMANN, P, SILKE, J, BAECHI, T, GEORGIEV, O & SCHAFFNER, W. A serine/arginine-rich nuclear matrix cyclophilin interacts with the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nucleic Acids Res* **25**, 2055–2061 (1997).
92. LIN, CL, LEU, S, LU, MC & OUYANG, P. Over-expression of SR-cyclophilin, an interaction partner of nuclear pinin, releases SR family splicing factors from nuclear speckles. *Biochem Biophys Res Commun* **321**, 638–647 (2004).
93. YOKOYAMA, N, HAYASHI, N, SEKI, T, PANTÉ, N, OHBA, T, NISHII, K, KUMA, K, HAYASHIDA, T, MIYATA, T & AEBI, U. A giant nucleopore protein that binds Ran/TC4. *Nature* **376**, 184–188 (1995).
94. WU, J, MATUNIS, MJ, KRAEMER, D, BLOBEL, G & COUTAVAS, E. Nup358, a cytoplasmically exposed nucleoporin with peptide repeats, Ran-GTP binding sites, zinc fingers, a cyclophilin A homologous domain, and a leucine-rich region. *J Biol Chem* **270**, 14209–14213 (1995).
95. KALAB, P & HEALD, R. The RanGTP gradient—a GPS for the mitotic spindle. *J Cell Sci* **121**, 1577–1586 (2008).
96. CHO, KI, PATIL, H, SENDA, E, WANG, J, YI, H, QIU, S, YOON, D, YU, M, ORRY, A, PEACHEY, NS & FERREIRA, PA. Differential loss of prolyl-isomerase or chaperone activity of Ran-binding protein 2 (Ranbp2) unveils distinct physiological roles of its cyclophilin domain in proteostasis. *J Biol Chem* **289**, 4600–4625 (2014).
97. PICHLER, A, GAST, A, SEELER, JS, DEJEAN, A & MELCHIOR, F. The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* **108**, 109–120 (2002).
98. SAITOH, H, PU, R, CAVENAGH, M & DASSO, M. RanBP2 associates with Ubc9p and a modified form of RanGAP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3736–3741 (1997).
99. WERNER, A, FLOTHO, A & MELCHIOR, F. The RanBP2/RanGAP1*SUMO1/Ubc9 complex is a multisubunit SUMO E3 ligase. *Mol Cell* **46**, 287–298 (2012).
100. FLOTHO, A & WERNER, A. The RanBP2/RanGAP1*SUMO1/Ubc9 complex: a multisubunit E3 ligase at the intersection of sumoylation and the RanGTPase cycle. *Nucleus* **3**, 429–432 (2012).
101. SINGH, BB, PATEL, HH, ROEPMAN, R, SCHICK, D & FERREIRA, PA. The zinc finger cluster domain of RanBP2 is a specific docking site for the nuclear export factor, exportin-1. *J Biol Chem* **274**, 37370–37378 (1999).
102. PRUNUSKE, AJ, LIU, J, ELGORT, S, JOSEPH, J, DASSO, M & ULLMAN, KS. Nuclear envelope breakdown is coordinated by both Nup358/RanBP2 and Nup153, two nucleoporins with zinc finger modules. *Mol Biol Cell* **17**, 760–769 (2006).
103. MAHADEVAN, K, ZHANG, H, AKEF, A, CUI, XA, GUEROUSSOV, S, CENIK, C, ROTH, FP & PALAZZO, AF. RanBP2/Nup358 potentiates the translation of a subset of mRNAs encoding secretory proteins. *PLoS Biol* **11**, e1001545 (2013).
104. CAI, Y, SINGH, BB, ASLANUKOV, A, ZHAO, H & FERREIRA, PA. The docking of kinesins, KIF5B and KIF5C, to Ran-binding protein 2 (RanBP2) is mediated via a novel RanBP2 domain. *J Biol Chem* **276**, 41594–41602 (2001).
105. SPLINTER, D, TANENBAUM, ME, LINDQVIST, A, JAARSMAN, D, FLOTHO, A, YU, KL, GRIGORIEV, I, ENGELSMA, D, HAASDIJK, ED, KEIJZER, N, DEMMERS, J, FORNEROD, M, MELCHIOR, F, HOOGENRAAD, CC, MEDEMA, RH & AKHMANOVA, A. Bicaudal D2, dynein, and kinesin-1 associate with nuclear pore complexes and regulate centrosome and nuclear positioning during mitotic entry. *PLoS Biol* **8**, e1000350 (2010).
106. JOSEPH, J & DASSO, M. The nucleoporin Nup358 associates with and regulates interphase microtubules. *FEBS Lett* **582**, 190–196 (2008).

107. ANDERSON, SK, GALLINGER, S, RODER, J, FREY, J, YOUNG, HA & ORTALDO, JR. A cyclophilin-related protein involved in the function of natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 542–546 (1993).
108. RINFRET, A, COLLINS, C, MÉNARD, R & ANDERSON, SK. The N-terminal cyclophilin-homologous domain of a 150-kilodalton tumor recognition molecule exhibits both peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase and chaperone activities. *Biochemistry* **33**, 1668–1673 (1994).
109. GIARDINA, SL, ANDERSON, SK, SAYERS, TJ, CHAMBERS, WH, PALUMBO, GA, YOUNG, HA & ORTALDO, JR. Selective loss of NK cytotoxicity in antisense NK-TR1 rat LGL cell lines. Abrogation of antibody-independent tumor and virus-infected target cell killing. *J Immunol* **154**, 80–87 (1995).
110. ALKHATIB, G, MURATA, K & RODER, JC. Cellular distribution of a natural killer cell tumour recognition-related surface antigen in purified human lymphocytes. *Immunology* **92**, 173–179 (1997).
111. GIARDINA, SL, COFFMAN, JD, YOUNG, HA, POTTER, SJ, FREY, JL, ORTALDO, JR & ANDERSON, SK. Association of the expression of an SR-cyclophilin with myeloid cell differentiation. *Blood* **87**, 2269–2274 (1996).
112. ZENG, L, ZHOU, Z, XU, J, ZHAO, W, WANG, W, HUANG, Y, CHENG, C, XU, M, XIE, Y & MAO, Y. Molecular cloning, structure and expression of a novel nuclear RNA-binding cyclophilin-like gene (PPIL4) from human fetal brain. *Cytogenet Cell Genet* **95**, 43–47 (2001).
113. WANG, BB, HAYENGA, KJ, PAYAN, DG & FISHER, JM. Identification of a nuclear-specific cyclophilin which interacts with the proteinase inhibitor eglin c. *Biochem J* **314**, 313–319 (1996).
114. ARAVIND, L & KOONIN, EV. The U box is a modified RING finger - a common domain in ubiquitination. *Curr Biol* **10**, R132–R134 (2000).
115. ZYDOWSKY, LD, ETZKORN, FA, CHANG, HY, FERGUSON, SB, STOLZ, LA, HO, SI & WALSH, CT. Active site mutants of human cyclophilin A separate peptidyl-prolyl isomerase activity from cyclosporin A binding and calcineurin inhibition. *Protein Sci* **1**, 1092–1099 (1992).
116. LIU, J, CHEN, CM & WALSH, CT. Human and Escherichia coli cyclophilins: sensitivity to inhibition by the immunosuppressant cyclosporin A correlates with a specific tryptophan residue. *Biochemistry* **30**, 2306–2310 (1991).
117. MARÍN, I. Ancient origin of animal U-box ubiquitin ligases. *BMC Evol Biol* **10**, 331 (2010).
118. HATAKEYAMA, S, YADA, M, MATSUMOTO, M, ISHIDA, N & NAKAYAMA, KI. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J Biol Chem* **276**, 33111–33120 (2001).
119. HEGELE, A, KAMBUROV, A, GROSSMANN, A, SOURLIS, C, WOWRO, S, WEIMANN, M, WILL, CL, PENA, V, LÜHRMANN, R & STELZL, U. Dynamic protein-protein interaction wiring of the human spliceosome. *Mol Cell* **45**, 567–580 (2012).
120. HATAKEYAMA, S, MATSUMOTO, M, YADA, M & NAKAYAMA, KI. Interaction of U-box-type ubiquitin-protein ligases (E3s) with molecular chaperones. *Genes Cells* **9**, 533–548 (2004).
121. PUSHKARSKY, T, YURCHENKO, V, VANPOUILLE, C, BRICHACEK, B, VAISMAN, I, HATAKEYAMA, S, NAKAYAMA, KI, SHERRY, B & BUKRINSKY, MI. Cell surface expression of CD147/EMMPRIN is regulated by cyclophilin 60. *J Biol Chem* **280**, 27866–27871 (2005).
122. ENGDAHL, C, NÄSLUND, J, LINDGREN, L, AHLM, C & BUCHT, G. The Rift Valley Fever virus protein NSm and putative cellular protein interactions. *Virology* **9**, 139 (2012).
123. ESPESETH, AS, HUANG, Q, GATES, A, XU, M, YU, Y, SIMON, AJ, SHI, XP, ZHANG, X, HODOR, P, STONE, DJ, BURCHARD, J, CAVET, G, BARTZ, S, LINSLEY, P, RAY, WJ & HAZUDA, D. A genome wide analysis of ubiquitin ligases in APP processing identifies a novel regulator of BACE1 mRNA levels. *Mol Cell Neurosci* **33**, 227–235 (2006).

124. CARSON, R, MCKNIGHT, AJ, TODD, S, LIU, WW, HEGGARTY, S, CRAIG, D, MCGUINNESS, B, IRVINE, GB, PASSMORE, AP & JOHNSTON, JA. Variation in RTN3 and PPIL2 genes does not influence platelet membrane beta-Secretase activity or susceptibility to alzheimer's disease in the northern irish population. *Neuromolecular Med* **11**, 337–344 (2009).
125. PAGE, AP & WINTER, AD. A divergent multi-domain cyclophilin is highly conserved between parasitic and free-living nematode species and is important in larval muscle development. *Mol Biochem Parasitol* **95**, 215–227 (1998).
126. GRAHAM, PL, SCHEDL, T & KIMBLE, J. More mog genes that influence the switch from spermatogenesis to oogenesis in the hermaphrodite germ line of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Genet* **14**, 471–484 (1993).
127. BELFIORE, M, PUGNALE, P, SAUDAN, Z & PUOTI, A. Roles of the *C. elegans* cyclophilin-like protein MOG-6 in MEP-1 binding and germline fates. *Development* **131**, 2935–2945 (2004).
128. YORIMITSU, T & KLIONSKY, DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**, 1542–1552 (2005).
129. GLICKMAN, MH & CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* **82**, 373–428 (2002).
130. THROWER, JS, HOFFMAN, L, RECHSTEINER, M & PICKART, CM. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* **19**, 94–102 (2000).
131. VOGES, D, ZWICKL, P & BAUMEISTER, W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* **68**, 1015–1068 (1999).
132. KERSCHER, O, FELBERBAUM, R & HOCHSTRASSER, M. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 159–180 (2006).
133. ULRICH, HD. The SUMO system: an overview. *Methods Mol Biol* **497**, 3–16 (2009).
134. KRAVTSOVA-IVANTSIV, Y & CIECHANOVER, A. Non-canonical ubiquitin-based signals for proteasomal degradation. *J Cell Sci* **125**, 539–548 (2012).
135. IKEDA, F & DIKIC, I. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series. *EMBO Rep* **9**, 536–542 (2008).
136. VAN WIJK, SJL & TIMMERS, HTM. The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins. *FASEB J* **24**, 981–993 (2010).
137. LI, W, BENGTON, MH, ULBRICH, A, MATSUDA, A, REDDY, VA, ORTH, A, CHANDA, SK, BATALOV, S & JOAZEIRO, CAP. Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS One* **3**, e1487 (2008).
138. PICKART, CM & EDDINS, MJ. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 55–72 (2004).
139. MARÍN, I. Animal HECT ubiquitin ligases: evolution and functional implications. *BMC Evol Biol* **10**, 56 (2010).
140. OHI, MD, VANDER KOOI, CW, ROSENBERG, JA, CHAZIN, WJ & GOULD, KL. Structural insights into the U-box, a domain associated with multi-ubiquitination. *Nat Struct Biol* **10**, 250–255 (2003).
141. FORTSCHEGGER, K, WAGNER, B, VOGLAUER, R, KATINGER, H, SIBILIA, M & GRILLARI, J. Early embryonic lethality of mice lacking the essential protein SNEV. *Mol Cell Biol* **27**, 3123–3130 (2007).
142. VANDER KOOI, CW, REN, L, XU, P, OHI, MD, GOULD, KL & CHAZIN, WJ. The Prp19 WD40 domain contains a conserved protein interaction region essential for its function. *Structure* **18**, 584–593 (2010).
143. AJUH, P, KUSTER, B, PANOV, K, ZOMERDIJK, JC, MANN, M & LAMOND, AI. Functional analysis of the human CDC5L complex and identification of its components by mass spectrometry. *EMBO J* **19**, 6569–6581 (2000).

144. CHANARAT, S & STRÄSSER, K. Splicing and beyond: the many faces of the Prp19 complex. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 2126–2134 (2013).
145. SIHN, CR, CHO, SY, LEE, JH, LEE, TR & KIM, SH. Mouse homologue of yeast Prp19 interacts with mouse SUG1, the regulatory subunit of 26S proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* **356**, 175–180 (2007).
146. LÖSCHER, M, FORTSCHEGGER, K, RITTER, G, WOSTRY, M, VOGLAUER, R, SCHMID, JA, WATTERS, S, RIVETT, AJ, AJUH, P, LAMOND, AI, KATINGER, H & GRILLARI, J. Interaction of U-box E3 ligase SNEV with PSMB4, the beta7 subunit of the 20 S proteasome. *Biochem J* **388**, 593–603 (2005).
147. KOEGL, M, HOPPE, T, SCHLENKER, S, ULRICH, HD, MAYER, TU & JENTSCH, S. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* **96**, 635–644 (1999).
148. MATSUMOTO, M, YADA, M, HATAKEYAMA, S, ISHIMOTO, H, TANIMURA, T, TSUJI, S, KAKIZUKA, A, KITAGAWA, M & NAKAYAMA, KI. Molecular clearance of ataxin-3 is regulated by a mammalian E4. *EMBO J* **23**, 659–669 (2004).
149. BALLINGER, CA, CONNELL, P, WU, Y, HU, Z, THOMPSON, LJ, YIN, LY & PATTERSON, C. Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol* **19**, 4535–4545 (1999).
150. CONNELL, P, BALLINGER, CA, JIANG, J, WU, Y, THOMPSON, LJ, HÖHFELD, J & PATTERSON, C. The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol* **3**, 93–96 (2001).
151. ARNDT, V, ROGON, C & HÖHFELD, J. To be, or not to be—molecular chaperones in protein degradation. *Cell Mol Life Sci* **64**, 2525–2541 (2007).
152. McDONOUGH, H & PATTERSON, C. CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress Chaperones* **8**, 303–308 (2003).
153. JIANG, J, BALLINGER, CA, WU, Y, DAI, Q, CYR, DM, HÖHFELD, J & PATTERSON, C. CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. *J Biol Chem* **276**, 42938–42944 (2001).
154. QIAN, SB, McDONOUGH, H, BOELLMANN, F, CYR, DM & PATTERSON, C. CHIP-mediated stress recovery by sequential ubiquitination of substrates and Hsp70. *Nature* **440**, 551–555 (2006).
155. ESSER, C, ALBERTI, S & HÖHFELD, J. Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 171–188 (2004).
156. LIOU, YC, ZHOU, XZ & LU, KP. Prolyl isomerase Pin1 as a molecular switch to determine the fate of phosphoproteins. *Trends Biochem Sci* **36**, 501–514 (2011).
157. SAITOH, T, TUN-KYI, A, RYO, A, YAMAMOTO, M, FINN, G, FUJITA, T, AKIRA, S, YAMAMOTO, N, LU, KP & YAMAOKA, S. Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. *Nat Immunol* **7**, 598–605 (2006).
158. LIOU, YC, RYO, A, HUANG, HK, LU, PJ, BRONSON, R, FUJIMORI, F, UCHIDA, T, HUNTER, T & LU, KP. Loss of Pin1 function in the mouse causes phenotypes resembling cyclin D1-null phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1335–1340 (2002).
159. SIEPE, D & JENTSCH, S. Prolyl isomerase Pin1 acts as a switch to control the degree of substrate ubiquitylation. *Nat Cell Biol* **11**, 967–972 (2009).
160. ZACCHI, P, GOSTISSA, M, UCHIDA, T, SALVAGNO, C, AVOLIO, F, VOLINIA, S, RONAI, Z, BLANDINO, G, SCHNEIDER, C & DEL SAL, G. The prolyl isomerase Pin1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults. *Nature* **419**, 853–857 (2002).
161. LI, M, BROOKS, CL, WU-BAER, F, CHEN, D, BAER, R & GU, W. Mono- versus poly-ubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* **302**, 1972–1975 (2003).

162. YAMAGUCHI, T, KURISAKI, A, YAMAKAWA, N, MINAKUCHI, K & SUGINO, H. FKBP12 functions as an adaptor of the Smad7-Smurfl complex on activin type I receptor. *J Mol Endocrinol* **36**, 569–579 (2006).
163. OCHOCKA, AM, KAMPANIS, P, NICOL, S, ALLENDE-VEGA, N, COX, M, MARCAR, L, MILNE, D, FULLER-PACE, F & MEEK, D. FKBP25, a novel regulator of the p53 pathway, induces the degradation of MDM2 and activation of p53. *FEBS Lett* **583**, 621–626 (2009).
164. KAZLAUSKAS, A, POELLINGER, L & PONGRATZ, I. The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor. *J Biol Chem* **275**, 41317–41324 (2000).
165. NAKAGAWA, T, SHIRANE, M, IEMURA, Si, NATSUME, T & NAKAYAMA, KI. Anchoring of the 26S proteasome to the organellar membrane by FKBP38. *Genes Cells* **12**, 709–719 (2007).
166. BARTH, S, NESPER, J, HASGALL, PA, WIRTHNER, R, NYTKO, KJ, EDLICH, F, KATSCHINSKI, DM, STIEHL, DP, WENGER, RH & CAMENISCH, G. The peptidyl prolyl cis/trans isomerase FKBP38 determines hypoxia-inducible transcription factor prolyl-4-hydroxylase PHD2 protein stability. *Mol Cell Biol* **27**, 3758–3768 (2007).
167. BARTH, S, EDLICH, F, BERCHNER-PFANNSCHMIDT, U, GNEUSS, S, JAHREIS, G, HASGALL, PA, FANDREY, J, WENGER, RH & CAMENISCH, G. Hypoxia-inducible factor prolyl-4-hydroxylase PHD2 protein abundance depends on integral membrane anchoring of FKBP38. *J Biol Chem* **284**, 23046–23058 (2009).
168. CHOI, MS, MIN, SH, JUNG, H, LEE, JD, LEE, TH, LEE, HK & YOO, OJ. The essential role of FKBP38 in regulating phosphatase of regenerating liver 3 (PRL-3) protein stability. *Biochem Biophys Res Commun* **406**, 305–309 (2011).
169. LIU, X, SUN, L, YU, M, WANG, Z, XU, C, XUE, Q, ZHANG, K, YE, X, KITAMURA, Y & LIU, W. Cyclophilin A interacts with influenza A virus M1 protein and impairs the early stage of the viral replication. *Cell Microbiol* **11**, 730–741 (2009).
170. LIU, X, ZHAO, Z, XU, C, SUN, L, CHEN, J, ZHANG, L & LIU, W. Cyclophilin A restricts influenza A virus replication through degradation of the M1 protein. *PLoS One* **7**, e31063 (2012).
171. FERREIRA, PA, YUNFEI, C, SCHICK, D & ROEPMAN, R. The cyclophilin-like domain mediates the association of Ran-binding protein 2 with subunits of the 19 S regulatory complex of the proteasome. *J Biol Chem* **273**, 24676–24682 (1998).
172. YI, H, FRIEDMAN, JL & FERREIRA, PA. The cyclophilin-like domain of Ran-binding protein-2 modulates selectively the activity of the ubiquitin-proteasome system and protein biogenesis. *J Biol Chem* **282**, 34770–34778 (2007).
173. SCHERER, WF, SYVERTON, JT & GEY, GO. 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 (1953).
174. HANAHAAN, D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557–580 (1983).
175. MERRIFIELD, RB. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc* **85**, 2149–2154 (1963).
176. FRANK, R. Spot-synthesis: An easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* **48**, 9217–9232 (1992).
177. GILL, SC & VON HIPPEL, PH. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**, 319–326 (1989).
178. LAEMMLI, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
179. JANOWSKI, B, WÖLLNER, S, SCHUTKOWSKI, M & FISCHER, G. A protease-free assay for peptidyl prolyl cis/trans isomerases using standard peptide substrates. *Anal Biochem* **252**, 299–307 (1997).

180. GARCÍA-ECHEVERRÍA, C, KOFRON, JL, KUZMIC, P, KISHORE, V & RICH, DH. Continuous fluorimetric direct (uncoupled) assay for peptidyl prolyl cis-trans isomerases. *J Am Chem Soc* **114**, 2758–2759 (1992).
181. PTAK, C, VARELAS, X, MORAES, T, MCKENNA, S & ELLISON, MJ. Purification and properties of the ubiquitin-conjugating enzymes Cdc34 and Ubc13.Mms2. *Methods Enzymol* **398**, 43–54 (2005).
182. KARETSOU, Z, EMMANOUILIDOU, A, SANIDAS, I, LIOKATIS, S, NIKOLAKAKI, E, POLITOU, AS & PAPAMARCAKI, T. Identification of distinct SET/TAF-Ibeta domains required for core histone binding and quantitative characterisation of the interaction. *BMC Biochem* **10**, 10 (2009).
183. JORDAN, M & WURM, F. Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. *Methods* **33**, 136–143 (2004).
184. ELBASHIR, SM, HARBORTH, J, LENDECKEL, W, YALCIN, A, WEBER, K & TUSCHL, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494–498 (2001).
185. FANGHÄNEL, J. *Untersuchungen zum Katalysemechanismus von Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen*. Diss. (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2005).
186. SCHECHTER, I & BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* **27**, 157–162 (1967).
187. SCHMIDPETER, PAM, JAHREIS, G, GEITNER, AJ & SCHMID, FX. Prolyl isomerases show low sequence specificity toward the residue following the proline. *Biochemistry* **50**, 4796–4803 (2011).
188. HARRISON, RK & STEIN, RL. 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**, 3813–3816 (1990).
189. PTAK, RG, GALLAY, PA, JOCHMANS, D, HALESTRAP, AP, RUEGG, UT, PALLANSCH, LA, BOBARDT, MD, DE BÉTHUNE, MP, NEYTS, J, DE CLERCQ, E, DUMONT, JM, SCALFARO, P, BESSEGHIR, K, WENGER, RM & ROSENWIRTH, B. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human cells by Debio-025, a novel cyclophilin binding agent. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 1302–1317 (2008).
190. HOPKINS, S, SCORNEAUX, B, HUANG, Z, MURRAY, MG, WRING, S, SMITLEY, C, HARRIS, R, ERDMANN, F, FISCHER, G & RIBEILL, Y. SCY-635, a novel nonimmunosuppressive analog of cyclosporine that exhibits potent inhibition of hepatitis C virus RNA replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 660–672 (2010).
191. KAHLERT, V. *Synthese und biochemische Parameter zell-impermeabler Cyclosporine*. Diss. (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2013).
192. MALESEVIC, M, GUTKNECHT, D, PRELL, E, KLEIN, C, SCHUMANN, M, NOWAK, RA, SIMON, JC, SCHIENE-FISCHER, C & SAALBACH, A. Anti-inflammatory effects of extracellular cyclosporins are exclusively mediated by CD147. *J Med Chem* **56**, 7302–7311 (2013).
193. YANG, Y, LORICK, KL, JENSEN, JP & WEISSMAN, AM. Expression and evaluation of RING finger proteins. *Methods Enzymol* **398**, 103–112 (2005).
194. KNIPSCHEER, P & SIXMA, TK. Protein-protein interactions regulate Ubl conjugation. *Curr Opin Struct Biol* **17**, 665–673 (2007).
195. BRIDGES, D & MOORHEAD, GBG. 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. *Sci STKE* **2005**, re10 (2005).
196. RIX, U, REMSING RIX, LL, TERKER, AS, FERNBACH, NV, HANTSCH, O, PLANYAVSKY, M, BREITWIESER, FP, HERRMANN, H, COLINGE, J, BENNETT, KL, AUGUSTIN, M, TILL, JH, HEINRICH, MC, VALENT, P & SUPERTI-FURGA, G. A comprehensive target selectivity survey of the BCR-ABL kinase inhibitor INNO-406 by kinase profiling and chemical proteomics in chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia* **24**, 44–50 (2010).

197. YANG, X, LEE, WH, SOBOTT, F, PAPAGRIGORIOU, E, ROBINSON, CV, GROSSMANN, JG, SUNDRÖM, M, DOYLE, DA & ELKINS, JM. Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17237–17242 (2006).
198. PETOSA, C, MASTERS, SC, BANKSTON, LA, POHL, J, WANG, B, FU, H & LIDDINGTON, RC. 14-3-3zeta binds a phosphorylated Raf peptide and an unphosphorylated peptide via its conserved amphipathic groove. *J Biol Chem* **273**, 16305–16310 (1998).
199. GARDINO, AK, SMERDON, SJ & YAFFE, MB. Structural determinants of 14-3-3 binding specificities and regulation of subcellular localization of 14-3-3-ligand complexes: a comparison of the X-ray crystal structures of all human 14-3-3 isoforms. *Semin Cancer Biol* **16**, 173–182 (2006).
200. MATSUMOTO, K, NAGATA, K, OKUWAKI, M & TSUJIMOTO, M. Histone- and chromatin-binding activity of template activating factor-I. *FEBS Lett* **463**, 285–288 (1999).
201. MATSUMOTO, K, NAGATA, K, MIYAJI-YAMAGUCHI, M, KIKUCHI, A & TSUJIMOTO, M. Sperm chromatin decondensation by template activating factor I through direct interaction with basic proteins. *Mol Cell Biol* **19**, 6940–6952 (1999).
202. OKUWAKI, M & NAGATA, K. Template activating factor-I remodels the chromatin structure and stimulates transcription from the chromatin template. *J Biol Chem* **273**, 34511–34518 (1998).
203. SEO, SB, MCNAMARA, P, HEO, S, TURNER, A, LANE, WS & CHAKRAVARTI, D. Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. *Cell* **104**, 119–130 (2001).
204. LI, M, GUO, H & DAMUNI, Z. Purification and characterization of two potent heat-stable protein inhibitors of protein phosphatase 2A from bovine kidney. *Biochemistry* **34**, 1988–1996 (1995).
205. LI, M, MAKKINJE, A & DAMUNI, Z. The myeloid leukemia-associated protein SET is a potent inhibitor of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* **271**, 11059–11062 (1996).
206. BIALOJAN, C & TAKAI, A. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J* **256**, 283–290 (1988).
207. BERESFORD, PJ, KAM, CM, POWERS, JC & LIEBERMAN, J. Recombinant human granzyme A binds to two putative HLA-associated proteins and cleaves one of them. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9285–9290 (1997).
208. BERESFORD, PJ, ZHANG, D, OH, DY, FAN, Z, GREER, EL, RUSSO, ML, JAJU, M & LIEBERMAN, J. Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *J Biol Chem* **276**, 43285–43293 (2001).
209. FAN, Z, BERESFORD, PJ, OH, DY, ZHANG, D & LIEBERMAN, J. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* **112**, 659–672 (2003).
210. NAGATA, K, SAITO, S, OKUWAKI, M, KAWASE, H, FURUYA, A, KUSANO, A, HANAI, N, OKUDA, A & KIKUCHI, A. Cellular localization and expression of template-activating factor I in different cell types. *Exp Cell Res* **240**, 274–281 (1998).
211. WU, D, INGRAM, A, LAHTI, JH, MAZZA, B, GRENET, J, KAPOOR, A, LIU, L, KIDD, VJ & TANG, D. Apoptotic release of histones from nucleosomes. *J Biol Chem* **277**, 12001–12008 (2002).
212. TEN KLOOSTER, JP, LEEUWEN, Iv, SCHERES, N, ANTHONY, EC & HORDIJK, PL. Rac1-induced cell migration requires membrane recruitment of the nuclear oncogene SET. *EMBO J* **26**, 336–345 (2007).
213. HUBBARD, SJ. The structural aspects of limited proteolysis of native proteins. *Biochim Biophys Acta* **1382**, 191–206 (1998).
214. GALAT, A & METCALFE, SM. Peptidylproline cis/trans isomerases. *Prog Biophys Mol Biol* **63**, 67–118 (1995).

215. PIRKL, F & BUCHNER, J. Functional analysis of the Hsp90-associated human peptidyl prolyl cis/trans isomerases FKBP51, FKBP52 and Cyp40. *J Mol Biol* **308**, 795–806 (2001).
216. VANDER KOOI, CW, OHI, MD, ROSENBERG, JA, OLDDHAM, ML, NEWCOMER, ME, GOULD, KL & CHAZIN, WJ. The Prp19 U-box crystal structure suggests a common dimeric architecture for a class of oligomeric E3 ubiquitin ligases. *Biochemistry* **45**, 121–130 (2006).
217. PAGE, AP, MACNIVEN, K & HENGARTNER, MO. Cloning and biochemical characterization of the cyclophilin homologues from the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem J* **317** (Pt 1), 179–185 (1996).
218. HONG, X, MA, D & CARLOW, CK. Cloning, expression and characterization of a new filarial cyclophilin. *Mol Biochem Parasitol* **91**, 353–358 (1998).
219. WIBORG, J, O'SHEA, C & SKRIVER, K. Biochemical function of typical and variant *Arabidopsis thaliana* U-box E3 ubiquitin-protein ligases. *Biochem J* **413**, 447–457 (2008).
220. BERGSMA, DJ, EDER, C, GROSS, M, KERSTEN, H, SYLVESTER, D, APPELBAUM, E, CUSIMANO, D, LIVI, GP, MCLAUGHLIN, MM & KASYAN, K. The cyclophilin multigene family of peptidyl-prolyl isomerases. Characterization of three separate human isoforms. *J Biol Chem* **266**, 23204–23214 (1991).
221. COMPTON, LA, DAVIS, JM, MACDONALD, JR & BÄCHINGER, HP. Structural and functional characterization of *Escherichia coli* peptidyl-prolyl cis-trans isomerases. *Eur J Biochem* **206**, 927–934 (1992).
222. XU, G, PAIGE, JS & JAFFREY, SR. Global analysis of lysine ubiquitination by ubiquitin remnant immunoaffinity profiling. *Nat Biotechnol* **28**, 868–873 (2010).
223. KILKA, S. *Vergleichende Charakterisierung der humanen Calcineurin-Isoformen*. Diss. (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2009).
224. PFLÜGL, G, KALLEN, J, SCHIRMER, T, JANSONIUS, JN, ZURINI, MG & WALKINSHAW, MD. X-ray structure of a decameric cyclophilin-cyclosporin crystal complex. *Nature* **361**, 91–94 (1993).
225. SADOWSKI, M, SURYADINATA, R, TAN, AR, ROESLEY, SNA & SARCEVIC, B. Protein monoubiquitination and polyubiquitination generate structural diversity to control distinct biological processes. *IUBMB Life* **64**, 136–142 (2012).
226. KOEPP, DM, HARPER, JW & ELLEDGE, SJ. How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell* **97**, 431–434 (1999).
227. DAVID, Y, ZIV, T, ADMON, A & NAVON, A. The E2 ubiquitin-conjugating enzymes direct polyubiquitination to preferred lysines. *J Biol Chem* **285**, 8595–8604 (2010).
228. NIKOLAY, R, WIEDERKEHR, T, RIST, W, KRAMER, G, MAYER, MP & BUKAU, B. Dimerization of the human E3 ligase CHIP via a coiled-coil domain is essential for its activity. *J Biol Chem* **279**, 2673–2678 (2004).
229. ZHANG, M, WINDHEIM, M, ROE, SM, PEGGIE, M, COHEN, P, PRODROMOU, C & PEARL, LH. Chaperoned ubiquitylation–crystal structures of the CHIP U box E3 ubiquitin ligase and a CHIP-Ubc13-Uev1a complex. *Mol Cell* **20**, 525–538 (2005).
230. BENIRSCHKE, RC, THOMPSON, JR, NOMINÉ, Y, WASIELEWSKI, E, JURANIĆ, N, MACURA, S, HATAKEYAMA, S, NAKAYAMA, KI, BOTUYAN, MV & MER, G. Molecular basis for the association of human E4B U box ubiquitin ligase with E2-conjugating enzymes UbcH5c and Ubc4. *Structure* **18**, 955–965 (2010).
231. NORDQUIST, KA, DIMITROVA, YN, BRZOVIC, PS, RIDENOUR, WB, MUNRO, KA, SOSS, SE, CAPRIOLI, RM, KLEVIT, RE & CHAZIN, WJ. Structural and functional characterization of the monomeric U-box domain from E4B. *Biochemistry* **49**, 347–355 (2010).
232. OHI, MD, VANDER KOOI, CW, ROSENBERG, JA, REN, L, HIRSCH, JP, CHAZIN, WJ, WALZ, T & GOULD, KL. Structural and functional analysis of essential pre-mRNA splicing factor Prp19p. *Mol Cell Biol* **25**, 451–460 (2005).
233. PEMBERTON, TJ & KAY, JE. The cyclophilin repertoire of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **22**, 927–945 (2005).

234. HANES, SD, SHANK, PR & BOSTIAN, KA. Sequence and mutational analysis of ESS1, a gene essential for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **5**, 55–72 (1989).
235. GEMMILL, TR, WU, X & HANES, SD. Vanishingly low levels of Ess1 prolyl-isomerase activity are sufficient for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**, 15510–15517 (2005).
236. BETTENCOURT-DIAS, M & GLOVER, DM. Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 451–463 (2007).
237. MAHEN, R & VENKITARAMAN, AR. Pattern formation in centrosome assembly. *Curr Opin Cell Biol* **24**, 14–23 (2012).
238. SANKARAN, S, STARITA, LM, SIMONS, AM & PARVIN, JD. Identification of domains of BRCA1 critical for the ubiquitin-dependent inhibition of centrosome function. *Cancer Res* **66**, 4100–4107 (2006).
239. SKOP, AR, LIU, H, YATES, J 3rd, MEYER, BJ & HEALD, R. Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms. *Science* **305**, 61–66 (2004).
240. GRENFELL, SJ, TRAUSCH-AZAR, JS, HANDLEY-GEARHART, PM, CIECHANOVER, A & SCHWARTZ, AL. Nuclear localization of the ubiquitin-activating enzyme, E1, is cell-cycle-dependent. *Biochem J* **300** (Pt 3), 701–708 (1994).
241. WÓJCIK, C, PAWELETZ, N & SCHROETER, D. Localization of proteasomal antigens during different phases of the cell cycle in HeLa cells. *Eur J Cell Biol* **68**, 191–198 (1995).
242. POHL, C & JENTSCH, S. Final stages of cytokinesis and midbody ring formation are controlled by BRUCE. *Cell* **132**, 832–845 (2008).
243. BANNON, JH, O'DONOVAN, DS, KENNELLY, SME & MC GEE, MM. The peptidyl prolyl isomerase cyclophilin A localizes at the centrosome and the midbody and is required for cytokinesis. *Cell Cycle* **11**, 1340–1353 (2012).
244. ARNAUD, L, PINES, J & NIGG, EA. GFP tagging reveals human Polo-like kinase 1 at the kinetochore/centromere region of mitotic chromosomes. *Chromosoma* **107**, 424–429 (1998).
245. RUSTICI, G, MATA, J, KIVINEN, K, LIÓ, P, PENKETT, CJ, BURNS, G, HAYLES, J, BRAZMA, A, NURSE, P & BÄHLER, J. Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nat Genet* **36**, 809–817 (2004).
246. DUBOURG, B, KAMPHAUSEN, T, WEIWAD, M, JAHREIS, G, FEUNTEUN, J, FISCHER, G & MODJTAHEDI, N. The human nuclear SRcyp is a cell cycle-regulated cyclophilin. *J Biol Chem* **279**, 22322–22330 (2004).
247. PAN, H, LUO, C, LI, R, QIAO, A, ZHANG, L, MINES, M, NYANDA, AM, ZHANG, J & FAN, GH. Cyclophilin A is required for CXCR4-mediated nuclear export of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2, activation and nuclear translocation of ERK1/2, and chemotactic cell migration. *J Biol Chem* **283**, 623–637 (2008).
248. CHAMBRAUD, B, BELABES, H, FONTAINE-LENOIR, V, FELLOUS, A & BAULIEU, EE. The immunophilin FKBP52 specifically binds to tubulin and prevents microtubule formation. *FASEB J* **21**, 2787–2797 (2007).
249. THIELE, A, KRENTZLIN, K, ERDMANN, F, RAUH, D, HAUSE, G, ZERWECK, J, KILKA, S, PÖSEL, S, FISCHER, G, SCHUTKOWSKI, M & WEIWAD, M. Parvulin 17 promotes microtubule assembly by its peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity. *J Mol Biol* **411**, 896–909 (2011).
250. MUSLIN, AJ, TANNER, JW, ALLEN, PM & SHAW, AS. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* **84**, 889–897 (1996).
251. YAFFE, MB, RITTINGER, K, VOLINIA, S, CARON, PR, AITKEN, A, LEFFERS, H, GAMBLLIN, SJ, SMERDON, SJ & CANTLEY, LC. The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* **91**, 961–971 (1997).
252. AITKEN, A, BAXTER, H, DUBOIS, T, CLOKIE, S, MACKIE, S, MITCHELL, K, PEDEN, A & ZEMLICKOVA, E. Specificity of 14-3-3 isoform dimer interactions and phosphorylation. *Biochem Soc Trans* **30**, 351–360 (2002).

253. MASTERS, SC, PEDERSON, KJ, ZHANG, L, BARBIERI, JT & FU, H. Interaction of 14-3-3 with a nonphosphorylated protein ligand, exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **38**, 5216–5221 (1999).
254. HENRIKSSON, ML, FRANCIS, MS, PEDEN, A, AILI, M, STEFANSSON, K, PALMER, R, AITKEN, A & HALLBERG, B. A nonphosphorylated 14-3-3 binding motif on exoenzyme S that is functional in vivo. *Eur J Biochem* **269**, 4921–4929 (2002).
255. FU, H, COBURN, J & COLLIER, RJ. The eukaryotic host factor that activates exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is a member of the 14-3-3 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2320–2324 (1993).
256. FRITZH-LINDSTEN, E, DU, Y, ROSQVIST, R & FORSBERG, A. Intracellular targeting of exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* via type III-dependent translocation induces phagocytosis resistance, cytotoxicity and disruption of actin microfilaments. *Mol Microbiol* **25**, 1125–1139 (1997).
257. DU, X, FOX, JE & PEI, S. Identification of a binding sequence for the 14-3-3 protein within the cytoplasmic domain of the adhesion receptor, platelet glycoprotein Ib alpha. *J Biol Chem* **271**, 7362–7367 (1996).
258. ANDREWS, RK, HARRIS, SJ, MCNALLY, T & BERNDT, MC. Binding of purified 14-3-3 zeta signaling protein to discrete amino acid sequences within the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex. *Biochemistry* **37**, 638–647 (1998).
259. CAMPBELL, JK, GURUNG, R, ROMERO, S, SPEED, CJ, ANDREWS, RK, BERNDT, MC & MITCHELL, CA. Activation of the 43 kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase by 14-3-3zeta. *Biochemistry* **36**, 15363–15370 (1997).
260. BRUNET, A, KANAI, F, STEHN, J, XU, J, SARBASSOVA, D, FRANGIONI, JV, DALAL, SN, DECAPRIO, JA, GREENBERG, ME & YAFFE, MB. 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol* **156**, 817–828 (2002).
261. DU, J, CHEN, L, LUO, X, SHEN, Y, DOU, Z, SHEN, J, CHENG, L, CHEN, Y, LI, C, WANG, H & YAO, X. 14-3-3zeta cooperates with phosphorylated Plk1 and is required for correct cytokinesis. *Front Biosci (Schol Ed)* **4**, 639–650 (2012).
262. VON LINDERN, M, VAN BAAL, S, WIEGANT, J, RAAP, A, HAGEMEIJER, A & GROSVELD, G. Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the set gene. *Mol Cell Biol* **12**, 3346–3355 (1992).
263. MATSUMOTO, K, NAGATA, K, UI, M & HANAOKA, F. Template activating factor I, a novel host factor required to stimulate the adenovirus core DNA replication. *J Biol Chem* **268**, 10582–10587 (1993).
264. VAESSEN, M, BARNIKOL-WATANABE, S, GÖTZ, H, AWNI, LA, COLE, T, ZIMMERMANN, B, KRATZIN, HD & HILSCHMANN, N. Purification and characterization of two putative HLA class II associated proteins: PHAPI and PHAPII. *Biol Chem Hoppe Seyler* **375**, 113–126 (1994).
265. KUTNEY, SN, HONG, R, MACFARLAN, T & CHAKRAVARTI, D. A signaling role of histone-binding proteins and INHAT subunits pp32 and Set/TAF-Ibeta in integrating chromatin hypoacetylation and transcriptional repression. *J Biol Chem* **279**, 30850–30855 (2004).
266. KAWASE, H, OKUWAKI, M, MIYAJI, M, OHBA, R, HANDA, H, ISHIMI, Y, FUJII-NAKATA, T, KIKUCHI, A & NAGATA, K. NAP-I is a functional homologue of TAF-I that is required for replication and transcription of the adenovirus genome in a chromatin-like structure. *Genes Cells* **1**, 1045–1056 (1996).
267. GAMBLE, MJ, ERDJUMENT-BROMAGE, H, TEMPST, P, FREEDMAN, LP & FISHER, RP. The histone chaperone TAF-I/SET/INHAT is required for transcription in vitro of chromatin templates. *Mol Cell Biol* **25**, 797–807 (2005).
268. KUZUHARA, T & HORIKOSHI, M. A nuclear FK506-binding protein is a histone chaperone regulating rDNA silencing. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 275–283 (2004).

269. XIAO, H, JACKSON, V & LEI, M. The FK506-binding protein, Fpr4, is an acidic histone chaperone. *FEBS Lett* **580**, 4357–4364 (2006).
270. NELSON, CJ, SANTOS-ROSA, H & KOUZARIDES, T. Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression. *Cell* **126**, 905–916 (2006).
271. ARÉVALO-RODRÍGUEZ, M & HEITMAN, J. Cyclophilin A is localized to the nucleus and controls meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **4**, 17–29 (2005).
272. LI, H, HE, Z, LU, G, LEE, SC, ALONSO, J, ECKER, JR & LUAN, S. A WD40 domain cyclophilin interacts with histone H3 and functions in gene repression and organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 2403–2416 (2007).
273. LI, H & LUAN, S. The cyclophilin AtCYP71 interacts with CAF-1 and LHP1 and functions in multiple chromatin remodeling processes. *Mol Plant* **4**, 748–758 (2011).
274. KIRSH, O, SEELER, JS, PICHLER, A, GAST, A, MÜLLER, S, MISKA, E, MATHIEU, M, HAREL-BELLAN, A, KOUZARIDES, T, MELCHIOR, F & DEJEAN, A. The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *EMBO J* **21**, 2682–2691 (2002).
275. SAITO, S, MIYAJI-YAMAGUCHI, M, SHIMOYAMA, T & NAGATA, K. Functional domains of template-activating factor-I as a protein phosphatase 2A inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* **259**, 471–475 (1999).
276. TSUJIO, I, ZAIDI, T, XU, J, KOTULA, L, GRUNDKE-IQBAL, I & IQBAL, K. Inhibitors of protein phosphatase-2A from human brain structures, immunocytological localization and activities towards dephosphorylation of the Alzheimer type hyperphosphorylated tau. *FEBS Lett* **579**, 363–372 (2005).
277. JANSSENS, V & GORIS, J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* **353**, 417–439 (2001).
278. ADACHI, Y, PAVLAKIS, GN & COPELAND, TD. Identification and characterization of SET, a nuclear phosphoprotein encoded by the translocation break point in acute undifferentiated leukemia. *J Biol Chem* **269**, 2258–2262 (1994).
279. RITTINGER, K, BUDMAN, J, XU, J, VOLINIA, S, CANTLEY, LC, SMERDON, SJ, GAMBLIN, SJ & YAFFE, MB. Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Mol Cell* **4**, 153–166 (1999).
280. GARCIA-GUZMAN, M, DOLFI, F, RUSSELLO, M & VUORI, K. Cell adhesion regulates the interaction between the docking protein p130(Cas) and the 14-3-3 proteins. *J Biol Chem* **274**, 5762–5768 (1999).
281. VINCENZ, C & DIXIT, VM. 14-3-3 proteins associate with A20 in an isoform-specific manner and function both as chaperone and adapter molecules. *J Biol Chem* **271**, 20029–20034 (1996).
282. KINYAMU, HK, CHEN, J & ARCHER, TK. Linking the ubiquitin-proteasome pathway to chromatin remodeling/modification by nuclear receptors. *J Mol Endocrinol* **34**, 281–297 (2005).
283. GOEBL, MG, YOICHEM, J, JENTSCH, S, MCGRATH, JP, VARSHAVSKY, A & BYERS, B. The yeast cell cycle gene CDC34 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Science* **241**, 1331–1335 (1988).
284. EKMAN, D, BJÖRKLUND, AK, FREY-SKÖTT, J & ELOFSSON, A. Multi-domain proteins in the three kingdoms of life: orphan domains and other unassigned regions. *J Mol Biol* **348**, 231–243 (2005).
285. EDLICH, F, WEIWAD, M, ERDMANN, F, FANGHÄNEL, J, JARCZOWSKI, F, RAHFELD, JU & FISCHER, G. Bcl-2 regulator FKBP38 is activated by Ca²⁺/calmodulin. *EMBO J* **24**, 2688–2699 (2005).
286. DAUM, S, LÜCKE, C, WILDEMANN, D & SCHIENE-FISCHER, C. On the benefit of bivalency in peptide ligand/pin1 interactions. *J Mol Biol* **374**, 147–161 (2007).

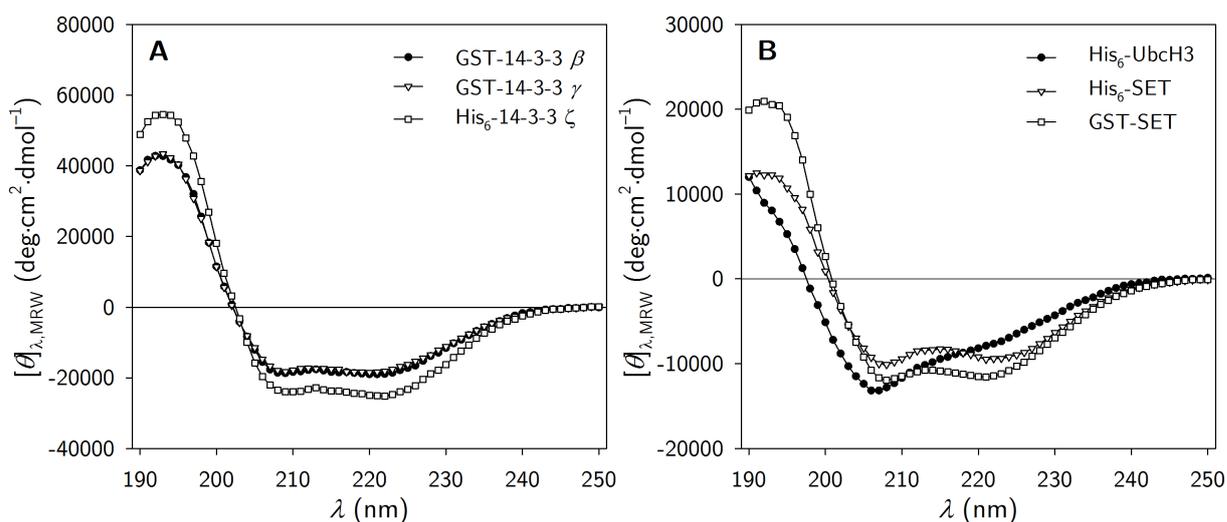


Abb. A.2: Sekundärstruktur der gereinigten rekombinanten Proteine. Fern-UV-CD-Spektren von 1,5–3 μM Protein (5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4) aufgenommen in Quarzküvetten mit 1 mm Schichtdicke bei 20 °C. Es wurden jeweils 50 Spektren akkumuliert. Zur Korrektur wurde ein Pufferspektrum subtrahiert. **A** His₆-14-3-3-Protein ζ , GST-14-3-3-Proteine β und γ . **B** His₆-UbcH3, His₆-SET-Protein, GST-SET-Protein.

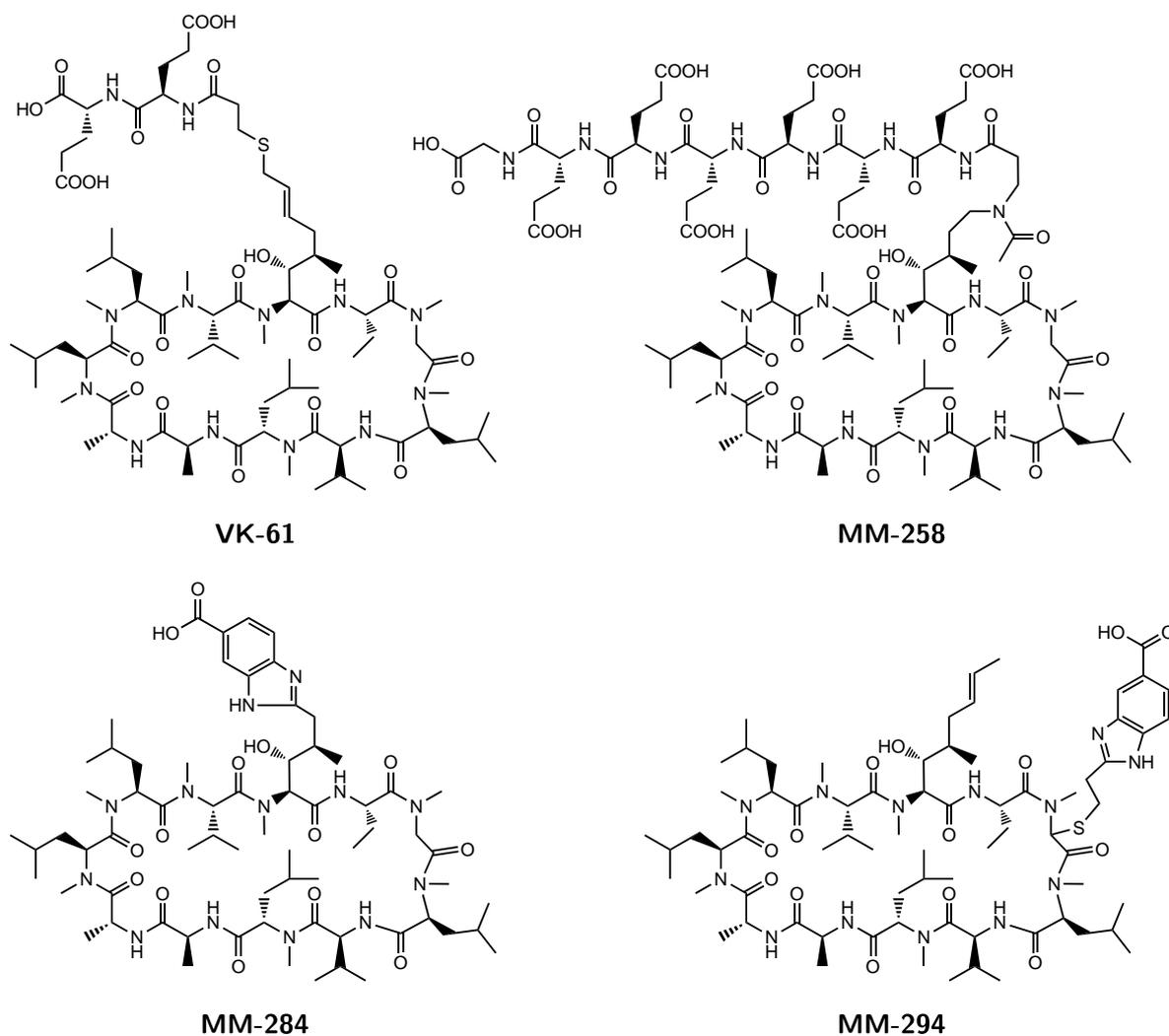


Abb. A.3: Strukturen der verwendeten CsA-Derivate.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Gunter FISCHER danke ich für die Möglichkeit meine Dissertation an der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung anfertigen zu dürfen und von den ausgezeichneten Arbeitsbedingungen profitieren zu könne.

Frau Dr. Cordelia SCHIENE-FISCHER danke ich für die Bereitstellung dieses interessanten Themas sowie die Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft beim anfertigen dieser Arbeit.

Frau Dr. Angelika SCHIERHORN danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen.

Herrn Dr. Miroslav MALEŠEVIĆ danke ich für die Durchführung der *Spot*-Synthese und die Bereitstellung der CsA-Derivate.

Herrn Dr. Sebastian MATHEA danke ich für die Zusammenarbeit bei der Durchführung der *StrepII*-Pulldown-Experimente und der Konfokalmikroskopie sowie für ausgiebige fachliche Diskussionen.

Herrn Dr. Matthias WEIWAD und Frau Stephanie BLOCK danke ich für die Zusammenarbeit bei der radioaktiven Markierung von Proteinen.

Herrn Dr. Hauke LILIE danke ich für die Durchführung der analytischen Ultrazentrifugation.

Herrn Michael SCHUMANN, Herrn Marten VILLMOW, Herrn Erik HINZE und Herrn Henrik HOFFMANN danke ich für die enge Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe und die stete Diskussionsbereitschaft.

Frau Barbara KORGE danke ich für die praktische Unterstützung im Laboralltag, stete Hilfsbereitschaft, die wertvollen Hinweise und das gute Laborklima.

Ich danke allen anderen Mitarbeitern der Forschungsstelle für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Dem Graduiertenkolleg 1026 und seinen Mitgliedern danke ich für vielfältige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich herzlich für die ständige Unterstützung und ihr Verständnis während des gesamten Studiums.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Mario Träger
Geburtsdatum	22.09.1981
Geburtsort	Reichenbach im Vogtland
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

09/1988 – 08/1992	Grundschule Friedensschule, Reichenbach im Vogtland
09/1992 – 07/2000	Goethe-Gymnasium, Reichenbach im Vogtland Abschluss: Abitur
09/2000 – 08/2001	Wehrdienst
10/2001 – 09/2002	Studium der Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/2002 – 07/2007	Studium der Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Diplomarbeit an der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle (Saale) Thema: „Detektion von Protein-Protein-Interaktionen mithilfe des IANUS-Spot-Arrays“ Abschluss: Diplom-Biochemiker
10/2007 –	Promotion an der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle (Saale) Thema: „Biochemie und Protein-Protein-Interaktionen des Multidomänen-Cyclophilins Cyp58“

Stipendien

04/2008 – 06/2011	Doktorandenstipendium des DFG Graduiertenkollegs 1026 “Conformational transitions in macromolecular interactions“
07/2011 – 12/2012	Doktorandenstipendium der Max-Planck-Gesellschaft

Halle (Saale), den 24.09.2014

Mario Träger

Eigene Veröffentlichungen

MALEŠEVIĆ, M, POEHLMANN, A, HERNANDEZ ALVAREZ, B, DIESSNER, A, TRÄGER, M, RAHFELD, JU, JAHREIS, G, LIEBSCHER, S, BORDUSA, F, FISCHER, G & LÜCKE, C. The protein-free IANUS peptide array uncovers interaction sites between Escherichia coli parvulin 10 and alkyl hydroperoxide reductase. *Biochemistry* **49**, 8626–8635 (2010).

NACEV, BA, LOW, WK, HUANG, ZN, SU, TT, SU, Z, ALKURAYA, H, KASUGA, D, SUN, W, TRÄGER, M, BRAUN, M, FISCHER, G, ZHANG, K & LIU, JO. A calcineurin-independent mechanism of angiogenesis inhibition by a nonimmunosuppressive cyclosporin A analog. *J Pharmacol Exp Ther* **338**, 466–475 (2011).

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die vorliegende Dissertation wurde von mir an keiner anderen Einrichtung zur Bewerbung um einen Doktorgrad eingereicht. Ich selbst habe mich noch nicht um einen Doktorgrad beworben.

Halle (Saale), den 24.09.2014

Mario Träger