

KONFORMATIONELLE REGULATION
DES
RNA-BINDENDEN CYCLOPHILINS CYP57

Dissertation

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

der

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

vorgelegt von Herrn Henrik Hoffmann

geboren am 30. Juni 1985 in Luckau

Gutachter:

1. Prof. Dr. Gunter Fischer

2. Prof. Dr. Mike Schutkowski

3. PD Dr. Felix Hausch

Promotionsgesuch eingereicht am: 03.12.2015

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.04.2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungen	iv
1. Einleitung	1
1.1 Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerasen	1
1.1.1 Die biologische Bedeutung der Prolyl-Bindung	1
1.1.2 Die Familien der PPlasen	1
1.1.3 FK506-bindende Proteine	3
1.1.4 Parvuline	4
1.2 Cyclophiline	4
1.2.1 Eigenschaften von Cyclophilinen	4
1.2.2 Humane Multidomänen-Cyclophiline	6
1.2.3 Splicing und spliceosomale Cyclophiline	8
1.3 Das Multidomänen-Cyclophilin Cyp57	10
1.3.1 Das humane Cyp57	10
1.3.2 Orthologe Proteine von Cyp57	10
1.3.3 Die RRM (<i>RNA recognition motif</i>) - Domäne	12
1.4 Zielstellung der Arbeit	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Materialien	14
2.1.1 Kits	14
2.1.2 Chromatographiesäulen/ -material	14
2.1.3 Chemikalien und Enzyme	14
2.1.4 Geräte	15
2.1.5 Puffer	15
2.1.6 Verwendete Organismen	16
2.1.6.1 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	16
2.1.6.2 Humane Zelllinien	16
2.1.7 Plasmid-DNA	17
2.1.8 Oligonukleotide	17
2.1.8.1 DNA-Oligonukleotide	17
2.1.8.2 RNA-Oligonukleotide	18
2.1.8.3 pSUPERIOR-RNAi Oligonukleotide	18
2.1.9 Konstrukte	19
2.1.10 Antikörper	20
2.1.11 Kristallisationskits	20
2.2 Methoden	21
2.2.1 Mikrobiologische Methoden	21
2.2.1.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	21
2.2.1.2 Transformation von <i>E. coli</i>	21
2.2.2 Zellkultur	21
2.2.2.1 Kultivierung humaner Zellen	21
2.2.2.2 Anlegen einer Kryokultur	21
2.2.2.3 Transfektion von humanen Zellen mit Plasmid-DNA	22
2.2.2.4 Transfektion von humanen Zellen mit siRNA und RNAi	22
2.2.2.5 Herstellung von Zelllysat für Präzipitationsexperimente	22
2.2.2.6 Konfokal-Mikroskopie	22
2.2.2.7 Fraktionierung von Zellen durch differentielle Zentrifugation	23
2.2.3 Molekularbiologische Methoden	23
2.2.3.1 PCR	23
2.2.3.2 Restriktionsverdau	23

2.2.3.3 Plasmid-Isolation.....	23
2.2.3.4 Ligation	24
2.2.3.5 Sequenzierung	24
2.2.3.6 CLIP (<i>in vivo cross-linking and immunoprecipitation</i>)	24
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden.....	25
2.2.4.1 Reinigung rekombinant hergestellter Proteine aus <i>E. coli</i> mit His ₆ -SUMO-Fusion	25
2.2.4.2 Interaktionsanalysen von Proteinen mit rekombinantem Protein aus <i>E. coli</i>	26
2.2.4.3 Interaktionsanalysen von Proteinen mit rekombinantem Cyp57- <i>Strep</i> aus HEK293-Zellen	27
2.2.5 Proteinanalytik	27
2.2.5.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	27
2.2.5.2 Limitierte Proteolyse	28
2.2.5.3 Massenspektrometrische Analyse	28
2.2.5.4 SDS-PAGE.....	28
2.2.5.5 Western-Blot-Analysen.....	28
2.2.5.6 Ribohomopolymer-Assay.....	29
2.2.5.7 CD-Spektroskopie	29
2.2.5.8 Bestimmung der PPIase-Aktivität und Inhibition der PPIase-Aktivität	30
2.2.5.9 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC).....	30
2.2.6 Kristallstrukturanalyse	31
2.2.6.1 Proteinkristallisation.....	31
2.2.6.2 Röntgenbeugungsanalyse und -datensammlung	32
2.2.6.3 Strukturlösung, -modellierung und -verfeinerung.....	32
3. Ergebnisse.....	34
3.1 Einordnung von Cyp57 als Cyclophilin.....	34
3.2 Klonierung, Expression und Reinigung von Cyp57	35
3.3 Bestimmung der Domänengrenzen von Cyp57	37
3.4 Klonierung und Reinigung von Cyp57-Varianten	38
3.5 Sekundärstrukturanalyse von Cyp57 und seiner Fragmente.....	40
3.6 Untersuchung der PPIase-Aktivität und Inhibition von Cyp57	42
3.7 Strukturaufklärung der PPIase-Domäne von Cyp57 ₁₋₁₆₈	46
3.7.1 Klonierung, Reinigung und Charakterisierung von Cyp57 ₁₋₁₆₈	46
3.7.2 Kristallisation von Cyp57 ₁₋₁₆₈	48
3.8 Charakterisierung der RRM-Domäne von Cyp57	50
3.8.1 Untersuchung der Bindeeigenschaften der RRM-Lys Domäne von Cyp57	50
3.8.2 Spektroskopische Untersuchung der Bindung von Cyp57 an Nukleinsäuren.....	53
3.8.3 Analyse der Interaktion von RNA-Oligonukleotiden und Cyp57 mittels ITC	56
3.8.4 PPIase-Aktivität von Cyp57 in Gegenwart von RNA	57
3.9 Expression von Cyp57 in humanen Zellen	58
3.9.1 Endogene Expression.....	58
3.9.2 Rekombinante Expression und Depletion von Cyp57 in HEK293-Zellen.....	58
3.9.3 Subzelluläre Lokalisation von Cyp57 in HEK293-Zellen.....	60
3.9.4 Untersuchung der RNA-Bindung von Cyp57 <i>in vivo</i>	62
3.10 Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern von Cyp57	63
3.10.1 Wechselwirkung von Cyp57 mit Smad5	63
3.10.2 Smad5-Binderegion in Cyp57	66
3.10.3 Wechselwirkung von Cyp57 mit CHERP	68
3.10.4 Zelluläre Lokalisation von Smad5 und CHERP in HEK293-Zellen.....	71
4. Diskussion.....	73
4.1 Charakterisierung von Cyp57	73
4.2 Cyp57 ist eine aktive PPIase.....	76
4.3 Strukturaufklärung der PPIase-Domäne	80
4.4 Cyp57 bindet Ribonukleinsäuren.....	83
4.5 Zelluläre Lokalisierung von Cyp57	87

4.6 Interaktionspartner von Cyp57.....	88
4.7 Mögliche Funktionen von Cyp57 <i>in vivo</i>	91
5. Zusammenfassung	93
Literatur	I
Anhang.....	XIV
Danksagung.....	XVIII
Lebenslauf	XIX
Publikationen	XX
Tagungsbeiträge.....	XX
Eidesstattliche Erklärung	XXI

Abkürzungen

Abz	2-Aminobenzoyl
AS	Aminosäure
CD	Circulardichroismus
CNBr	Bromcyan
CsA	Cyclosporin A
CTD	C-terminale Domäne
Cyp	Cyclophilin
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
FKS	fetales Kälber Serum
eGFP	<i>enhanced</i> grün fluoreszierendes Protein
ER	endoplasmatisches Retikulum
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IF	Immunfluoreszenz
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid
ITC	isotherme Titrationskalorimetrie
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
K _D	Dissoziationskonstante
k _{kat}	Wechselzahl, Katalyse-Konstante
k _{kat} /K _M	Spezifitätskonstante, katalytische Effizienz
mAb	monoklonaler Antikörper
MS	Massenspektrometrie
NMWL	nominal <i>molecular weight</i> Limit
Nt	Nukleotid
pAb	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PG	<i>prep grade</i>
pNA	p-Nitroanilid
PNK	T4-Polynukleotid Kinase
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
RNAi	RNA-Interferenz
RP-HPLC	<i>reversed phase high performance liquid chromatography</i>
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	<i>small interfering</i> RNA-Duplex
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
U	<i>Unit</i> , Einheit der Enzymaktivität
UpM	Umdrehungen pro Minute
WB	Western-Blot-Analyse

1. Einleitung

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

1.1.1 Die biologische Bedeutung der Prolyl-Bindung

Proteine sind Makromoleküle, die aus einem oder mehreren Polypeptiden aufgebaut sind. Jedes Polypeptid besteht aus einer Kette von Aminosäuren, die über Peptidbindungen miteinander verbunden sind. Die dreidimensionale Struktur eines Proteins wird durch die Aminosäuresequenz des Polypeptids bestimmt. Dabei ist die Konformation des Proteinrückgrats entscheidend für dessen biologische Aktivität.

Die räumliche Anordnung der Aminosäuren wird durch die Torsionswinkel ϕ (C α -N-Bindung) und ψ (C α -CO-Bindung) bestimmt. Deren Einzelbindungscharakter ermöglicht die Ausbildung einer Vielzahl von Konformationen, die im Wesentlichen durch sterische Wechselwirkungen der Aminosäureseitenketten beschränkt werden. Daneben bestimmt ein dritter Winkel ω (C-N-Bindung) die Verdrehung innerhalb der Ebene. Durch den partiellen Doppelbindungscharakter dieser Bindung, die auch als Peptidbindung bezeichnet wird, wird die freie Drehbarkeit um den Winkel ω beschränkt, sodass dieser nur zwei stabile Konformationen mit den Winkeln $\omega = 0^\circ$ (*cis*) und $\omega = 180^\circ$ (*trans*) einnehmen kann (Abbildung 1).

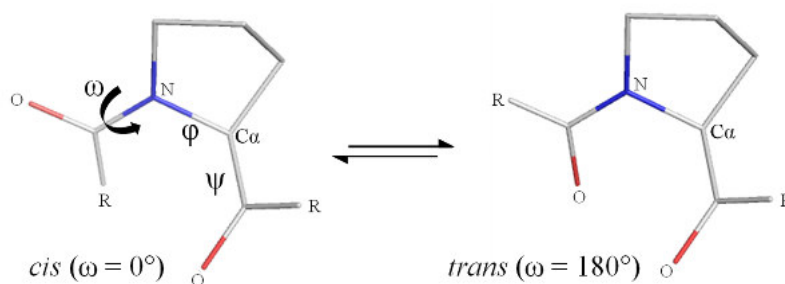


Abbildung 1: *cis/trans*-Isomerisierung der Peptidyl-Prolyl-Bindung. Stabdarstellung der Prolyl-Bindung (Xaa-Pro); in blau Stickstoff, in rot Sauerstoff und in grau Kohlenstoff. Erstellt mit Pymol 1.3.

In einer Polypeptid-Kette sind die meisten Proteinbausteine in der energetisch bevorzugten *trans*-Form miteinander verbunden (Ramachandran & Sasisekharan, 1968). Eine Besonderheit stellt die Peptidbindung N-terminal vor einem Prolin (Prolyl-Bindung) dar. Durch die Ringstruktur der Iminosäure Prolin unterliegt auch die *trans*-Konformation einer sterischen Hinderung. Im Vergleich zu nicht-Prolyl-Bindungen haben Prolyl-Bindungen eine höhere Rotationsbarriere und weisen durch den geringen Energieunterschied zwischen *cis*- und *trans*-Form einen erhöhten *cis*-Anteil auf (Ramachandran & Mitra, 1976). Untersuchungen von Proteinstrukturen zeigten, dass die Prolyl-Bindung in Proteinen in der *cis*-Form mit einem Anteil von 5-6% auftritt (Pal & Chakrabarti, 1999; Stewart *et al.*, 1990). Die strukturellen Unterschiede zwischen den beiden Konformationen können entscheidend für die Änderung funktioneller Protein-Zustände oder der Erkennung zwischen Bindepartnern sein (Schiene & Fischer, 2000).

1.1.2 Die Familien der PPIasen

Bei der Faltung von Proteinen *in vivo* spielen zelluläre Faktoren oft eine entscheidende Rolle. Die *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen ist biologisch gesehen ein langsamer Vorgang, der geschwindigkeitslimitierend auf den Faltungsprozess wirken kann (Brandts *et al.*, 1975; Fischer & Schmid, 1990). Durch eine Gruppe von Faltungshelferenzymen kann diese Reaktion effizient

beschleunigt werden (Fischer *et al.*, 1984). Entsprechend ihrer enzymatischen Aktivität werden diese Faltungshelferenzyme als Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen, EC 5.1.2.8) bezeichnet. Die Enzymklasse der PPIasen umfasst drei Familien von Proteinen, die aufgrund der Unterschiede in ihrer Aminosäuresequenz, ihrer Substratspezifität und ihrer Inhibierbarkeit durch verschiedene Naturstoffe unterschieden werden (**Abbildung 2**). Dazu zählen die Cyclophiline, die FK506-bindenden Proteine (FKBP) und die Parvuline (Fischer *et al.*, 1984; Harding *et al.*, 1989; Rahfeld *et al.*, 1994; Siekierka *et al.*, 1989). Die Cyclophiline und FKBP's werden wegen ihrer Fähigkeit Immunsuppressiva zu binden auch als Immunophiline bezeichnet (Schreiber, 1991). Cyclophiline werden von dem Immunsuppressivum Cyclosporin A (CsA) und FKBP's von FK506 oder Rapamycin reversibel inhibiert (Handschumacher *et al.*, 1984; Harding *et al.*, 1989). CsA wurde erstmalig als natürlich vorkommendes Metabolit aus *Tolypocladium inflatum* isoliert (Borel *et al.*, 1976). FK506 wurde in *Streptomyces tsukubaensis* gefunden (Kino *et al.*, 1987). Später wurde noch Juglon als irreversibler Parvulin-Inhibitor aus *Juglans nigra* entdeckt (Hennig *et al.*, 1998).

Die Bildung eines Inhibitor-Komplexes des hoch abundanten Cyclophilins Cyp18 bzw. FKBP's FKBP12 mit dem entsprechenden immunsuppressiven Inhibitor ermöglicht es, die Proteinphosphatase Calcineurin in einem ternären Komplex zu binden. Dadurch erfolgt die Inaktivierung des Calcineurins, das daraufhin den Transkriptionsfaktor NF-AT nicht mehr dephosphorylieren kann. Dadurch wird verhindert, dass NF-AT in den Zellkern transloziert und die Transkription von Cytokinen-Genen aktiviert. Auf diese Weise können beide Protein-Inhibitor-Komplexe die Aktivierung und Vermehrung von T-Lymphozyten hemmen (Clipstone & Crabtree, 1992; O'Keefe *et al.*, 1992). Aufgrund ihrer immunsuppressiven Wirkung werden CsA und FK506 in der Medizin bei Organ- und Knochenmarkstransplantationen verwendet. Bis heute wurden PPIasen als Schlüsselenzyme für die verschiedensten physiologischen und biologischen Prozesse, wie der *in vivo* Proteinfaltung, der Hitzeschock-Antwort, der Transkription, der Translation, der Ionenkanal- und Rezeptor-Regulation, der Signalweiterleitung, der Pathogen-Wirt-Interaktion und der Zellzykluskontrolle identifiziert (Frausto *et al.*, 2013; Galat & Bua, 2010; Kumari *et al.*, 2013).

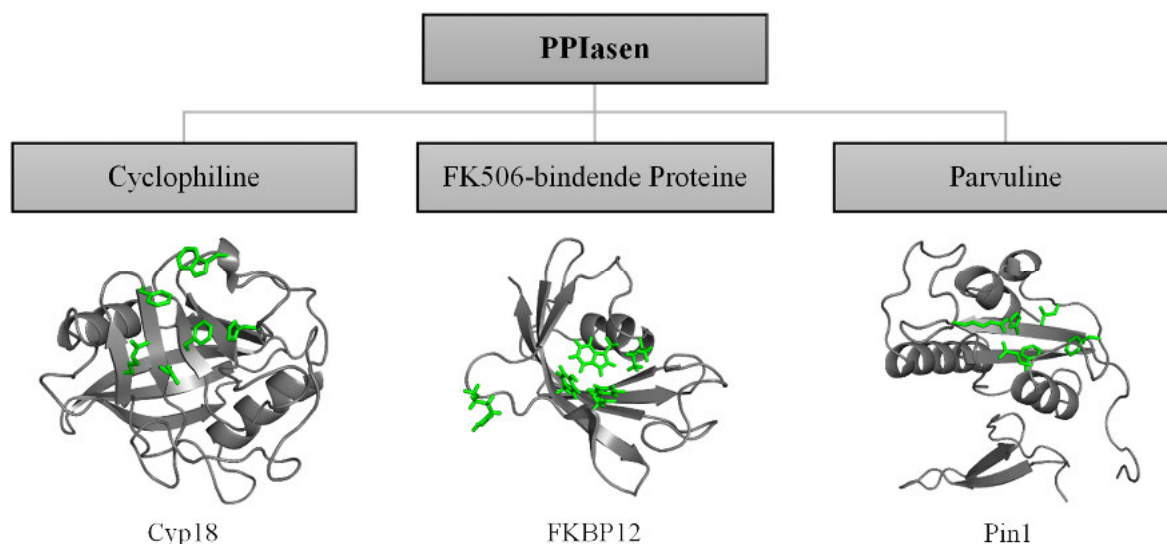


Abbildung 2: Die Enzymklasse der PPIasen. Dargestellt sind die Strukturen der prototypischen humanen Vertreter der Cyclophiline - Cyp18 (PDB-ID: 2CPL), der FK506-bindenden Proteine - FKBP12 (PDB-ID: 1FKS) und der Parvuline - Pin1 (PDB-ID: 1PIN). Als Cartondarstellung (grau) sind die Proteinstrukturen gezeigt und als Stabdarstellung die Aminosäuren des aktiven Zentrums (grün) - Cyp18 (Arg55, Phe60, Gln63, Phe113, Trp121, His126); FKBP12 (Tyr26, Asp37, Arg42, Ile56, Trp59, Phe99) und Pin1 (His59, Arg68, Leu122, Phe125, Gln131, Phe134) (Fanghänel & Fischer, 2004). Abbildung verändert nach (Lu *et al.*, 2007).

1.1.3 FK506-bindende Proteine

FKBPs bilden eine Familie der PPIasen, die durch die Bindung der makrolidischen Verbindungen FK506 und Rapamycin entdeckt wurden (Harding *et al.*, 1989). Im Menschen sind bisher 16 verschiedene FKBP bekannt (Schiene-Fischer, 2015). FKBP12 ist der prototypische Vertreter der FKBP-Familie. Es besteht aus einer einzelnen FKBP-Domäne, die aus einem fünfsträngigen antiparallelen β -Faltblatt und einer kurzen Helix gebildet wird (**Abbildung 2**) (Michnick *et al.*, 1991; Moore *et al.*, 1991). Diese Domäne ist für die PPIase-Aktivität als auch für die FK506- bzw. Rapamycin-Bindung verantwortlich (Itoh & Navia, 1995). Bisher konnte noch nicht für alle Vertreter eine PPIase-Aktivität oder FK506-Bindung nachgewiesen werden (Jarczowski, 2008; Linnert, 2012).

FKBPs vermitteln viele zelluläre Prozesse. Das prototypische FKBP12 ist unter anderem in die Regulation von Rezeptoren involviert. So interagiert FKBP12 mit den Ryanodin-Rezeptoren (RyRs) und dem Inositol 1,4,5-Triphosphat Rezeptor (IP₃R), die zu den Calcium-Kanälen gehören. Bei RyR moduliert FKBP12 die Aktivierung, die zur Freisetzung von Calciumionen führt (Ahern *et al.*, 1994; Cameron *et al.*, 1995). Außerdem interagiert FKBP12 mit dem *transforming growth factor*- β (TGF- β) (Wang *et al.*, 1994). TGF- β spielt eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung und der interzellulären Kommunikation. Bei diesem Signalweg wirken Smad-Proteine als Transkriptionsfaktoren regulatorisch auf spezifische Gene (Massagué *et al.*, 2005).

Neben FKBP12 und anderen nur aus der PPIase-Domäne bestehenden FKBP gibt es bei den humanen FKBP Proteine, die neben der PPIase-Domäne noch zusätzlich andere Domänen enthalten und daher als Multidomänen-FKBPs bezeichnet werden. Darüber hinaus besitzen einige Vertreter wie zum Beispiel FKBP51 oder FKBP52 noch weitere FKBP-Domänen (Barent *et al.*, 1998; Callebaut *et al.*, 1992). Bei FKBP51 und FKBP52 wird die katalytische Aktivität nur durch die N-terminale PPIase-Domäne vermittelt, die andere Domäne wird für die Bindung von verschiedenen Interaktionspartnern benötigt (Pirkl *et al.*, 2001; Sinars *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004). Weiterhin können die humanen FKBP Signal- und Transportsequenzen, Transmembrandomänen oder EF-Handstrukturen zur Bindung von Calcium enthalten (Galat, 2003), sowie weitere Elemente für Protein-Protein-Interaktionen wie Calmodulin-Bindestellen oder TPR-Domänen besitzen (Blatch & Lässle, 1999; Edlich *et al.*, 2005).

Etwa die Hälfte der Multidomänen-FKBPs besitzen mehrere TPR-Domänen, worüber diese FKBP mit dem molekularen Chaperon Hsp90 assoziiert sind (Allan & Ratajczak, 2011; Schiene-Fischer, 2015). FKBP51 und FKBP52 binden über Hsp90 an unterschiedliche Steroid-Rezeptoren (Callebaut *et al.*, 1992). Dabei wird FKBP51 bevorzugt von Glukokortikoid-Rezeptoren gebunden, wohingegen FKBP52 präferiert Progesteron-Rezeptoren bindet (Banerjee *et al.*, 2008). Die Assoziation von FKBP und Rezeptor hat unterschiedliche Auswirkungen auf die Aktivität des Rezeptors. Auch FKBP38 interagiert über seine TPR-Domäne mit Hsp90, durch die Bindung geht die Interaktion von FKBP38 mit dem anti-apoptotischen Protein Bcl-2 verloren (Edlich *et al.*, 2007). Zudem wird durch die TPR-Domäne von FKBP38 ein ternärer Komplex mit Hsp90 und dem Hepatitis-C-Virusprotein NS5A gebildet. Das Virusprotein besitzt eine Schlüsselrolle bei der Replikation der Hepatitis-C-Virus RNA (Okamoto *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006).

Daneben wurde für FKBP51 und FKBP52 gezeigt, dass sie eine wichtige Rolle in der Aktivierung und Regulation von Genen spielen. Beide Proteine sind mit dem Argonautenprotein Ago2 assoziiert, das für die Erkennung der siRNA und das Schneiden des nicht-involvierten Komplementärstrangs im RISC verantwortlich ist (Martinez *et al.*, 2013; Pare *et al.*, 2013).

Aufgrund der vielfältigen physiologischen Funktionen der FKBP ist eine Beteiligung an unterschiedlichen, individuellen Signaltransduktionsprozessen wahrscheinlicher als eine generelle und essentielle Beteiligung bei der Proteinfaltung (Göthel & Marahiel, 1999).

1.1.4 Parvuline

Der erste Vertreter der Parvuline, Par10 wurde in *Escherichia coli* entdeckt (Rahfeld *et al.*, 1994). Später wurden Parvuline auch in vielen anderen pro- und eukaryotischen Organismen gefunden. Im humanen Genom werden zwei Parvuline codiert. Das humane Pin1 ist das am besten untersuchte Parvulin. Ursprünglich wurde es als Mitose-Inhibitor beschrieben (Lu *et al.*, 1996). Pin1 ist evolutionär stark konserviert, mit Orthologen in vielen Eukaryoten, wie Dodo in *Drosophila melanogaster*, Ess1 in *Saccharomyces cerevisiae* und Pin1 in *Schizosaccharomyces pombe* (Hanes *et al.*, 1989; Huang *et al.*, 2001; Maleszka *et al.*, 1996). Pin1 besteht aus einer N-terminalen WW-Domäne und einer C-terminalen PPIase-Domäne. Die PPIase-Domäne ist aus einem viersträngigen antiparallelen β -Faltblatt aufgebaut, das von vier α -Helices umgeben ist (**Abbildung 2**) (Ranganathan *et al.*, 1997).

Es wurde gezeigt, dass sowohl Pin1 als auch Ess1 über die WW-Domäne mit der phosphorylierten C-terminalen Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II interagieren (Albert *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 1999; Myers *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2000). Die Überexpression von Pin1 und die Mutation von *ess1* führten zur Inhibition der Transkription durch die RNA-Polymerase II und deuten damit auf eine funktionelle Interaktion hin (Wu *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2003). Studien zu der Substratspezifität von Pin1 zeigten, dass beide Domänen von Pin1 in der Lage sind, phosphorylierte Serin-/ Threonin-Prolin Sequenzen zu erkennen (Lu *et al.*, 1999a, 1999b; Yaffe *et al.*, 1997). Wahrscheinlich werden die Pin1-Substrate von Kinasen phosphoryliert, die spezifisch Ser- und Thr-Reste gefolgt von einem Prolin erkennen (Brown *et al.*, 1999; Weiwad *et al.*, 2004). Zu diesen Kinasen gehören unter anderem die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK2, CDK7, CDK8 und CDK9, die an der Phosphorylierung der CTD der RNA-Polymerase II beteiligt sind. Verschiedene Studien zeigten zwar einen Einfluss auf die Phosphorylierung der CTD, aber die physiologische Funktion der RNA-Polymerase II-Inhibition ist weiterhin ungeklärt (Kops *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003). Weitere Substratproteine von Pin1 sind Cdc25, das Zellzyklus-abhängig den Eintritt in die Mitose reguliert (Stukenberg & Kirschner, 2001) oder Fdw7, das als Tumorsuppressor verschiedene Onkoproteine für deren Abbau markiert (Min *et al.*, 2012). Darüber hinaus sind noch viele weitere Substratproteine von Pin1 mit unterschiedlichen zellulären Funktionen beschrieben, die in Lu & Hunter, (2014) zusammengefasst sind.

1.2 Cyclophiline

Cyclophiline wurden in verschiedenen Organismen, einschließlich Vertebraten, Pflanzen, Pilzen, Bakterien und Archaeen gefunden (Galat, 2003). Die meisten Prokaryoten und Archaeen verfügen nur über wenige Cyclophiline, wohingegen Eukaryoten eine deutlich höhere Anzahl dieser Enzyme besitzen. So verfügt *S. cerevisiae* über 8, *Caenorhabditis elegans* über 17, *D. melanogaster* über 14 und *Arabidopsis thaliana* über 29 Cyclophilin-Isoformen. Im humanen Genom werden 19 verschiedene Cyclophiline codiert (Galat, 2003; Kumari *et al.*, 2013; Schiene-Fischer, 2015).

1.2.1 Eigenschaften von Cyclophilinen

Allen Cyclophilinen gemeinsam ist die strukturell konservierte PPIase-Domäne (Fanghänel & Fischer, 2004). Cyp18 als prototypischer Vertreter dieser Familie besteht nur aus dieser Domäne, die aus einem geschlossenen β -Fass aufgebaut ist, das aus acht antiparallelen β -Faltblättern gebildet wird, um das zwei α -Helices angeordnet sind (**Abbildung 2**) (Ke *et al.*, 1991). Neben Cyp18 und weiteren acht Einzeldomänen-Cyclophilinen gibt es noch Mitglieder der Cyclophilin-Familie mit einer Mehrdomänen-Organisation. Diese Proteine werden durch zusätzliche funktionale Domänen N- oder C-terminal der PPIase-Domäne ergänzt (Adams *et al.*, 2005).

Die PPIase-Domäne katalysiert die *cis/trans*-Isomerisierung von Xaa-Pro-Peptidbindungen in Polypeptidketten. Der Beschleunigungsfaktor der enzymatischen Reaktion gegenüber der unkatalysierten Reaktion liegt bei ca. 10^6 für Cyp18 und dem Peptid-Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA. Die Aktivität von Cyp18 mit einer hohen katalytischen Effizienz (k_{kat}/K_M) von bis zu $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ liegt im Bereich des Diffusionslimits von $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Kofron *et al.*, 1991). Cyp18 besitzt eine geringe Spezifität gegenüber Substraten mit unterschiedlichen Aminosäuren in der N-terminal benachbarten Position zum Prolin (P1-Position nach Schechter & Berger, 1967) (Zoldák *et al.*, 2009). Die Aktivität von Multidomänen-Cyclophilinen ist mit einer katalytischen Effizienz von $10^4 - 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Fanghänel & Fischer, 2004) meist deutlich geringer als die von Cyp18.

Wie bereits erwähnt, erhielten die Cyclophiline ihren Namen durch die Bindung des zyklischen Undekapeptides Cyclosporin A (Fischer *et al.*, 1989). CsA als potenter Inhibitor von Cyp18 bindet mit hoher Affinität im aktiven Zentrum von Cyp18 und inhibiert dadurch die PPIase-Aktivität des Enzymes. Die meisten Einzeldomänen-Cyclophiline werden mit einem K_i -Wert im nanomolaren Bereich inhibiert, wie Cyp18 mit 2.9 nM oder Cyp23 mit 8.4 nM (Daum *et al.*, 2009). Dagegen wurden Inhibitionskonstanten für Mehrdomänen-Cyclophiline im mikromolaren Bereich bestimmt, wie für Cyp58 mit 11 μM oder Cyp165 mit 0.7 μM (Träger, 2015; Rinfret *et al.*, 1994). Neben CsA wurden auch andere niedermolekulare Cyclophilin-Inhibitoren identifiziert, nicht immunsuppressive CsA-Derivate (Rosenwirth *et al.*, 1994) oder isoenzym-spezifische, nicht-peptidische Inhibitoren, die zwischen verschiedenen Cyclophilin-Isoformen unterscheiden können (Daum *et al.*, 2009). Durch deren Einsatz sollen starke Nebenwirkungen, die bei der Behandlung mit CsA auftreten, verringert werden.

Der Katalysemechanismus der Cyclophiline ist trotz intensiver Untersuchung bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt und verstanden. NMR-Studien und Kristallstrukturdaten mit Substrat-Peptiden bzw. Inhibitoren, sowie gerichtete Mutagenesen dienten als Basis für die Identifizierung verschiedener Aminosäuren im aktiven Zentrum von Cyp18, die für den Katalysemechanismus und/ oder die Substratbindung von Bedeutung sind (Fanghänel & Fischer, 2004). So zeigt die Kristallstruktur von Cyp18 im Komplex mit einem Peptid-Substrat mögliche an der Katalyse beteiligte Aminosäuren des aktiven Zentrums von Cyp18 (Kallen & Walkinshaw, 1992). Als Aminosäuren von Cyp18, die in Kontakt mit dem Substrat stehen, wurden Arg55, Phe60, Met61, Gln63, Gly72, Ala101, Asn102, Ala103, Gln111, Phe113, Trp121, Leu122 und His126 identifiziert (Kallen & Walkinshaw, 1992; Ke *et al.*, 1994). Die Bindung des Prolin-Pyrrolidinrings erfolgt durch hydrophobe Wechselwirkungen mit den Aminosäureresten Phe60, Met61, Phe113 und Leu122 (Fanghänel & Fischer, 2004). Ähnliche Wechselwirkungen von Cyp18 wurden mit den Resten Methylvalin 11 und Methylleucin 9 des Inhibitors CsA beschrieben (Ke & Huai, 2004; Ke *et al.*, 1994). Protein-Varianten von Cyp18, in denen die Reste Arg55, Phe60 und His126 ausgetauscht wurden, zeigten nur noch 0.1%, 3% bzw. 9% Restaktivität (Zydowsky *et al.*, 1992). Durch Computersimulationen wurde gezeigt, dass Cyp18 sein Substrat bevorzugt im Übergangszustand bindet, wobei Arg55 besonders wichtig für die Substratbindung und die Stabilisierung ist (McGowan & Hamelberg, 2013).

Humane Cyclophiline kommen sowohl in Zellen in verschiedenen Zellkompartimenten (Cytosol, ER, Zellmembran, Mitochondrien, Nukleus), als auch extrazellulär in der Blutbahn vor (Ryffel *et al.*, 1991; Hoffmann & Schiene-Fischer, 2014). Cyp18 ist das am stärksten exprimierte humane Cyclophilin, es wurde mit einer durchschnittlichen Konzentration von 1-2 $\mu\text{g mg}^{-1}$ Protein in verschiedenen humanen Geweben und mit einer etwas höheren Konzentration im Hirn gefunden (Ryffel *et al.*, 1991).

Cyp18 wird neben seiner immunsuppressiven Wirkung durch den Cyp18-CsA-Komplex noch mit verschiedenen weiteren zellulären Funktionen in Verbindung gebracht. So moduliert Cyp18 die Infektiosität und Replikation verschiedener Viren, wie zum Beispiel HIV und HCV (Braaten & Luban, 2001; Chatterji *et al.*, 2009). Cyp18 dient aber auch dem Schutz vor oxidativem Stress (Doyle *et al.*, 1999). Zudem scheint Cyp18 eine Schlüsselrolle bei der Ausbildung humaner Krankheiten zu spielen. Beispielsweise neigen Cyp18-defiziente Mäuse zu allergischen Erkrankungen (Colgan *et al.*, 2004).

Auch ein Zusammenhang von Cyp18 und der Entstehung von Asthma bzw. rheumatoider Arthritis wird diskutiert (Gwinn *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2008). Wahrscheinlich ist extrazelluläres Cyp18 an diesen entzündlichen Prozessen beteiligt.

Intrazelluläres Cyp18 beeinflusst die Funktionen des Tumorsuppressors p53 bei der Zellzyklusregulation bzw. Apoptose und spielt eine Rolle bei der Differenzierung und dem Wachstum von Nervenzellen (Baum *et al.*, 2009; Nahreini *et al.*, 2001). Das Funktionsspektrum der Cyclophiline wird durch die Kombination mit anderen Domänen erweitert (Schiene-Fischer, 2015).

Rund die Hälfte der bisher bekannten humanen Cyclophiline sind Mehrdomänen-Proteine. Im Vergleich zu Cyclophilinen mit nur einer Domäne liegen Multidomänen-Cyclophiline meist in niedrigeren zellulären Konzentrationen vor und sind schwieriger rekombinant zu gewinnen (Träger, 2015). Viele Multidomänen-Cyclophiline sind bisher auf Proteinebene wenig charakterisiert. Jedoch wurde für fast alle humanen Multidomänen-Cyclophiline die Kristallstruktur der PPIase-Domäne gelöst (Davis *et al.*, 2010). Eine Gesamtstruktur liegt allein nur für das bovine Cyp40 vor (Taylor *et al.*, 2001).

1.2.2 Humane Multidomänen-Cyclophiline

In Multidomänen-Cyclophilinen liegt die Cyclophilin-Domäne durch eine oder mehrere funktionelle Domänen N- oder C-terminal erweitert vor. Bisher sind 6 zusätzliche funktionale Domänen bekannt, die bei der Ausbildung der zehn humanen Multidomänen-Cyclophiline vorkommen, die TPR-Domäne, die WD40-Domäne, die U-box-Domäne, die E3-SUMO-Ligase-Domäne, die RRM-Domäne und die Ran-Bindedomäne (Tabelle 1) (Schiene-Fischer, 2015).

Tabelle 1: Übersicht der humanen Multidomänen-Cyclophiline. Die Anzahl der Aminosäuren (AS) und die molekulare Masse (MW) sind entsprechend der UniProtKB-Datenbank angegeben. PPIase, PPIase-Domäne; RRM, RNA-bindende-Domäne; TPR, TPR-Domäne; U-Box, U-Box-Domäne; WD40, WD40-Domäne; RanBP, Ran-Bindedomäne; E3-SUMO, E3-SUMO-Ligase-Domäne; *cc*, *coiled coil*-Region; RS, Arginin/ Serin-reiche Region; ZF, Zinkfinger-Motiv. CsA-Bindung: eine Bindung konnte bestimmt werden (+), keine Bindung wurde bestimmt (-) oder die Bindung wurde noch nicht untersucht (n. d.) (Davis *et al.*, 2010; Träger, 2015).

Name	Gen-Name	AS	MW (Da)	Domänen	CsA-Bindung
Cyp33	PPIE	301	33 431	PPIase, RRM	+
Cyp40	PPID	370	40 764	PPIase, TPR	+
Cyp54	SDCCAG10	472	53 847	PPIase, <i>cc</i>	-
Cyp57	PPIL4	492	57 225	PPIase, RRM	n. d.
Cyp58	PPIL2	520	58 823	PPIase, U-Box, <i>cc</i>	+
Cyp73	PPWD1	646	73 575	PPIase, WD40	+
Cyp88	PPIG	754	88 617	PPIase; RS	+
Cyp165	NKTR	1462	165 677	PPIase; RS	+
Cyp358	RANBP2	3224	358 218	PPIase, TPR, RanBD, E3-SUMO, ZF	-

Die TPR- und WD40-Domäne, sind dafür bekannt, dass sie als Plattform für Protein-Protein-Interaktionen dienen (Kieffer *et al.*, 1992; Stirnimann *et al.*, 2010). Die U-Box-Domäne als modifizierte RING-Domäne und die E3-SUMO-Ligase-Domäne besitzen E3-Ligase-Aktivität (Hatakeyama *et al.*, 2001; Melchior *et al.*, 2003). Die RRM-Domäne ist als Domäne für die Bindung von RNA aber auch

von Proteinen beschrieben (Maris *et al.*, 2005). Die Ran-Bindedomäne ist als Komponente des Kernporen-Komplexes bekannt (Wu *et al.*, 1995). Neben diesen funktionalen Domänen sind noch das Vorkommen von *coiled coil*-Regionen und Arginin/ Serin-reichen Regionen in Multidomänen-Cyclophilinen beschrieben (Tabelle 1). Einem zehnten Multidomänen-Cyclophilin, Cyp35, konnte bisher noch keine funktionale Proteindomäne in seinem Sequenzbereich zusätzlich zur Cyclophilin-Domäne zugeordnet werden.

Eine RRM-Domäne wurde für die humanen Cyclophiline Cyp33 und Cyp57 gefunden. In Cyp33 befindet sich diese Domäne im N-terminalen Teil des Proteins, während sie bei Cyp57 C-terminal der PPIase-Domäne auftritt. Beide Cyclophiline wurden als Komponenten des Spliceosoms identifiziert (Deckert *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2002). Daneben wurde für Cyp33 gezeigt, dass über seine PPIase-Aktivität bestimmte Zielgene reguliert werden. Cyp33 ist in die epigenetische Kontrolle der Transkription durch die direkte Bindung des PHD3-Fingers der Mixed-Lineage-Leukemia 1 (MLL1) Histon Methyltransferase involviert (Grow & Wysocka, 2010; Wang *et al.*, 2010). Um die Transkription zu reprimieren, wird die katalytische Aktivität der PPIase-Domäne benötigt (Park *et al.*, 2010). Cyp33 katalysiert die *cis/trans*-Isomerisierung der Peptidbindung His1628-Pro1629 in der Linker-Region zwischen dem PHD3-Finger und der Bromo-Domäne in MLL1, wodurch es zu einer Konformationsänderung in MLL1 kommt (Park *et al.*, 2010). Durch die *cis/trans*-Isomerisierung der Prolyl-Bindung kann die RRM-Domäne von Cyp33 den PHD3-Finger von MLL1 binden. Dadurch wird die Rekrutierung von Histon-Deacetylasen ermöglicht und in Folge dessen kommt es zur Repression der Transkription (Wang *et al.*, 2010). Welche Funktion die Fähigkeit von Cyp33 zur Bindung von RNA bei der epigenetischen Regulation spielt, ist unklar. Außerdem wurde gezeigt, dass Cyp33 als Wirtsfaktor die virale Replikation und Transkription von Influenza-A-Viren inhibiert. Cyp33 interagiert dabei mit dem viralen Nukleoprotein und beeinträchtigt damit die Bildung des viralen Ribonukleoprotein-Komplexes. Obwohl Cyp33 das Nukleoprotein mit der PPIase-Domäne bindet, scheint diese Interaktion unabhängig von der PPIase-Aktivität von Cyp33 zu sein (Wang *et al.*, 2011). Eine weitere Eigenschaft von Cyp33 ist die spezifische Bindung von poly(A), poly(U) bzw. mRNA, die zur Stimulation der PPIase-Aktivität des Enzyms führt (Mi *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2008).

Es gibt zwei humane Cyclophiline mit TPR-Domänen, Cyp40 und das große Cyp358. Cyp40 besitzt neben seiner N-terminalen PPIase-Domäne C-terminal noch die TPR-Domäne mit drei TPR-Motiven, womit es die molekularen Chaperone Hsp90 und Hsc70 bindet (Carrello *et al.*, 2004; Hoffmann & Handschumacher, 1995; Kieffer *et al.*, 1992). Außerdem verfügt Cyp40 über eine eigene Chaperon-Aktivität, die sich in der Linker-Region zwischen beiden Domänen befindet (Mok *et al.*, 2006). Cyp40 ist unter anderem an der Regulation und Signalweiterleitung von Steroidrezeptoren im Komplex mit Hsp90 beteiligt (Pratt & Toft, 1997). Zudem spielt Cyp40 eine Rolle bei der Replikation von HCV (Goto *et al.*, 2009).

Eine E3-Ligase-Aktivität besitzt Cyp58 und Cyp358. Bei Cyp58 wird sie durch eine N-terminale U-Box-Domäne des Proteins generiert, für die ein E3-Ligase-Aktivität in Kombination mit den E2-Proteinen Ubc3 und Ubc2b gezeigt wurde (Hatakeyama *et al.*, 2001). Cyp58 bindet CD147 und reguliert dessen Zelloberflächen-Expression (Pushkarsky *et al.*, 2005). Zudem wurde Cyp58 im Zusammenhang mit der Amyloid- β -Produktion und der Alzheimer-Erkrankung gefunden (Espeseth *et al.*, 2006). Außerdem wurde Cyp58 als Komponente des Spliceosoms identifiziert (Zhou *et al.*, 2002). Lokalisationsstudien mit eGFP-Cyp58 zeigten eine überwiegend nukleäre Lokalisation des Proteins (Träger, 2015).

Über Cyp73 ist bisher wenig bekannt. Cyp73 besitzt neben der aktiven PPIase-Domäne noch N-terminal eine WD40-Domäne (Davis *et al.*, 2008). Auch Cyp73 wurde als Komponente des Spliceosoms beschrieben (Chen *et al.*, 2007). Eine Grundfunktion der WD40-Proteine ist es, eine Plattform für Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktionen bereitzustellen (Mishra *et al.*, 2012; Zhang & Zhang, 2015). Für AtCyp71, dem Ortholog von Cyp73 aus *A. thaliana* wurde gezeigt, dass es durch die Bindung von Histon H3 und der Regulation der Genexpression wesentlich für die pflanzliche Entwicklung ist (Li *et al.*, 2007). Zudem bindet es Schlüsselkomponenten der pflanzlichen Chromatin-Assemblierung bzw. -Modifikation, wodurch deren Funktion am Chromatin vermittelt wird (Li & Luan, 2011).

Cyp88 und Cyp165 sind sich sehr ähnlich. Beide Proteine verfügen über eine Arginin/ Serin-reiche Region zusätzlich zur Cyclophilin-Domäne (Anderson *et al.*, 1993; Nestel *et al.*, 1996; Rinfret *et al.*, 1994). Cyp88 wurde im Spliceosom detektiert (Mortillaro & Berezney, 1998), Cyp165 wurde ursprünglich auf der Oberfläche von natürlichen Killerzellen (NK) und später auf T-Lymphozyten nachgewiesen (Alkhatib *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 1993). Dort spielt es eine Rolle bei der lytischen Aktivität der NK-Zellen und der Erkennung von Tumorzellen (Chambers *et al.*, 1994). Cyp88 kontrolliert unter anderem die Verteilung von SR-Proteinen wie SC35 im Zellkern (Lin *et al.*, 2004). Ähnliche Cyclophiline mit einer SR-Domäne wurden in *A. thaliana* gefunden, AtCyp59, AtCyp63 und AtCyp95 (Gullerova *et al.*, 2006; Lorkovic *et al.*, 2004). AtCyp63 und AtCyp95 interagieren mit den pflanzlichen SR-Proteinen SCL28, SCL30, SRp30 bzw. SRp34 und den Kernkomponenten des Spliceosoms, den Ribonukleoproteinen U1-70K und U11-35K. SRp34 ist das Ortholog zum humanen Splicing-Faktor SF2/ASF der wichtig für die Erkennung der 5'-Spleißstelle im Intron ist (Lorkovic *et al.*, 2004).

Das größte bekannte humane Cyclophilin Cyp358 besitzt neben seiner aktiven PPIase-Domäne noch mehrere Zinkfinger-Motive, TPR-Domänen, eine E3-SUMO-Ligase-Domäne und vier Ran-Bindedomänen. Über die Ran-Bindedomänen kann das Protein mit dem Kernporen-Komplex interagieren (Wu *et al.*, 1995; Yokoyama *et al.*, 1995). Damit ist Cyp358 ein wichtiges Protein für den nukleären Im- und Export von Proteinen und RNA (Kalab & Heald, 2008; Yokoyama *et al.*, 1995). Die E3-SUMO-Ligase-Domäne besitzt in Verbindung mit dem SUMO-konjugierenden Enzym Ubc9 eine SUMO1-spezifische E3-Ligase-Aktivität (Saitoh *et al.*, 1997; Werner *et al.*, 2012). Über die Zinkfinger-Motive können mRNAs mit speziellen Elementen gebunden und aus dem Kern transportiert werden (Mahadevan *et al.*, 2013). Zudem wird der Import des HIV-1 Kapsid-Proteins durch die Bindung von Cyp358 in den Kern vermittelt (Schaller *et al.*, 2011).

1.2.3 Splicing und spliceosomale Cyclophiline

Viele prä-mRNA-Transkripte besitzen Introns, die nicht translatiert werden, sondern vorher durch zwei aufeinanderfolgende Umesterungen aus dem Transkript herausgeschnitten werden. Die Splicing-Reaktion wird durch das Spliceosom katalysiert. Dabei handelt es sich um einen dynamischen Ribonukleoprotein-Komplex (RNP) der aus *small nuclear RNAs* (snRNAs: U1, U2, U3, U4, U5) und einer Vielzahl verschiedener Proteine zusammengesetzt ist (Jurica & Moore, 2003; Newman & Nagai, 2010; Ritchie *et al.*, 2009; Staley & Guthrie, 1998). Die snRNAs sind mit verschiedenen Splicing-Faktoren assoziiert, wodurch das Spliceosom seine katalytische Aktivität erhält. Nach dem Modell von Wahl *et al.*, (2009) erkennt das U1-snRNP die GU-Sequenz an der 5'-Spleißstelle des Introns. Der U2AF-Hilfsfaktor zusammen mit dem SF1/BBP-Protein erkennt den Verzweigungspunkt, ein Adenosin und das Dinukleotid AG an der 3'-Spleißstelle des Introns, wodurch das Prä-E-Komplex-Spliceosom gebildet wird. Nach der Freisetzung von SF1/BBP bindet U2-snRNP am Verzweigungspunkt, womit das Prä-A-Komplex-Spliceosom entsteht. Schließlich bindet der U4/U6.U5 tri-snRNP-Komplex an den

A-Komplex zur Bildung des inaktiven B-Komplex-Spliceosoms. Der Übergang vom inaktiven zum aktiven Komplex wird auch als B^{act}-Komplex-Spliceosom bezeichnet. Dabei kommt es zu Umlagerungen im B-Komplex, der Freisetzung der U1- und U4-snRNPs, und zum Austausch verschiedener Proteinkomponenten. Die übrigen snRNPs bilden das aktive B*-Komplex-Spliceosom, das die erste Umesterung katalysiert. Erneut kommt es zu Umlagerungen und zur Bildung des C-Komplex-Spliceosoms, das die zweite Umesterung katalysiert. Danach zerfällt der Komplex und die gespleißte mRNA wird freigesetzt.

Häufig wurden Cyclophiline in verschiedenen Organismen als Komponenten des Spliceosoms gefunden. Zuletzt wurden neun humane Cyclophiline durch massenspektrometrische Analysen im Spliceosom identifiziert, darunter befanden sich die drei Einzeldomänen-Cyclophiline Cyp18.1, Cyp18.2a und Cyp19.2, sowie die sechs Multidomänen-Cyclophiline Cyp33, Cyp54, Cyp57, Cyp58, Cyp73 und Cyp88 (Behzadnia *et al.*, 2007; Bessonov *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2007; Deckert *et al.*, 2006; Makarova *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2002). Bisher wurden diese Proteine zwar als Komponenten des Spliceosoms identifiziert, aber ihre genaue Funktion innerhalb des Spliceosoms ist unbekannt.

Cyp57 wurde als Komponente des B-Komplex-Spliceosoms identifiziert. Cyp54 und Cyp58 wurden ebenfalls im B-Komplex-Spliceosom gefunden. Die Bindung von Cyp54 und Cyp58 zum Spliceosom wurde im B^{act}-Komplex während der Aktivierung des B-Komplex-Spliceosoms stabilisiert (Adams *et al.*, 2015; Bessonov *et al.*, 2010). Beide Cyclophiline dissoziieren vom Spliceosom während des Überganges vom B^{act}-Komplex zum C-Komplex. Damit besitzen sie möglicherweise eine wichtige Funktion bei der Aktivierung des Spliceosoms (Adams *et al.*, 2015; Wahl *et al.*, 2009). Das Cyp54-Orthologe CWC27 ist das einzige spliceosomale Cyclophilin in *S. cerevisiae*, wodurch seine konservierte Funktion beim Splicing unterstrichen wird (Fabrizio *et al.*, 2009). Cyp33 als Prp19/CDC5L-verwandtes Protein ist eine Kernkomponente des katalytisch aktiven C-Komplex-Spliceosoms, wurde aber auch im B- und B^{act}-Komplex gefunden (Bessonov *et al.*, 2008, 2010). Cyp73 und Cyp88 werden erst nach der Aktivierung des Spliceosoms gebunden. Sie wurden ausschließlich im C-Komplex-Spliceosom gefunden und spielen möglicherweise eine Rolle bei Konformationsänderungen während der zweiten Umesterung (Bessonov *et al.*, 2008; Wahl *et al.*, 2009). Cyp88 besitzt neben seiner N-terminalen PPIase-Domäne noch eine C-terminale Domäne mit einer langen Arginin/ Serin-reichen Region. Ursprünglich wurde Cyp88 als Interaktionspartner der Proteinkinase Clk/Sty identifiziert, die spezifisch SR-Proteine phosphoryliert (Nestel *et al.*, 1996). Später wurde gezeigt, dass Cyp88 über die SR-Domäne mit der phosphorylierten C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II interagiert (Bourquin *et al.*, 1997). Möglicherweise ist die SR-Domäne von Cyp88 wichtig, um beide Funktionen, das Splicing und die Transkription zu koppeln.

Aufgrund ihrer hohen Abundanz werden Cyp33, Cyp58, Cyp73 und Cyp88 als Kernkomponenten des Spliceosoms klassifiziert (Hegele *et al.*, 2012). CsA zeigte nur einen geringen Effekt auf die Splicing-Reaktion (Adams *et al.*, 2015; Horowitz *et al.*, 2002), obwohl die Proteine Cyp33, Cyp73 bzw. Cyp88 gut an CsA binden können (Davis *et al.*, 2010).

1.3 Das Multidomänen-Cyclophilin Cyp57

1.3.1 Das humane Cyp57

Das für Cyp57 kodierende Gen PPIL4 wurde in einer cDNA-Bibliothek von humanen und murinen fötalen Gehirnen entdeckt (Carninci *et al.*, 2000; Zeng *et al.*, 2001). Eine Analyse seiner Aminosäuresequenz ergab, dass Cyp57 einen Sequenzabschnitt besitzt, der homolog zu anderen Cyclophilinen ist. Diese konservierte PPIase-Domäne des aus 492 Aminosäurereste bestehenden Cyp57 ist N-terminal gelegen und umfasst die Aminosäuren 1-161. Bei der PPIase-Domäne handelt es sich um eine Cyclophilin-like-Domäne. Bei Cyp57 sind 6 der 13 Aminosäuren, die bei der CsA-Bindung und PPIase-Aktivität von Cyclophilinen eine wichtige Rolle spielen, verändert (**Abbildung 6A**) (Zeng *et al.*, 2001). Bisher konnte die Struktur der PPIase-Domäne von Cyp57 noch nicht gelöst werden und ein Nachweis der enzymatischen Aktivität der PPIase-Domäne von Cyp57 wurde ebenfalls noch nicht erbracht (Davis *et al.*, 2010). C-terminal von der PPIase-Domäne befinden sich durch eine Linker-Region getrennt, eine RNA-bindende Domäne, ein bipartite-Kernlokalisationsignal sowie eine Lysinreiche Region.

In humanen Geweben wurde die mRNA-Expression von Cyp57 untersucht. Besonders hoch war der mRNA-Gehalt in Nieren und am geringsten im Gehirn und der Skelettmuskulatur (Zeng *et al.*, 2001). Bisher ist noch nichts über die Expression und Nachweisbarkeit des endogenen Proteins in Geweben bekannt. Aber Cyp57 konnte durch massenspektrometrische Analysen von Spliceosom-Präparationen im B-Komplex-Spliceosom nachgewiesen werden (Deckert *et al.*, 2006).

Für Cyp57 konnte bei der Analyse des mRNA-gebundenen Proteoms die Bindung von mRNA nachgewiesen werden, aber eine nähere Charakterisierung der RNA-Bindung des Proteins ist nicht beschrieben (Baltz *et al.*, 2012). Die Funktion der Lysin-reichen Region von Cyp57 ist unbekannt. Für verschiedene Proteine mit Lysin-reichen Regionen wurde beschrieben, dass Lysin-Reste an der Wechselwirkung mit Nukleinsäuren beteiligt sind (Auweter *et al.*, 2006) oder als Transportsignal in *Nuclear speckles* gelten (Spector & Lamond, 2011). *Nuclear speckles* sind Bereiche des Zellkerns in denen Splicing-Faktoren (darunter viele SR-Proteine) angereichert vorliegen (Fu, 1995).

1.3.2 Orthologe Proteine von Cyp57

Orthologe Proteine von Cyp57 wurden in Vertebraten wie Maus, Rind, Huhn, aber auch in Nematoden, Insekten und sogar in einzelligen Organismen gefunden. Näher untersucht sind die Orthologen aus *A. thaliana* (AtCyp59), *S. pombe* (SpCyp6/ Rct1) und *Paramecium tetraurelia* (Kin241p) (Gullerova *et al.*, 2006, 2007; Krzywicka *et al.*, 2001). Außerdem sind weitere Orthologe in *D. melanogaster* (CG5808) und *C. elegans* (Sig-7) beschrieben (Zeng *et al.*, 2001). Ein Vergleich zeigt, dass alle Proteine eine konservierte PPIase-Domäne und eine konservierte RRM-Domäne besitzen (**Abbildung 3**). Diese Ergebnisse deuten auf eine wichtige und konservierte biologische Funktion von Cyp57 hin, bei der beide Domänen des Proteins erforderlich sind (Zeng *et al.*, 2001).

Das Cyp57-Orthologe AtCyp59 hat eine etwas andere Domänenstruktur als Cyp57. Anstatt der Lysinreichen Region besitzt es eine Arginin/ Serin-reiche Region und ein Zinkfinger-Motiv direkt C-terminal nach der RRM-Domäne. Das Zinkfinger-Motiv scheint nur in Pflanzen vorzukommen, da die anderen orthologen Proteine dieses Element nicht aufweisen (**Abbildung 3**). AtCyp59 ist im Zellkern lokalisiert und für AtCyp59 wurde bereits die Bindung von poly(G)- und poly(C)-RNA gezeigt (Gullerova *et al.*, 2006). Mittels SELEX konnte eine RNA-Consensus-Sequenz (G[U/C]N[G/A]CC[A/G]) für AtCyp59 bestimmt werden. Anders als bei Cyp33 führte die RNA-Bindung zu einer Reduktion der PPIase-Aktivität von AtCyp59 (Bannikova *et al.*, 2012). Außerdem interagiert AtCyp59 mit SR-Proteinen und der CTD der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II *in vitro*. Die ektopische Expression von

AtCyp59 führte zu einer reduzierten Phosphorylierung der CTD der RNA-Polymerase II und zu einer Verlangsamung des Wachstums (Gullerova *et al.*, 2006). Zudem wurde AtCyp59 als Interaktionspartner von BRZ1 identifiziert. BRZ1 ist ein Transkriptionsfaktor des Brassinosteroid-Signalweges. Brassinosteroide sind Phytohormone, die für die Entwicklung und das Wachstum von Pflanzen wichtig sind (Wang *et al.*, 2013).











Organismus – Gen-Name	Domänenstruktur	Anzahl der AS
<i>Homo sapiens</i> – PPIL4		492 AS
<i>Mus Musculus</i> – PPIL4		492 AS
<i>Gallus gallus</i> – PPIL4		505 AS
<i>Xenopus tropicalis</i> – PPIL4		471 AS
<i>Danio rerio</i> – PPIL4		454 AS
<i>Drosophila melanogaster</i> – CG5808		653 AS
<i>Caenorhabditis elegans</i> – Sig-7		427 AS
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> – Rct1		432 AS
<i>Arabidopsis thaliana</i> – AtCyp59		506 AS
<i>Paramecium tetraurelia</i> – Kin241		695 AS

Abbildung 3: Cyp57-Orthologe Proteine in Pro- und Eukaryoten. Schematische Darstellung der Domänenstruktur mit ■ PPIase-Domäne, ■ RRM-Domäne, ■ Nukleotid-Phosphorylase-Domäne, ■ PRP38-Bindedomäne (hydrophil), ■ Zinkfinger-Motiv, ■ Region mit geladenen Resten (K: Lysin-reiche Region; R: Arginin-reiche Region, EK: Glutaminsäure/ Lysin-reiche Region, S: Serin-reiche Region).

Das Cyp57-Orthologe Rct1 aus *S. pombe* hat eine dem AtCyp59 ähnliche Domänenstruktur, jedoch besitzt es kein Zinkfinger-Motiv (**Abbildung 3**). Rct1 gilt als essentielles Gen in *S. pombe*, der *knock out* von *rct1* ist letal. Heterozygote *S. pombe*-Zellen mit nur einem funktionalen *rct1*-Allel besitzen einen pleiotropen Phänotyp mit schweren Störungen im Wachstum und in der Morphologie der Zellen. Die Phänotypen beruhen auf dem reduzierten Rct1-Gehalt in der Zelle, da sie durch die episomale Expression von Rct1 wieder hergestellt werden konnten. Ähnlich wie AtCyp59 beeinflusst Rct1 den Phosphorylierungsstatus der CTD und die Transkription durch die RNA-Polymerase II (Gullerova *et al.*, 2007). Die Überexpression von Rct1 führte zu einer Hyperphosphorylierung der CTD, dagegen nahm die Phosphorylierung von Ser2 und Ser5 der CTD in heterozygoten Zellen (*rct1/Δrct1*) ab. Rct1 interagiert zwar mit den für Ser2 der CTD spezifischen Kinasen Cdk9 und Lsk1, aber nicht mit den für Ser5 der CTD spezifischen Kinasen Msc6 bzw. Srb10 und den CTD-spezifischen Phosphatasen Fcp1, Scp1 und Ssu71 (Skrahina, 2009). Zudem bindet Rct1 über die PPIase-Domäne an Cdk9 und die CTD, wobei die Bindung von Cdk9 negativ die Phosphorylierung der CTD beeinflusst (Skrahina, 2009).

Das Cyp57-Orthologe Kin241p aus *P. tetraurelia* hat eine dem Cyp57 ähnliche Domänenstruktur. Anstatt der Lysin-reichen Region besitzt es eine Glutaminsäure/ Lysin-reiche Region und zusätzlich am C-Terminus noch eine Serin-reiche Region (**Abbildung 3**). Wie auch AtCyp59 ist Kin241p im Zellkern lokalisiert. Kin241p besitzt eine Funktion in der Zell-Morphogenese und der kortikalen Organisation des Cytoskeletts von *C. elegans* (Krzywicka *et al.*, 2001), die noch nicht näher untersucht wurde.

1.3.3 Die RRM (RNA recognition motif) - Domäne

Die RRM-Domäne, auch bekannt als RNA-bindende Domäne (RBD), ist das häufigste RNA-Bindemotiv in eukaryotischen Zellen. Im menschlichen Genom besitzen ca. 1% der kodierten Proteine eine oder mehrere RRM-Domänen (Lunde *et al.*, 2007). Die RRM-Domäne umfasst 90 Aminosäuren und verfügt über eine typische Faltung mit vier antiparallelen β -Faltblättern ($\beta_4\beta_1\beta_3\beta_2$) und zwei darüber oder darunter liegenden α -Helices, die in einer $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$ -Struktur angeordnet sind (**Abbildung 4**) (Daubner *et al.*, 2013; Maris *et al.*, 2005). Strukturuntersuchungen zeigten zwei hoch konservierte Sequenzabschnitte, die als RNP1 (Lys/Arg-Gly-**Phe/Tyr**-Gly/Ala-**Phe/Tyr**-Val/Ile/Leu-X-Phe/Tyr) und RNP2 (Ile/Val/Leu-**Phe/Tyr**-Ile/Val/Leu-X-Asn-Leu) bezeichnet werden. Bei den meisten RRM-Domänen befinden sich die drei konservierten aromatischen Aminosäuren auf dem β -Faltblatt eins (RNP2) und drei (RNP1) (Daubner *et al.*, 2013). Diese Reste sind wichtig für die RNA-RRM-Bindung. Die Seitenketten der aromatischen Reste von Phe und Tyr vermitteln die RNA-Bindung durch das Stapeln der RNA-Basen (*base stacking*) oder durch die Insertion zwischen zwei Zuckermolekülen (Maris *et al.*, 2005). Die resultierende RNA-RRM-Bindung besitzt für gewöhnlich eine hohe Spezifität und Affinität, kann aber durch Protein-Protein-Interaktionen variieren. Abweichend von der klassischen RNA-Bindung der β -Faltblatt-Oberfläche sind auch noch andere Bindungsmodi beschrieben. HnRNP F erkennt G-Triplet-Sequenzen über konservierte Reste in den Loop-Regionen 1, 3, 5 und dem 4. β -Strang (Dominguez *et al.*, 2010). Bei p65 wird durch eine zusätzliche Helix das β -Faltblatt verdeckt, so dass nur zwei konservierte Reste des 2. β -Strangs mit der RNA interagieren können (Singh *et al.*, 2012). Die bakterielle RNA-Helikase YxiN bindet fünf Nukleotide über die Reste des 2. β -Strangs und der 1. α -Helix (Hardin *et al.*, 2010).

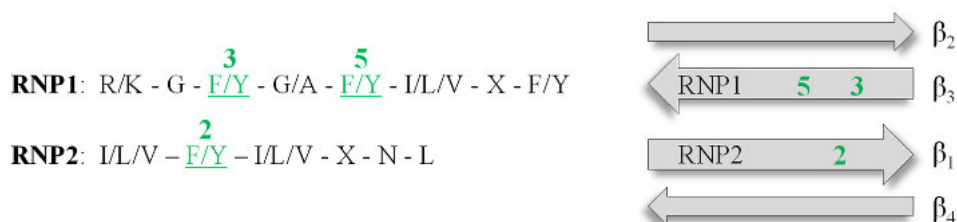


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Consensus-Sequenz der RRM-Domäne. Die konservierten aromatischen Aminosäuren für die RNA-Bindung sind grün hervorgehoben. (Abbildung verändert nach Maris *et al.*, 2005).

Eine einzelne RRM-Domäne kann 2 bis 8 Nukleotide erkennen. Zusätzlich ermöglicht die Beteiligung nicht-konservierter Aminosäuren an der RNA-Bindung sowie die Kombination mehrerer RRM-Domänen innerhalb eines Proteins die Bindung längerer RNA-Abschnitte (Auweter *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 1999; Handa *et al.*, 1999). Außerdem kann durch andere RNA-Bindungsmotive, wie dem Zinkfinger, die Affinität und die Sequenzspezifität der Bindung erhöht werden (Cavaloc *et al.*, 1999; Lunde *et al.*, 2007; Maris *et al.*, 2005).

Ursprünglich wurde angenommen, dass die RRM-Domäne ausschließlich eine RNA-bindende Domäne ist. Doch bei einigen Proteinen ist diese Domäne auch in der Lage, Protein-Protein-Interaktionen zu vermitteln. Beispielsweise interagiert die RRM3-Domäne von U2AF65 mit SF-1 (Kielkopf *et al.*, 2004; Selenko *et al.*, 2003). Auch für die RRM-Domäne von UPF3b wurde eine Wechselwirkung mit dem UPF2-UPF3-Komplex gezeigt (Kadlec *et al.*, 2004). Die hohe Variabilität der Anzahl und Anordnung von RRM-Domänen, sowie deren Kombination mit weiteren RNA- oder Protein-bindenden Domänen gehen mit einem breiten Funktionsspektrum RRM-haltiger Proteine einher. Dieses umfasst im Nukleus unter anderem die Polyadenylierung, das Splicing, die mRNA-Stabilisierung, sowie den RNA-Export (Glisovic *et al.*, 2008).

1.4 Zielstellung der Arbeit

Im humanen Genom sind zwei Cyclophiline mit einer RRM-Domäne codiert. Neben dem kürzeren Cyp33, das als aktive PPIase spezifisch mRNA bindet und dadurch die PPIase-Aktivität stimuliert wird (Wang *et al.*, 2008), ist Cyp57 bislang in der Literatur nur wenig beschrieben. Aus diesem Grund wurde der Fokus dieser Arbeit auf die Analyse der proteinbiochemischen und zellbiologischen Eigenschaften von Cyp57 gelegt. Zunächst sollte das Volllängenprotein rekombinant in *E. coli* hergestellt und funktionelles Protein gereinigt werden.

Damit sollten die proteinbiochemischen und enzymatischen Eigenschaften von Cyp57 näher untersucht werden. Zudem sollten die individuellen funktionalen Domänen von Cyp57 separat und in Kombination in Bezug auf ihre katalytischen Aktivitäten und auf mögliche synergistische Effekte untersucht werden.

Die PPIase-Domäne von Cyp57 ist im Vergleich zu anderen Cyclophilinen nur relativ wenig homolog zu Cyp18. Der Vergleich von Cyp18 zu Cyp57 zeigte, dass in etwa die Hälfte der konservierten Aminosäuren der CsA-Bindung und der PPIase-Aktivität in Cyp57 verändert sind. Daher sollte als weiteres Ziel der Arbeit die Struktur der PPIase-Domäne von Cyp57 gelöst werden.

Ein weiterer Schwerpunkt war es, einen Einblick in die *in vivo* Funktion von Cyp57 zu gewinnen. Cyp57 wurde als mRNA-bindendes Protein identifiziert (Baltz *et al.*, 2012). Bislang sind die Sequenz der gebundenen mRNA und die Funktion dieser Bindung unbekannt. Durch verschiedene Methoden sollten die Bindungseigenschaften von Cyp57 charakterisiert werden, um eine mögliche biologische Funktion ableiten zu können.

Außerdem sollte die subzelluläre Lokalisation von Cyp57 analysiert werden und durch Pulldown-Experimente mit humanen Zellen sollten Interaktionspartner von Cyp57 identifiziert werden, um ebenfalls Hinweise auf die zelluläre Funktion von Cyp57 zu erhalten.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Kits

Plasmid-Isolations Mini-Prep/ Maxi-Prep Kit	Sigma Aldrich
<i>Easy Pure DNA Purification Kit</i>	Biozym Diagnostik
Western <i>Blotting detection Kit</i>	GE Healthcare

2.1.2 Chromatographiesäulen/ -material

HisTrap HP, Ni-NTA-Sepharose (1/ 5 ml)	GE Healthcare
HiTrap SP HP, Kationenaustauscher (5 ml)	GE Healthcare
HiTrap Desalting, Sephadex G-25 (5 ml)	GE Healthcare
HiLoad Superdex 75PG 16/ 600	GE Healthcare
HiLoad Superdex 200PG 16/ 600 oder 26/ 600	GE Healthcare
Streptactin Superflow (1 ml)	IBA lifescience
Streptactin-Sepharose	IBA lifescience
Heparin-Sepharose	Thermo Fisher Scientific
CNBr-aktivierte Sepharose 4B	GE Healthcare

2.1.3 Chemikalien und Enzyme

PBS	Gibco
DMEM, FKS, Trypsin-EDTA-Lösung	GE Healthcare
TRIS, NaCl, HEPES, HNa ₂ PO ₄ , Milchpulver, BisTris	Appllichem
Triton X-100, Agarose low EEO, MOPS, Agar-Agar	Appllichem
EDTA, Tween-20, Guanidinhydrochlorid	Roth
Rotiphorese Gel 30 (37.5:1), DTT	Roth
Sucrose, Glycerol, NaOH, Bicine, Heparin	Sigma-Aldrich
SDS, Hefe-Extrakt, EGTA, PMSF	Serva
Imidazol, Magnesiumchlorid, Natriumthiosulfat	Merck-Milipore
<i>Protease inhibitor complete</i> EDTA-frei, Natriumcarbonat	Merck-Milipore
Silbernitrate, DMSO, Trypsin, Centrikons, DAPI	Merck-Milipore
β-Mercaptoethanol, Coomassie	Merck-Milipore
Pepton	Fluka
Harnstoff, Glycin	MPI
Restriktionsenzyme, Phusion HF DNA-Polymerase	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase, PNK	New England Biolabs
SuperSignal <i>West femto luminol enhancer solution</i>	Thermo Fischer Scientific
Lipofectamin, RNaseI, NuPage LDS Probenpuffer	Thermo Fischer Scientific
Saran-Folie	Dow
RQ DNaseI, rekombinantes RNasin	Promega
BMP-2	Prof. E. Schwarz
Senp2, Cyp18	Arbeitsgruppe
CsA-Affinitäts- und Kontrollmatrix	Martin Theuerkorn

2.1.4 Geräte

Chromatographie System ÄKTAprime plus	GE Healthcare
Imager Typhoon Trio+	GE Healthcare
BAS Imaging Plate MP	Fujifilm
Feinwaage	Sartorius
Protein Elektrophorese System	Biometra
Tischzentrifuge 5415R mit Rotor F45-24-11	Eppendorf
Thermomixer comfort, Mastercycler personal	Eppendorf
Zentrifuge Sorvall RC5B Plus mit Rotor SLA3000	Thermo Fischer Scientific
Ultrazentrifuge Sorvall RCM120GX, Multifuge 3S-R	Thermo Fischer Scientific
Zentrifuge Heraeus Biofuge mit HIGHConic Rotor	Thermo Fischer Scientific
CO ₂ -Inkubator Heracell	Thermo Fischer Scientific
Biologische Sicherheitswerkbank HeraSafe	Thermo Fischer Scientific
Ultrazentrifuge Beckman Optima LE-80K mit Rotor Type 45Ti	Beckman Coulter
Hochdruck Zellaufschlussystem Modell Ts 0.75 KW	Constant Systems limited
Ultraschallgerät W250D	Branson
HPLC Class LC10	Shimadzu
Konfokal-Mikroskop Nikon Eclipse C1	Nikon
CD-Spektrometer Jasco J710	Jasco
Fluoromax 2-Spectrofluorometer	Horiba
Nukleinsäure Elektrophorese System	Biotec Fischer
Kühlbarer Inkubationsschüttler innova 4330	New Brunswick Scientific Co.
Chemismart 5000	Peqlab
NanoDrop 1000	Peqlab
WTW pH Meter	inoLab
VP-ITC	MicroCal

2.1.5 Puffer

LB-Medium	1% Pepton, 0.5% Hefe Extrakt, 1% NaCl
<i>E. coli</i> -Aufschlusspuffer	50 mM Tris/ HCl pH 7.5 (20°C), 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 5% Glycerol
Gelfiltrationspuffer	25 mM Tris/ HCl pH 7.6 (20°C), 300 mM NaCl, 1.5 mM DTT
TBT (1x)	50 mM Tris/ HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.2% Tween 20
TAE (1x)	40 mM Tris/ HCl pH 8.3, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA
TBE (1x)	89 mM Tris/ HCl pH 8.0, 89 mM Borat, 2 mM EDTA
Sammelgelpuffer	1.25 M Tris/ HCl pH 6.8
Trenngelpuffer	1.8 M Tris/ HCl pH 8.8
SDS Probenpuffer (2x)	100 mM Tris/ HCl, 2% SDS, 4% Glycerol, 5% β-Mercaptoethanol, Bromphenol Blau
SDS-Laufpuffer (1x)	25 mM Tris/ HCl pH 8.3, 192 mM Glycin, 0.1% SDS
Transferpuffer	25 mM Tris/ HCl pH 8.3, 150 mM Glycin, 10% Methanol
Coomassie-Lösung	2 g Coomassie R250, 0.5 g Coomassie G250, 100 ml Essigsäure, 300 ml Methanol, 175 ml Ethanol
Coomassie-Entfärber	45% Methanol, 10% Essigsäure
2x HBS-Puffer	50 mM HEPES pH 7.05 (20°C); 280 mM NaCl; 10 mM KCl; 1.5 mM NaH ₂ PO ₄ ; 12 mM Glucose

Präzipitationspuffer I	25 mM Tris/ HCl pH 7.5 (20°C); 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10% Glycerol, 0.1% NP-40
Präzipitationspuffer II	25 mM Tris/ HCl pH 7.5 (20°C); 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 5% Glycerol, 0.1% NP-40
HEK-Lysepuffer	20 mM Tris/ HCl pH 7.5 (20°C), 150 mM NaCl, 2 mM MgCl ₂ , 10% Glycerol, 0.5% NP-40
Hypertonischer Puffer	10 mM HEPES pH 7.5 (20°C), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl ₂ , 5 mM DTT
Clip-Puffer 1	50 mM Tris/ HCl pH 8.0 (6°C); 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1 mM DTT
Clip-Puffer 2	50 mM Tris/ HCl pH 8.0 (6°C), 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1 mM DTT
PNK-Puffer	20 mM Tris/ HCl pH 8.0 (6°C), 10 mM MgCl ₂ , 0.2% Tween 20
Puffer D	20 mM Tris/ HCl pH 8 (6°C), 10 mM MgCl ₂ , 20 mM EGTA, 0.2% Tween 20
MOPS-Laufpuffer (1x)	50 mM MOPS, 50 mM Tris, 0.1% SDS, 1 mM EDTA
NuPage-Transferpuffer (2x)	50 mM BisTris, 50 mM Bicine, 2 mM EDTA
Puffer W	100 mM Tris/ HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA

2.1.6 Verwendete Organismen

2.1.6.1 *Escherichia coli*-Stämme

Tabelle 2: Verwendete *E. coli*-Stämme.

Bezeichnung	Genotyp	Hersteller
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZAM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Novagen
Rosetta (DE3) pLysS	<i>F⁻ ompT hsdS_B(R_B m_B) gal dcm λ(DE3) pLysSRARE (Cam^R)</i>	Novagen

2.1.6.2 Humane Zelllinien

Tabelle 3: Verwendete humane Zelllinien.

Bezeichnung	Gewebe	DSMZ Nummer
HEK293-Zellen	menschliche embryonale Nierenzellen	ACC 305
Jurkat-Zellen	T-Lymphozyten	ACC 282
SH-SY5Y-Zellen	Neuroblasten	ACC 209
Hela-Zellen	Gebärmutterhals Krebszellen	ACC 57
A431-Zellen	Epidermale Krebszellen	ACC 91

2.1.7 Plasmid-DNA

Tabelle 4: Verwendete Plasmid-DNA.

Bezeichnung	Resistenz	Herkunft
pE-SUMO	Amp	Lifesensor
pEGFP-N3	Kan	Takara Clontech
pET-28a	Kan	Novagen
pDNR-Dual_Smad5	Amp	DNASU Plasmid Repository
pSUPERIOR	Amp	Oligoengine
pET-28b_Senp2	Kan	Prof. F. X. Schmid, Universität Bayreuth
pE-SUMO_PREP	Amp	Alexander Rentzsch, MPFS für Enzymologie der Proteinfaltung

2.1.8 Oligonukleotide

2.1.8.1 DNA-Oligonukleotide

Die DNA-Oligonukleotide für die Klonierung von Cyp57 wurden von Eurofins Genomics hergestellt.

Tabelle 5: Verwendete DNA-Oligonukleotide. Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen bzw. die Mutagenesestellen sind fett und kursiv.

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	Restriktionsenzym
Cyp57_fl_f	GGC GGC <u>CGT CTC AAG GT</u> ATG GCG GTT CTA CTG GAG ACC AC	<i>BsmBI</i>
Cyp57_fl_r	GGC GGC <u>GGA TCC</u> TCA TCT ATA CTT AGA TTT TTC	<i>BamHI</i>
Cyp57_203_r	GGC GGC <u>GGA TCC</u> TCA TCT TCC TTT GAA ATC ATC	<i>BamHI</i>
Cyp57_168_r	GATCT <u>GGA TCC</u> TTA GTC ATC AAA TGG ATC	<i>BamHI</i>
Cyp57_204_f	GGC GGC <u>CGT CTC AAG GT</u> ATG TCA GCT GAG GAA GTA GAA	<i>BsmBI</i>
Cyp57_240_f	GGC GGC <u>CGT CTC AAG GT</u> ATG AAT GTA CTG TTT GTG TGT AAA TTG	<i>BsmBI</i>
Cyp57_318_r	GAT CT <u>GGA TCC</u> CTA CGA CTG GCT AAA ATC CAC ATG	<i>BamHI</i>
Cyp57_388_r	GAT CT <u>GGA TCC</u> CTA TTT CTT GTG TTT TTT ACT TG	<i>BamHI</i>
Cyp57_240pet_f	GG <u>GAA TTC</u> CAT ATG AAT GTA CTG TTT GTG TGT AAA TTG	<i>NdeI</i>
Cyp57_N3_f	GGC GGC <u>GAA TTC</u> C ATG GCG GTT CTA CTG GAG ACC AC	<i>EcoRI</i>
Cyp57_Strep_r	GGC GGC <u>GTC GAC</u> TTA TTA TTT TTC GAA CTG CGG GTG GCT CCA TCC TCC TCT ATA CTT AGA TTT TTC	<i>SalI</i>
Cyp57_N44R_f	CC TTA TT CAC <u>AGA</u> GTA CAG AGG G	-
Cyp57_N44R_r	C CCT CTG TAC <u>TCT</u> GTGAATAAGG	-
Smad5_fl_f	GGC GGC <u>CGT CTC AAG GT</u> ATG ACG TCA ATG GCC AGC TTG	<i>BsmBI</i>
Smad5_fl_r	GGC GGC <u>GTC GAC</u> TCA TGA AAC AGA AGA TAT GG	<i>SalI</i>

2.1.8.2 RNA-Oligonukleotide

Die RNA-Oligonukleotide für Bindungsstudien wurden HPLC-gereinigt bestellt.

Tabelle 6: Verwendete RNA-Homopolymere/ -Oligonukleotide.

Bezeichnung	Hersteller
poly(A), poly(G), poly(C), poly(U)	Sigma-Aldrich
G ₁₀	Eurofins Genomics
GUGGCCG	Sigma-Aldrich
siRNA (PPIL4)	Origene

2.1.8.3 pSUPERIOR-RNAi Oligonukleotide

Die DNA-Oligonukleotide für die Klonierung von vektorbasierter RNAi in pSUPERIOR wurden von Eurofins Genomics hergestellt. Die DNA-Oligonukleotide wurden entsprechend den Herstellerangaben von der Cyp57-mRNA mit dem Programm Oligoengine Version 2.0 abgeleitet.

Tabelle 7: Oligonukleotide der vektorbasierten RNAi kloniert in pSUPERIOR. Die Oligo-Bezeichnung gibt an, ab welcher Position in der Cyp57-mRNA eine 19-Nukleotid (Nt) umfassende Sequenz abgeleitet wurde. Das *forward* (f) und *reverse* (r) Oligo wurden hybridisiert und in den Vektor pSUPERIOR mit den Restriktionsenzymen *Bgl*II und *Xho*I kloniert. Unterstrichen ist die 19-Nt umfassende *sense* und *antisense* Sequenz geteilt durch einen Linker (grün). In rot sind die Überhangregionen dargestellt, die mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen im Vektor korrespondieren.

Name	Sequenz (5' -> 3')
261_f	<u>GAT</u> CCCCACAAGAAGAAAGGCACAG <u>TTCAAGAGA</u> CTGTGCCTTTCTTCTTGTTTTTC
261_r	TCGAGAAAAAGCACAAGAAGAAAGGCACA <u>TCTCTTGAAT</u> TGTGCCTTTCTTCTTGTCGGG
789_f	<u>GAT</u> CCCGGGCCAATAAGAAGTTGTG <u>TTCAAGAGA</u> CACAACCTTCTTATTGGCCCTTTTC
789_r	TCGAGAAAAAGGGCCAATAAGAAGTTGTG <u>TCTCTTGAAC</u> CACAACCTTCTTATTGGCCCGG

2.1.9 Konstrukte

Tabelle 8: Erzeugte DNA-Konstrukte zur Expression in *E. coli* und humanen Zellen.

Konstrukt	Primer	Vektor
His ₆ -SUMO-Cyp57	Cyp57_fl_f Cyp57_fl_r	pE-SUMO
His ₆ -SUMO-Cyp57 ₁₋₂₀₃	Cyp57_fl_f Cyp57_203_r	pE-SUMO
His ₆ -SUMO-Cyp57 ₁₋₂₀₃ N44R	Cyp57_N44R_f Cyp57_N44R_r	pE-SUMO
His ₆ -SUMO-Cyp57 ₁₋₁₆₈	Cyp57_fl_f Cyp57_168_r	pE-SUMO
His ₆ -SUMO-Cyp57 ₂₀₄₋₄₉₂	Cyp57_204_f Cyp57_fl_r	pE-SUMO
His ₆ -SUMO-Cyp57 ₂₄₀₋₃₁₈	Cyp57_240_f Cyp57_318_r	pE-SUMO
His ₆ -Cyp57 ₂₄₀₋₃₈₈	Cyp57_240pet_f Cyp57_388_r	pet28a
Cyp57-EGFP	Cyp57_N3_f Cyp57_fl_r	pEGFP-N3
Cyp57- <i>Strep</i> -Tag II	Cyp57_N3_f Cyp57_Strep_r	pEGFP-N3
His ₆ -SUMO-Smad5	Smad5_fl_f Smad5_fl_r	pE-SUMO
Cyp57-RNAi 261	261_f 261_r	pSUPERIOR
Cyp57-RNAi 789	789_f 789_r	pSUPERIOR

2.1.10 Antikörper

Tabelle 9: Primäre Antikörper

Bezeichnung	Ursprung	Anwendung	Hersteller
Anti-Cyp57 pAb	Maus	WB 1:250	Sigma-Aldrich
Anti-Smad5 mAb	Maus	WB 1:500, IF 1:100	Sigma-Aldrich
Anti-pSC35 mAb	Maus	WB 1:1000, IF 1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-Cherp pAb	Kaninchen	WB 1:500, IF 1:100	Biorbyt
Anti-GFP pAb	Kaninchen	WB 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-Histon H3 pAb	Kaninchen	WB 1:1000	Cell Signaling Technology
Anti-Calnexin pAb	Kaninchen	WB 1:1000	Cell Signaling Technology
Anti-Strep mAb	Maus	WB 1:1000	IBA Lifescience
Anti-GAPDH mAb	Maus	WB 1:1000	Sigma-Aldrich
Anti-Aktin pAb	Ziege	WB 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-HIS mAb	Maus	WB 1:1000	Qiagen

Tabelle 10: Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Ursprung	Anwendung	Hersteller
Anti-Maus IgG HRP	Schaf	WB 1:1000	Sigma-Aldrich
Anti-Kaninchen IgG HRP	Ziege	WB 1:1000	Sigma-Aldrich
Anti-Ziege IgG HRP	Kaninchen	WB 1:1000	Sigma-Aldrich
<i>Rhodamine Red-X</i> Anti-Kaninchen IgG	Ziege	IF 1:100	Molecular probes
Alexa Fluor 546 Anti-Maus IgG	Ziege	IF 1:100	Molecular probes

2.1.11 Kristallisationskits

Crystal Screen 1+2, *Slice* pH
JBScreen classic 1-10, *JCSG++* 1-4, *Cryo* 1-4
 Morpheus HT
Low Ionic Strength, Extension Kit, Membrane 1-36

Hampton Research
 Jena Bioscience
 Molecular Dimensions
 Sigma-Aldrich

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB-Medium (1% Pepton, 0.5% Hefe Extrakt, 1% NaCl). Dafür wurde von einer Einzel-Kolonie etwas Zellmaterial in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika inokuliert und über Nacht bei 37°C und 200 UpM schüttelnd inkubiert. Die Hauptkultur (in Schikanekolben) wurde 1:500-1:1000 mit der Übernachtskultur angeimpft. Die Zellen wuchsen bei 37°C unter Schütteln mit 125 UpM bis zu einer OD₆₀₀ von 0.8-1. Dann wurden die Kulturen für 30 min auf Eis gestellt und regelmäßig geschüttelt. Die Expression des Zielproteins wurde mit 0.5-1 mM IPTG induziert. Die Zellen wuchsen für 18-20 h bei 18°C, 125 UpM. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (6000 UpM, 15 min, 4°C) sedimentiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.1.2 Transformation von *E. coli*

E. coli-Zellen wurden mit der CaCl₂-Methode chemisch kompetent gemacht und mit Hitzeschock nach der Methode von Hanahan, (1985) transformiert.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Kultivierung humaner Zellen

Eine Kryokultur (1 ml) mit humanen Zellen wurde bei 37°C im vortemperierten Wasserbad aufgetaut und zu 10 ml DMEM-Medium mit 10% FKS gegeben. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren für 3 min bei 500 x g, 20°C pelletiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 10 ml Medium mit 10% FKS aufgenommen und in eine 25 cm² Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden in humider Atmosphäre bei 37°C mit 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium durch neues Medium ersetzt.

Bei Konfluenz (> 6 x 10⁶ Zellen ml⁻¹) der Zellen wurden diese passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und mehrfach mit vorgewärmten PBS gespült. Mit 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen von der Oberfläche abgelöst. Die Reaktion wurde durch die Zugaben von Medium mit 10% FKS gestoppt. Anschließend wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 1 x 10⁴ Zellen ml⁻¹ in Medium mit 10% FKS in entsprechender Atmosphäre subkultiviert.

2.2.2.2 Anlegen einer Kryokultur

Humane Zellen wurden in einer 75 cm²-Zellkulturflasche wie unter 2.2.2.1 beschrieben kultiviert, bis diese ca. 90% Konfluenz erreichten. Dann wurde das Medium über den Zellen abgenommen und zweimal mit vorgewärmtem PBS gespült. Mit Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen von der Oberfläche gelöst und in Medium suspendiert. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 300 x g zentrifugiert, wobei der Überstand verworfen wurde. Das entstandene Pellet wurde in 2 ml Lagerlösung (10% DMSO in FKS) aufgenommen und in 1 ml Fraktionen in Kryoröhrchen aliquotiert. Über Nacht wurden die Röhrchen langsam in einer Styroporbox bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2.3 Transfektion von humanen Zellen mit Plasmid-DNA

Die Transfektion humaner Zellen erfolgte mittels der Calcium-Phosphat-Methode abgewandelt nach Urabe *et al.*, (2000) und Jordan & Wurm, (2004). Dazu wurde ein Lösung aus Plasmid-DNA (1-2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Medium) in H_2O und 2 M CaCl_2 -Lösung (Endkonzentration im Transfektionsansatz: 125 mM) hergestellt. Diese wurde 1:1 mit 2 x HBS-Puffer (50 mM HEPES pH 7.05 (20°C); 280 mM NaCl; 10 mM KCl; 1.5 mM NaH_2PO_4 ; 12 mM Glucose) gut gemischt. Das entstandene DNA-Calcium-Phosphat-Präzipitat wurde 1:10 in das Kulturmedium der Zellen gegeben und für 16 h in humider Atmosphäre bei 37°C mit 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit mit den Zellen inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden für weitere 8-24 h kultiviert.

2.2.2.4 Transfektion von humanen Zellen mit siRNA und RNAi

Für die Transfektion mit siRNA und pSUPERIOR-RNAi wurden HEK293-Zellen in der entsprechenden Verdünnung in DMEM-Medium mit 10% FKS eingesetzt, sodass diese nach 24 h rund 50-70% Konfluenz erreichten. Anschließend wurden die Zellen entsprechend den Herstellerangaben mit drei Gen-spezifischen siRNAs und einer unspezifischen siRNA mittels Lipofektion transfiziert und für 48 bis 72 h in humider Atmosphäre bei 37°C mit 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Entsprechend wurden HEK293-Zellen mit einem der beiden Cyp57-spezifischen Vektoren mit pSUPERIOR-RNAi oder dem Leervektor pSUPERIOR als Kontrolle mittels Lipofektion transfiziert und für 22-72 h kultiviert. Danach wurden die Zellen mikroskopisch oder immunologisch untersucht.

2.2.2.5 Herstellung von Zelllysate für Präzipitationsexperimente

Für die Herstellung von Gesamt-Zelllysate wurden 24-48 h nach der Transfektion transfizierte oder nicht transfizierte Zellen bei Konfluenz geerntet. Die folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Erst wurde das Medium abgenommen, dann wurden die Zellen mit eiskaltem PBS überschichtet und mit einem Zellschaber am Rand des Gefäß gesammelt. Von dort wurden sie in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 500 x g, 4°C pelletiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und die Zellen wurden erneut mit einem großen Volumen PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in 5 Pellet-Volumen HEK-Lysepuffer (20 mM Tris/ HCl pH 7.5 (20°C), 150 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , 10% Glycerol, 0.5% NP-40 mit *Protease inhibitor complete*) aufgenommen und gut gemischt. Zusätzlich wurden die Zellen mittels Ultraschall 10 x 10 s - 30% Amplitude aufgeschlossen. Danach wurden 50 U Benzonase dazugegeben und für 1-2 h auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei 10 000 x g für 15 min wurde der Überstand von Zelltrümmern getrennt und dieser wurde entweder in Ko-Immünpräzipitations-Experimenten verwendet oder nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

2.2.2.6 Konfokal-Mikroskopie

HEK293-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion in Poly-L-Lysin beschichtete 8-well IBIDI-Kavitäten in entsprechenden Verdünnungen eingesetzt und für 16-24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd in PBS 15 min fixiert, sowie zweimal 5 min mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 0.1% Triton X-100 für 5 min permeabilisiert und wieder dreimal mit PBS gewaschen. Durch Inkubation mit 3% Milchpulver in PBS für 1 h bei RT wurden unspezifische Bindestellen der Antikörper blockiert. Der primäre Antikörper wurde wie in **Tabelle 9** in PBS mit 3% Milchpulver für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C eingesetzt. Danach wurde dreimal 5 min mit 3% Milchpulver in PBS gewaschen und der entsprechende sekundäre Antikörper, wie in **Tabelle 10** vermerkt, für 1 h bei RT eingesetzt. Dann wurde wieder dreimal 5 min mit 3% Milchpulver in PBS gewaschen. Abschließend wurden die Zellkerne mit

DAPI (0.1 mg ml^{-1}) (1:800 in PBS) für 15 min gefärbt, dreimal 5 min mit PBS gewaschen und nach dem letzten Waschschrift in PBS belassen. Dann wurde das Präparat mit dem Konfokal-Mikroskop D-Eclipse C1 Si (Nikon) untersucht. Dabei wurde das Ölimmersionsobjektiv Plan Apo 40x Oil mit einer Auflösung von 1024×1024 Pixeln gewählt.

Zur Untersuchung der Lokalisation von Smad5 in HEK293-Zellen wurden diese Zellen nach 5 h Inkubation in DMEM-Medium und 0.5% FKS mit 100 nM BMP-2 (bereitgestellt von Prof. E. Schwarz, Martin-Luther-Universität, Halle/ Saale) für 40 min stimuliert.

2.2.2.7 Fraktionierung von Zellen durch differentielle Zentrifugation

Die subzelluläre Fraktionierung der HEK293-Zellen wurde abgewandelt nach Sasaki-Osugi *et al.*, (2013) durchgeführt. Dazu wurden pelletierte HEK293-Zellen in hypertonischem Puffer (10 mM HEPES pH 7.5 (20°C), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 5 mM DTT mit *Protease inhibitor complete*) suspendiert und homogenisiert, indem das Lysat 25-mal mit einer Spritze durch eine 26-Gauge-Kanüle gezogen wurde. Anschließend wurde die NaCl-Konzentration auf 150 mM erhöht. Dann wurde das Lysat im ersten Zentrifugationsschritt mit $600 \times g$, 5 min bei 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet (P_{0.6}) wurde einmal mit hypertonischem Puffer gespült. Der erste Überstand wurde weiter mit $10\,000 \times g$, 5 min, 4°C zentrifugiert. Das Pellet (P₁₀) wurde abgetrennt. Der resultierende Überstand wurde dann bei $100\,000 \times g$, 10 min, 4°C zentrifugiert. Das Pellet (P₁₀₀) und der Überstand (S₁₀₀) wurden getrennt. Die gewonnen Pellets (P_{0.6}, P₁₀, P₁₀₀) wurden in hypertonischem Puffer mit 400 mM NaCl homogenisiert. Die erhaltenen Proben wurden mittels Western-Blot-Analyse untersucht.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

Standardtechniken, wie Aufreinigung, Fällung und elektrophoretische Auftrennung von DNA, PCR, Restriktionsverdau, Ligation, Plasmid-Isolation oder Klonierungstechniken wurden wie in Sambrook & Russell, (2001) beschrieben durchgeführt.

2.2.3.1 PCR

Für die Vervielfältigung von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) verwendet. Dabei werden DNA-Template durch die Anlagerung kurzer Oligonukleotide (Tabelle 5) mit einer DNA-Polymerase und Nukleotiden exponentiell vervielfältigt. Standardmäßig wurde die PCR entsprechend den Herstellerangaben der DNA-Polymerase durchgeführt.

Für Klonierungen hergestellte DNA-Fragmente wurden in einem 0.8%igen Agarose-TAE-Gel aufgetrennt und entsprechend ihrer Größe aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem *Easy Pure DNA Purification* Kit entsprechend den Herstellerangaben gereinigt.

2.2.3.2 Restriktionsverdau

Plasmid-DNA oder DNA-Fragmente aus einer PCR-Reaktion mit entsprechenden Restriktionsstellen wurden mit spezifischen Restriktionsendonukleasen hydrolysiert. Es wurde üblicherweise ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl und 3 µg Plasmid-DNA verwendet. Die Endonukleasen wurden nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Restriktionsenzyme in den Ansätzen wurden thermisch inaktiviert und die hydrolysierte Plasmid-DNA wurde wie unter 2.2.3.1 beschrieben gereinigt.

2.2.3.3 Plasmid-Isolation

Plasmid-DNA wurde aus transfizierten *E. coli*-Zellen mit einem Plasmid-Isolations-Kit entsprechend den Herstellerangaben isoliert.

2.2.3.4 Ligation

Linearisierte DNA aus 2.2.3.2 wurde mit Hilfe der T4-DNA-Ligase zirkularisiert. Dazu wurden in einem Ligationsansatz restringierte Plasmid-DNA und ein DNA-Fragment in einem Verhältnis 1:3.5 eingesetzt. Die Ligation wurde entsprechend den Angaben des Herstellers der T4-DNA-Ligase durchgeführt.

2.2.3.5 Sequenzierung

Die DNA-Sequenz-Analyse wurde von der Firma Eurofins Genomics durchgeführt. Dafür wurde Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 50-100 µg ml⁻¹ verwendet.

2.2.3.6 CLIP (*in vivo cross-linking and immunoprecipitation*)

Die Identifizierung der Sequenzen von RNA-Molekülen, die mit Cyp57 interagieren, wurde mittels CLIP untersucht. Bei der CLIP-Methode werden Nukleinsäuren und Proteine, die sich durch Interaktion in räumlicher Nähe zueinander befinden, durch Bestrahlung mit UV-Licht quervernetzt. Anschließend wird das Protein immunpräzipitiert und die gebundene RNA sequenziert (Ule *et al.*, 2003).

Die RNA-Bindung von Cyp57 wurde basierend auf der Methode von Ule *et al.*, (2003) evaluiert. Für diesen Versuch wurden transient mit pE-Cyp57 transfizierte HEK293-Zellen verwendet. Die Zellen wurden in 60 cm² Zellkulturschalen kultiviert. 48 h nach der Transfektion mit pE-Cyp57 wurde das Medium abgenommen und 4 x 10⁷ Zellen wurden mit 6 ml eiskaltem PBS überschichtet. In einem Stratalinker 1800 erfolgte auf Eis die UV-C-Bestrahlung mit 400 mJ cm⁻² bei 254 nm. Als Kontrollen dienten bestrahlte nicht-transfizierte Zellen und nicht bestrahlte transfizierte Zellen. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 500 x g für 2 min bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden mit 10 ml PBS gewaschen. Dann wurde das Zellpellet in 2 ml PBS aufgenommen und in 2 x 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden erneut durch Zentrifugation mit maximaler Geschwindigkeit für 10 s bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Affinitätsreinigung von Cyp57-*Strep* erfolgte über Streptactin-Sepharose. 50 µl der Sepharose-Mischung wurden in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß durch Zentrifugation für 1 min bei 2000 UpM, 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Streptactin-Sepharose wurde zweimal in 500 µl Clip-Puffer 1 (50 mM Tris/ HCl pH 8.0 (6°C); 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1 mM DTT) für 1 min bei 1000 UpM, 6°C im Thermomixer äquilibriert.

Die eingefrorenen Zellpellets wurden in 500 µl Clip-Puffer 2 (50 mM Tris/ HCl pH 8.0 (6°C), 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1 mM DTT mit 2 x *Protease inhibitor complete* und 1/ 1000 Vol RNasin) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension zum Zellaufschluss mit Ultraschall (2 x 10 s mit 30% Amplitude) behandelt. Dann wurden 15 µl RQ DNaseI hinzugegeben und für 10 min mit 1000 UpM bei 37°C inkubiert.

Zum partiellen Abbau der RNA wurde RNaseI in den Verdünnungen 1:50 und 1:200 eingesetzt. Von den Verdünnungen wurden 5 µl zum Zelllysat gegeben. Der Versuchsansatz wurde 3 min bei 37°C mit 1000 UpM geschüttelt und für 3 min auf Eis gelagert. Die NaCl-Konzentration wurde auf 200 mM erhöht und es wurde 1 mM EDTA hinzugegeben. Das Zelllysat wurde dann für 10 min bei 16 000 x g, 4°C zentrifugiert und der Überstand wurde in die Reaktionsgefäße mit der vorbereiteten Streptactin-Sepharose überführt. Die Proben rotierten für 1 h bei 4°C mit 25 UpM. Die Streptactin-Sepharose wurde durch vorsichtiges Zentrifugieren mit 2000 UpM für 1 min bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Streptactin-Sepharose wurde je zweimal mit Clip-Puffer 1 und PNK-Puffer (20 mM Tris/ HCl pH 8.0 (6°C), 10 mM MgCl₂, 0.2% Tween 20) 1 min mit 1000 UpM bei 6°C gewaschen.

Anschließend wurde die gebundene RNA radioaktiv durch PNK markiert. Ein Mischung aus 2 µl PNK, 1 µl ^{32}P - γ -ATP (3000 Ci mmol⁻¹), 4 µl 10 x PNK-Puffer und 33 µl Wasser wurde zusammen mit der Streptactin-Sepharose für 10 min bei 37°C (alle 3 min für 15 s mit 1200 UpM) geschüttelt. Dann wurden 5 µl 1 mM ATP dazugegeben und für weitere 5 min inkubiert. Der radioaktive PNK-Mix wurde abgenommen und die Streptactin-Sepharose wurde mit 100 µl PNK-Puffer sowie zweimal mit Puffer D (20 mM Tris/ HCl pH 8.0 (6°C), 10 mM MgCl₂, 20 mM EGTA, 0.2% Tween 20) gewaschen. Durch Zugabe von 37.5 µl 5 mM D-Desthiobiotin erfolgte die Elution bei 1000 UpM für 10 min bei 6°C. Der Überstand wurde mit 12.5 µl 4 x NuPage-Ladepuffer (mit 1 mM DTT) versetzt und 10 min bei 70°C inkubiert. Von den Proben wurden 25 µl sowie 3 µl einer vorgefärbten Proteinleiter auf ein 10% Bis-Tris-Gel geladen. In die obere Pufferkammer wurde 1 x MOPS-Laufpuffer (50 mM MOPS, 50 mM Tris, 0.1% SDS, 1 mM EDTA) mit zusätzlich 1.25 mM DTT gefüllt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Spannung von 180 V für 50 min. Anschließend wurde die Lauffront entfernt und die Proteine per Elektrotransfer auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Dazu wurde das Gel 10 min schüttelnd in 2 x NuPage-Transferpuffer (50 mM BisTris, 50 mM Bicine, 2 mM EDTA) ohne Methanol äquilibriert. Die Nitrocellulose-Membran und die Filterpapiere wurden kurz in 2 x NuPage-Transferpuffer mit 10% Methanol getränkt. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 200 mA für 30 min. Nach dem Transfer wurde die Membran mit PBS gespült und in Saran-Folie eingeschlagen. Die radioaktiv markierte RNA wurde durch Exposition mit einer Imaging Plate (Fujifilm BAS-IP MP) für 1-24 h und anschließender Analyse mit dem Typhoon Trio+ Imager sichtbar gemacht.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Reinigung rekombinant hergestellter Proteine aus *E. coli* mit His₆-SUMO-Fusion

Das aus 2.2.1.1 gewonnene Zellpellet wurde in 50 ml *E. coli*-Aufschlusspuffer (50 mM Tris/ HCl pH 7.5 (20°C), 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 5% Glycerol mit *Protease inhibitor complete*) resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit einem Hochdruck-Homogenisator (French Press) bei 2.5 kbar durch dreimaliges Passagieren. Die lösliche Protein-Fraktion wurde durch Ultrazentrifugation (100 000 x g, 1 h, 4°C) von der unlöslichen Fraktion getrennt und anschließend säulenchromatographisch aufgetrennt. Die säulenchromatische Trennung erfolgte unter Benutzung eines ÄKTaprime plus Systems.

His₆-SUMO-Cyp57 wurde im ersten Schritt durch IMAC mittels Ni-NTA-Sepharose (HisTrap HP, Säulenvolumen: 5 ml) gebunden. Als Laufpuffer wurde 50 mM Tris/ HCl pH 7.5 (20°C), 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 1% Glycerol verwendet. Die Elution erfolgte stufenweise mit 50 mM und 500 mM Imidazol. Die Fraktionen die das Fusionsprotein enthielten wurden mit einem Konzentrierungsröhrchen mit einem NMWL von 50 kDa (Centrikon) konzentriert und im zweiten Schritt mittels Größenausschlusschromatographie über eine Gelfiltrationssäule HiLoad Superdex 200 PG 26/ 600 in 25 mM Tris/ HCl pH 7.6 (18°C), 300 mM NaCl, 1.5 mM DTT weiter aufgetrennt. Das Fusionsprotein eluierte bei ca. 190 ml von der Säule. Die Fraktionen mit dem Fusionsprotein wurden vereinigt und mit der SUMO-Protease Senp2 (0.2 µM) über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch konzentriert und umgepuffert in Puffer ohne DTT (25 mM Tris/ HCl pH 7.6 (18°C), 300 mM NaCl). Im letzten Schritt erfolgte die Abtrennung des Zielproteins von den His₆-Fusionsproteinen über eine Ni-NTA-Sepharose-Säule (HisTrap HP, Säulenvolumen: 5 ml) in 25 mM Tris/ HCl pH 7.6 (18°C), 300 mM NaCl. Cyp57 wurde mit 25 mM Imidazol eluiert. Die Fraktionen, die rekombinantes Cyp57 enthielten, wurden vereinigt und konzentriert.

His₆-SUMO-Cyp57₁₋₂₀₃ und **His₆-SUMO-Cyp57₁₋₁₆₈** wurden ebenfalls durch IMAC mittels Ni-NTA-Sepharose (HisTrap HP, Säulenvolumen: 5 ml) gereinigt. Die Elution erfolgte in zwei Stufen mit 50 mM und 500 mM Imidazol. Im zweiten Reinigungsschritt wurde das konzentrierte Fusionsprotein mittels Größenausschlusschromatographie über eine Gelfiltrationssäule (HiLoad Superdex 200 PG 26/ 600) in 25 mM Tris/ HCl pH 7.6 (18°C), 300 mM NaCl, 1.5 mM DTT weiter aufgetrennt. His₆-SUMO-Cyp57₁₋₂₀₃ eluierte bei 220 ml und His₆-SUMO-Cyp57₁₋₁₆₈ bei 230 ml von der Säule. Die Fraktionen mit dem jeweiligen Fusionsprotein wurden vereinigt und mit der SUMO-Protease Senp2 (0.2 µM) über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch konzentriert und umgepuffert in Puffer 25 mM Tris/ HCl pH 7.6 (18°C), 300 mM NaCl. Im letzten Schritt erfolgte die Abtrennung des Zielproteins von den His₆-Fusionsproteinen über eine Ni-NTA-Sepharose-Säule (HisTrap HP, Säulenvolumen: 5 ml) in 25 mM Tris/ HCl pH 7.8 (8°C), 300 mM NaCl. Cyp57₁₋₂₀₃ und Cyp57₁₋₁₆₈ haben nicht an die Säule gebunden. Deshalb konnte der Durchlauf mit dem jeweiligen Protein vereinigt und konzentriert werden.

His₆-SUMO-Cyp57₂₀₄₋₄₉₂. Die Reinigung dieser Domäne entsprach der von His₆-SUMO-Cyp57 mittels IMAC und Größenausschlusschromatographie. Nach der Abspaltung des SUMO-Proteins mit der SUMO-Protease Senp2 (0.2 µM) über Nacht bei RT erfolgte ein Pufferaustausch durch eine Entsalzungssäule (HiTrap *Desalting*, Säulenvolumen: 5 ml) in den Puffer 25 mM Tris/ HCl pH 8.4 (8°C), 250 mM NaCl. Anschließend wurde das Proteingemisch auf einen Kationenaustauscher (HiTrap SP, Säulenvolumen: 5 ml) aufgetragen und mit einem Gradienten von 0-2 M NaCl in 10 SV eluiert. Die Elutionsfraktionen mit Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ wurden konzentriert.

His₆-SUMO-Cyp57₂₄₀₋₃₁₈ wurde wie His₆-SUMO-Cyp57₁₋₂₀₃ im ersten Schritt durch IMAC mittels Ni-NTA-Sepharose (HisTrap HP, Säulenvolumen: 5 ml) gereinigt und in 2 Stufen mit 50 mM und 500 mM Imidazol eluiert. Die Fraktionen mit dem Fusionsprotein wurden konzentriert und im zweiten Schritt mittels Größenausschlusschromatographie über eine Gelfiltrationssäule HiLoad Superdex 200 PG 26/ 600 in 25 mM Tris/ HCl pH 7.6 (18°C), 300 mM NaCl, 1.5 mM DTT weiter aufgetrennt. His₆-SUMO-Cyp57₂₄₀₋₃₁₈ eluierte bei 240 ml von der Säule. Über Nacht wurde das Fusionsprotein durch die SUMO-Protease Senp2 (0.2 µM) bei RT gespalten. Danach wurde der Puffer gegen 25 mM Tris/ HCl pH 7.6 (18°C), 300 mM NaCl ausgetauscht. Im letzten Schritt der Reinigung erfolgte die Abtrennung des Zielproteins von den His₆-Fusionsproteinen über eine Ni-NTA-Sepharose-Säule (HisTrap HP, Säulenvolumen: 5 ml) in 25 mM Tris/ HCl pH 7.8 (8°C), 300 mM NaCl. Cyp57₂₀₄₋₃₁₈ hatte nicht an die Säule gebunden, weshalb der Durchlauf vereinigt und konzentriert wurde.

2.2.4.2 Interaktionsanalysen von Proteinen mit rekombinantem Protein aus *E. coli*

Für die Interaktionsanalyse von Proteinen mit rekombinantem His₆-Fusionsprotein aus *E. coli* wurde 2 g *E. coli*-Zellpellet (Abschnitt: 2.2.1.1) in 10 ml Präzipitationspuffer I (25 mM Tris/ HCl pH 7.5 (20°C); 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10% Glycerol, 0.5% NP-40, *Protease inhibitor complete*) suspendiert und mittels Ultraschall (2 x 1 min: 10 s Puls mit 30% Amplitude) lysiert. Zu dem *E. coli*-Zelllysate wurden 50 U Benzonase gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lösung zentrifugiert und die löslichen Proteine wurden auf eine Ni-NTA-Sepharose-Säule aufgetragen. Danach wurde die Säule mit Präzipitationspuffer II (25 mM Tris/ HCl pH 7.5 (20°C); 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 5% Glycerol, 0.1% NP-40) gespült, bis die Absorption bei 280 nm kleiner als 20 mAU war. Daraufhin wurde HEK293-Zelllysate (Abschnitt: 2.2.2.5) auf die so vorbereitete Säule aufgetragen und gespült, bis die Absorption bei 280 nm kleiner war als 20 mAU. Dann erfolgte die Elution mit 500 mM Imidazol. Die Fraktionen der Elution mit der höchsten Absorption bei 280 nm wurden durch Western-Blot-Analysen untersucht.

2.2.4.3 Interaktionsanalysen von Proteinen mit rekombinantem Cyp57-*Strep* aus HEK293-Zellen

Um eine Interaktionsanalyse von potentiellen Interaktions-Partnern von Cyp57 mit diesem Protein durchzuführen, wurden HEK293-Zellen verwendet, die transient das rekombinante Fusionsprotein Cyp57 mit dem C-terminal angefügten *Strep*-Tag II (Cyp57-*Strep*) exprimierten. Nahezu konfluente HEK293-Zellen (rund 6×10^7 Zellen) wurden ca. 40 h nach der Transfektion mit pE-Cyp57 mit eiskaltem PBS überschichtet und mit einem Zellschaber von der Oberfläche abgelöst. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte Zellen. Anschließend wurden sie für 3 min bei $800 \times g$, 4°C pelletiert und zweimal mit PBS gespült. Das gewonnene Zellpellet wurde in 10 ml Puffer W (100 mM Tris/ HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) resuspendiert. Mittels Ultraschall (10 x 10 s Puls mit 30% Amplitude) wurden die Zellen aufgeschlossen. Danach wurden 50 U Benzonase hinzugegeben und für 1-2 h auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei $10\,000 \times g$ für 10 min wurde der Überstand von Zelltrümmern getrennt. Das Proteinlysate wurde mittels ÄKTAprime plus System säulenchromatographisch aufgetrennt. Dazu wurde Cyp57-*Strep* auf eine Säule, die Streptactin-Sepharose (Säulenvolumen: 1 ml) enthielt aufgebracht. Anschließend wurde die Säule mit Puffer W gespült. Die Elution erfolgte durch Puffer W, der zusätzlich 5 mM D-Desthiobiotin enthielt. Die Fraktionen der Elution wurden durch Western-Blot-Analysen untersucht.

2.2.5 Proteinanalytik

2.2.5.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentrationsbestimmung der gereinigten Proteine erfolgte spektroskopisch an einem NanoDrop ND-1000 nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz (**Formel 1**). Für die Berechnung der Proteinkonzentration wurde die Absorption bei 280 nm genutzt.

$$A_{280} = \epsilon_{280} \cdot d \cdot c \quad \text{[Formel 1]}$$

A_{280}	Absorption der Proteinlösung bei 280 nm
ϵ_{280}	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient bei 280 nm in $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$
c	Proteinkonzentration in M
d	Schichtdicke der Küvette in cm

Die Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine wurden nach Gill & von Hippel, (1989) berechnet (**Tabelle 11**).

Tabelle 11: Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine.

Protein	ϵ_{280} in $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$
Cyp57	43 820
Cyp57 ₁₋₂₀₃	10 555
Cyp57 ₁₋₁₆₈	10 555
Cyp57 ₂₀₄₋₄₉₂	33 265
Cyp57 ₂₄₀₋₃₁₈	7 240
His ₆ -Cyp57 ₂₄₀₋₃₈₈	17 210

2.2.5.2 Limitierte Proteolyse

Für die analytische limitierte Proteolyse wurden 30 µg von Cyp57 und 4 U ml⁻¹ Trypsin eingesetzt. Die Proteolyse erfolgte bei RT. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots von 2 µg Cyp57 entnommen und durch Zugabe von 1 mM PMSF wurde die Reaktion gestoppt. Die Aliquots wurden mittels SDS-Page und Coomassie-Färbung untersucht.

Im präparativen Ansatz wurden 15 µg von Cyp57 mit 4 U ml⁻¹ Trypsin inkubiert. Nach 3 min wurde durch Zugabe von 1 mM PMSF die Reaktion inhibiert. Die entstandenen Fragmente von Cyp57 wurden mit einer *reversed phase* HPLC (RP-HPLC) getrennt, aufgefangen, lyophilisiert und massenspektrometrisch untersucht.

2.2.5.3 Massenspektrometrische Analyse

Die massenspektrometrischen Analysen wurden durch Dr. A. Schierhorn am Institut für Biochemie und Biotechnologie in der Serviceeinheit für Massenspektrometrie an der Martin-Luther-Universität, Halle/ Saale durchgeführt. Die molekulare Massenbestimmung bzw. die Sequenzierung der zu untersuchenden Proteine erfolgte mittels MALDI-TOF/ TOF MS oder ESI-Q-TOF MS und bei der Protein-Identifizierung aus einem SDS-Polyacrylamidgel mittels der Nano-HPLC MS/ MS-Analyse.

Tabelle 12: Molekulare Massen der gereinigten rekombinanten Proteine. Theoretische und experimentell bestimmte molekulare Massen.

Protein	Molekular Masse (Da)	
	theoretisch	experimentell
Cyp57	57 225	57 227
Cyp57 ₁₋₂₀₃	22 947	22 948
Cyp57 ₁₋₁₆₈	19 030	19 027
Cyp57 ₂₀₄₋₄₉₂	34 428	34 430
Cyp57 ₂₄₀₋₃₁₈	9 474	9 475
His ₆ -Cyp57 ₂₄₀₋₃₈₈	19 777	19 779

2.2.5.4 SDS-PAGE

Nach der Methode von Laemmli, (1970) wurden die Proteinproben entsprechend ihres Molekulargewichts in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel (30% Acrylamid-Stammlösung; 0.8% Bisacrylamid; Verhältnis 37.5:1) elektrophoretisch aufgetrennt.

Dazu wurden die Proteinproben mit SDS-Probenpuffer (100 mM Tris/ HCl, 2% SDS, 4% Glycerol, 5% β-Mercaptoethanol, Bromphenol Blau) versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Das Polyacrylamidgel bestand aus einem 5%igen Sammelgel und einem 10-15%igen Trenngel. Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte bei einer konstanten Spannung von 180 V in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris/ HCl pH 8.3, 192 mM Glycin, 0.1% SDS).

2.2.5.5 Western-Blot-Analysen

Der immunologische Nachweis der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine erfolgte per Elektrotransfer auf eine Nitrocellulose-Membran und der Detektion mit spezifischem Antikörper.

Der Elektrotransfer vom SDS-Gel auf die Nitrocellulose erfolgte im *Semi-Dry-Blot*-Verfahren in Transferpuffer (25 mM Tris/ HCl pH 8.3; 150 mM Glycin; 10% Methanol) bei einer konstanten Stromstärke von 200 mA für 40 min.

Anschließend wurde die Membran 1 h in 3%igem Milchpulver in TBT (50 mM Tris/ HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.2% Tween 20) bei RT blockiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden primären Antikörper (**Tabelle 9**) über Nacht bei 4°C. Dann wurde 3 x 10 min mit TBT gespült. Folgend wurde die Membran mit dem entsprechenden mit *horseradish*-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper (**Tabelle 10**) 1 h bei RT inkubiert. Erneut wurde 5 x 5 min mit TBT gespült.

Für die Detektion der gebundenen *horseradish*-Peroxidase am sekundären Antikörper wurde ECL des ECL Plus Kits oder des *SuperSignal West femto luminol enhancer* Kits nach Angaben des Herstellers genutzt. Die Chemilumineszenz wurde mit dem Chemismart 5000 Imaging System detektiert und digital ausgegeben.

2.2.5.6 Ribohomopolymer-Assay

Um die Bindungseigenschaften zwischen Cyp57 oder einzelnen Domänen von Cyp57 mit einzelsträngigen RNA-Homopolymeren (poly(A), poly(U), poly(G), poly(C)) zu untersuchen, wurde der Ribohomopolymer-Assay verwendet (Brown *et al.*, 1998; Swanson & Dreyfuss, 1988). Dazu wurden 350 mg CNBr-aktivierte Sepharose 4B FF in 50 ml 1 mM HCl für 5 min quellen gelassen und anschließend dreimal mit Wasser gewaschen. Die Sepharose wurde in 2 ml DEPC-H₂O aufgenommen und in vier 1.5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Zur Sepharose wurden dann drei Volumina 0.1 M NaHCO₃ pH 8.0 mit gelösten Homopolymeren gegeben und für 20 h bei 4°C rotierend gemischt. Danach wurden die Sepharose zweimal mit 5 Vol eiskaltem 0.1 M NaHCO₃ pH 8.0 gespült, sowie zweimal mit eiskaltem 0.1 M Tris/ HCl pH 8.0. Anschließend wurden nicht reagierte funktionelle Gruppen mit 5 Vol 0.1 M Tris/ HCl pH 8.0 bei 4°C für 4 h umgesetzt und damit blockiert. Durch Zentrifugation wurde die Sepharose pelletiert und zweimal in 5 Vol Bindungspuffer equilibriert (10 mM Tris/ HCl pH 7.4; 100 mM NaCl; 2.5 mM MgCl₂; 0.5% Triton X-100; *Protease inhibitor complete*). Danach wurde die poly(A), poly(U), poly(G), poly(C)-gekoppelte Sepharose zu je 25 µl aliquotiert und zweimal mit 5 Vol Bindungspuffer der zwischen 0.2; 0.5; 1.0 oder 2.0 M NaCl enthielt, equilibriert. Dann wurde 20 µg rekombinantes Protein in 1 ml Bindungspuffer mit entsprechenden NaCl-Konzentrationen zu der Sepharose gegeben und für 10 min schüttelnd inkubiert. Durch Inkubation für 10 min in den Puffern mit den entsprechenden NaCl-Konzentrationen und zusätzlich 2 mg ml⁻¹ Heparin wurden unspezifische Bindungen unterdrückt. Zudem wurde viermal mit den entsprechenden Puffern ohne Heparin gespült (5 min). Abschließend wurde der Überstand entfernt und die Sepharose wurden für 5 min bei 95°C in 50 µl SDS-Probenpuffer erhitzt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung untersucht.

2.2.5.7 CD-Spektroskopie

Die optische Aktivität von Proteinen wurde mittels Circular dichroismus-Spektroskopie (CD) untersucht. Mit dieser Methode kann der Gehalt von Sekundärstrukturelementen in Proteinen bestimmt werden. Dazu wurden mit einem temperierbaren CD-Spektrometer Jasco J710 Fern-UV CD-Spektren in 5 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.5 aufgenommen. Typischerweise wurden von einem Protein 25 Spektren akkumuliert. Die Spektren wurden, wenn nicht anders angegeben, mit einer Proteinkonzentration von 0.1-0.5 mg ml⁻¹ (5-20 µM) in einer 0.1 cm Quarzglaszelle bei 20°C aufgenommen. Die mittlere molare Elliptizität, bezogen auf das durchschnittliche Molekulargewicht einer Aminosäure, wurde unter Verwendung der **Formel 2** und **Formel 3**, berechnet.

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta \cdot \text{MRW}}{d \cdot c \cdot 10} \quad \text{[Formel 2]}$$

$$\text{MRW} = \frac{N_A - 1}{\text{MW}} \quad \text{[Formel 3]}$$

$[\Theta]_{\text{MRW}}$	mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$)
Θ	gemessene Elliptizität (mdeg)
MW	Molekulargewicht (g mol^{-1})
MRW	mittlere molare Masse einer Aminosäure
c	Proteinkonzentration (mg ml^{-1})
d	Schichtdicke der Küvette (cm)
N_A	Anzahl der Aminosäuren

Die Änderung der Konformation von Cyp57 bzw. der RNA bei der Bildung von Cyp57-RNA-Komplexen wurde in Titrationsexperimenten untersucht. Dazu wurden die Proben in Bindungspuffer (5 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.4, 1 mM DTT, 100 mM NaCl oder mit 250 mM NaCl) äquilibriert. Sechs akkumulierte Nah-UV CD-Spektren wurden von 300 bis 220 nm in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0.1 cm bei 20°C aufgenommen. Es wurden separat die Spektren von der RNA, von dem Komplex und vom Protein aufgenommen. Für die Titrationsexperimente wurde die RNA-Konzentration konstant gehalten und mit steigenden Proteinkonzentrationen inkubiert. Die Extinktionskoeffizienten wurden aus der Literatur oder vom Hersteller für poly(G): $\epsilon_{253} - 9400 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Savintsev & Vekshin, 2002), poly(A): $\epsilon_{257} - 10\,300 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Riley *et al.*, 1966), G_{10} : $\epsilon_{260} - 102\,400 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Eurofins Genomics), GUGGCCG: $\epsilon_{260} - 63\,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Sigma-Aldrich) übernommen.

2.2.5.8 Bestimmung der PPIase-Aktivität und Inhibition der PPIase-Aktivität

Die Bestimmung der PPIase-Aktivität von Cyp57 erfolgte mittels des Protease-freien PPIase-Tests (Zoldák *et al.*, 2009). Dafür wurden neben dem Substrat Abz-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA auch weitere Tetrapeptid-Substrate der Form Abz-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA verwendet, wobei Xaa weitere proteinogene Aminosäuren darstellt. Die Substrate wurden in wasserfreiem 0.55 M LiCl/ TFE gelöst. Die Messung der *cis/trans*-Isomerisierung der Xaa-Pro Bindung erfolgte nach einem Sprung in 50 mM Tris/ HCl pH 8.0, 500 mM NaCl am Spektrofluorometer Fluoromax 2 bei 10°C.

Die Inhibition von Cyp57 mit Cyclosporin A wurde durch Analyse der PPIase-Aktivität des Enzyms gegenüber dem Substrat Abz-Ala-Met-Pro-Phe-pNA in zusätzlicher Gegenwart verschiedener Konzentrationen CsA bestimmt. Zur Herstellung einer 100 mM Stammlösung wurde CsA in 100% EtOH gelöst. Weitere Verdünnungen von CsA wurden in 50% EtOH hergestellt. Vor der Messung der PPIase-Aktivität wurde CsA mit Cyp57 10 min in 50 mM Tris/ HCl pH 8.0, 500 mM NaCl vorinkubiert. Durch die Zugabe von Substrat wurde die Messung gestartet.

2.2.5.9 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Zur Charakterisierung der Bindung von einzelsträngigen RNA-Oligonukleotiden an Cyp57 wurde die Isotherme Titrationskalorimetrie eingesetzt. Diese Methode ermöglicht die physikalische Bestimmung der erzeugten oder aufgenommenen Wärme während einer Bindungsreaktion. Dabei wurde typischerweise Cyp57 schrittweise zu RNA titriert. Gemessen wurde dabei die Energie, die zur Erhaltung der Temperatur zwischen Proben- und Referenzzelle benötigt wird (Salim & Feig, 2009). Dadurch ist es möglich, die thermodynamischen Parameter einer Bindungsreaktion zu charakterisieren, welche die Bindungsenthalpie (ΔH), die freie Energie (ΔG), die Stöchiometrie (n) und die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) beinhaltet (Wiseman *et al.*, 1989).

Die Experimente wurden an einem Titrationskalorimeter VP-ITC durchgeführt. In der Messzelle mit einem Volumen von ca. 1.4 ml wurde eine 10-15 μM RNA-Oligonukleotid-Lösung vorgelegt. Eine 100-400 μM Proteinlösung wurde in 19 bzw. 29 Injektionen zu je 15 bzw. 10 μl zutitriert.

Zwischen jedem Titrationsschritt wurden 300 s äquilibriert, die Rührgeschwindigkeit betrug 310 Umdrehungen pro Minute. Die Messungen für Cyp57₂₄₀₋₃₁₈ erfolgten in 10 mM Tris/ HCl pH 7.4 (20°C), 100 mM NaCl, 0.5 mM TCEP sowie für Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ in 10 mM Na-Phosphatpuffer pH 6.0 (20°C), 500 mM NaCl bei 20°C. Die Daten wurden mit der von MicroCal gelieferten Software ORIGIN 5.0 analysiert. Auftretende Verdünnungswärme des Titranten konnte durch ein Referenzexperiment ermittelt werden, bei dem die Proteinlösung in den entsprechenden Puffer titriert wurde.

2.2.6 Kristallstrukturanalyse

Die Kristallstrukturanalyse der PPIase-Domäne von Cyp57 (Cyp57₁₋₁₆₈) wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Milton Stubbs, Abteilung Physikalische Biotechnologie an der Martin-Luther-Universität, Halle/ Saale ermöglicht. Zusammen mit Dr. Michael Schöpfel wurden erste Kristallisationsversuche durchgeführt. Dr. Christoph Parthier übernahm die Aufnahmen der Röntgenstreubilder, die Prozessierung der Daten, die Lösung des Phasenproblems sowie die Strukturerstellung und -verfeinerung.

2.2.6.1 Proteinkristallisation

Für die Röntgenstrukturanalyse von Proteinen sind Einkristalle eine Grundvoraussetzung. Dazu muss das Protein in einer hohen Reinheit vorliegen. Dies wurde durch verschiedene chromatographische Trennmethode (Abschnitt: 2.2.4) und einer anschließenden Analytik (Abschnitt: 2.2.5) sichergestellt. Damit sich Proteinkristalle bilden, müssen Proteine eine übersättigte Lösung bilden. Durch Zugabe von Salzen oder wasserentziehende Agenzien (Präzipitantien) wird die Übersättigung erreicht. Dies führt zu einer initialen Kristallisationskeimbildung und unter geeigneten Bedingungen zu voranschreitendem Kristallwachstum.

Für die Kristallisation wurde die Methode der Gasphasendiffusion (*vapor diffusion*) verwendet. Hierbei wird eine Mischung aus Protein- und Kristallisationslösung hergestellt, die in einem geschlossenen System äquilibriert wird. Durch die Konzentrationsunterschiede von Präzipitant im Tropfen und im Reservoir der Kristallisationslösung kommt es zur Diffusion des Solvens, wobei dem Tropfen langsam Wasser entzogen wird, so dass es dort zu einer Übersättigung der Proteinlösung kommt. Dabei kann je nach Aufbau des Kristallisationsexperimentes der Tropfen hängend (*hanging drop*) oder sitzend (*sitting drop*) angesetzt werden.

Die initialen Kristallisationsuntersuchungen wurden unter Verwendung der *sitting drop*-Methode durchgeführt. Für die Kristallisation wurde Cyp57₁₋₁₆₈ in einer Konzentrationen von 10 mg ml⁻¹ in 10 mM Tris/ HCl pH 7.8 (20°C), 100 mM NaCl eingesetzt. Die Kristallisationsansätze wurden automatisiert mit Hilfe eines Pipettierroboters (Cartesian Microsys) durch Mischen von 0.2 μl Cp57₁₋₁₆₈ und 0.2 μl Kristallisationslösung (verwendete Kits, Abschnitt: 2.1.11) in 96-well Mikrotiterplatten (MRC 3-well-Platten) angesetzt, mit UV-durchlässigem Klebefilm versiegelt und bei 16°C inkubiert. Bereits nach 12 h wurden erste Kristalle sichtbar. Der Kristallisationsverlauf wurde mit einem automatisierten *Imaging*-System (Rigaku Desktop Minstrel UV) dokumentiert.

Für die Optimierung der im 96-well-Maßstab identifizierten Kristallisationsbedingungen wurde mit der *hanging drop*-Methode in 24-well-Kristallisationsplatten (Qiagen, EasyXtal 24-well) ein *Fin-screening* durchgeführt. Zur Reproduktion der Kristallisationsbedingungen wurde Cyp57₁₋₁₆₈ in Konzentrationen von 10-15 mg ml⁻¹ eingesetzt. Zusätzlich wurden Bedingungen wie z.B. der pH-Wert der

Kristallisationslösung und die Präzipitanzkonzentration verändert, die das Kristallwachstum beeinflussen. Für diese Analyse wurden gleiche Volumina der Protein- und Kristallisationslösung in einem Tropfen mit einem Endvolumen von 4 µl gemischt und bei 16°C gelagert. Ebenfalls wurden bei dieser Methode erste Kristalle nach 12 h bis 24 h sichtbar.

Die Ko-Kristallisation von Cyp57₁₋₁₆₈-Inhibitor- bzw. Cyp57₁₋₁₆₈-Substrat-Komplexen wurde nach der Methode von Stegmann *et al.*, (2009) untersucht. Cyp57₁₋₁₆₈ wurde mit einem 5fachen molaren Überschuss kristallinem CsA gemischt und über Nacht rotierend inkubiert. Ungebundenes CsA wurde durch Zentrifugieren abgetrennt. Der Überstand mit dem Protein-CsA-Komplex wurde auf 10-15 mg ml⁻¹ konzentriert und im 96-well bzw. 24-well Maßstab eingesetzt. Die Ko-Kristallisation des Cyp57₁₋₁₆₈-Substrat- (Ac-Ala-Met-Pro-Phe-NH₂) Komplexes wurde ähnlich, wie für die Ko-Kristallisation des Proteins mit CsA beschrieben, durchgeführt. Abweichend vom ursprünglichen Protokoll wurde das Substrat jedoch nur 2 h mit Cyp57₁₋₁₆₈ inkubiert.

2.2.6.2 Röntgenbeugungsanalyse und -datensammlung

Initiale Beugungsanalysen der erhaltenen Kristalle wurden am Röntgengenerator des Instituts für Biochemie und Biotechnologie der Martin-Luther-Universität, Halle/ Saale durchgeführt. Dazu wurden die Kristalle mit Hilfe von Kryoschleifen (*CryoLoop, Hampton Research*) aus den Tropfen isoliert und durch kurzzeitige Inkubation in Kristallisationslösung unter Zusatz von 15% Ethylenglykol gefriereschützt. Diese Beugungsanalysen erfolgten unter kryogenen Bedingungen (100 K, Rigaku XSTREAM 2000) an einem Kupferdrehanoden-Röntgengenerator (Rigaku Micromax 007, Wellenlänge 1.5418 Å) in Verbindung mit einem CCD-Detektor (Rigaku Saturn 944+, Belichtungszeit 60 s).

Die Datensammlung anhand ausgewählter, eingefrorener Kristalle wurde am Synchrotron BESSY II (Helmholtz-Zentrum, Berlin), am *Beamline* 14.1 (Wellenlänge 0.9184 Å) unter Verwendung eines Pilatus 6M-Detektors (Dectris, Belichtungszeit 0.2 s) durchgeführt. Die Prozessierung der Datensätze erfolgte mit der Software XDS (Kabsch, 2010). Statistische Angaben zur Prozessierung des besten Datensatzes sind aus **Tabelle 13** ersichtlich.

2.2.6.3 Strukturlösung, -modellierung und -verfeinerung

Die Strukturlösung (Phasierung der Daten) erfolgte durch molekularen Ersatz mittels der Software BALBES (Long *et al.*, 2008) unter Nutzung der Kristallstruktur des humanen Cyclophilins 18.1 (PDB-ID: 2OJU) als Suchmodell. Die Struktur der PPIase-Domäne von Cyp57₁₋₁₆₈ wurde im Anschluss mit Hilfe der Programme COOT (Emsley *et al.*, 2010) manuell komplettiert und unter Einbeziehung von TLS-parametrisierten B-Faktoren (*translation/ libration/ screw*) mit dem Softwarepaket PHENIX (Adams *et al.*, 2010) verfeinert. Die Validierung der Struktur erfolgte mit der Software MolProbity (Davis *et al.*, 2007), die Visualisierung mittels PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC.). Statistische Angaben zur Strukturverfeinerung sind aus **Tabelle 13** ersichtlich.

Tabelle 13: Statistik der Datenprozessierung und Strukturverfeinerung Cyp57₁₋₁₆₈**Datenprozessierung**

Wellenlänge (Å)	0.9184
Röntgenquelle	BESSY II BL 14.1
Raumgruppe	P3 ₂ 21
Einheitszelle	
<i>a, b, c</i> (Å)	39.7, 39.7, 162.6
α, β, γ (°)	90, 90, 120
Auflösung (Å)	30.0 - 2.4
<i>R</i> _{observed} / <i>R</i> _{meas} (%)	5.9 (46.9) / 6.5 (52.9)
<i>I</i> / σI	18.4 (3.5)
Vollständigkeit (%)	99.5 (100.0)
Multiplizität	5.1 (5.2)
Wilson B-Faktor	53.3
Moleküle / asymmetrische Einheit	1

Strukturverfeinerung

Auflösung (Å)	30.0 - 2.4
Anzahl Reflexe (<i>work/ test</i>)	6333/ 318
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.20/ 0.28
Anzahl Atome	
Protein	1297
Wasser	6
B-Faktoren	
Protein	58.5
Wasser	46.0
R.m.s Abweichungen	
Bindungslängen (Å)	0.01
Bindungswinkel (°)	1.24
Ramachandranplot (%)	
Bevorzugt	92.6
Erlaubt	6.8
Nicht erlaubt	0.6
MolProbity <i>clashscore</i>	8.91

Die Werte für die äußerste Auflösungsschale (2.5-2.4 Å) sind in Klammern angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Einordnung von Cyp57 als Cyclophilin

Cyp57 besteht aus einer PPIase-Domäne, einer RRM-Domäne und einem Lysin-reichen Sequenzabschnitt (Abbildung 5).

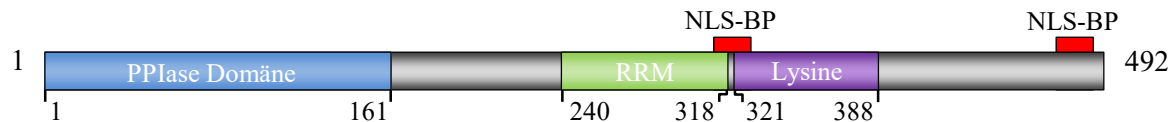


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Cyp57. Gezeigt ist das Volllängenprotein (Aminosäuren 1-492). Die Zahlen unter der Abbildung geben die Grenzen der einzelnen Domänen an, diese sind von UniProtKB abgeleitet.

Die Zuordnung von Cyp57 zu den PPIasen, speziell den Cyclophilinen wurde durch die Programme BLASTP (PSI-Blast Algorithmus) und MUSCLE (Edgar 2004) analysiert. Dazu wurde die Aminosäuresequenz der PPIase-Domäne von Cyp57 mit der des prototypischen Vertreters Cyp18 verglichen. Cyp57 besitzt eine Cyclophilin-like-Domäne, wobei 6 der 13 Aminosäuren, Arg55-Asn44, Met61-Ile50, Ala101-Val97, Ala103-Asn99, Phe113-Leu109 und Trp121-Tyr118 (Cyp18-Cyp57), die bei der CsA-Bindung bzw. bei der Ausbildung der PPIase-Aktivität eine wichtige Rolle spielen, bei Cyp57 verändert sind (Zeng *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wird Cyp57 auch als Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase-like-Protein bezeichnet (Kumari *et al.*, 2013). Neben Cyp57 gibt es mit Cyp18.2a (PPIL1) und Cyp18.1 (PPIL3) noch weitere PPIase-like-Proteine, deren Sequenzen ebenfalls mit in den Vergleich einbezogen wurden (Abbildung 6A). Die Sequenz der PPIase-Domäne von Cyp57 (AS 1-161) ist zu 34% identisch zur prototypischen PPIase Cyp18, beide Sequenzen besitzen mit 51% ähnlichen Aminosäuren eine große Ähnlichkeit. Der Sequenzvergleich mit den anderen humanen PPIase-like Proteinen Cyp18.1 und Cyp18.2a zeigt eine erhöhte Sequenzidentität von 42% bzw. 40%. Darüber hinaus sind 62% bzw. 59% der Aminosäuren von Cyp18.1 und Cyp18.2a zur PPIase-Domäne von Cyp57 ähnlich.

A)

Cyp57	-----MAVLLETT-----LGDVVIDLYTEERPRACLNFLLKLC--KIKY--YNYCL	41
Cyp18	-----MVNPTVFFDIAVDGEPLGRVSFELFADKVPKTAENFRALSTGEKGFYKGGSC	52
Cyp18.1	-----MSVTLHTD-----VGDIKIEVFCERTPKTCENFLALC--ASNY--YNGCI	41
Cyp18.2a	MAAIPPDSWQPPNVYLETS-----MGIIVLELYWKHAPKTCKNFAELA--RRGY--YNGTK	52
	* : : * : : : : : . * : . * * * . : * :	
Cyp57	IHN V QR D F I QTGDPTGT-GRGGESIFGQLYGDQASFFEAEKVPRIKHKKKGTVSM V NN G	100
Cyp18	FHR I IPG F MC Q GGDFTRHNGTGGKSIYG-----EKFEDE-NFILKHTGPGILSM A N A G	104
Cyp18.1	FHR N IK G FM V Q T GDPTGT-GRGGNSIWG-----KKFEDEYSEYLKHNVRG V SM A NN G	93
Cyp18.2a	FHR I IK D FM I QGGDPTGT-GRGGASIYG-----KQFEDELHPDLKFTGAGIL A M A N A G	104
	: * . . * : * * * * * * * * * : * * * * : * . * : * * * * *	
Cyp57	SDQHGS Q F I TTGENLD L DGV H TVFGEVTEGMDI I KKIN E TFVD-KDFVPYQDIRINHT	159
Cyp18	PNTNGS Q F F ICTAKT- E W L DG K H V VFGK V KEGMNIVEAMERF--GSRNGKTSKKITI A D C	161
Cyp18.1	PNTNGS Q F F ITYG K Q- P H L DM K Y T VFG K VIDGLETLDELE K L P VNE K TYR P LND V H I K D I	152
Cyp18.2a	PDTNGS Q F F VT L APT- Q W L DG K H T IFGR V CC Q G I GM V N R VG M VE T NS Q D-R P V D D V K I ---	159
	. : : * * * : : . * * : : * * * * * : * : : * :	

B)

hCyp57	MAVLLLETTLGDVVIDLYTEERPRACLNFLKLCKIKYYNYCLIHNVQRDFIIQTGDPTG-T	60
Rct1	MSVLIETTVGDLVIDLDFVKEAPKTCENFLKLCKLKYNFPCFYNIQHNYTCQTGDPLGPT	60
AtCyp59	MSVLIIVTSLGDIVIDLHSDKCLPTCKNFKLCKIKYYNGCLFHTVQKDFTAQTGDPTG-T	60
	:	
hCyp57	GRGGESIFGQLYGDQASFFAEKVPRIKHKKGTVSMVNNGSDQH-----GSQFLITT	112
Rct1	GDDGRCVWNVL-NKGTRFFKAEFNPSLVHNKMLVSMSTATISSRDDKLLVCGSQFIITL	119
AtCyp59	GAGGDSIYKFLYGEQARFYKDEIHLDLKHSKGTGTVMASGGENLN-----ASQFYFTL	112
	* ** . : : * . . : * : : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
hCyp57	GENLDYLDGVHTVFGVEVTEGMDIIKKINETFVDKDFVPYQDIRINHVTI LDDPFDDPPDL	172
Rct1	SDNLEGLDERYPPIYGQVAEGFDTLKINDAICDEEGQPYRDIRIKHTII LDDPFEDPPDL	179
AtCyp59	RDDL DYLDGKHTVFGQIAEGFDTLTRINEAYVDPKRPYKNIRIKHTHI LDDPFDDPPQL	172
	: : : * * * . . : : * : : * : *	
hCyp57	--LIPDRSPE--PTREQLDSGRIGADEEIDDFFKGRSAEEVEEIKAEKEAKTQAILLEMVG	228
Rct1	--VEPLRSPS--PTPEQLATVRIGENEQI---ESETSEDKLQREKEMEAEAEAVTLEMIG	232
AtCyp59	AEMMPDASPEGKPKKEEVKDDVRL-EDDWVPMDEELGAQEEVIREKAAHSSAVVLESIG	231
	: * ** . * . * * : : : : : : : : * * : * : * * * *	
hCyp57	DLPDADIKPPENVLFVCKLNPVTTDEDELEIIFSRFGPIRSCEVIRDWKTGESLCYAFIEF	288
Rct1	DLPFAHVAPPENVLFVCKLNPVTQDEDELEIIFSRFGKIIISQVIRDKETGDSLQYAFIEF	292
AtCyp59	DIPEAEVKKPPDNVLFVCKLNPVTEDEDLHTIIFSRFGTVVSADVIRDFKTGDSLQYAFIEF	291
	* : * * : * * : * * * * * * * * * * * * * * * : * : * * * : * : * * * * * *	
hCyp57	EKEEDCEKAFFKMDNVLIDRRRIHVDFSQSVAKVKW-----KGKGGKYTKSDFKEY	339
Rct1	DNKESVEKAYFKMQNVLIDDSRIHVDFSQSVARY-----	326
AtCyp59	ENKESCEQAYFKMDNALIDRRRIHVDFSQSVSKL-WSQFRQKDSQKGGKNGCFKCGSTDH	350
	: : : * . * : *	

Abbildung 6: Homologie-Untersuchung von Cyp57. A) Sequenz-Alignment von homologen humanen Cyclophilinen: Cyp57 (UniProtKB-Nummer: Q8WUA2), Cyp18 (P62937), Cyp18.1 (Q9H2H8) und Cyp18.2a (Q9Y3C6). Dargestellt sind die PPIase-Domänen nach den Grenzen von UniProtKB. Rot markiert sind die 13 funktionellen Reste von Cyp18 die in Zusammenhang mit der Substrat-Katalyse und Inhibition durch CsA (Arg55, Phe60, Met61, Glu63, Gly72, Ala101, Asn102, Ala103, Gln111, Phe113, Trp121, Leu122, His126) stehen. Gelb markiert sind die in Cyp57 veränderten Reste die wichtig für die CsA-Bindung und PPIase-Aktivität in Cyp18 sind. B) Sequenz-Alignment von Cyp57-Orthologen aus *Arabidopsis thaliana* - AtCyp59 (Q6Q151) und *Schizosaccharomyces pombe* - Rct1 (Q9UUE4). Bei Cyp57 sind von AS 1-161 die PPIase-Domäne (—) und von AS 240-318 die RRM-Domäne (- -) markiert. Teile der Aminosäuresequenz von Cyp57 (AS 340-492), AtCyp59 (AS 327-506) und Rct1 (AS 351-432) werden nicht gezeigt. Rot markiert sind funktionelle Reste von Cyp18 die in Zusammenhang mit der Substrat-Katalyse (Arg55 und Glu63) und Inhibition durch CsA (Trp121) stehen. Alignments wurden mit MUSCLE (Edgar, 2004) erstellt. (*) hoch konservierte AS; (:) AS mit sehr ähnlichen Eigenschaften; (.) AS mit weniger ähnlichen Eigenschaften.

Außerdem erfolgte ein Sequenz-Vergleich mit Cyp57-Orthologen aus *A. thaliana* (AtCyp59) und *S. pombe* (Rct1) (**Abbildung 6B**). Die Analyse mit BLASTP ergab, dass die PPIase-Domänen der orthologen Vertreter von *A. thaliana* (AtCyp59) und *S. pombe* (Rct1) mit 58% bzw. 49% eine hohe Identität zur PPIase-Domäne von Cyp57 aufweisen, sowie zwischen 73% und 68% ähnliche Aminosäuren besitzen. Besonders interessant ist die Homologie der RRM-Domäne von Cyp57 (AS 240-318) zu der RRM-Domäne von AtCyp59 und Rct1 mit 80% bzw. 78% Sequenzidentität und fast 90% ähnlichen Aminosäuren. Da bei den drei Proteinen die Linker-Region AS 162-239 und die C-terminale Region beginnend ab AS 319 nicht konserviert sind, weisen die Vollängenproteine von AtCyp59 und Rct1 zu Cyp57 eine Identität von 46% bzw. 42% auf.

3.2 Klonierung, Expression und Reinigung von Cyp57

Zur proteinbiochemischen Charakterisierung von Cyp57 wurde mit der Klonierung und Expression des Vollängenproteins in *Escherichia coli* begonnen. Dazu wurde der Vektor pE-SUMO verwendet. Dieser Vektor verspricht hohe Ausbeuten löslichen Proteins durch die SUMO-Fusionstechnologie. Dabei

wurde das SUMO-Protein mit dem Zielprotein Cyp57 fusioniert, um die korrekte Faltung zu verbessern und damit die Löslichkeit zu erhöhen. Zudem war es möglich, den natürlichen N-Terminus des Zielproteins Cyp57 nach der Proteolyse mit einer spezifischen Protease ohne überzählige Aminosäuren zu erhalten (Malakhov *et al.*, 2004).

Mittels molekularbiologischer Methoden (Abschnitt: 2.2.3) wurde die codierende Nukleotidsequenz von Cyp57 über die Restriktionsschnittstellen *BsmBI* und *BamHI* in den Vektor pE-SUMO integriert. Die erfolgreiche Insertion der DNA-Sequenz wurde durch Sequenzierung der erhaltenen Plasmid-DNA überprüft. Anschließend wurde die lösliche Expression des rekombinanten Fusionsproteins His₆-SUMO-Cyp57 bei unterschiedlichen Temperaturen (37°C, 30°C, 18°C) in den *E. coli*-Stämmen BL21 und Rosetta untersucht. Es zeigte sich, dass das Fusionsprotein im *E. coli*-Stamm BL21 für eine effektive Reinigung in unzureichender Menge gebildet wurde (Abbildung 7A). Ausreichende Mengen des Fusionsproteins wurden nur im *E. coli*-Stamm Rosetta bei Temperaturen unter 20°C und der Kultivierung über Nacht detektiert (Abbildung 7B). Der *E. coli*-Stamm Rosetta besitzt ein zusätzliches Plasmid, das für sechs seltene Codone codiert, die häufig in humanen Proteinen vorkommen (Novy *et al.*, 2001). Neben der Expression des Fusionsproteins wurde auch dessen Löslichkeit untersucht. Dabei zeigte sich, dass lösliches His₆-SUMO-Cyp57 nur bei den oben beschriebenen Bedingungen in *E. coli* Rosetta gebildet wurde (Abbildung 7C).

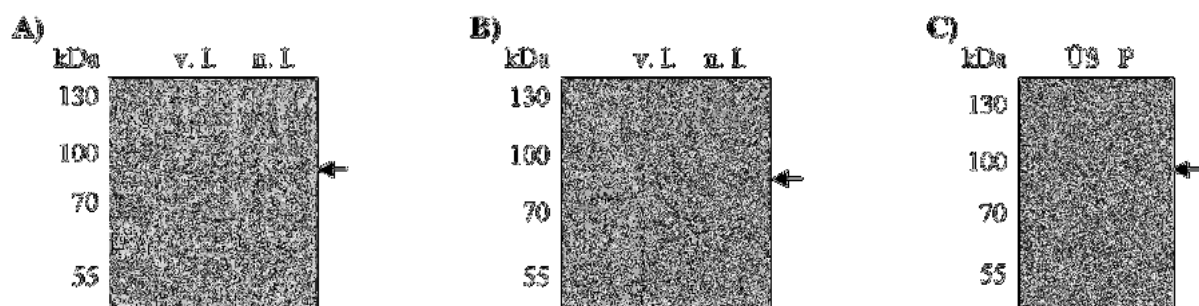


Abbildung 7: Expressions- und Löslichkeitstest von His₆-SUMO-Cyp57 in *E. coli*. Expressionstest von His₆-SUMO-Cyp57 in *E. coli* BL21 (A) und Rosetta (B). Analysiert wurde das Gesamt-Zelllysate vor (v. I.) und nach (n. I.) Induktion. Für den Test wurde eine 5 ml Hauptkultur 1/ 100 mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C, 200 UpM kultiviert. Bei einer OD₆₀₀ von 0.8 wurden die Kulturen 10 min auf Eis gekühlt und mit 1 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte über Nacht bei 18°C, 200 UpM. Anschließend wurden 500 µl der Kultur durch Zentrifugation pelletiert, mit SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE (10%) sowie Coomassie-Färbung untersucht. C) Löslichkeitstest von His₆-SUMO-Cyp57 in *E. coli* Rosetta. Von der induzierten Übernachtskultur wurde 1 ml abgenommen und pelletiert. Das Zellpellet wurde in 300 µl *E. coli*-Aufschlusspuffer (50 mM Tris/ HCl pH 7.5 (20°C), 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 5% Glycerol) aufgenommen, mittels Ultraschall lysiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand (ÜS) und das Pellet (P) wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (10%) und Coomassie-Färbung untersucht. Die Pfeile markieren His₆-SUMO-Cyp57.

Entsprechend wurden die Bedingungen für die präparative Proteinanzucht in *E. coli* gewählt. Die Kultivierung der *E. coli* Rosetta-Zellen, die His₆-SUMO-Cyp57 exprimierten, erfolgte über Nacht bei 18°C (Abschnitt: 2.2.2.1). In der sich anschließenden Präparation wurde das Fusionsprotein His₆-SUMO-Cyp57 durch Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie gereinigt. Dazu erfolgte die Affinitätschromatographie über IMAC durch zwei gekoppelte HisTrap HP-Säulen und die Größenausschlusschromatographie über eine HiLoad Superdex 200 PG-Säule. Daran schloss sich die Abspaltung des SUMO-Proteins unter Verwendung der SUMO-Protease Senp2. Die Trennung der SUMO-Protease und des SUMO-Proteins von Cyp57 wurde durch eine abschließende Affinitätsreinigung mittels IMAC unter Verwendung einer HisTrap HP-Säule realisiert. Entsprechend dem Reinigungsschema (Abbildung 8A) konnte rekombinantes Cyp57 nahezu bis zur Homogenität

gereinigt werden (Abschnitt: 2.2.4.1). In **Abbildung 8B** ist exemplarisch ein SDS-Polyacrylamidgel mit Cyp57 nach dem letzten Reinigungsschritt gezeigt.

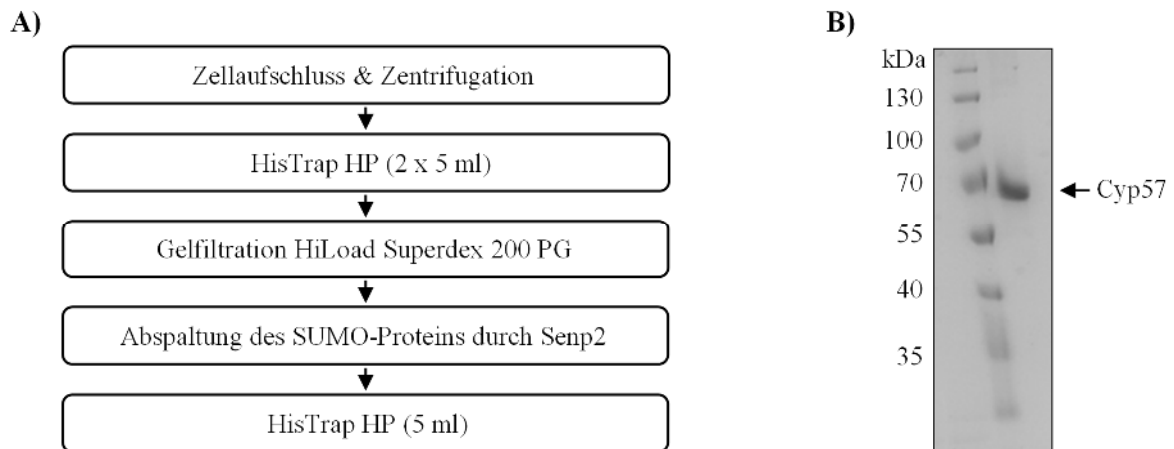


Abbildung 8: Reinigung von His₆-SUMO-Cyp57 und Cyp57. **A)** Schema für die Reinigung von His₆-SUMO-Cyp57. **B)** Rekombinantes Cyp57 gereinigt aus *E. coli*. 3 µg von Cyp57 (57.2 kDa) wurden nach dem letzten Reinigungsschritt mittels SDS-PAGE (10%) und Coomassie-Färbung analysiert. Die linke Spur zeigt den mitgeführten Größenstandard.

Mit dem Programm ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) vom ExPASy-Server (Artimo *et al.*, 2012) wurde für Cyp57 eine molekulare Masse von 57 225 Da berechnet. Rekombinantes Cyp57 gereinigt aus *E. coli* zeigte im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel eine apparente molekulare Masse von ca. 60 kDa. Vom gereinigten Protein wurde durch MALDI-TOF Massenspektrometrie die molekulare Masse von 57 227 Da experimentell bestimmt. Die Ausbeuten der Reinigung von Cyp57 waren sehr gering, durchschnittlich wurden pro 6 l Expressionskultur 4 mg des Vollängenproteins gereinigt.

3.3 Bestimmung der Domänengrenzen von Cyp57

Die Expression von Cyp57-Fragmenten unter der Verwendung der *in silico* berechneten Domänengrenzen, die bei UniProtKB für Cyp57 (PPIase-Domäne: AS 1-161; RRM-Lys-Domäne: AS 240-388) hinterlegt sind, führten in vorangegangenen Experimenten zu unlöslichen Proteinen. Um lösliche Fragmente des Proteins zu erhalten, wurde zunächst die Organisation der beiden Domänen im Protein analysiert. Daher erfolgte eine Bestimmung der Domänengrenzen mittels limitierter Proteolyse. Dazu wurde Cyp57 mit der Serinprotease Trypsin inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Zugabe des Serinprotease-Inhibitors PMSF unterbrochen und die Proben mittels SDS-PAGE analysiert. Bereits nach drei Minuten wurde Cyp57 durch Trypsin in mehrere Fragmente gespalten (**Abbildung 9A**). Für die massenspektrometrische Analyse der Fragmente wurde ein Reaktionsansatz chromatographisch mit einer RP-HPLC (C8-Säule - Grace Vydac 208TP) aufgetrennt und die Peaks separat aufgefangen (**Abbildung 9B**). Anschließend erfolgte die Bestimmung der molekularen Massen der Fragmente sowie deren Sequenzierung durch massenspektrometrische *de novo* Peptidsequenzierung (Seidler *et al.*, 2010). Dabei wurde durch ESI-MS ein Fragment mit einer molekularen Masse von 22 947 Da isoliert (**Abbildung 9C**). In der folgenden Peptidsequenzierung konnte durch zusätzliche Fragmentierung dieses Peptid dem N-Terminus von Cyp57 von AS 1 bis AS 203 zugeordnet werden.

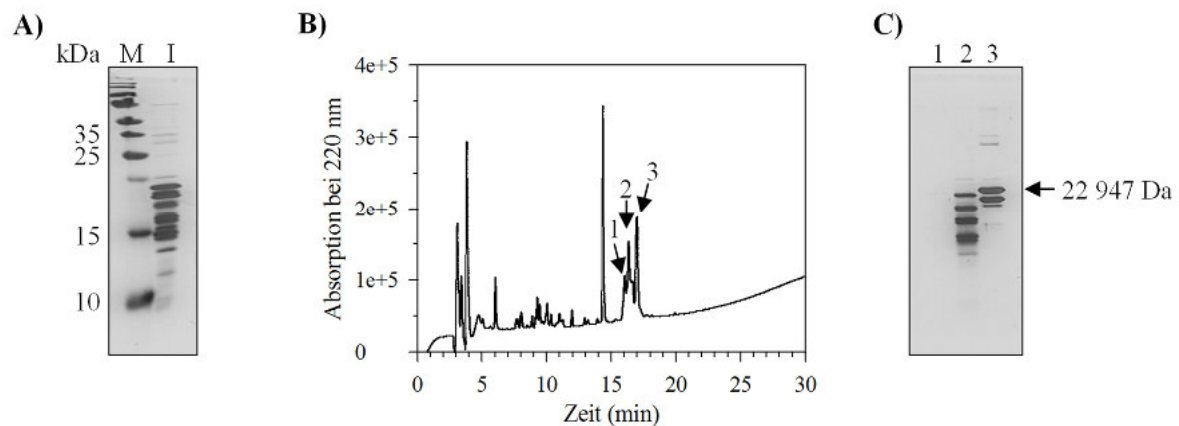


Abbildung 9: Limitierte Proteolyse von Cyp57. 15 μg Cyp57 wurden zusammen mit 4 U ml^{-1} Trypsin für 3 min bei RT in Puffer (50 mM Tris/ HCl pH 7.8, 200 mM NaCl) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mM PMSF abgestoppt und mittels RP-HPLC getrennt. Es wurde eine Shimadzu Class-LC10-HPLC mit einer Grace Vydac 208TP C8-Säule (4.6 mm x 250 mm; 5 μm) mit Laufmittel A: H_2O (0.1% v/v TFA) und Laufmittel B: ACN (0.1% v/v TFA) verwendet. Die Trennung erfolgte bei einem Lineargradient von 5-100% B in 30 min bei einer Flussrate von 1 ml min^{-1} und einer Temperatur von 40°C. Die Peaks wurden für die massenspektrometrische Analyse und SDS-PAGE separat aufgefangen. In **A**) wurde die limitierte Proteolyse von Cyp57 mit einem silbergefärbten 15%igen SDS-Polyacrylamidgel untersucht. In **B**) ist ein repräsentativer RP-HPLC-Lauf von A) dargestellt. In **C**) wurden die markierten Peak-Fractionen aus B) mittels SDS-PAGE (15%) und Silberfärbung analysiert.

Durch die massenspektrometrische Analyse des Fragments war es möglich, die Schnittstelle von Trypsin in Cyp57 abzuleiten. Sie ergab, dass Trypsin Cyp57 zwischen Arginin 203 und Serin 204 hydrolysiert hatte. Die Proteolysestelle von Trypsin in Cyp57 ist in **Abbildung 10** schematisch dargestellt. Ein stabiles Fragment, das den C-terminalen Teil des Proteins repräsentiert, konnte durch diese Untersuchung nicht identifiziert werden.

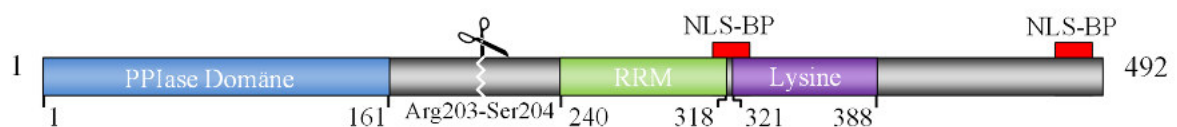


Abbildung 10: Proteolyse von Cyp57 durch Trypsin. Die Proteolysestelle zwischen Arg203 und Ser204 ist durch eine Schere markiert.

3.4 Klonierung und Reinigung von Cyp57-Varianten

Zur näheren Untersuchung der beiden Fragmente Cyp57 AS 1-203 (Cyp57₁₋₂₀₃) und Cyp57 AS 204-492 (Cyp57₂₀₄₋₄₉₂) wurden die jeweiligen codierenden Nukleotidsequenzen in den Vektor pE-SUMO inseriert, durch DNA-Sequenzierung überprüft und in *E. coli* Rosetta-Zellen transformiert. Für die Anzucht der Fusionsproteine der Cyp57-Fragmente exprimierenden *E. coli* Rosetta-Zellen wurden die Bedingungen gewählt, die bereits bei der Herstellung des Volllängenproteins verwendet wurden. Die Reinigung der Fusionsproteine His₆-SUMO-Cyp57₁₋₂₀₃ und His₆-SUMO-Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ entsprach der von Cyp57. Nach dem Zellaufschluss und der Klärung des Zelllysats durch Ultrazentrifugation erfolgte die säulenchromatographische Reinigung des jeweiligen Fusionsproteins mittels HisTrap HP-Säulen und HiLoad Superdex 200 PG-Säule. Nach der Abspaltung des SUMO-Proteins wurde im Falle der PPIase-Domäne (Cyp57₁₋₂₀₃), wie bei der Reinigung des Volllängenproteins, eine HisTrap HP-Säule als finaler

Reinigungsschritt eingesetzt. Im Gegensatz dazu wurde die RRM-Lys-Domäne (Cyp57₂₀₄₋₄₉₂) nach der Abspaltung des SUMO-Proteins unter Nutzung eines starken Kationenaustauschers final gereinigt. Dazu wurde eine HiTrap SP-Säule verwendet (**Abbildung 11**). Die detaillierten Schritte der Reinigung sind unter Abschnitt: 2.2.4.1 aufgeführt.

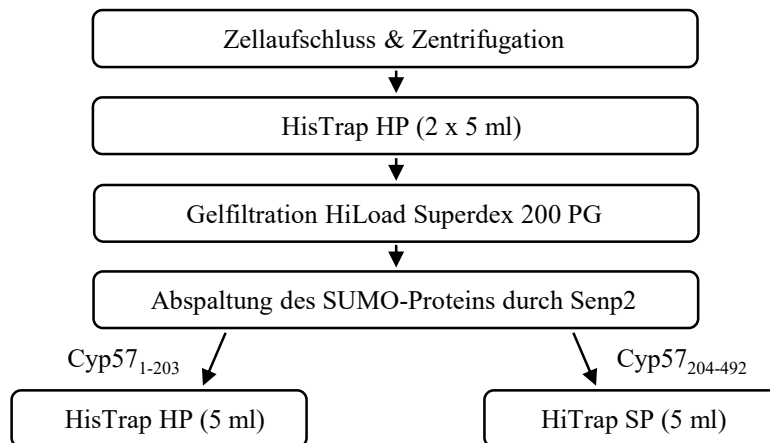


Abbildung 11: Reinigungsschema His₆-SUMO-Cyp57₁₋₂₀₃ und Cyp57₁₋₂₀₃, sowie His₆-SUMO-Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ und Cyp57₂₀₄₋₄₉₂.

Beide Domänen wurden nahezu zur Homogenität gereinigt. Die Reinheit der beiden Domänen wurde nach dem letzten Schritt der Reinigung mittels SDS-PAGE untersucht und ist exemplarisch in **Abbildung 12A** und **B** dargestellt. Mit dem Programm ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) vom ExPASy-Server (Artimo *et al.*, 2012) wurden für Cyp57₁₋₂₀₃ und Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ molekulare Massen von 22 947 Da und 34 428 Da berechnet. Durch MALDI-TOF Massenspektrometrie wurden von den gereinigten Domänen die molekularen Massen von 22 948 Da und 34 430 Da experimentell ermittelt. Im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel zeigte Cyp57₁₋₂₀₃ eine apparente molekulare Masse von 23 kDa und Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ von 38 kDa (**Abbildung 12**).

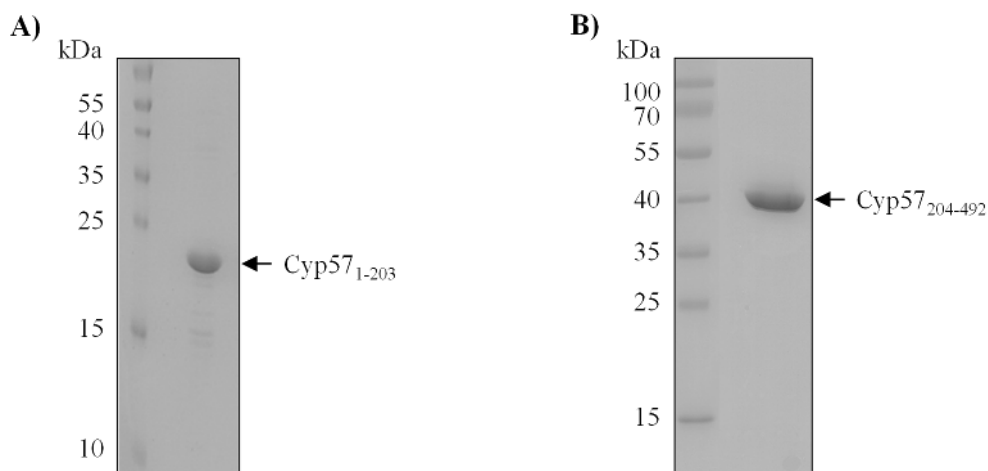


Abbildung 12: Aus *E. coli* gereinigte Cyp57-Fragmente. A) Cyp57₁₋₂₀₃, die PPIase-Domäne (AS 1-203) von Cyp57 (22.9 kDa) **B)** Cyp57₂₀₄₋₄₉₂, die RRM-Lys-Domäne (AS 204-492) von Cyp57 (34.4 kDa). Jeweils 5 µg Protein wurde nach dem letzten Reinigungsschritt in einem SDS-Polyacrylamidgel (12.5%) aufgetrennt und mit Coomassie-Lösung gefärbt. Die linke Spur zeigt jeweils den mitgeführten Größenstandard.

3.5 Sekundärstrukturanalyse von Cyp57 und seiner Fragmente

Im Folgenden wurde analysiert, welche Sekundärstrukturelemente in Cyp57 auftreten. Dazu wurde das gereinigte Vollängenprotein Cyp57 mittels CD-Spektroskopie untersucht. Das Fern-UV CD-Spektrum von Cyp57 wies zwei Minima der molaren Elliptizität bei 218 nm und 206 nm auf. Außerdem war eine positive molare Elliptizität bei Wellenlängen kleiner 200 nm zu beobachten (**Abbildung 13A**). Im Fern-UV CD-Spektrum von Cyp57 in 6 M Guanidiniumchlorid war nur eine geringe molare Elliptizität im Bereich zwischen 220-260 nm sichtbar. Dieses CD-Spektrum weist auf eine starke Abnahme der α -helikalen und β -faltblatthaltigen Bereiche des Proteins in Gegenwart von 6 M Guanidiniumchlorid hin. Nach dem Versuch der Rückfaltung des Proteins aus denaturierenden Bedingungen (6 M Guanidiniumchlorid) in Bedingungen ohne Denaturierungsmittel war das Fern-UV CD-Spektrum von Cyp57 ähnlich zu dem unter nativen Bedingungen. Jedoch waren einige Veränderungen zu dem ursprünglichen Spektrum zu beobachten, so waren die Minima der molaren Elliptizität verschoben (**Abbildung 13C**). Außerdem kam es zu einer Verschiebung der positiven molaren Elliptizität zu höheren Wellenlängen. Das deutet daraufhin, dass Cyp57 nach der Rückfaltung aus denaturierenden Bedingungen nicht mehr seine ursprüngliche Konformation einnimmt, wodurch die Bestimmung der thermodynamischen Parameter der Proteinestabilität ausgeschlossen ist.

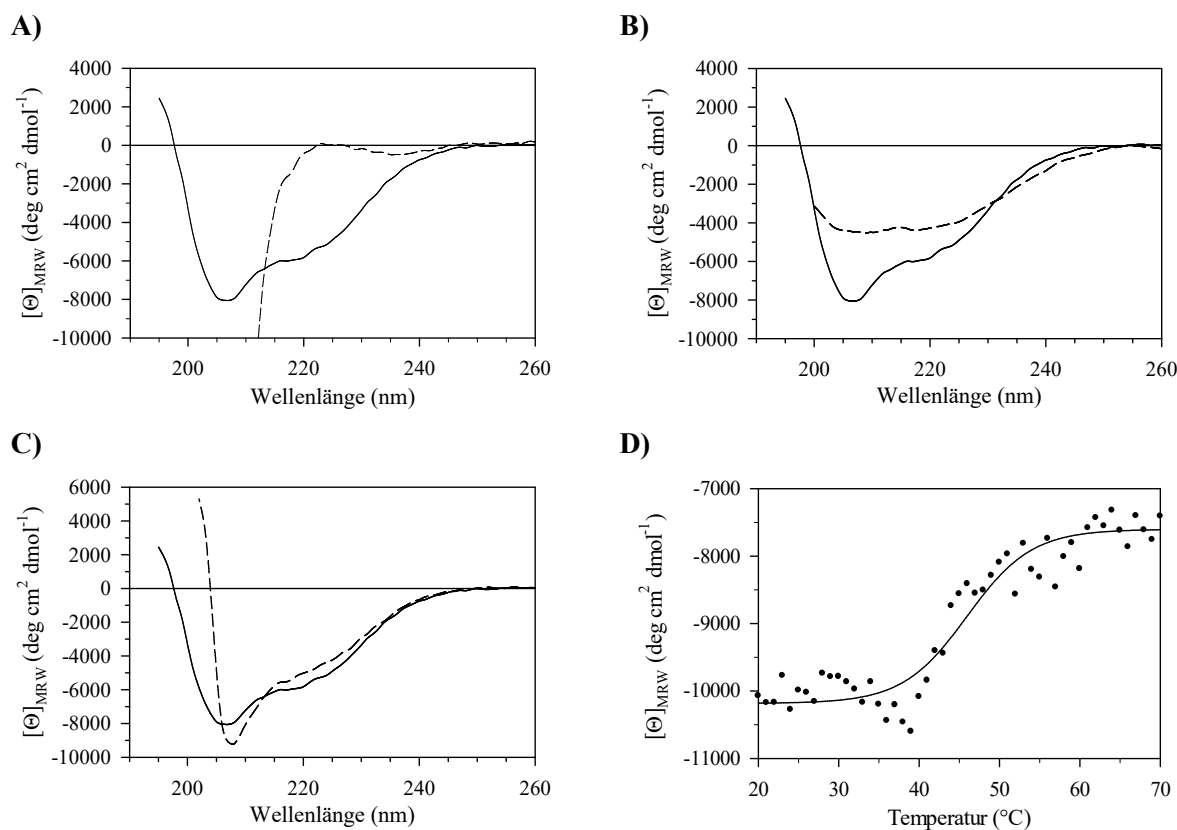


Abbildung 13: Fern-UV CD-Spektren von rekombinantem Cyp57. **A)** CD-Spektren von 20 μ M Cyp57 in 5 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.4 (—) und in 6 M Guanidiniumchlorid, 5 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.4 (- -) bei 20°C gemessen. **B)** CD-Spektren wurden von 20 μ M Cyp57 in 5 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.4 bei 20°C (—) und 70°C (- -) aufgenommen. **C)** CD-Spektren von 20 μ M Cyp57 in 5 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.4 (—) und nach der Rückfaltung aus 6 M Guanidiniumchlorid in 5 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.4 (- -) bei 20°C. Dargestellt ist die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure aus 25 Akkumulationen. **D)** Thermische Stabilität von Cyp57. Die Entfaltung von Cyp57 wurde bei 206 nm verfolgt (•). Der Temperaturübergang von 46°C wurde über nicht-lineare Regression bestimmt (—).

Zur Untersuchung der thermischen Stabilität von Cyp57 wurden Fern-UV CD-Spektren bei 20°C und bei 70°C aufgenommen (**Abbildung 13B**). Dabei kam es zu einer deutlichen Verringerung der Intensität der molaren Elliptizität von Cyp57 bei 218 und 206 nm (**Abbildung 13D**). Die größte Differenz in den Signalintensitäten zeigte sich bei 206 nm. Deshalb wurde bei dieser Wellenlänge die Temperaturabhängigkeit der Denaturierung von Cyp57 kontinuierlich verfolgt (**Abbildung 13D**). Der Übergangsmittelpunkt der Signaländerung lag bei ca. 46°C. Die thermische Denaturierung von Cyp57 war nicht reversibel.

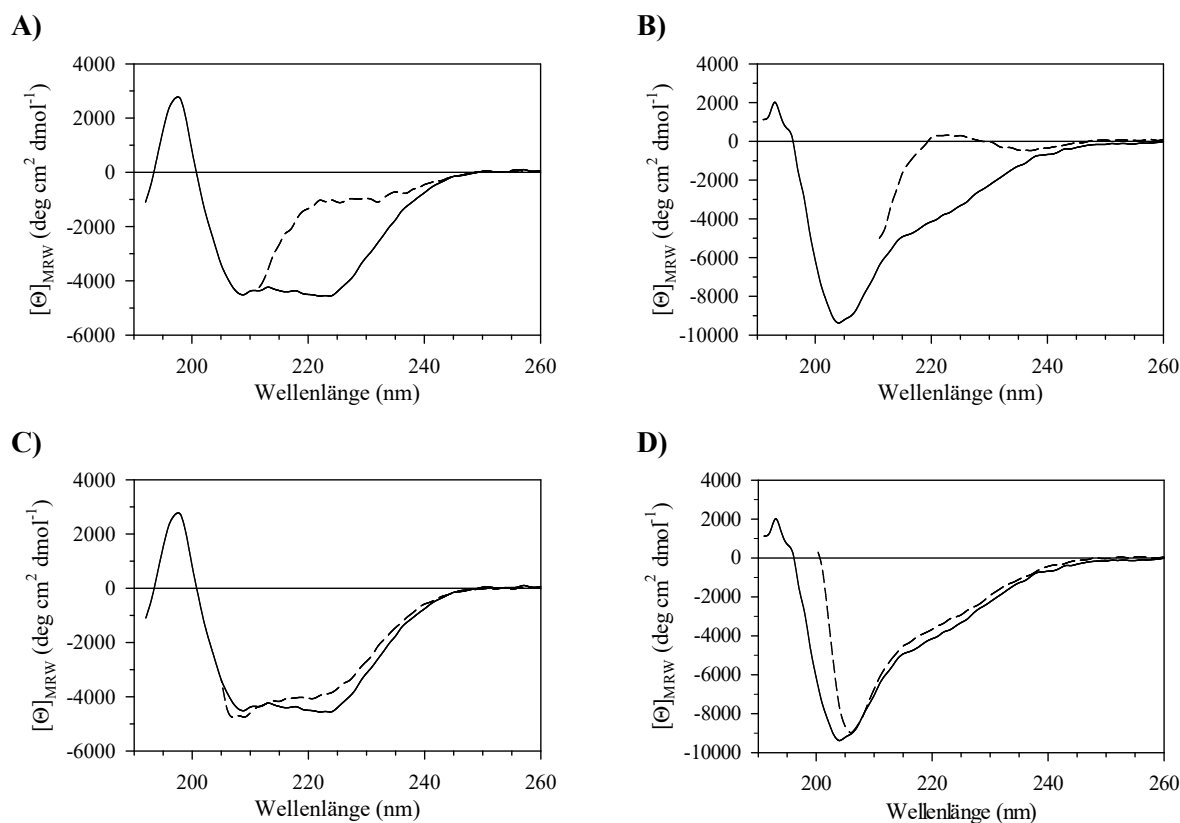


Abbildung 14: Fern-UV CD-Spektren der rekombinanten Proteine Cyp57₁₋₂₀₃ und Cyp57₂₀₄₋₄₉₂. CD-Spektren von 15 μM Cyp57₁₋₂₀₃ **A**) und Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ **B**) in 5 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.4 (—) und in 6 M Guanidiniumchlorid, 5 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.4 (- -) bei 20°C aufgenommen. CD-Spektren von 15 μM Cyp57₁₋₂₀₃ **C**) und Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ **D**) in 5 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.4 (—) und nach der Rückfaltung aus 6 M Guanidiniumchlorid in 5 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.4 (- -) bei 20°C gemessen. Dargestellt ist die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure aus 25 Akkumulationen.

Im Folgenden wurde das Vorhandensein von Sekundärstrukturelementen in Cyp57₁₋₂₀₃ und Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ mittels CD-Spektroskopie analysiert (**Abbildung 14**).

Das Fern-UV CD-Spektrum von Cyp57₁₋₂₀₃ wies zwei Minima der molaren Elliptizität bei 208 nm und 222 nm, sowie ein Maximum der molaren Elliptizität bei 198 nm auf (**Abbildung 14A**). Im Fern-UV CD-Spektrum von Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ in **Abbildung 14B** wurde ein Minimum bei 205 nm und ein Maximum bei 193 nm sichtbar.

Nur von Cyp57₁₋₂₀₃ konnte die thermische Stabilität analysiert werden, bei Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ kam es bei der Erwärmung zur starken Aggregation des Proteins, wodurch die Stabilitätsanalyse nicht möglich war. Die größte Differenz in den Signalintensitäten von Cyp57₁₋₂₀₃ zeigte sich bei 208 nm. Deshalb wurde bei dieser Wellenlänge die Temperaturabhängigkeit der Denaturierung von Cyp57₁₋₂₀₃ kontinuierlich verfolgt (**Abbildung 57**, siehe Anhang). Der Übergangsmittelpunkt der Signaländerung lag bei ca. 40°C. Die thermische Denaturierung von Cyp57₁₋₂₀₃ war nicht reversibel.

Unter denaturierenden Bedingungen in 6 M Guanidiniumchlorid wurde bei Cyp57₁₋₂₀₃ (**Abbildung 14A**) und Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ (**Abbildung 14B**) nur noch eine geringe molare Elliptizität von 260-220 nm gefunden. Dies deutet auf einen Verlust der Sekundärstruktur der Domänen unter den verwendeten Bedingungen hin. Nach der Rückfaltung aus denaturierenden Bedingungen zeigte sich im Fern-UV CD-Spektrum von Cyp57₁₋₂₀₃, dass es zu einer Änderung der Intensitäten der Minima kam (**Abbildung 14C**). Dabei nahm die Intensität des Minimums der molaren Elliptizität bei 208 nm zu und die Intensität des Minimums der molaren Elliptizität bei 222 nm ab. Bei Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ kam es nach der Rückfaltung zu einer Verschiebung des Minimums der molaren Elliptizität von 204 auf 206 nm (**Abbildung 14D**). Das weist daraufhin, dass die beiden Domänen nach der Rückfaltung aus denaturierenden Bedingungen nicht mehr ihre ursprüngliche Konformation einnehmen können.

Unter den getesteten Bedingungen lassen sich die beiden Domänen nicht korrekt zurückfalten, wodurch die Bestimmung der thermodynamischen Parameter der Proteinstabilität wie beim Volllängenprotein ausgeschlossen ist.

Bei der Addition der CD-Spektren der einzelnen Domänen ergab sich ein Additions-CD-Spektrum, das nahezu identisch zu dem CD-Spektrum des Volllängenproteins Cyp57 ist (**Abbildung 15B**). Das Additionsspektrum wies ebenfalls zwei Minima der molaren Elliptizität bei 218 nm und 206 nm, sowie eine positive molare Elliptizität ab 200 nm auf. Damit wurde gezeigt, dass Cyp57 aus zwei unabhängig gefalteten Domänen zusammengesetzt ist, deren Strukturelemente addiert das CD-Spektrum des Volllängenproteins ergaben (**Abbildung 15A**). Das zeigte, dass eine gegenseitige Beeinflussung der Sekundärstruktur der Domänen im Falle ihrer kovalenten Verbindung im Volllängenprotein mittels Fern-UV CD-Spektroskopie nicht nachweisbar war.

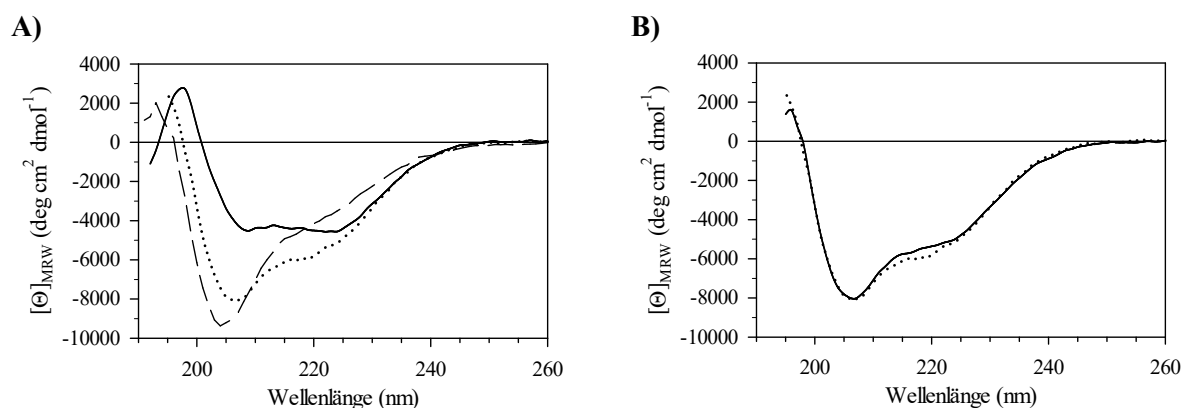


Abbildung 15: Additionsspektrum der Fern-UV CD-Spektren der einzelnen Domänen Cyp57₁₋₂₀₃ und Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ im Vergleich zu Cyp57. A) Einzelspektren von Cyp57₁₋₂₀₃ (—), Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ (- -) und Cyp57(⋯). B) Additionsspektrum von Cyp57₁₋₂₀₃ und Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ (—) im Vergleich zum Fern-UV CD-Spektrum des Volllängenproteins Cyp57 (⋯).

3.6 Untersuchung der PPIase-Aktivität und Inhibition von Cyp57

Da Cyp57 zu den Cyclophilinen gehört und über eine PPIase-like Domäne verfügt, wurde es hinsichtlich seiner enzymatischen Aktivität genauer untersucht. Die katalytische Aktivität von Cyp57 wurde im Protease-freien PPIase-Test ermittelt, der auf der Einstellung des *cis/trans*-Gleichgewichtes des Substrat-Peptides nach einem Lösungsmittelsprung aus 0.55 M LiCl/ TFE in Messpuffer basiert (Zoldák *et al.*, 2009). Der ursprüngliche PPIase-Aktivitäts-Test, der auf der isomerspezifischen Proteolyse des Substrat-Peptides durch eine Hilfsprotease beruht (Fischer *et al.*, 1984), wurde nicht verwendet, da dort die Protease Chymotrypsin zugegen ist. Untersuchungen hinsichtlich der proteolytischen Stabilität von

Cyp57 in Gegenwart von Chymotrypsin zeigten, dass rekombinantes Cyp57 sehr sensitiv gegen diese Protease ist und schon nach wenigen Minuten hydrolysiert vorlag (**Abbildung 58**, siehe Anhang).

Im Protease-freien PPIase-Test konnte gezeigt werden, dass Cyp57 die *cis/trans*-Isomerisierung von Prolyl-Bindungen in Tetrapeptid-Substraten beschleunigt (**Abbildung 16A** und **B**). Dabei lag der $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Wert für Cyp57 bei $1.5 \times 10^4 \pm 0.2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für das Substrat Abz-Ala-Met-Pro-Phe-pNA. Die katalytische Effizienz von Cyp57 ist damit rund 400-mal geringer als die von Cyp18. Die Aktivitäten der PPIase-Domäne Cyp57₁₋₂₀₃ und des Volllängenproteins sind vergleichbar (**Abbildung 16C**). Damit zählt Cyp57 zu den schwach aktiven humanen PPIasen.

Zudem wurde untersucht, ob durch den Austausch des katalytisch wichtigen Restes in Position 44 von Asparagin zu Arginin eine Cyp57-Variante erzeugt werden kann, die eine gesteigerte PPIase-Aktivität besitzt. Der Austausch des Arginin-Restes in Position 55 in Cyp18 mit Alanin führt zu einer Reduktion der PPIase-Aktivität auf unter 0.1% (Zydowsky *et al.*, 1992). Daher wurde vermutet, dass der Austausch zurück zu Arginin die katalytische Effizienz von Cyp57₁₋₂₀₃ steigert. Der $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Wert der Variante Cyp57₁₋₂₀₃ Asn44Arg lag bei $1.5 \times 10^3 \pm 0.2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für das Substrat Abz-Ala-Met-Pro-Phe-pNA und ist damit rund 80% niedriger als der von Cyp57₁₋₂₀₃. Durch diesen einfachen Aminosäureaustausch war es nicht möglich, die Aktivität in Cyp57₁₋₂₀₃ zu steigern.

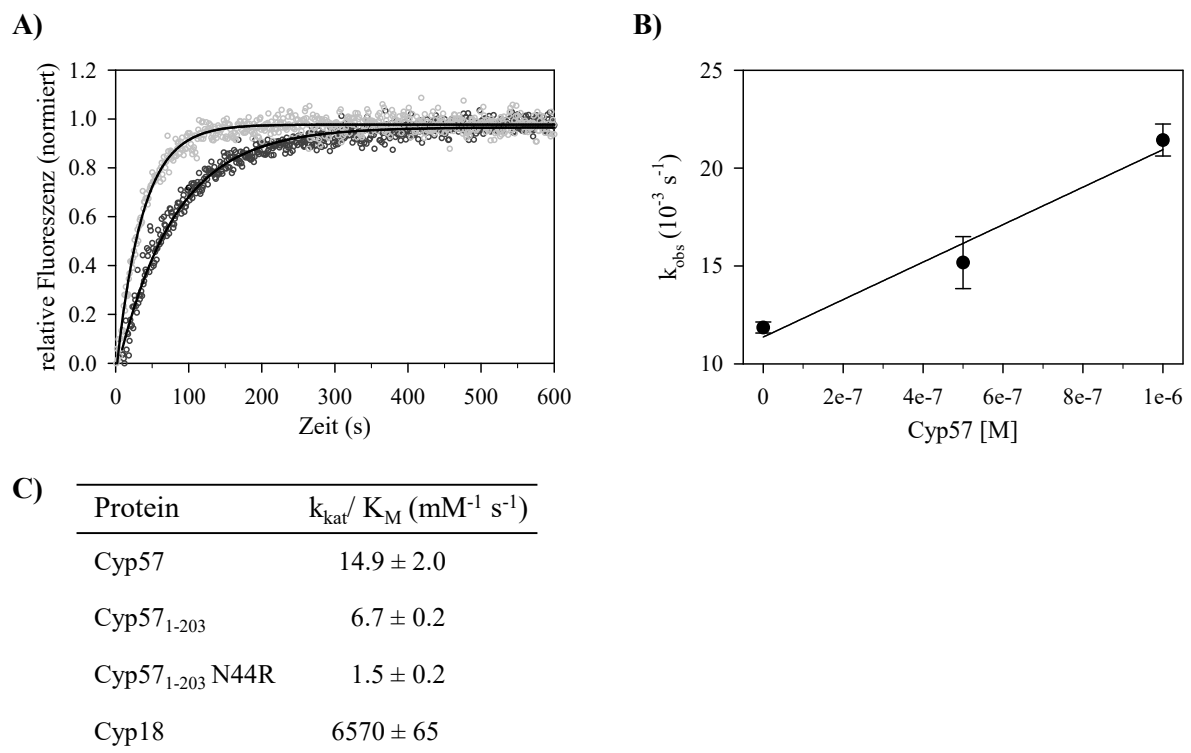


Abbildung 16: PPIase-Aktivität von Cyp57. **A)** Dargestellt ist die un-katalysierte (●) und durch Cyp57 katalysierte (○) Prolyl-Isomerisierung in Abz-Ala-Met-Pro-Phe-pNA. **B)** Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante k_{obs} für die enzymkatalysierte Prolyl-Isomerisierung in Abz-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA von der Cyp57-Konzentration. Die Gerade repräsentiert die lineare Regression, über deren Anstieg der $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ ermittelt wurde. **C)** Gegenüberstellung der Aktivitäten von Cyp57, Cyp57₁₋₂₀₃, Cyp57₁₋₂₀₃ Asn44Arg und Cyp18 für das Substrat Abz-Ala-Met-Pro-Phe-pNA. Die Aktivitäten wurde im Protease-freien PPIase-Assay mit Cyp57, Cyp57₁₋₂₀₃ Asn44Arg oder Cyp57₁₋₂₀₃ in 35 mM HEPES pH 7.8, 500 mM NaCl bei 10°C bestimmt und für Cyp18 der Literatur entnommen (nach Zoldák *et al.*, 2009).

Da Cyp57 zur PPIase-Familie der Cyclophiline gehört, wurde der Einfluss des Inhibitors CsA auf die PPIase-Aktivität des Enzyms analysiert. CsA ist ein typischer Inhibitor für eine Vielzahl von Cyclophilinen. Für die Inhibitionsmessungen wurde Cyp57 zehn Minuten mit CsA vorinkubiert. Die eingesetzte CsA-Konzentration lag bei maximal 5 μ M.

Durch Zugabe von CsA wurde die Aktivität von Cyp57 konzentrationsabhängig bis um 40% reduziert (**Abbildung 17A**). Durch die schlechte Löslichkeit von CsA in wässrigen Puffern konnten höhere CsA-Konzentrationen nicht analysiert werden. Eine Abschätzung des IC_{50} -Wertes für die CsA-Inhibition durch nicht-lineare Regression ergab einen IC_{50} -Wert von ca. 6 μ M (**Abbildung 60**, siehe Anhang).

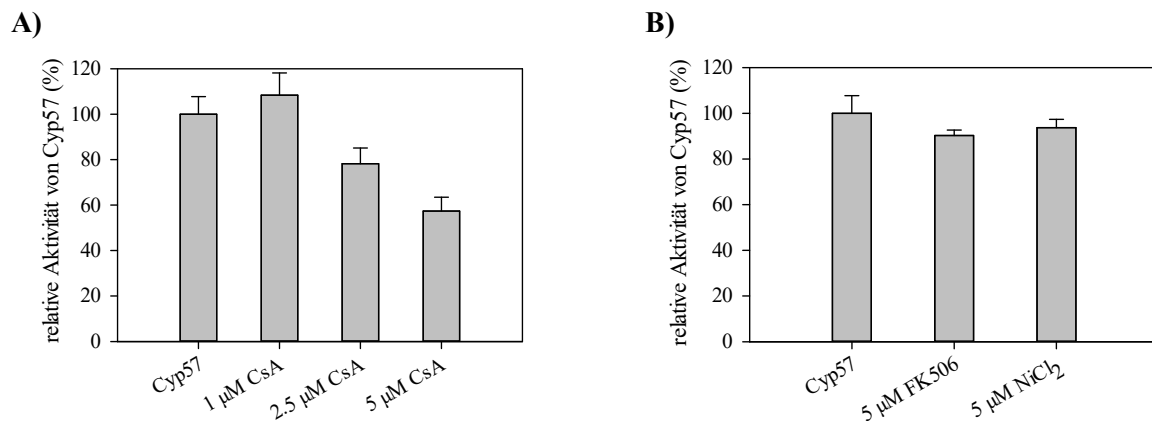


Abbildung 17: Inhibition der PPIase-Aktivität von Cyp57. Die Inhibition von Cyp57 wurde im Protease-freien PPIase-Test mit 1 μ M Cyp57 und Abz-Ala-Met-Pro-Phe-pNA als Substrat bei 10°C untersucht. Die Messung erfolgte nach 10-minütiger Vorinkubation mit **A)** 1-5 μ M CsA und **B)** 5 μ M FK506, NiCl₂. Die relative PPIase-Aktivität ist bezogen auf 100% Cyp57 ohne Inhibitor.

Um Verunreinigungen durch FKBP's aus *E. coli*, dem Wirt der heterologen Expression des Proteins auszuschließen, wurde zusätzlich der Einfluss von FK506 und NiCl₂ auf die bestimmte PPIase-Aktivität untersucht. FK506 ist ein Inhibitor von FKBP's und NiCl₂ ist ein Inhibitor der *E. coli* PPIase SlyD. Für diese Inhibitionsmessungen wurde Cyp57 zehn Minuten mit dem jeweiligen Inhibitor vorinkubiert. Die eingesetzten NiCl₂- und FK506-Konzentrationen lagen bei maximal 5 μ M. Mit FK506 und NiCl₂ konnte die vorhandene Aktivität von Cyp57 nicht deutlich reduziert werden (**Abbildung 17B**). Das weist darauf hin, dass Verunreinigungen mit *E. coli* FKBP's und SlyD in der Cyp57-Präparation ausgeschlossen werden.

Zur weiteren Analyse der Interaktion von Cyp57 mit CsA wurde die Bindung von Cyp57 an Sepharosegekoppeltes CsA untersucht (**Abbildung 18**). Von Martin Theuerkorn (MPFS für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle/Saale) wurde eine CsA-Affinitätsmatrix synthetisiert, bei der CsA über einen Linker an Cyanbromid-aktivierte Sepharose gebunden wurde. Dabei wurden nicht reagierte funktionelle Gruppen mit Tris-Puffer (0.1 M Tris/ HCl pH 8.0) umgesetzt und dadurch blockiert. Parallel dazu wurde eine Kontrollmatrix hergestellt, bei der alle funktionellen Gruppen mit Tris-Puffer (0.1 M Tris/ HCl pH 8.0) umgesetzt wurden. In diesem Versuch wurde sowohl endogenes Cyp57 aus HEK293-Zellen als auch in *E. coli* rekombinant hergestelltes Cyp57 und His₆-SUMO-Cyp57₁₋₂₀₃ untersucht. Dazu wurde HEK293-Zellysate oder rekombinantes Cyp57 bzw. His₆-SUMO-Cyp57₁₋₂₀₃ zusammen mit der CsA-Sepharose-Matrix oder der Kontrollmatrix 4-16 h inkubiert, gewaschen und mit 100 μ M CsA eluiert. In allen drei Fällen wurde keine Bindung von Cyp57 an die CsA-Sepharose gefunden. Diese Ergebnisse untermauern, dass Cyp57 eine geringe Affinität zu CsA aufweist. Im Gegensatz zu Cyp57 konnte Cyp18, das eine hohe Affinität zu CsA besitzt, aus HEK293-Zellen durch die CsA-Sepharose isoliert werden (**Abbildung 18A**).

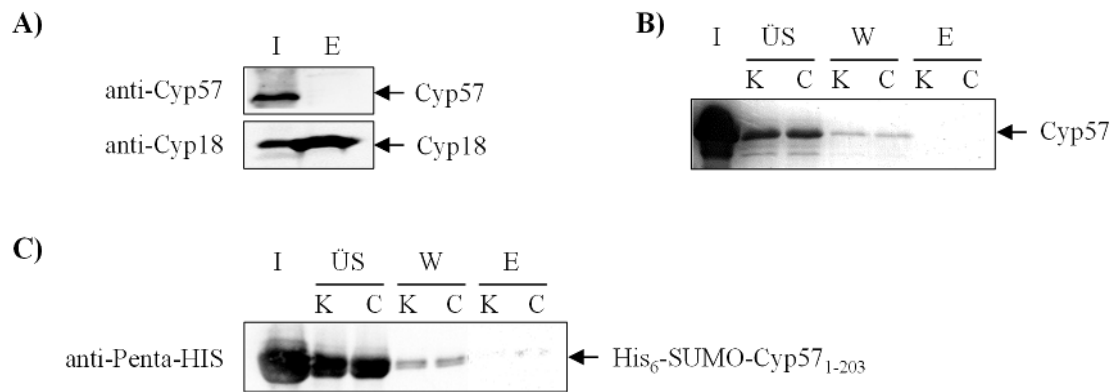


Abbildung 18: Bindungsstudien von Cyp57 an CsA-Sepharose. **A)** HEK293-Zelllysate wurde für 16 h mit CsA-Sepharose bei 4°C inkubiert und mit 100 μM CsA für 30 min eluiert. Der Überstand wurde im Western-Blot mit Anti-Cyp57- und Anti-Cyp18-Antikörper analysiert. I, Input; E, Elution. **B)** 50 μg Cyp57 wurde mit Sepharose (K - Kontrollmatrix) und mit CsA-Sepharose (C) für 4 h bei 4°C inkubiert, mit Puffer (50 mM Tris/ HCl pH 8.0, 500 mM NaCl) gespült und mit 100 μM CsA für 30 min eluiert. Die Fraktionen vom Überstand (ÜS), der Waschfraktionen (W) und der Elutionsfraktionen (E) wurden mittels SDS-PAGE (12.5%) und Coomassie-Färbung untersucht. **C)** wie unter B) beschrieben, wurde hier für die Interaktion His₆-SUMO-Cyp57₁₋₂₀₃ eingesetzt und die erhaltenen Proben wurden mittels Western-Blot mit Anti-Penta-His-Antikörper analysiert.

Neben den Inhibitionsstudien wurde auch die Spezifität der PPIase-Aktivität von Cyp57 gegenüber dem Aminosäurerest N-terminal zu Prolin untersucht (P1-Position; nach der Nomenklatur von Schechter & Berger, (1967)). Zur Analyse der Substratspezifität wurde die PPIase-Domäne Cyp57₁₋₂₀₃ verwendet. Es wurde bereits gezeigt, dass die katalytische Effizienz von Cyp57₁₋₂₀₃ ähnlich zu der des Vollängenproteins ist (Abbildung 16C). Die Substratspezifität der PPIase-Domäne wurde im Protease-freien PPIase-Assay mit einer Bibliothek von Tetrapeptid-Substraten bestimmt, bei denen sich jeweils eine von 15 Aminosäuren in der P1-Position befand (Abbildung 19) (nach Zoldák *et al.*, 2009). Diese Aminosäure beeinflusste die Katalyse der Isomerisierung der Prolyl-Bindung durch Cyp57₁₋₂₀₃ unterschiedlich stark.

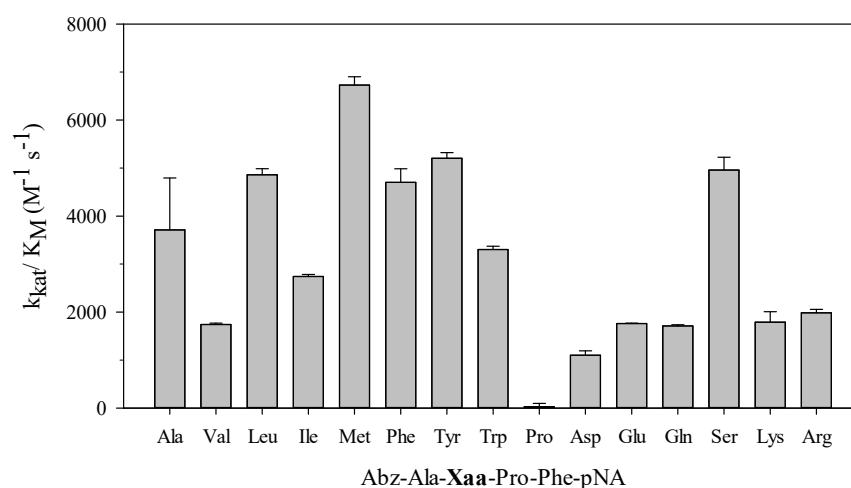


Abbildung 19: Substratspezifität von Cyp57. Absolute katalytische Aktivität für die Prolyl-Isomerisierung in Abz-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA für Cyp57₁₋₂₀₃. Die Aktivität wurde im Protease-freien PPIase-Test mit Cyp57₁₋₂₀₃ für die Substrate Abz-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA in 50 mM Tris/ HCl pH 8.0, 500 mM NaCl bei 10°C bestimmt (nach Zoldák *et al.*, 2009).

Die Aktivität für Cyp57₁₋₂₀₃ gegenüber den getesteten Tetrapeptid-Substraten ist in **Abbildung 19** dargestellt. Cyp57₁₋₂₀₃ zeigte die höchste Aktivität für das Substrat Abz-Ala-Met-Pro-Phe-pNA mit einem k_{kat}/K_M -Wert von $6.7 \times 10^3 \pm 0.2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Darüber hinaus war eine Präferenz für die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, dem ungeladenen Leucin und dem polaren Serin in P1-Position erkennbar. Nahezu keine Aktivität wies Cyp57₁₋₂₀₃ gegenüber dem Substrat mit Prolin in P1-Position auf. Für Substrate mit den verzweigten Aminosäuren Valin und Isoleucin, sowie polaren, basischen und sauren Aminosäuren N-terminal vor dem Prolin war die katalytische Aktivität um rund 50% im Vergleich zu Alanin reduziert.

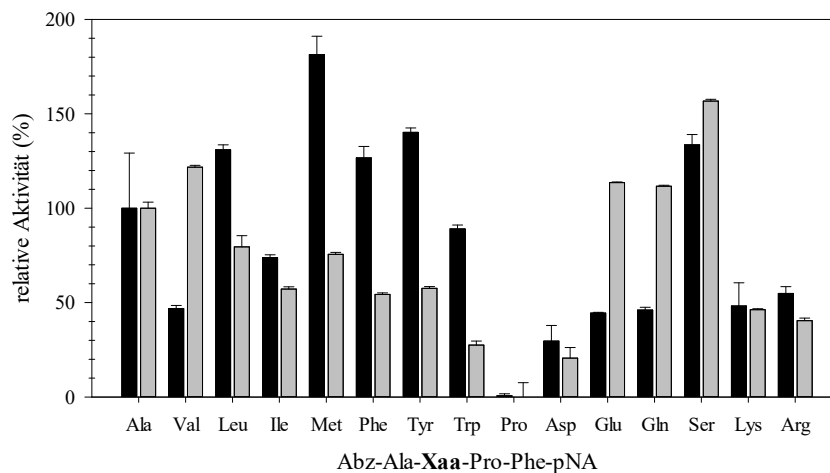


Abbildung 20: Relative PPIase-Aktivität von Cyp57₁₋₂₀₃ im Vergleich zu Cyp18. Die relative katalytische Aktivität von Cyp57₁₋₂₀₃ wurde im Protease-freien PPIase-Test mit Cyp57₁₋₂₀₃ (schwarze Balken) für die Substrate Abz-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA in 50 mM Tris/ HCl pH 8.0, 500 mM NaCl bestimmt bei 10°C. Aktivitäts-Werte von Cyp18 wurden der Literatur entnommen (graue Balken) (Zoldák *et al.*, 2009). Die relative Aktivität ist bezogen auf 100% Abz-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA.

Die relative Substratspezifität von Cyp57₁₋₂₀₃ ist vergleichend zu Cyp18 in **Abbildung 20** dargestellt. Eine geringe Aktivität weisen beide Proteine für Substrate mit polaren (Asp, Lys, Arg) und unpolaren Aminosäureresten (Ile, Pro) auf. Beide Cyclophiline präferieren das Substrat mit der polaren Aminosäure Serin. Während Cyp57₁₋₂₀₃ aromatische Aminosäuren (Phe, Tyr, Trp) und Methionin in P1-Position bevorzugt, zeigt Cyp18 eine Präferenz für verzweigte (Val) und polare Aminosäurereste (Gln, Glu).

3.7 Strukturaufklärung der PPIase-Domäne von Cyp57₁₋₁₆₈

3.7.1 Klonierung, Reinigung und Charakterisierung von Cyp57₁₋₁₆₈

Durch Kristallisation von Cyp57₁₋₂₀₃ und die anschließende Röntgenkristallstrukturanalyse sollten Erkenntnisse über die molekulare Struktur der PPIase-Domäne von Cyp57 erhalten werden. Zudem sollten Hinweise auf strukturelle Unterschiede zu Cyp18 eine Erklärung ermöglichen, warum Cyp57 im Gegensatz zur prototypischen PPIase Cyp18 eine so geringe Aktivität aufweist.

Zunächst wurde versucht, Bedingungen zu finden, unter denen das Protein kristallisiert. Für das *Screening* wurden im *sitting drop vapor diffusion*-Verfahren verschiedene Kits im 96-well Format verwendet, um eine möglichst hohe Anzahl an experimentellen Bindungen abzudecken. Außerdem wurden verschiedene Proteinkonzentrationen (5-25 mg ml⁻¹) eingesetzt. Jedoch bildeten sich unter keiner der untersuchten Bedingung Kristalle. Berechnungen zur Strukturvorhersage von Cyp57₁₋₂₀₃

zeigten eine flexible α -Helix am C-Terminus, die möglicherweise die Kristallisation negativ beeinflussen kann (**Abbildung 64**, siehe Anhang). Ausgehend von den Grenzen, die für die PPIase-Domäne (AS 1-161) die bei *ExpPASy* (Artimo *et al.*, 2012) hinterlegt sind, wurden zusätzliche Nukleotidsequenzen gewählt, die Protein-Fragmente codieren die zwei und sieben Aminosäuren länger sind als Cyp57₁₋₁₆₁. Von den drei verschiedenen Fragmenten (Cyp57₁₋₁₆₁, Cyp57₁₋₁₆₃ und Cyp57₁₋₁₆₈) wurde jeweils die codierende Nukleotidsequenz in pE-SUMO inseriert, mittels DNA-Sequenzierung überprüft und in *E. coli* Rosetta-Zellen transformiert. Die Expression der Fusionsproteine erfolgte unter denselben Bedingungen, die bereits bei der Herstellung des Volllängenproteins verwendet wurden. Nur das Cyp57-Fragment mit 168 AS wurde löslich exprimiert und konnte säulenchromatographisch gereinigt und durch Spaltung durch die SUMO-Protease Senp2 vom SUMO-Protein abgetrennt werden (**Abbildung 21A**). Dagegen war die Reinigung der beiden anderen Cyp57-Varianten aufgrund der Ausbildung unlöslicher Aggregate nicht möglich.

Mit dem Programm ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) vom *ExpPASy*-Server (Artimo *et al.*, 2012) wurde für Cyp57₁₋₁₆₈ eine molekulare Masse von 19 030 Da berechnet. Durch MALDI-TOF MS wurde von der gereinigten Domäne die molekulare Masse von 19 027 Da experimentell ermittelt. Im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel zeigte Cyp57₁₋₁₆₈ eine apparente molekulare Masse von 19 kDa (**Abbildung 21A**).

Zur Überprüfung des Vorhandenseins von Sekundärstrukturelementen wurde das gereinigte Cyp57-Fragment Cyp57₁₋₁₆₈ mittels CD-Spektroskopie untersucht. Das Fern-UV CD-Spektrum (**Abbildung 21B**) wies zwei Minima der molaren Elliptizität bei 222 und 208 nm und ein Maximum bei 198 nm auf. Damit ähnelt das Fern-UV CD-Spektrum des Cyp57-Fragments Cyp57₁₋₁₆₈ dem der prototypischen PPIase Cyp18 und dem von Cyp57₁₋₂₀₃ deutlich (**Abbildung 21B**). Das deutet darauf hin, dass Cyp57₁₋₁₆₈ im Vergleich zu Cyp18 und Cyp57₁₋₂₀₃ ähnliche Sekundärstrukturanteile aufweist. Daneben wurde auch der Faltungszustand in 6 M Guanidiniumchlorid untersucht. Im entsprechenden Fern-UV CD-Spektrum war eine stark verringerte negative molare Elliptizität zwischen 220-260 nm feststellbar (**Abbildung 59**, siehe Anhang). Dieses CD-Spektrum deutet auf einen Verlust der für den gefalteten Zustand typischen Sekundärstrukturelemente der PPIase-Domäne hin.

Außerdem wurde die katalytische Aktivität von Cyp57₁₋₁₆₈ im Protease-freien PPIase-Assay bestimmt (**Tabelle 14**). Der k_{kat}/K_M -Wert betrug $1.2 \times 10^4 \pm 0.2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für das Substrat Abz-Ala-Met-Pro-Phe-pNA. Damit entsprach die katalytische Effizienz des Fragmentes Cyp57₁₋₁₆₈ der des Volllängenproteins und der längeren Variante der PPIase-Domäne Cyp57₁₋₂₀₃.

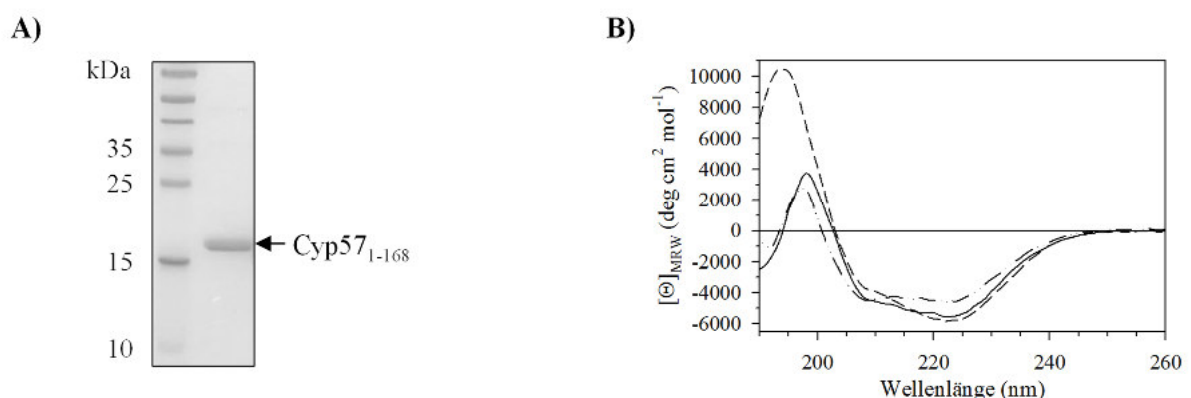


Abbildung 21: Rekombinantes Cyp57₁₋₁₆₈ gereinigt aus *E. coli*. (A) 3 μg von Cyp57₁₋₁₆₈ (19 kDa) wurden nach dem letzten Reinigungsschritt in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und in Coomassie-Lösung gefärbt. Die linke Spur zeigt den mitgeführten Größenstandard. (B) Fern-UV CD-Spektren von Cyp57₁₋₁₆₈ (—), Cyp57₁₋₂₀₃ (- -) und Cyp18 (- · -). Gemessen wurde mit 15 μM Protein in 5 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.4 bei 20°C. Dargestellt ist die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure aus 25 Akkumulationen.

Tabelle 14: PPIase-Aktivität von Cyp57-Varianten. Aktivität von Cyp57₁₋₁₆₈ wurde im Protease-freien PPIase-Assay mit Abz-Ala-Met-Pro-Phe-pNA als Substrat gemessen (Zoldák *et al.*, 2009).

Protein	Aktivität k_{kat}/K_M ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Cyp57 ₁₋₁₆₈	12.3 ± 1.7
Cyp57 ₁₋₂₀₃	6.7 ± 0.2
Cyp57	14.9 ± 2.0

Damit wurde gezeigt, dass Cyp57₁₋₁₆₈ nativ gefaltet und enzymatisch aktiv ist. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde Cyp57₁₋₁₆₈ in reiner Form in der Kristallisation eingesetzt.

3.7.2 Kristallisation von Cyp57₁₋₁₆₈

Zunächst wurden für Cyp57₁₋₁₆₈ Bedingungen gesucht, bei denen das Protein kristallisiert. Wiederum wurden für das *Screening* im *sitting drop vapor diffusion*-Verfahren verschiedene Kits im 96-well-Format verwendet, um eine möglichst hohe Anzahl an experimentellen Bindungen abzudecken. Für die Kristallisation stand Cyp57₁₋₁₆₈ in reiner Form in 10 mM Tris/ HCl pH 7.8, 100 mM NaCl zur Verfügung. Es wurde eine Proteinkonzentration von rund 10 mg ml⁻¹ eingesetzt. Die Kristallisationsexperimente wurden bei einer Temperatur von 16°C durchgeführt.

Unter der Bedingung 0.1 M Tris/ HCl pH 8.5, 0.2 M MgCl₂, 28% (w/v) PEG 4000 bildeten sich Stäbchenkristalle, wobei diese Stäbchen miteinander verwachsen waren (**Abbildung 22A**). Bereits nach wenigen Stunden wurde das Kristallwachstum in diesem Ansatz beobachtet (**Abbildung 22A**). Zur Kontrolle wurde die Kristallisation unter dieser Bedingung und veränderten pH-Werten/ PEG-4000-Konzentrationen mit dem *hanging drop vapor diffusion*-Verfahren wiederholt. Dabei bildeten sich wieder Kristalle mit gleicher Form aus (**Abbildung 22B** und **C**). Versuche, die Kristallisation durch Zugabe von Additiven zu optimieren und Einzelkristalle zu generieren, gelangen nicht. Dennoch waren die erhaltenen Kristalle stabil genug, um sie mittels Röntgenkristallstrukturanalyse zu untersuchen, wodurch die die Struktur des Proteins gelöst werden konnte.

Für die Aufnahme von Datensätzen wurden die verwachsenen Stäbchen vor der Messung in Einzelkristalle zerteilt. Dann wurden entsprechende Datensätze für die Kristalle wie unter Abschnitt: 2.2.6.2 beschrieben aufgenommen. Die Strukturlösung erfolgte durch molekularen Ersatz mit der Kristallstruktur des humanen Cyp18.1 (PDB ID: 2OJU) als Suchmodell.

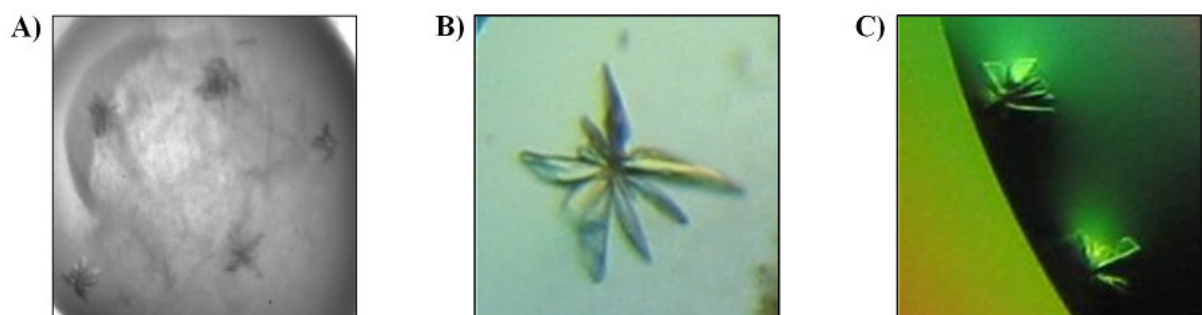


Abbildung 22: Kristalle von Cyp57₁₋₁₆₈. Kristalle gewachsen von Cyp57₁₋₁₆₈ in **A**) 0.1 M Tris/ HCl pH 8.5, 0.2 M MgCl₂, 28% (w/v) PEG 4000. **B**) 0.1 M Tris/ HCl pH 8.1, 0.2 M MgCl₂, 26% (w/v) PEG 4000 und **C**) 0.1 M Tris/ HCl pH 8.9, 0.2 M MgCl₂, 30% (w/v) PEG 4000.

Die Parameter der Datensammlung und der Verfeinerung dieses Kristalls sind in **Tabelle 13** aufgelistet. Die Beugungsreflexe konnten bis zu einer maximalen Auflösung von 2.4 Å integriert und skaliert werden. Von Cyp57₁₋₁₆₈ wurde ein Molekül in der asymmetrischen Einheit ermittelt. Für die Kristallstruktur von Cyp57₁₋₁₆₈ konnten Elektronendichten im Bereich vom N-Terminus bis zum Aminosäurerest 163 beobachtet werden, aber nicht für die Aminosäurerest 164-168 (**Abbildung 23**).

Es zeigte sich, dass sich die Struktur von Cyp57₁₋₁₆₈ aus einem geschlossenem β -Fass zusammensetzt, das aus acht antiparallelen β -Faltblättern gebildet wird und zwei α -Helices, die an den Enden dieser Fass-Struktur angeordnet sind (**Abbildung 23A**). Die Struktur von Cyp57₁₋₁₆₈ ähnelt stark der Struktur von Cyp18 (**Abbildung 23B**). Die Hauptunterschiede in der Konformation von Cyp18 und Cyp57 liegen in den Loop-Bereichen zwischen β 1- β 2, α 1- β 3, α 3- β 8 und β 4- β 5. Die Loop-Bereiche zwischen β 1- β 2 und α 1- β 3 sind in Cyp57 fünf bzw. drei Aminosäuren kürzer als bei Cyp18 (Davis *et al.*, 2010). Außerdem kommt es zur Ausbildung einer zusätzlichen α -Helix (α 2) zwischen β 4- β 5 bei Cyp57.

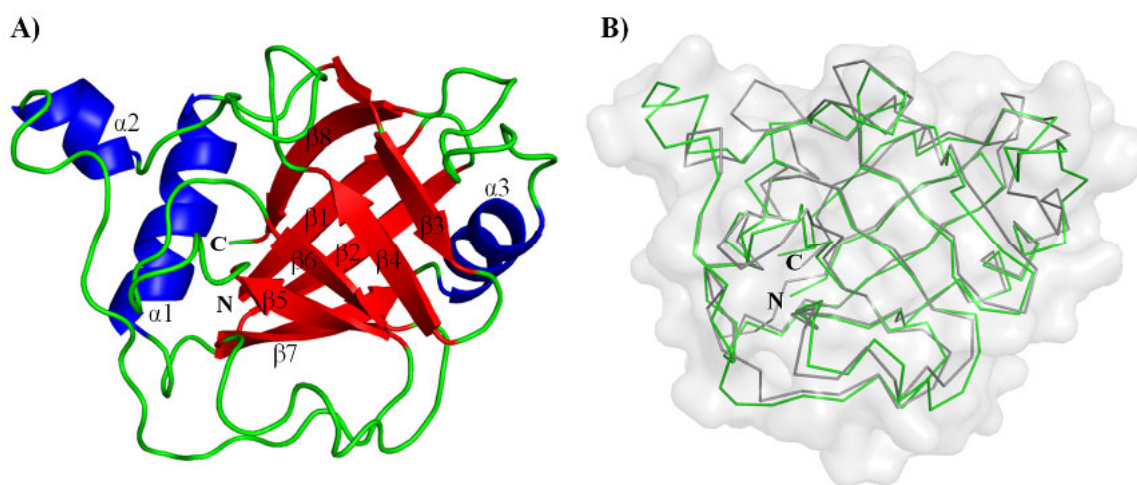


Abbildung 23: Kristallstruktur von Cyp57 im Vergleich mit der Struktur von Cyp18. **A)** Cartoon-Darstellung der PPIase-Domäne von Cyp57₁₋₁₆₈. Dargestellt in blau sind α -helikale Bereiche und als rote Pfeile β -Faltblatt-Strukturen. **B)** Strukturelles Alignment von Cyp57₁₋₁₆₈ in grau und Cyp18 (PDB-ID: 2CPL) in grün, dargestellt in Bändern. Die Oberfläche von Cyp57 ist weiß dargestellt.

Die Analyse der Elektronendichteverteilung für den Bereich des aktiven Zentrums von Cyp57 mit den ausgewählten Aminosäureresten Asn44, Phe49, Gln52, Tyr118 und His123 zeigt deren eindeutige 2Fo-Fc Elektronendichte und schließt alternative Konformationen aus (**Abbildung 24**). Da keine zusätzliche positive Fo-Fc Differenzelektronendichte für die Reste ermittelt wurde, ist davon auszugehen, dass keine Atome in der gebauten Struktur fehlen.

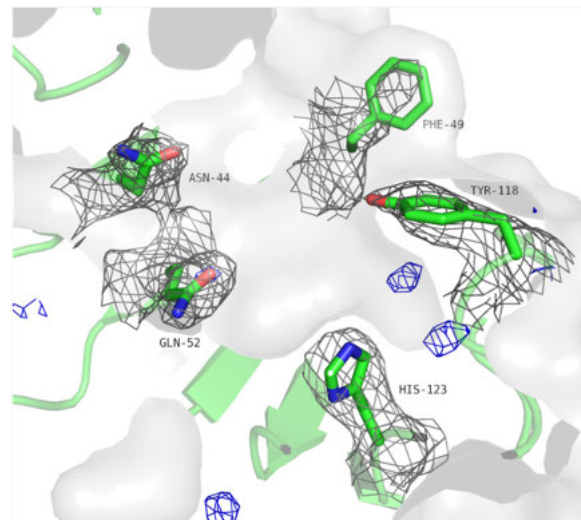


Abbildung 24: Aktives Zentrum von Cyp57. Stabdarstellung (C, grün; N, blau; O, rot) von ausgewählten Aminosäureresten (Asn44, Phe49, Gln52, Tyr118 und His123) im aktiven Zentrum von Cyp57, sowie deren 2Fo-Fc Elektronendichte (1σ , graues Gitter) und deren Fo-Fc Differenzelektronendichte (3σ , blaues Gitter). Die restliche Struktur ist als Cartoon-Darstellung grün gefärbt. Die Oberfläche des Proteins ist weiß dargestellt.

Neben dem unkomplexierten Cyp57₁₋₁₆₈ wurde auch die Kristallisation von Komplexen von Cyp57₁₋₁₆₈ mit dem Inhibitor CsA bzw. mit dem Peptid NH₂-Ala-Met-Pro-Phe-COOH untersucht.

Für die Kristallisation dieser Komplexe wurden erneut Bedingungen gesucht, bei denen das Protein kristallisiert. Wiederum wurden für das *Screening* im *sitting drop vapor diffusion*-Verfahren verschiedene Kits im 96-*well*-Format verwendet, um eine möglichst hohe Anzahl an experimentellen Bindungen abzudecken. Für die Kristallisation stand Cyp57₁₋₁₆₈ in reiner Form in 10 mM Tris/ HCl pH 7,8, 100 mM NaCl zur Verfügung. CsA wurde in kristalliner Form in 5fachen molaren Überschuss zusammen mit Cyp57₁₋₁₆₈ über Nacht inkubiert (Abschnitt: 2.2.6.1). Das Substrat in 5fachen molaren Überschuss wurde für 2 h mit Cyp57₁₋₁₆₈ inkubiert. Ungelöstes CsA oder Peptid wurde durch Zentrifugieren vom Überstand abgetrennt. Anschließend wurde der jeweilige Überstand mit dem Komplex auf 10-15 mg ml⁻¹ konzentriert und bei 16°C kristallisiert. Bereits nach wenigen Stunden bildeten sich verwachsene Stäbchenkristalle, die kristallisiertem Cyp57₁₋₁₆₈ ohne Zusätze sehr ähnlich waren (Abbildung 22). Vor der Messung wurden die Stäbchen wieder in Einzelkristalle zerteilt und mittels Röntgenkristallstrukturanalyse untersucht. Dann wurden entsprechende Datensätze aufgenommen und die Strukturlösung erfolgte durch molekularen Ersatz mit der Kristallstruktur des humanen Cyp18.1 (PDB-ID: 2OJU) als Suchmodell. Weder für die Kristalle, die in Gegenwart von CsA noch für die, die in Gegenwart des Peptides entstanden, wurde eine zusätzliche Elektronendichte gefunden. Das heißt, es lagen keine Komplexe aus Cyp57₁₋₁₆₈ und CsA bzw. Peptid innerhalb der Kristalle vor. Wahrscheinlich ist die Affinität des aktiven Zentrums von Cyp57 zu den beiden Liganden zu gering, um unter den getesteten Bedingungen kristallisierbare Komplexe auszubilden.

3.8 Charakterisierung der RRM-Domäne von Cyp57

3.8.1 Untersuchung der Bindeeigenschaften der RRM-Lys Domäne von Cyp57

Cyp57 besitzt neben der PPIase-Domäne ein RNA-Erkennungsmotiv (RRM) und eine poly-Lysin-reiche Region. Daher war zu vermuten, dass Cyp57 in der Lage ist, mit Nukleinsäuren zu interagieren. Vor der Untersuchung der Bindeeigenschaften der RRM-Domäne wurden verschiedene Fragmente der RRM-Domäne in Kombination mit der Lysin-reichen Region (Cyp57₂₀₄₋₄₉₂, His₆-Cyp57₂₄₀₋₃₈₈) und ohne

die Lysin-reiche Region (Cyp57₂₄₀₋₃₁₈) in *E. coli* rekombinant hergestellt und chromatographisch gereinigt. Im Folgenden wurde mittels CD-Spektroskopie analysiert, welche Sekundärstrukturelemente in den verschiedenen Cyp57-Varianten der RRM-Domäne auftreten (**Abbildung 25**). Das Fern-UV CD-Spektrum von Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ wies ein Minimum der molaren Elliptizität bei 204 nm auf. Außerdem war eine positive molare Elliptizität bei Wellenlängen kleiner 196 nm zu beobachten. Das Fern-UV CD-Spektrum von His₆-Cyp57₂₄₀₋₃₈₈ wies ein Minimum der molaren Elliptizität bei 207 nm auf. Zudem war eine positive molare Elliptizität bei Wellenlängen kleiner 196 nm zu beobachten. Das Fern-UV CD-Spektrum von Cyp57₂₄₀₋₃₁₈ wies ein Minimum der molaren Elliptizität bei 210 nm und eine positive molare Elliptizität bei Wellenlängen kleiner 202 nm auf. Dabei wurde deutlich, dass sich das Minimum der molaren Elliptizität von 204 nm bei Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ auf 207 nm bei His₆-Cyp57₂₄₀₋₃₈₈ und auf 210 nm bei Cyp57₂₄₀₋₃₁₈ verschob.

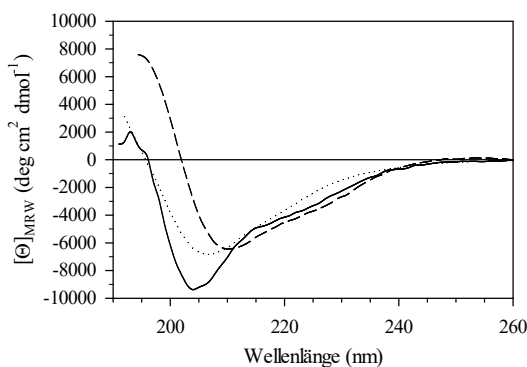


Abbildung 25: Sekundärstrukturanalyse der rekombinanten RRM-Domänen von Cyp57. Fern-UV CD-Spektren von je 15 μM : Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ (—), His₆-Cyp57₂₄₀₋₃₈₈ (···) und Cyp57₂₄₀₋₃₁₈ (- -) in 5 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.4 bei 20°C gemessen. Dargestellt ist die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure aus 25 Akkumulationen.

Um die Interaktion mit Nukleinsäuren zu untersuchen, wurde eine mögliche Bindung der Proteine an Heparin-Sepharose überprüft (**Abbildung 26A**). Heparin enthält neben seiner negativen Ladung auch Zuckermoleküle, die zu einer strukturellen Ähnlichkeit zu DNA/ RNA führen, wodurch es zur Nachahmung von Nukleinsäuren bei Bindungsexperimenten eingesetzt werden kann (Bendak *et al.*, 2012; Piñol-Roma *et al.*, 1988).

In *E. coli* rekombinant hergestelltes Cyp57 und die Fragmente von Cyp57, die die verschiedenen Domänen repräsentieren, wurden auf eine Heparin-Sepharose-Säule aufgetragen. Nach intensivem Waschen wurden die an die Säule gebundenen Proteine stufenweise mit 0.3, 0.5, 0.75 und 1.0 M NaCl eluiert. Dabei ist davon auszugehen, dass Proteine ohne Affinität zu Heparin nur im Durchlauf detektierbar sind, während mit Heparin interagierende Proteine abhängig von der Stärke ihrer Bindung bei steigenden Konzentrationen an NaCl eluieren.

Bei der Affinitätschromatographie war eine Bindung des Vollängenproteins an die Heparin-Sepharose festzustellen. Cyp57 eluierte ab 0.5 M NaCl und band bei einer Konzentration von 1.0 M NaCl nicht mehr an Heparin-Sepharose (**Abbildung 26A**). Die PPIase-Domäne von Cyp57 (Cyp57₁₋₂₀₃) band nicht an die Heparin-Sepharose. Die RRM-Lys-Domäne von Cyp57 (Cyp57₂₀₄₋₄₉₂) band ähnlich zum Vollängenprotein an die Heparin-Sepharose, die Interaktion war im Vergleich zu Cyp57 etwas stärker. Die Domäne wurde erst ab einer NaCl-Konzentration von 0.75 M NaCl eluiert. Neben den beiden Teilen von Cyp57, die die beiden kompletten N- und C-terminalen Teile des Proteins repräsentieren, wurden auch zwei Fragmente der RRM-Lys-Domäne auf ihre Bindungseigenschaften zu Heparin untersucht. Das Fragment Cyp57₂₄₀₋₃₈₈, das die RRM-Domäne zusammen mit der Lysin-reichen Region repräsentiert, band zwar an Heparin-Sepharose, diese Interaktion wurde aber schon bei deutlich geringeren NaCl-Konzentrationen von 0.3 M NaCl verhindert. Das Fragment Cyp57₂₄₀₋₃₁₈, das nur die RRM-Domäne von Cyp57 repräsentiert, vermochte nicht, mit Heparin-Sepharose zu interagieren. Vermutlich war der C-terminale Teil von Cyp57, der die Aminosäuren 389 bis 492 umfasst, für eine starke Bindung an Heparin erforderlich.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, welche Nukleinsäuren bevorzugt durch Cyp57 gebunden werden. Dazu wurde die Interaktion von Cyp57 und verschiedenen Ribohomopolymeren analysiert. Ribohomopolymere sind Modell-Verbindungen, die einzelsträngiger RNA ähneln und damit eine gute Möglichkeit bieten, die Bindeeigenschaften von RNA-bindenden Proteinen zu untersuchen. Cyp57 wurde jeweils mit den Ribohomopolymeren poly(G), poly(C), poly(A) und poly(U), die an Sepharose als feste Matrix gekoppelt waren, bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen inkubiert. Nach gründlichem Waschen mit der entsprechenden NaCl-Konzentration wurde die Fähigkeit RNA zu binden, durch die Analyse der Bindung bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen evaluiert. Dazu wurden die gebundenen Proteine mit SDS-Probenpuffer eluiert. Analog dazu wurden auch die Cyp57-Fragmente Cyp57₁₋₂₀₃, Cyp57₂₀₄₋₄₉₂, Cyp57₂₄₀₋₃₁₈ und His₆-Cyp57₂₄₀₋₃₈₈ auf ihre Fähigkeit, die Ribohomopolymere zu binden, analysiert (Abbildung 26B).

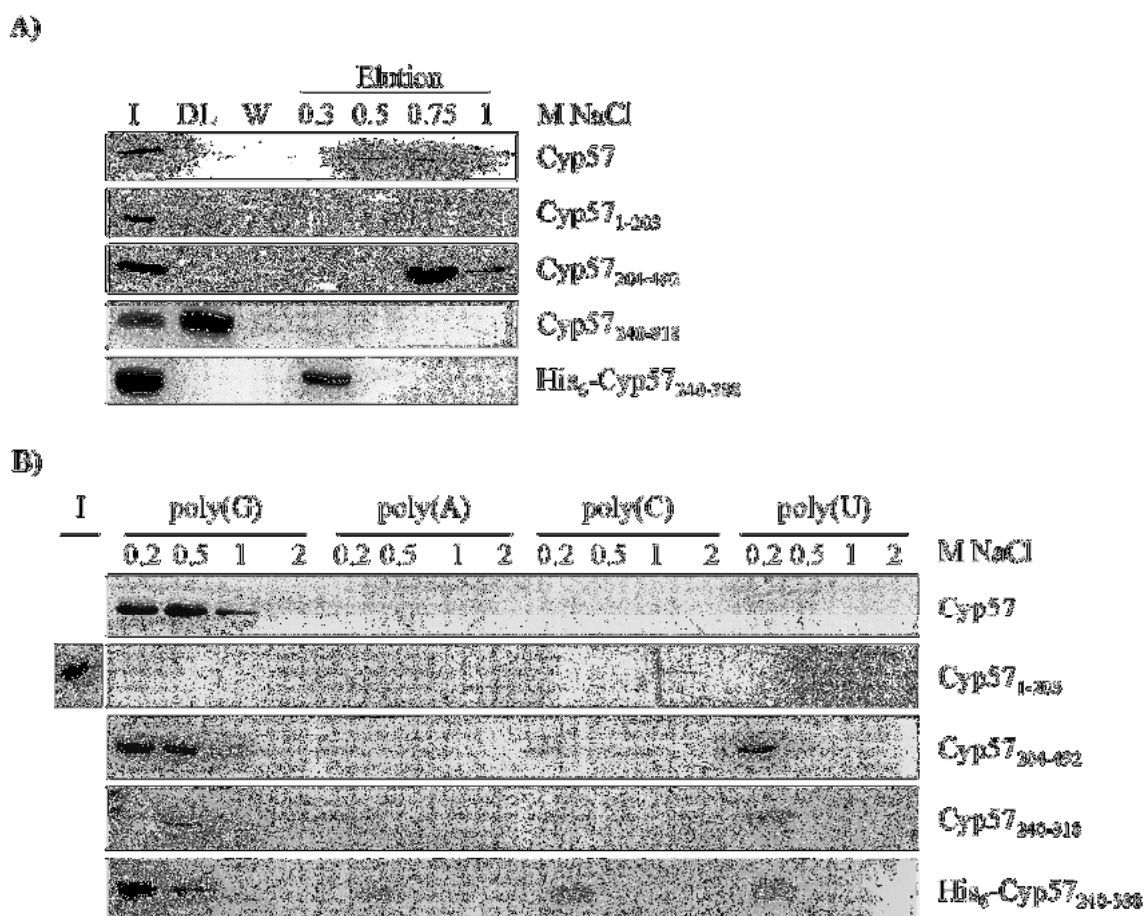


Abbildung 26: Bindung verschiedener Cyp57-Varianten an Heparin-Sepharose und Ribohomopolymere.

A) Aus *E. coli* gereinigte rekombinante Cyp57-Varianten wurden auf eine Heparin-Sepharose-Säule (Säulenvolumen: 0.5 ml) geladen und stufenweise mit den angegebenen NaCl-Konzentrationen eluiert. Die verschiedenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (10% und 12.5%) aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung analysiert. Input (I), Fraktion vom Durchlauf (DL), Waschfraktion (W). **B)** Rekombinante Cyp57-Varianten gereinigt aus *E. coli* wurden mit Sepharose gemischt, die zuvor mit den dargestellten Ribohomopolymeren poly(G), poly(A), poly(C) bzw. poly(U) gekoppelt wurde (Swanson & Dreyfuss, 1988). Die Sepharose wurde gewaschen und das gebundene Protein wurde durch SDS-Probenpuffer eluiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (10% und 12.5%) und Coomassie-Färbung untersucht. Input (I).

Es wurde deutlich, dass Cyp57 eine hohe Affinität zu poly(G) besitzt. Erst bei Konzentrationen höher als 1 M NaCl wurde die Interaktion verhindert. Neben poly(G) band Cyp57 mit geringerer Affinität an poly(U), während poly(A) und poly(C) nicht mit Cyp57 interagierten. Die Interaktion wurde durch den

C-terminalen Teil des Proteins vermittelt, da die PPIase-Domäne allein nicht in der Lage war, an eines der Ribohomopolymere zu binden (**Abbildung 26B**).

Für die drei Fragmente, die den gesamten C-terminalen Bereich von Cyp57 (Cyp57₂₀₄₋₄₉₂) bzw. nur die RRM- (Cyp57₂₄₀₋₃₁₈) und die RRM-Lys-Domäne (Cyp57₂₄₀₋₃₈₈) repräsentieren, wurde festgestellt, dass sie stark mit poly(G) interagierten, wobei die Interaktion von Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ erst bei NaCl-Konzentrationen über 1 M unterbrochen wurde. Cyp57₂₄₀₋₃₁₈ und His₆-Cyp57₂₄₀₋₃₈₈ interagierten bereits bei 1 M NaCl nicht mehr mit poly(G). Für alle drei Fragmente war auch eine Interaktion mit poly(U) nachweisbar, die aber bereits bei 0.5 M NaCl verhindert wurde. Im Gegensatz zum Volllängenprotein war für die Fragmente auch eine geringe Interaktion mit poly(A) und poly(C) sichtbar, die bei 0.5 M NaCl verhindert wurde. Alle drei Fragmente verhielten sich gegenüber den Ribohomopolymeren sehr ähnlich.

3.8.2 Spektroskopische Untersuchung der Bindung von Cyp57 an Nukleinsäuren

Da für poly(G) eine hohe Affinität gegenüber Cyp57 nachgewiesen wurde, wurde dieses Ribohomopolymer genutzt, um die Interaktion zwischen Cyp57 und Nukleinsäuren mittels CD-Spektroskopie zu evaluieren. Dazu wurden die Fern-UV CD-Spektren von Cyp57 und Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen poly(G) bestimmt (**Abbildung 27**). Veränderungen im Spektrum von Cyp57 nach der Korrektur mit dem CD-Spektrum für poly(G) bei der verwendeten Konzentration gaben Hinweise auf die Bildung eines Protein-Nukleotid-Komplexes und damit verbundene strukturelle Veränderungen.

Im Fern-UV CD-Spektrum (**Abbildung 27A**) kam es bei der Zugabe von poly(G) zu Cyp57 zu einer Zunahme der Signalintensität am Minimum der molaren Elliptizität bei 207 nm, ohne eine Verschiebung der Minima bei 207 und 218 nm zu bewirken. Das Differenzspektrum (**Abbildung 27C**) vom Cyp57-poly(G)-Komplex und Cyp57 zeigte, dass die Bindung von poly(G) zu einer Zunahme der Intensität der molaren Elliptizität unterhalb der Wellenlänge von 210 nm führte.

Bei Verwendung des C-terminalen Bereiches von Cyp57 (Cyp57₂₀₄₋₄₉₂) verhielt sich das CD-Signal entgegengesetzt zu dem des Volllängenproteins. Im Fern-UV CD-Spektrum von Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ war bei der Titration mit poly(G) eine deutliche Abnahme der Signalintensität der molaren Elliptizität am Minimum bei 204 nm sichtbar (**Abbildung 27B**). Das Differenzspektrum (**Abbildung 27D**) vom Cyp57₂₀₄₋₄₉₂-poly(G)-Komplex und Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ zeigte nochmal deutlich, dargestellt durch die positive molare Elliptizität, dass bei 204 nm der größte Unterschied in der Signalintensität auftrat.

Umgekehrt wurde der Einfluss von Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ und Cyp57₂₄₀₋₃₁₈ auf die Sekundärstruktur von RNA mittels CD-Spektroskopie untersucht. Dazu wurde das 10-mere RNA-Oligonukleotid G₁₀ verwendet. Es entsprach der ermittelten Spezifität für die Bindung von Ribohomopolymeren an Cyp57, aber anders als poly(G) besitzt es eine definierte Größe und damit definierte Eigenschaften. Es wurden Nah-UV CD-Spektren von G₁₀ in Gegenwart verschiedener Proteinkonzentrationen gemessen und mit dem jeweiligen CD-Spektrum des Proteins bei der verwendeten Konzentration korrigiert (**Abbildung 28**).

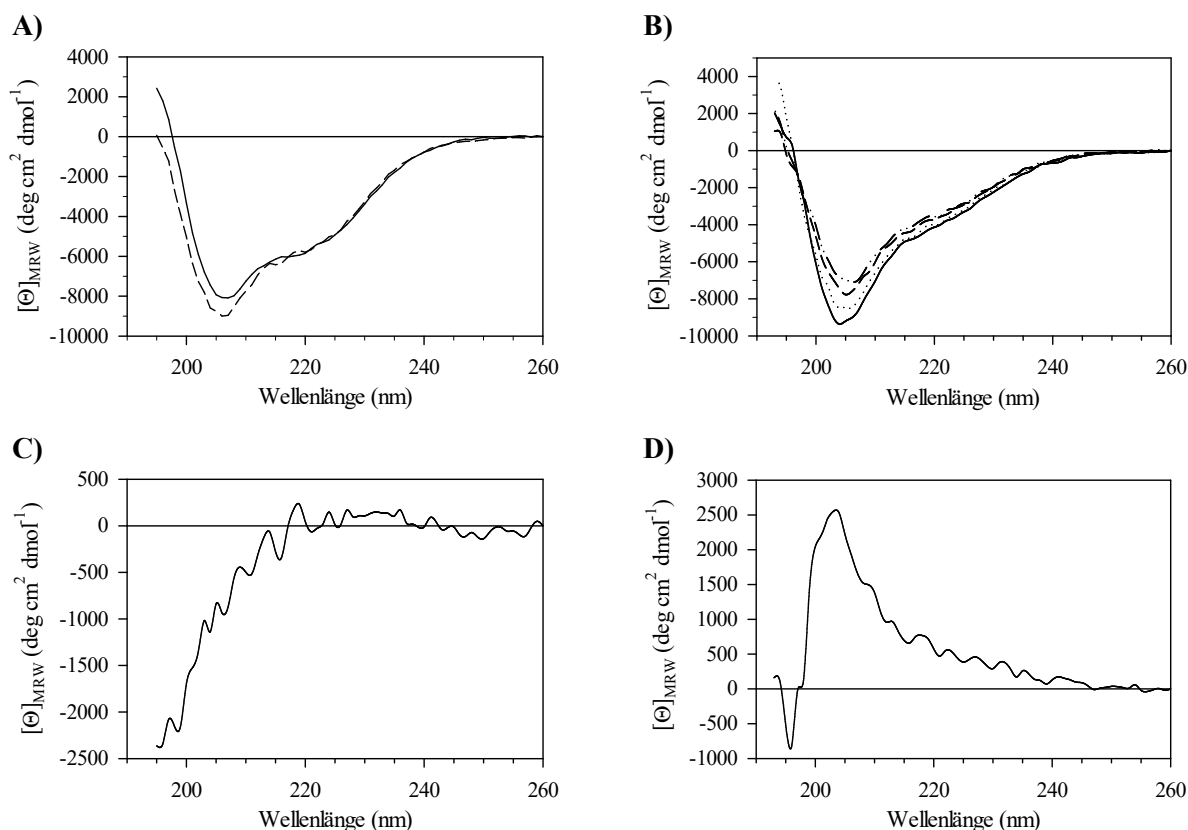


Abbildung 27: Einfluss des Ribohomopolymers poly(G) auf Cyp57 und den C-terminalen Bereich von Cyp57. Dargestellt sind die gegen poly(G) korrigierten CD-Spektren von Cyp57 (A) und Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ (B). A) CD-Spektren von 5 µM Cyp57 titriert mit 0 µM (—) und 12 µM (- -) poly(G). B) CD-Spektren von 8 µM Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ titriert mit 0 µM (—), 12 µM (···), 24 µM (- -), 36 µM (- · -) poly(G) C) Differenzspektrum von Cyp57. Von Cyp57 in Gegenwart von 12 µM poly(G) wurde Cyp57 ohne RNA subtrahiert. D) Differenzspektrum von Cyp57₂₀₄₋₄₉₂. Von Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ in Gegenwart von 36 µM poly(G) wurde Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ ohne RNA subtrahiert. Gemessen wurde in 5 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,4, 250 mM NaCl bei 20°C. Dargestellt ist die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure aus 25 Akkumulationen.

Das RNA-Oligonukleotid G₁₀ besaß ein RNA-typisches CD-Spektrum mit einem Maximum der molaren Elliptizität bei 260 nm und einem Minimum der molaren Elliptizität bei 235 nm. Die Titration von Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ zum RNA-Oligonukleotid G₁₀ führte zu einer Verringerung der Signalintensität der molaren Elliptizität am Maximum bei 260 nm und am Minimum bei 235 nm (Abbildung 28A). Das Differenzspektrum (Abbildung 28C) vom Komplex des RNA-Oligonukleotids mit der höchsten Cyp57₂₀₄₋₄₉₂-Konzentration und vom RNA-Oligonukleotid ohne Interaktionspartner im Ausgangszustand verdeutlichte für G₁₀ die größten Signaländerungen bei 260 nm und 235 nm sowie einen isodichroischen Punkt bei 250 nm. Die Änderung der Signalintensität von G₁₀ bei 260 nm wurde gegen die Proteinkonzentration aufgetragen, über nicht-lineare Regression war eine Abschätzung der Dissoziationskonstante (K_D) für diese Bindung auf rund 8 µM möglich (Abbildung 28E). Gegensätzlich verhielt sich das CD-Signal bei der Titration von Cyp57₂₄₀₋₃₁₈ zum RNA-Oligonukleotid G₁₀. Durch die Proteinzugabe kam es zu einer Vergrößerung der Signalintensität der molaren Elliptizität am Maximum bei 265 nm (Abbildung 28B). Das Differenzspektrum (Abbildung 28D) vom Komplex mit der höchsten Cyp57₂₄₀₋₃₁₈-Konzentration und vom RNA-Oligonukleotid ohne Interaktionspartner zeigte deutlich, dass die Differenz bei 265 nm am Größten war. Die Änderung der Signalintensität von G₁₀ bei 265 nm wurde gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Mittels nicht-linearer Regression war eine Abschätzung der Dissoziationskonstante für diese Bindung auf rund 11 µM möglich (Abbildung 28F).

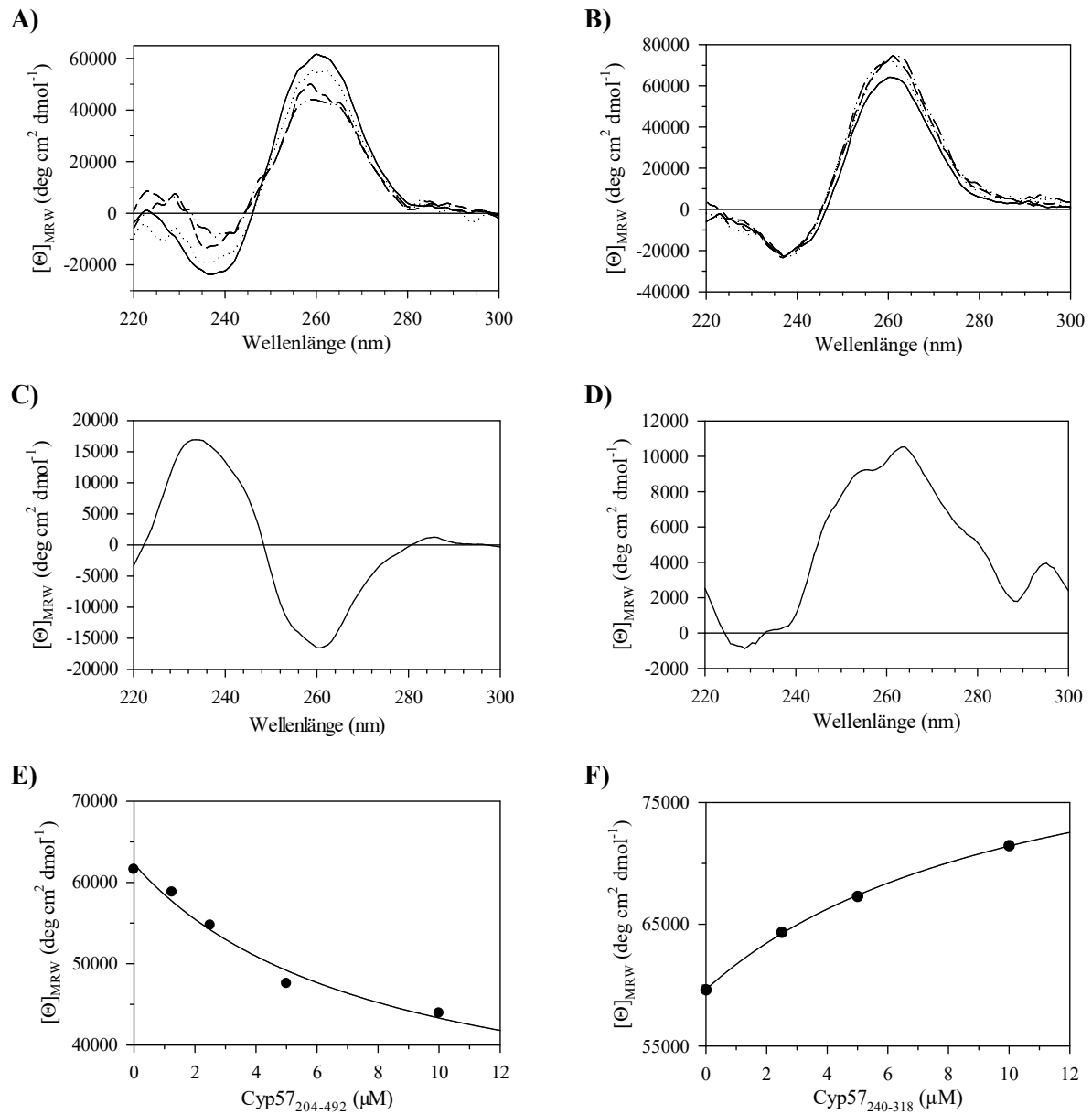


Abbildung 28: Einfluss der RRM-Domäne von Cyp57 auf das 10-mere RNA-Oligonukleotid G_{10} . Dargestellt sind die Protein-korrigierten CD-Spektren von 5 μM G_{10} . Titriert wurde mit 0 μM (—), 2.5 μM (⋯), 5 μM (- -) und 10 μM (---) Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ (A) in 5 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.4, 250 mM NaCl oder Cyp57₂₄₀₋₃₁₈ (B) in 5 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.4, 100 mM NaCl bei 20°C. Abgebildet ist die mittlere molare Elliptizität aus 6 Akkumulationen. C) Differenzspektrum von G_{10} . Von G_{10} in Gegenwart von 10 μM Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ wurde G_{10} ohne Protein subtrahiert. D) Differenzspektrum von G_{10} . Von G_{10} in Gegenwart von 10 μM Cyp57₂₄₀₋₃₁₈ wurde G_{10} ohne Protein subtrahiert. E) Auftragung der Änderung der molaren Elliptizität von G_{10} bei 260 nm gegen die Cyp57₂₀₄₋₄₉₂-Konzentration (●). Über nicht-lineare Regression wurde für die Bindung ein K_D -Wert von ca. 8 μM bestimmt (—). F) Auftragung der Änderung der molaren Elliptizität von G_{10} bei 265 nm gegen die Cyp57₂₄₀₋₃₁₈-Konzentration (●). Mittels nicht-linearer Regression wurde für die Bindung ein K_D -Wert von ca. 11 μM bestimmt (—).

3.8.3 Analyse der Interaktion von RNA-Oligonukleotiden und Cyp57 mittels ITC

In den folgenden Experimenten wurde die RNA-Cyp57-Interaktion mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) genauer untersucht. Die ITC wurde genutzt, um die Assoziation von zwei Cyp57-Varianten (Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ und Cyp57₂₄₀₋₃₁₈) mit dem RNA-Oligonukleotide G₁₀ hinsichtlich ihrer thermodynamischen Parameter zu quantifizieren. Die Titration für Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ und G₁₀ ist in **Abbildung 29A** dargestellt. Das Protein Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ wurde mit einer Konzentration von 186 μM in 19 Schritten von je 15 μl zu 10 μM G₁₀ in die Zelle titriert.

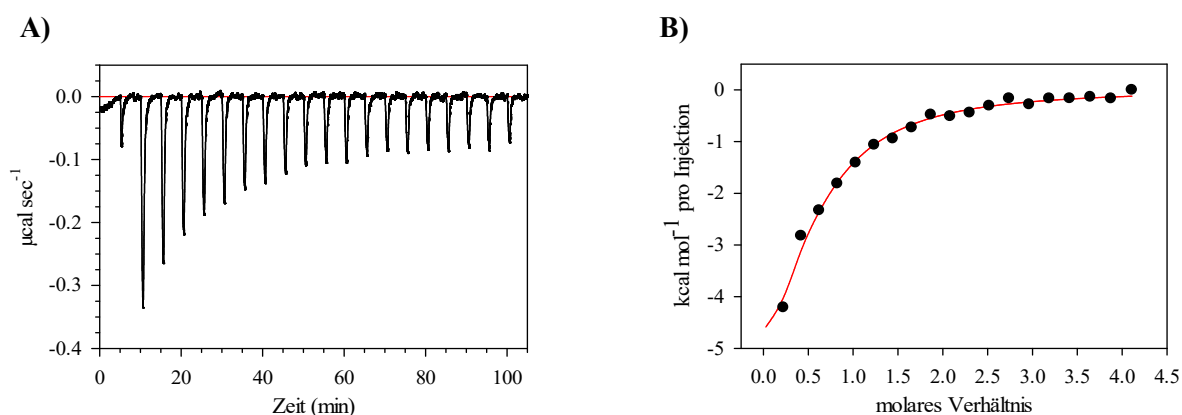


Abbildung 29: Thermodynamische Charakterisierung der Interaktion zwischen der RRM-Domäne von Cyp57 und dem 10-meren RNA-Oligonukleotid G₁₀. ITC-Messung von Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ und G₁₀. Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ (186 μM) wurde zu G₁₀ (10 μM) bei 20°C titriert. **A)** Titrationskurve. **B)** Die Auswertung erfolgte nach einem Einseitenbindungsmodell mit dem Programm ORIGIN Version 5.0.

Des Weiteren wurde die Bindung beider Cyp57-Varianten an das RNA-Oligonukleotid GUGGCCG untersucht. Bei dem RNA-Oligonukleotid (GUGGCCG) handelt es sich um eine RNA, von der bereits bekannt ist, dass sie mit hoher Affinität (K_D : 120 nM) das Cyp57-Orthologe AtCyp59 aus *A. thaliana* bindet (Bannikova *et al.*, 2012).

Die ermittelten Dissoziationskonstanten und thermodynamischen Parameter aller durchgeführten Messungen sind zusammengefasst in **Tabelle 15**.

Tabelle 15: Thermodynamische Parameter der Cyp57-RNA-Komplexe. Die thermodynamischen Parameter wurden bei 20°C mittels ITC ermittelt.

Protein	Oligo	K_D [μM]	ΔG [kJ · mol ⁻¹]	ΔH_{ITC} [kJ · mol ⁻¹]	$T\Delta S_{ITC}$ [kJ · mol ⁻¹]
RRM ₂₀₄₋₄₉₂	G ₁₀	3.4	-30.7	-18.4 ± 0,8	12.3
RRM ₂₄₀₋₃₁₈	G ₁₀	8.7	-28.4	6.7 ± 0.8	35.1
RRM ₂₀₄₋₄₉₂	GUGGCCG	6.3	-29.2	-9.6 ± 9.2	19.6
RRM ₂₄₀₋₃₁₈	GUGGCCG	16.6	-26.9	11.7 ± 1.7	38.6

Die Bindung zwischen Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ und den beiden RNA-Oligonukleotiden verlief exotherm. Sie war entropisch und enthalpisch günstig. Dabei war die Bindung von GUGGCCG an Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ mit ΔH_{ITC} von -9.6 kJ mol^{-1} enthalpisch weniger günstig als die Bindung von G₁₀ an Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ mit ΔH_{ITC} von $-18.4 \text{ kJ mol}^{-1}$. Dementsprechend wurde eine niedrigere Dissoziationskonstante für G₁₀ mit $3.4 \mu\text{M}$ im Vergleich zu GUGGCCG mit einem K_D von $6.3 \mu\text{M}$ gefunden.

Dagegen verlief die Bindung zwischen Cyp57₂₄₀₋₃₁₈ und den zwei RNA-Oligonukleotiden endotherm. Die Reaktionen waren beide entropisch begünstigt aber enthalpisch ungünstig. Die Affinität für G₁₀ war mit einer Dissoziationskonstante von $8.7 \mu\text{M}$ im Vergleich zu GUGGCCG mit $16.6 \mu\text{M}$ in etwa doppelt so hoch. Für beide Oligonukleotide waren die Reaktionsentropien von Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ etwa zwei bis dreimal niedriger als von Cyp57₂₄₀₋₃₁₈.

Generell besitzt das komplette C-terminale Fragment Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ eine höhere Affinität zu RNA-Oligonukleotiden, als das kürzere Fragment Cyp57₂₄₀₋₃₁₈. G₁₀ weist für das jeweilige Cyp57-Fragment eine höhere Affinität als GUGGCCG auf.

3.8.4 PPIase-Aktivität von Cyp57 in Gegenwart von RNA

Da Cyp57 *in vitro* an RNA bindet und eine aktive PPIase ist, wurde untersucht, ob die RNA-Bindung einen Einfluss auf die enzymatische Aktivität von Cyp57 hat. Dafür wurde die PPIase-Aktivität von Cyp57 in Gegenwart von poly(G), poly(A) und dem 10-meren RNA-Oligonukleotid G₁₀ im Protease-freien PPIase-Assay mit Abz-Ala-Met-Pro-Phe-pNA als optimalem Substrat bestimmt (Zoldák *et al.*, 2009) (Abbildung 30).

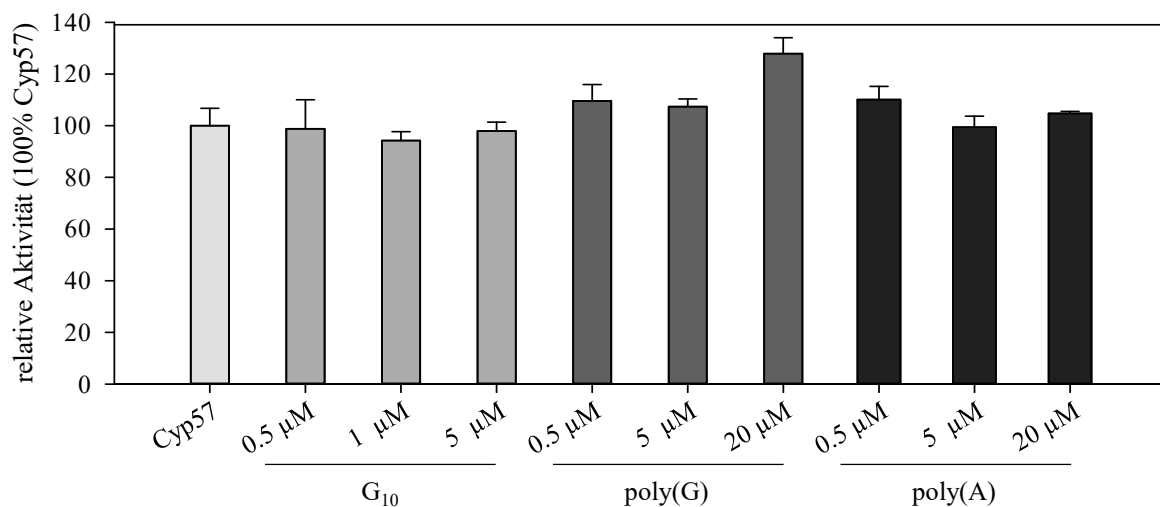


Abbildung 30: Relative PPIase-Aktivität von Cyp57 bei der Bindung von Ribohomopolymeren und 10-merer RNA. Die Aktivität von Cyp57 wurde im Protease-freien PPIase-Assay mit Abz-Ala-Met-Pro-Phe-pNA als Substrat bestimmt (nach Zoldák *et al.*, 2009). Homopolymere und 10-merer RNA (G₁₀) wurden in der angegebenen Konzentration zu $0.5 \mu\text{M}$ Cyp57 gegeben, für 10 min vorinkubiert und im PPIase-Assay in 35 mM HEPES pH 7.8, 250 mM NaCl bei 10°C gemessen.

Die Zugabe von poly(G) zu Cyp57 führte zu einer leichten Erhöhung der relativen Aktivität um etwa 20%. Im Gegensatz dazu hatte weder das RNA-Oligonukleotid G₁₀, noch die poly(A)-RNA bis zu einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ bzw. $20 \mu\text{M}$ einen Einfluss auf die PPIase-Aktivität von Cyp57 (Abbildung 30).

3.9 Expression von Cyp57 in humanen Zellen

3.9.1 Endogene Expression

Für die Analyse der Expression von Cyp57 in verschiedenen humanen Zellen wurde im Zelllysate verschiedener verfügbarer menschlicher Zelllinien endogenes Cyp57 mittels Western-Blot-Analyse unter Benutzung eines polyklonalen Anti-Cyp57-Antikörpers untersucht.

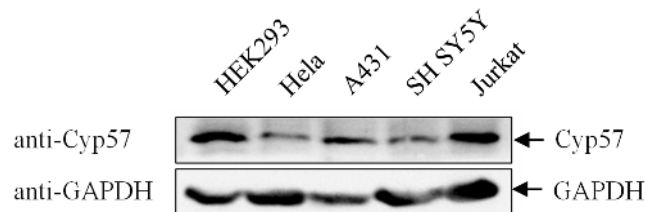


Abbildung 31: Expression von endogenem Cyp57. Analyse der Expression von Cyp57 in verschiedenen Zelllinien mit Anti-Cyp57-Antikörper. 10 µg vom Zelllysate wurde mittels SDS-PAGE (10%) und im Western-Blot analysiert. HeLa-Zellen: Gebärmutterhals Epithelzellen; Jurkat-Zellen: T-Lymphozyten; A431-Zellen: epidermoide Zellen; HEK293-Zellen: embryonale Nierenzellen ; SH-SY5Y-Zellen: Neuroblastoma-Zellen.

Es wurde das Zelllysate von Zellen der humanen-Zelllinien HeLa (Gebärmutterhals-Epithelzellen), Jurkat (T-Lymphozyten), A431 (epidermoide Zellen), HEK293 (embryonale Nierenzellen) und SH-SY5Y (Neuroblastoma-Zellen) verwendet. Mittels SDS-PAGE wurden die Proteine von 10 µg des Zelllysates aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. Mit einem Anti-Cyp57 spezifischen Antikörper wurde in allen getesteten Säuger-Zelllinien eine deutliche Bande bei ca. 60 kDa detektiert (**Abbildung 31**). Am stärksten war die Expression in HEK293- und Jurkat-Zellen. In Nervenzellen (SH-SY5Y) und Epithelzellen (HeLa) war die Expression am geringsten.

3.9.2 Rekombinante Expression und Depletion von Cyp57 in HEK293-Zellen

Um *in vivo* Analysen über die Funktion von Cyp57 in Zellen durchführen zu können, wurde eine Strategie zur Expression von rekombinantem Cyp57 in humanen Zellen entwickelt. Mehrere Möglichkeiten wurden verfolgt, um Cyp57 als Fusionsprotein mit einem Affinitätstag in HEK293-Zellen zu exprimieren. Es wurde die Expression von Cyp57 nach Klonierung in die Vektoren pCMV Tag 2a bzw. pcDNA4/ His-Max und der Transfektion der HEK293-Zellen mit der Calcium-Phosphat-Methode und einer auf Liposomen basierenden Methode untersucht. Diese Versuche resultierten nicht in einer detektierbaren zusätzlichen Expression von Cyp57 in HEK293-Zellen.

Als günstig erwies sich, die kodierende DNA-Sequenz von Cyp57 in den Säugerzellen Vektor pEGFP-N3 zu integrieren. Dazu wurde die DNA-Sequenz von Cyp57 mit einem Primer, der einen Linker, den *Strep*-Tag II (Skerra & Schmidt, 2000) und ein Stoppcodon als C-terminale Fusion enthielt, amplifiziert und nach Behandlung mit den entsprechenden Restriktionsenzymen in pEGFP-N3 ligiert. Durch das Stoppcodon wurde die Translation des eGFP-Proteins verhindert, so dass von dem entstandenen Vektor pE-Cyp57 Cyp57 als Fusion mit einem C-terminalen *Strep*-Tag II exprimiert werden konnte (**Abbildung 32**). Die Integration der DNA-Sequenz von Cyp57 wurde durch Sequenzierung auf Korrektheit überprüft.



Abbildung 32: DNA-Konstrukt von Cyp57 mit Linker und Strep-Tag II. Cyp57 wurde ohne Stoppcodon amplifiziert. Der Strep-Tag II (8 AS) wird durch einen Linker (Gly-Gly) vom Protein getrennt.

Mit dem erzeugten Vektor pE-Cyp57 wurden 50-70% konfluente HEK293-Zellen mit der Calcium-Phosphat-Methode transient transfiziert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und im Western-Blot untersucht. Der Nachweis des rekombinanten Cyp57 erfolgte mit Anti-Cyp57-Antikörper und Anti-Strep-Antikörper (**Abbildung 33A**).

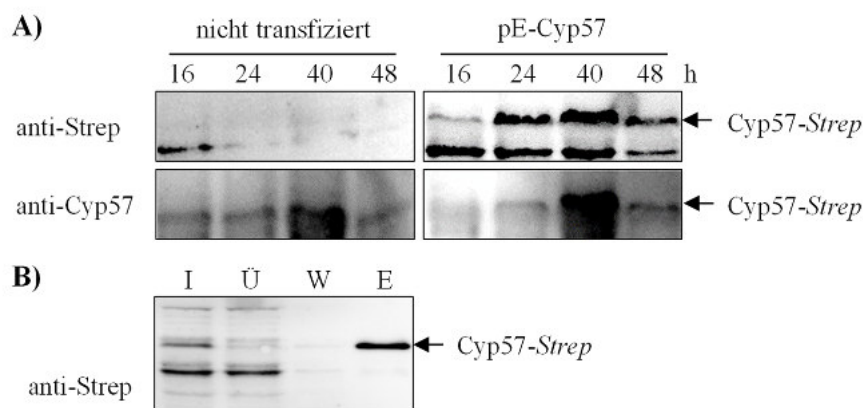


Abbildung 33: Expression und Reinigung von Cyp57-Strep aus HEK293-Zellen. **A)** Gesamt-Zelllysat von nicht-transfizierten HEK293-Zellen und mit pE-Cyp57 transfizierten HEK293-Zellen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zelllysate gewonnen und im Western-Blot mit Anti-Strep- und Anti-Cyp57-Antikörper analysiert. **B)** HEK293-Zellen wurden mit pE-Cyp57 transfiziert und nach 48 h wurden 4×10^7 Zellen geerntet. Die Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen. Das Lysat wurde auf eine Streptactin-Sepharose Säule geladen (Säulenvolumen: 1 ml), um Cyp57-Strep zu binden und mit 5 mM D-Desthiobiotin eluiert. Die gewonnenen Fraktionen wurden im Western-Blot analysiert und der Nachweis erfolgte mit Anti-Strep-Antikörper. Gesamt-Zelllysat (I), Überstand nach der Streptactin-Affinitätssäule (Ü), Waschfraktion (W), Elutionsfraktion (E).

In der Western-Blot-Analyse der mit pE-Cyp57 transfizierten HEK293-Zellen wurde mit Anti-Strep-Antikörper eine deutliche Bande bei ca. 60 kDa detektiert (**Abbildung 33A**), die 40 h nach der Transfektion der HEK293-Zellen am stärksten war. Bei nicht-transfizierten Zellen war auf gleicher Höhe hingegen keine Bande sichtbar. Somit war es möglich, rekombinantes mit einem Affinitätstag fusioniertes Cyp57 in HEK293-Zellen zu exprimieren.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob das Fusionsprotein aus dem Gesamt-Zelllysat isoliert werden kann. Dazu wurden HEK293-Zellen mit pE-Cyp57 durch die Calcium-Phosphat-Methode transient transfiziert (Abschnitt: 2.2.2.3) und nach 40 h geerntet (ca. 4×10^7 Zellen). Die Zellen wurden durch Ultraschall lysiert und das rekombinante Cyp57 wurde vom Lysat über eine Streptactin-Sepharose-Matrix getrennt. Das gebundene Protein wurde mit D-Desthiobiotin eluiert und im Western-Blot analysiert (**Abbildung 33B**).

In der Western-Blot-Analyse mit Anti-Strep-Antikörper war eine deutliche Anreicherung von Cyp57-Strep mit Streptactin-Sepharose im Vergleich zum Gesamt-Zelllysat erkennbar. Damit wurde gezeigt, dass rekombinantes Cyp57 aus humanen Zellen angereichert werden kann. Dadurch waren nachfolgende Untersuchungen zur Analyse von Proteinen bzw. Nukleinsäuren als intrazelluläre Bindungspartner von Cyp57 möglich.

Zusätzlich wurde versucht, die Proteinmenge von endogenem Cyp57 in HEK293-Zellen durch RNA-Interferenz (RNAi) zu verringern. Dafür kamen zwei Systeme zum Einsatz. Zum einen wurden zwei Plasmide pSUPERIOR-Cyp57-RNAi_261 sowie pSUPERIOR-Cyp57-RNAi_789, die je ein Oligo mit einer spezifischen shRNA-Sequenz gegen Cyp57-mRNA enthielten, verwendet. Zum anderen wurden synthetisch hergestellte RNA-Oligomere (siRNA) genutzt.

HEK293-Zellen wurden mit pSUPERIOR-Cyp57 (Abbildung 34A und B) oder spezifischer Cyp57-siRNA (Abbildung 34C) transient mittels Lipofektion transfiziert. Um zu überprüfen, ob die Transfektion zu einer Reduktion des Cyp57-Gehaltes der Zellen führte, wurden 22 bis 72 h nach der Transfektion Zelllysate der transfizierten HEK293-Zellen mittels Western-Blot mit Anti-Cyp57-Antikörper analysiert. Mit keinem der beiden Systeme konnte eine deutliche Verringerung des Cyp57-Proteingehaltes in HEK293-Zellen detektiert werden (Abbildung 34).

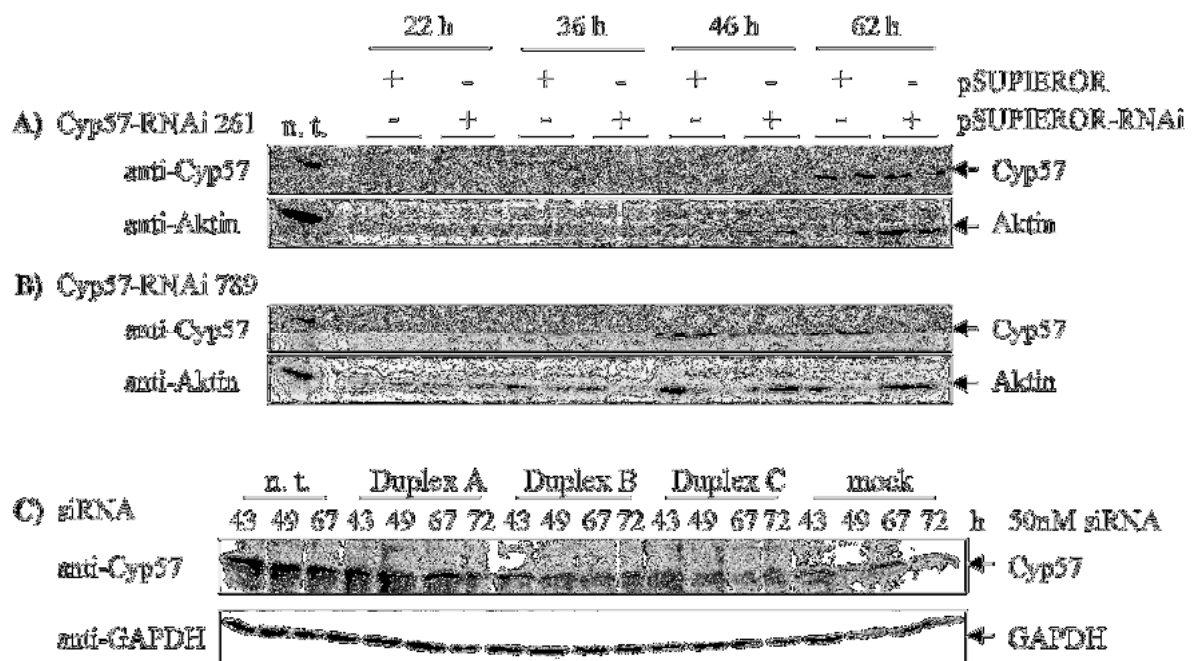


Abbildung 34: Depletion von Cyp57 in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit zwei Cyp57-spezifischen Vektoren pSUPERIOR-Cyp57-RNAi_261 (A) und pSUPERIOR-Cyp57-RNAi_789 (B) sowie dem Leervektor pSUPERIOR als Kontrolle mittels Lipofektion transfiziert und nach den angegebenen Zeitpunkten geerntet. C) Zellen wurden mit siRNA mit je 50 nM siRNA-Duplex gegen Cyp57 transient mittels Lipofektion transfiziert und nach den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Lysate wurden durch SDS-PAGE (10%) und Western-Blot-Analyse gegen Anti-Cyp57-, Anti-Aktin- oder Anti-GAPDH-Antikörper untersucht.

3.9.3 Subzelluläre Lokalisation von Cyp57 in HEK293-Zellen

Die subzelluläre Lokalisierung von Cyp57 in humanen Zellen wurde bisher noch nicht detailliert untersucht, jedoch deutet das bioinformatisch bestimmte bipartite-Kernlokalisierungssignal (Abbildung 5) darauf hin, dass Cyp57 überwiegend im Zellkern lokalisiert ist.

Für die Charakterisierung der subzellulären Verteilung von endogenem Cyp57 wurde Zelllysate von HEK293-Zellen durch differentielle Zentrifugation in verschiedene Fraktionen aufgeteilt. Dabei wurden Proteine aus dem Zellkern, aus dem endoplasmatischen Retikulum und aus dem Cytosol gewonnen (Sasaki-Osugi *et al.*, 2013) und im Western-Blot mit Anti-Cyp57-Antikörper sowie Antikörper gegen spezifische Markerproteine untersucht (Abbildung 35).

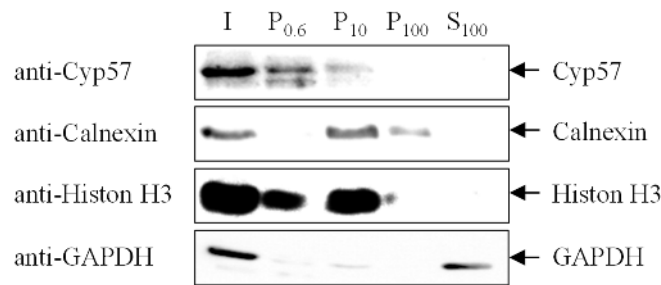


Abbildung 35: Differentielle Zentrifugation von endogenem Cyp57. HEK293-Zellen wurden homogenisiert und fraktioniert durch differentielle Zentrifugation bei 4°C. Die Pellets der verschiedenen Fraktionen: 600 x g ($P_{0.6}$), 10 000 x g (P_{10}), 100 000 x g (P_{100}) und der finale Überstand von 100 000 x g (S_{100}) wurden im Western-Blot mit spezifischem Anti-Cyp57-, Anti-Calnexin-, Anti-Histon H3- und Anti-GAPDH-Antikörper analysiert.

Zur Fraktionierung wurden anschließend an die Homogenisierung der Zellen durch eine Spritze mit Kanüle die Zellkerne und unzerstörten Zellen durch Zentrifugation bei 600 x g abgetrennt. Im entstandenen Pellet $P_{0.6}$ befanden sich hauptsächlich Kernproteine. Hier war deutlich das Markerprotein für den Zellkern, Histon H3 nachweisbar, nicht jedoch Calnexin oder GAPDH. Durch erneute Zentrifugation des Überstandes bei einer relativ niedriger Geschwindigkeit von 10 000 x g wurden Mitochondrien, Lysosomen, Peroxisomen und ER-Membranen pelletiert und befanden sich im entstandenen Pellet P_{10} . In diesem Pellet war das ER-typische Protein Calnexin nachweisbar sowie der Kernmarker Histon H3. Daher kann davon ausgegangen werden, dass unter diesen Bedingungen auch Kernproteine pelletierten. Das cytosolische Protein GAPDH wurde in dieser Fraktion der Zellproteine nicht gefunden. Die weitere Fraktionierung des verbliebenen Überstandes durch Hochgeschwindigkeits-Zentrifugation bei 100 000 x g resultierte in der Pelletierung von weiteren Zellmembranen mit dem Pellet P_{100} unter Zurücklassen der löslichen cytosolischen Proteine im Überstand S_{100} . Im Pellet P_{100} war das ER-Protein Calnexin nachweisbar, während im Überstand ausschließlich das cytosolische Protein GAPDH gefunden wurde. Cyp57 verhielt sich bei der Zellfraktionierung sehr ähnlich zu Histon H3. Es war in den Pellets $P_{0.6}$ und P_{10} aufzufinden, die durch die Gegenwart von Kernproteinen charakterisiert waren. Dagegen war Cyp57 im P_{100} und S_{100} nicht nachweisbar. Daher kann davon ausgegangen werden, dass Cyp57 im Zellkern lokalisiert vorlag.

Um die Lokalisation von Cyp57 in Zellen direkt beobachten zu können, wurden Lokalisationsstudien mit GFP-markiertem Cyp57 in HEK293-Zellen durchgeführt. Hierfür wurde ein Vektor hergestellt, bei dem Cyp57 als N-terminales Fusionsprotein mit eGFP exprimiert werden kann (pEGFP-N3_Cyp57). Mit diesem Vektor wurden 50-70% konfluente HEK293-Zellen transient transfiziert. Zuerst wurde die Expression von HEK293-Zellen, die transient mit pEGFP-N3_Cyp57 transfiziert wurden, in einer Western-Blot-Analyse mit Anti-GFP-Antikörper untersucht (**Abbildung 36**).

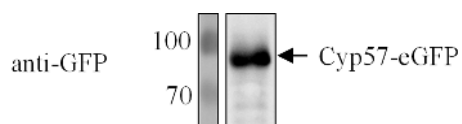


Abbildung 36: Expression von rekombinantem Cyp57-eGFP. HEK293-Zellen wurden transient mit pEGFP-N3_Cyp57 transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen in Western-Blot-Analysen mit Anti-GFP-Antikörper analysiert.

Die Western-Blot-Analyse der Zelllysate ergab, dass Cyp57-eGFP vollständig exprimiert wurde und eine apparente molekulare Masse von ca. 90 kDa aufwies. Das bestätigte die korrekte Expression von Cyp57-eGFP (molekulare Masse ca. 85 kDa, berechnet mit ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005)) in HEK293-Zellen.

Anschließend wurde die Lokalisation des exprimierten Fusionsproteins Cyp57-eGFP in HEK293-Zellen durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert. In pEGFP-N3_Cyp57 transfizierten Zellen

(**Abbildung 37**) war deutlich die grüne Fluoreszenz von Cyp57-eGFP ausschließlich im Kern zu erkennen. Damit steht die beobachtete Lokalisation der Immunfluoreszenz von Cyp57-eGFP in Übereinstimmung mit den Resultaten der Zellfraktionierung und den Ergebnissen im Human Protein Atlas (Uhlén *et al.*, 2015) mit Antikörper-markiertem Cyp57. Darüber hinaus zeigte sich bei einer genaueren Betrachtung der Verteilung von Cyp57-eGFP im Zellkern (**Abbildung 37**), dass es zu einer Anreicherung von Cyp57-eGFP in DAPI-lichten Regionen kam, was charakteristisch für Euchromatin ist. Euchromatin ist der Bereich des aufgelockerten Chromatins, dort gibt es die meisten Gene und die höchste Genaktivität (Huisinga *et al.*, 2006).

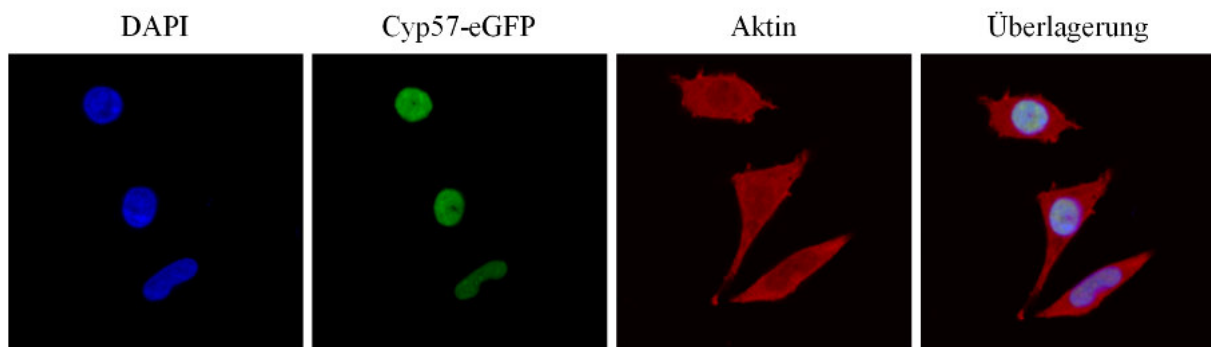


Abbildung 37: Subzelluläre Lokalisation von Cyp57-eGFP in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit pEGFP-N3_Cyp57 transfiziert und in IBIDI-Kavitäten kultiviert. Die Zellen wurden vor den mikroskopischen Aufnahmen fixiert und permeabilisiert. Dann wurden die Zellkerne mit DAPI sowie Aktin mit Rhodamin-Phalloidin angefärbt. Anschließend wurden Bilder mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop D-Eclipse C1 Si (Nikon) erstellt.

3.9.4 Untersuchung der RNA-Bindung von Cyp57 *in vivo*

Neben der Lokalisation von Cyp57 wurde auch untersucht, welche RNA von Cyp57 *in vivo* gebunden wird. Dadurch sollen Rückschlüsse auf die Funktionen von Cyp57 in humanen Zellen gezogen werden. Das Ziel war es, eine mögliche RNA-Consensus-Sequenz zu bestimmen. Unter Verwendung der CLIP-Methode sollte die von Cyp57 gebundene RNA identifiziert werden (Ule *et al.*, 2003) (**Abbildung 38**). Die CLIP-Methode wurde mit pE-Cyp57 transient transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt, die mit UV-Licht bestrahlt wurden. Als Kontrollen dienten ebenfalls transient transfizierte HEK293-Zellen ohne UV-Licht Bestrahlung und nicht-transfizierte HEK293-Zellen mit UV-Licht Bestrahlung. Cyp57-Strep und die Kontrollen wurden mittels Immunpräzipitation mit Streptactin-Sepharose präzipitiert und die gebundene RNA partiell mit verschiedenen RNase-Konzentrationen hydrolysiert. Die Hydrolyse mit verschiedenen RNase-Konzentrationen führt zu optimalen RNA-Fragmentgrößen, mit einer Länge zwischen 50-300 Nukleotiden (Huppertz *et al.*, 2014). Kürzere Fragmente sind schwieriger zu reinigen und längere Fragmente begünstigen Verunreinigungen durch andere RNA-bindende-Proteine (Ule *et al.*, 2005). Um die spezifisch an Cyp57 bzw. die unspezifisch an die Kontrollen gebundene RNA nachzuweisen, wurde diese anschließend mittels Polynukleotid-Kinase am 5'Ende radioaktiv markiert. Die Komplexe wurden durch eine denaturierende PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Im Anschluss wurde die radioaktiv markierte RNA in einem Autoradiogramm sichtbar gemacht.

Das Autoradiogramm (**Abbildung 38**) zeigte eine deutliche Anreicherung von Protein-RNA-Komplexen in der zweiten Spur mit einer niedrigen RNase-Konzentration im Vergleich zur ersten Spur mit einer hohen RNase-Konzentration. Da in keiner der vier Kontrollen Protein-RNA-Komplexe präzipitiert wurden, deuten die Ergebnisse der zweiten Spur auf eine *in vivo* RNA-Cyp57-Interaktion hin. Nach der Anreicherung war es jedoch nicht möglich, die Cyp57 gebundenen RNA-Sequenzen zu identifizieren.

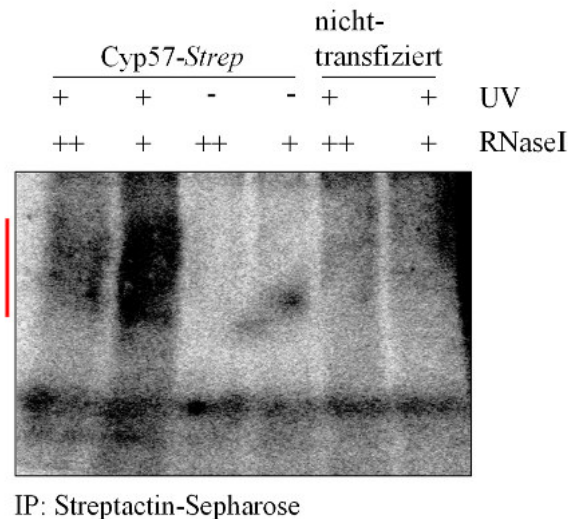


Abbildung 38: Autoradiogramm von CLIP Protein-RNA-Komplexen isoliert mit Cyp57-*Strep*. CLIP wurde mit pE-Cyp57 transient transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Transfizierte und nicht-transfizierte HEK293-Zellen wurden mit UV-Licht bestrahlt (+). Zusätzlich wurden transfizierte Zellen ohne UV-Licht Bestrahlung verwendet. Cyp57-*Strep* und die Kontrollen wurden mit Streptactin-Sepharose präzipitiert. Anschließend erfolgte ein partieller RNA-Verdau mit einer hohen (++) oder niedrigen (+) RNaseI-Konzentration, gefolgt von der radioaktiven Markierung der RNA. Danach wurden die Komplexe durch eine denaturierende PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Dargestellt ist ein Autoradiogramm von radioaktiv markierter RNA die an Cyp57-*Strep* gebunden ist (rote Markierung).

3.10 Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern von Cyp57

3.10.1 Wechselwirkung von Cyp57 mit Smad5

Die Kenntnis von Interaktionspartnern eines Proteins ist wichtig für das Verständnis seiner physiologischen Funktionen. Eine Möglichkeit der Identifizierung von Bindepartnern bieten Ko-Präzipitationsversuche mit anschließender massenspektrometrischer Analyse.

Durch Verwendung dieser Methoden sollten mögliche Cyp57-Bindepartner aus HEK293-Zellysate mit in *E. coli* rekombinant hergestelltem immobilisiertem His₆-SUMO-Cyp57 identifiziert werden. Für die Analyse wurde das ÄKTAprime-System mit einer 1 ml HisTrap HP-Säule zur Immobilisierung von His₆-SUMO-Cyp57 verwendet. Das ermöglicht die Verwendung von großen Mengen an HEK293-Zellysate und die stetige Bestimmung der Absorption des Durchlaufs. Zuerst wurde eine Nickelaffinitätssäule mit *E. coli*-Lysat, das rekombinant exprimiertes His₆-SUMO-Cyp57 enthielt, beladen und mit Präzipitationspuffer II gespült. Anschließend wurde HEK293-Zellysate, das einen möglichen Bindepartner enthielt, über die Säule geleitet. Am Ende wurde das gebundene Protein mit Imidazol eluiert und mittels SDS-PAGE und folgender Coomassie-Färbung untersucht. Als Kontrollprotein diente His₆-SUMO, das in gleicher Weise wie His₆-SUMO-Cyp57 behandelt wurde. Ein Vergleich der Bandenmuster des Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgels von His₆-SUMO-Cyp57 und His₆-SUMO mit HEK293-Lysate zeigte keine zusätzlichen Banden. Mit dieser Methode war es nicht möglich, neue Interaktionspartner von Cyp57 zu finden.

Deshalb wurden die Datenbanken MINT (Licata *et al.*, 2012) und STRING (Jensen *et al.*, 2009) bezüglich beschriebener Bindepartner durchsucht. Als mögliches Kandidatenprotein wurde Smad5 gefunden. Colland *et al.*, (2004) haben in einer groß angelegten Studie versucht, ein Netzwerk von humanen Signalwegen (Smads) zu kartieren. Dadurch sind sie auf Interaktionen gestoßen, die sie

genauer mit dem Hefe-2-Hybrid-System untersucht haben. Dabei wurde die Protein-Protein-Interaktion zwischen Cyp57 und Smad5 gefunden.

Smad5 ist ein Transkriptionsfaktor der interzellulären TGF- β -Kommunikations-Kaskade, wobei es inhibitorisch auf die Proliferation von hämatopoetischen Vorläuferzellen wirkt. BMP-2 aktiviert dabei die BMP-Rezeptor Typ I-Kinase, wodurch Smad5 phosphoryliert wird, in den Kern transloziert und BMP-regulierte Gene aktiviert (Feng & Derynck, 2005).

Um die Cyp57-Smad5-Interaktion näher zu charakterisieren, wurde eine Affinitätschromatographie mit an Nickel-Sepharose immobilisiertem His₆-SUMO-Cyp57 wie oben beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden die erhaltenen Proben im Western-Blot untersucht (**Abbildung 39A**).

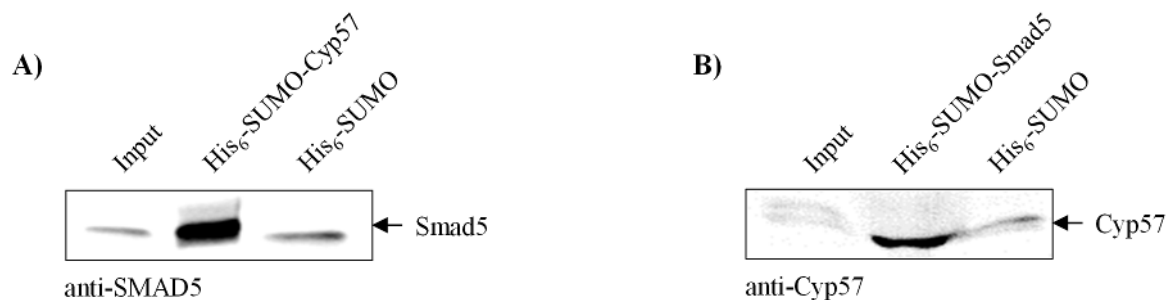


Abbildung 39: Interaktion von Cyp57 und Smad5 im Präzipitationsexperiment. **A)** Eine 1 ml HisTrap HP-Säule wurde mit His₆-SUMO-Cyp57 oder His₆-SUMO, als Kontrolle, beladen. Dann mit HEK293-Zelllysat inkubiert und anschließend mit 500 mM Imidazol eluiert. Der Input und die Elutionsfraktionen wurden mit Anti-Smad5-Antikörper im Western-Blot analysiert. **B)** wie unter A) beschrieben mit der Ausnahme, dass die 1 ml HisTrap HP-Säule mit His₆-SUMO-Smad5 beladen und der Western-Blot mit Anti-Cyp57-Antikörper analysiert wurde.

In **Abbildung 39A** wurde eine deutliche Anreicherung von Smad5 durch His₆-SUMO-Cyp57 in der Western-Blot-Analyse mit Anti-Smad5-Antikörper detektiert. Im Vergleich dazu wurde beim Kontrollprotein nur eine schwache Bande sichtbar. Dies weist auf eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen hin. Anschließend wurde dieser Versuch auch revers durchgeführt. Dazu wurde Smad5 zur Expression als His₆-SUMO-Fusionsprotein in pE-SUMO kloniert und in *E. coli* Rosetta überexprimiert. Zelllysat von His₆-SUMO-Smad5 exprimierenden *E. coli*-Zellen wurde genutzt, um His₆-SUMO-Smad5 an Nickel-Sepharose zu binden. Nach Inkubation mit HEK293-Zelllysat und Elution durch Imidazol wurden die erhaltenen Fraktionen ebenfalls in Western-Blot-Analysen untersucht (**Abbildung 39B**). Durch His₆-SUMO-Smad5 wurde endogenes Cyp57 aus HEK293-Zellen, im Vergleich zum Kontrollprotein His₆-SUMO, deutlich angereichert. Damit wurde die physische Interaktion von Cyp57 mit Smad5 auf Proteinebene bestätigt.

Daneben wurde versucht, Smad5 gemeinsam mit Cyp57-*Strep* aus HEK293-Zellen zu präzipitieren. Dazu wurden HEK293-Zellen, die Cyp57-*Strep* transient exprimierten, geerntet und lysiert. Das Zelllysat wurde auf eine Säule, die Streptactin-Sepharose enthielt, geladen. Nach gründlichem Waschen wurden die gebundenen Proteine mit D-Desthiobiotin eluiert und anschließend im Western-Blot mit Anti-Smad5- und Anti-Cyp57-Antikörper analysiert (**Abbildung 40**).

Smad5 wurde zusammen mit Cyp57-*Strep* deutlich an der Streptactin-Sepharose angereichert. Smad5 befand sich nur in der Elutionsfraktion von Cyp57-*Strep*. Es hatte nicht unspezifisch am Säulenmaterial gebunden. Somit konnte gezeigt werden, dass Cyp57 und Smad5 direkt im Zelllysat von HEK293-Zellen interagieren.

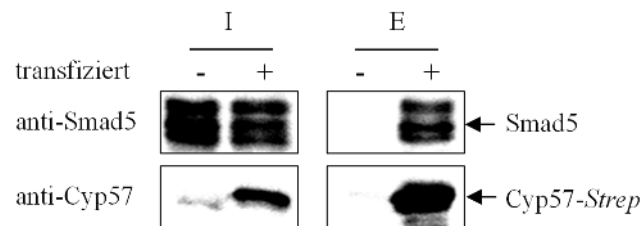


Abbildung 40: Western-Blot-Analyse der Ko-Präzipitation von Smad5 mit Cyp57-Strep aus HEK293-Zellen. HEK293-Zellen (4×10^7 Zellen) wurden mit pE-Cyp57 transfiziert und nach 48 h geerntet. Transfizierte und nicht-transfizierte HEK293-Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen und jeweils mit dem ÄKTAprime System über eine Säule mit Streptactin-Sepharose (Säulenvolumen: 1 ml) gereinigt. Die Elutionsfraktionen (E) der transfizierten und nicht-transfizierten Zellen wurden zusammen mit dem Gesamt-Zelllysat (I) im Western-Blot mit Anti-Cyp57- und Anti-Smad5-Antikörper untersucht.

Mittels der Untersuchung der Lokalisation beider Proteine in humanen Zellen wurde analysiert, ob sie unter bestimmten Bedingungen auch im zellulären Kontext in räumlicher Nähe zueinander gelangen können und so die Voraussetzung für eine Interaktion in humanen Zellen gegeben ist.

Um dies zu analysieren, wurden Lokalisationsstudien mit Cyp57-eGFP in HEK293-Zellen mit Hilfe konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie durchgeführt. Dazu wurden HEK293-Zellen, die transient Cyp57-eGFP exprimierten, 5 h in nährstoffarmen Medium kultiviert, fixiert, permeabilisiert und mit Fluoreszenzfarbstoff und Anti-Smad5-Antikörper inkubiert (**Abbildung 41**). Im Vergleich dazu wurden entsprechende Zellen vor der Fixierung ebenfalls 5 h in nährstoffarmen Medium kultiviert und anschließend für 40 min mit 10 nM BMP-2 behandelt.

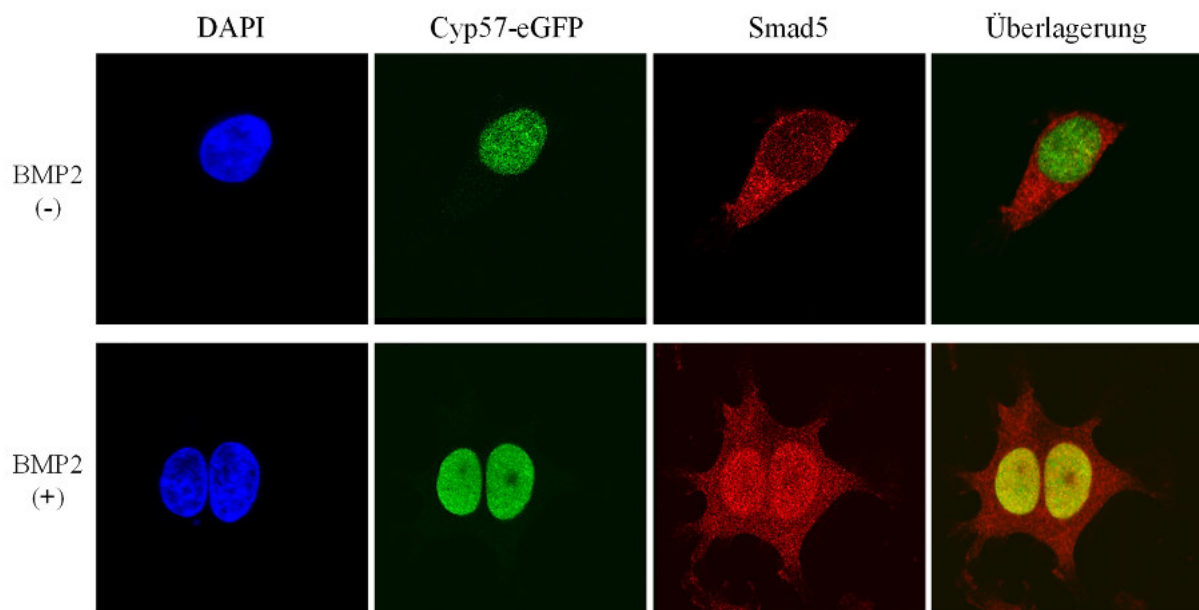


Abbildung 41: Smad5 Lokalisation ohne und mit BMP-2 Stimulation. HEK293-Zellen wurden mit pEGFP-N3_Cyp57 transient transfiziert und in IBIDI-Kavitäten kultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen 5 h in Medium mit 0.5% FKS kultiviert. Vor den mikroskopischen Aufnahmen wurden die Zellen mit 10 nM BMP-2 für 40 min behandelt (+). Dann wurden die Zellen mit Anti-Smad5-Antikörper inkubiert und die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt. Anschließend wurden Bilder mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop D-Eclipse C1 Si (Nikon) erstellt.

Wie bereits beschrieben, lokalisierte Cyp57-eGFP im Zellkern, dabei war es ohne Einfluss, ob die Zellen vorher mit BMP-2 behandelt worden waren. Bei HEK293-Zellen, die nicht mit BMP-2 behandelt worden waren, zeigte sich, dass Smad5 fast ausschließlich im Cytoplasma nachgewiesen wurde (**Abbildung 41**). HEK293-Zellen, die mit dem Wachstumsfaktor BMP-2 behandelt wurden, wiesen eine dazu veränderte Lokalisation von Smad5 auf. Smad5 war sowohl im Cytoplasma, als auch im Zellkern lokalisiert, wobei die Lokalisation im Zellkern deutlich bevorzugt auftrat.

Es ist bekannt, dass BMP-2 eine Signalkaskade in Zellen auslöst, die zur Phosphorylierung und zum Kerntransport des Transkriptionsfaktors Smad5 führt (Massagué *et al.*, 2005). Bei der Überlagerung der Cyp57-eGFP/ Smad5-Immunfluoreszenz zeigte sich in BMP-2 induzierten HEK293-Zellen eine deutliche Ko-Lokalisation beider Proteine im Kern. Dies deutet auf eine mögliche Interaktion der beiden Proteine in diesem Kompartiment hin.

3.10.2 Smad5-Binderegion in Cyp57

Um die Binderegion von Smad5 in Cyp57 näher einzugrenzen, wurde His₆-SUMO-Cyp57, die N-terminale PPIase-Domäne von Cyp57, His₆-SUMO-Cyp57₁₋₂₀₃ sowie die C-terminale RRM-Lys-Domäne His₆-SUMO-Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ hinsichtlich einer Interaktion mit endogenem Smad5 aus HEK293-Zelllysats untersucht. Hierzu wurde eine 1 ml HisTrap HP-Säule entweder mit His₆-SUMO-Cyp57, His₆-SUMO-Cyp57₁₋₂₀₃ oder His₆-SUMO-Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ *E. coli*-Lysat beladen, mit Präzipitationspuffer II gespült und mit HEK293-Zelllysats inkubiert. Nach gründlichem Waschen mit Präzipitationspuffer II wurde mit Imidazol eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden in einer Western-Blot-Analyse mit Anti-Smad5-Antikörper untersucht (**Abbildung 42**).

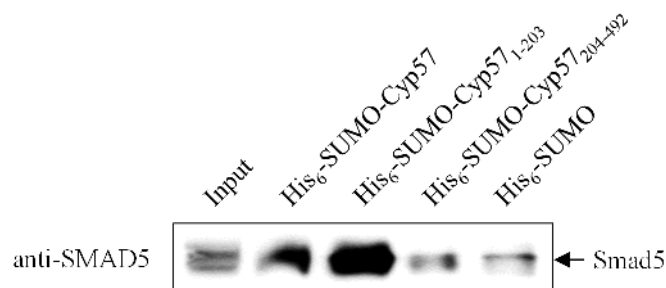


Abbildung 42: Interaktion von Smad5 mit verschiedenen His₆-SUMO-Cyp57-Varianten. Eine HisTrap HP-Säule (Säulenvolumen: 1 ml) wurde mit His₆-SUMO-Cyp57, His₆-SUMO-Cyp57₁₋₂₀₃, His₆-SUMO-Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ oder His₆-SUMO, als Kontrolle, beladen. Dann mit HEK293-Zelllysats inkubiert und anschließend mit 500 mM Imidazol eluiert. Der Input und die Elutionsfraktionen wurden mit Anti-Smad5-Antikörper im Western-Blot analysiert.

Die mit His₆-SUMO fusionierten Proteine Cyp57 und Cyp57₁₋₂₀₃ (PPIase-Domäne) führten zu einer deutlichen Anreicherung von Smad5. Dem gegenüber war für das Kontrollprotein His₆-SUMO und die C-terminale RRM-Domäne Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ nur eine geringfügige Menge an gebundenem Smad5 nachweisbar. Dies weist darauf hin, dass die Interaktion zwischen Cyp57 und Smad5 durch die PPIase-Domäne von Cyp57 vermittelt wird und die C-terminale RRM-Lys-Domäne nicht zu dieser Interaktion beiträgt.

Außerdem wurde der Einfluss des immunsuppressiven Cyclophilin-Inhibitors CsA auf die Cyp57-Smad5-Interaktion untersucht. In Bindungsexperimenten in Gegenwart verschiedener CsA-Konzentrationen wurde die Interaktion von rekombinant in *E. coli* hergestelltem His₆-SUMO-Cyp57

und His₆-SUMO-Cyp57₁₋₂₀₃ mit endogenem Smad5 aus HEK293-Zellysate untersucht. Die Fraktionen der Elution wurden in Western-Blot-Analysen mit Anti-Smad5-Antikörper analysiert (**Abbildung 43**). In Abhängigkeit von der CsA-Konzentration nahm die Bindung von Smad5 an Cyp57 (**Abbildung 43A**) und Cyp57₁₋₂₀₃ leicht ab (**Abbildung 43B**). Jedoch konnte die Bindung an das Volllängeprotein und an die Domäne auch bei einer CsA-Konzentration von 5 μM und der Vorinkubation mit CsA über 1 h nicht vollständig verhindert werden. Diese Daten zeigen, dass die Smad5-Cyp57-Interaktion nicht durch CsA in den verwendeten Konzentrationen blockiert werden konnte. Die durch PPIase-Messungen ermittelte schwache Affinität von Cyp57 zu CsA mit einem IC₅₀-Wert von etwa 6 μM macht wahrscheinlich, dass die verwendeten CsA-Konzentrationen zu gering waren, um eine Bindung des Interaktionspartners im aktiven Zentrum von Cyp57 unterbinden zu können. Höhere Konzentrationen an CsA konnten wegen seiner geringen Löslichkeit in wässrigen Lösungen nicht eingesetzt werden.

Außerdem wurde der Einfluss eines Liganden der RRM-Lys-Domäne auf die Cyp57-Smad5-Interaktion untersucht. Da HEK293-Zellysate in diesem Versuch eingesetzt wurden, die eine hohe Ribonuklease-Aktivität besitzen, musste auf die Verwendung von kurzen RNA-Oligonukleotiden als Ligand verzichtet werden. Heparin kann aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Nucleinsäuren, als Ersatz für RNA-Oligonukleotide verwendet werden. Deshalb wurde die Bindung von endogenem Smad5 aus HEK293-Zellysate an His₆-SUMO-Cyp57 in Gegenwart von Heparin analysiert. In der folgenden Western-Blot-Analyse zeigte sich, dass die Bindung von Smad5 an das Volllängeprotein Cyp57 völlig verloren geht (**Abbildung 43C und D**). Als Kontrolle für eine Beteiligung der RRM-Domäne wurde in einem Experiment nur die PPIase-Domäne Cyp57₁₋₂₀₃ eingesetzt. Hier wurde auch in Gegenwart von Heparin die Interaktion zwischen Cyp57₁₋₂₀₃ und Smad5 deutlich herabgesetzt. Der inhibitorische Einfluss von Heparin auf die Protein-Protein-Interaktion scheint nicht durch spezifische Bindung des Nucleinsäure-Analogons an den RNA-bindenden Bereich von Cyp57 verursacht zu werden. Möglicherweise interagiert Smad5 mit seiner DNA-bindenden Domäne mit Heparin, wodurch die Bindung des Proteins an Cyp57 gestört wird (Pardali *et al.*, 2000).

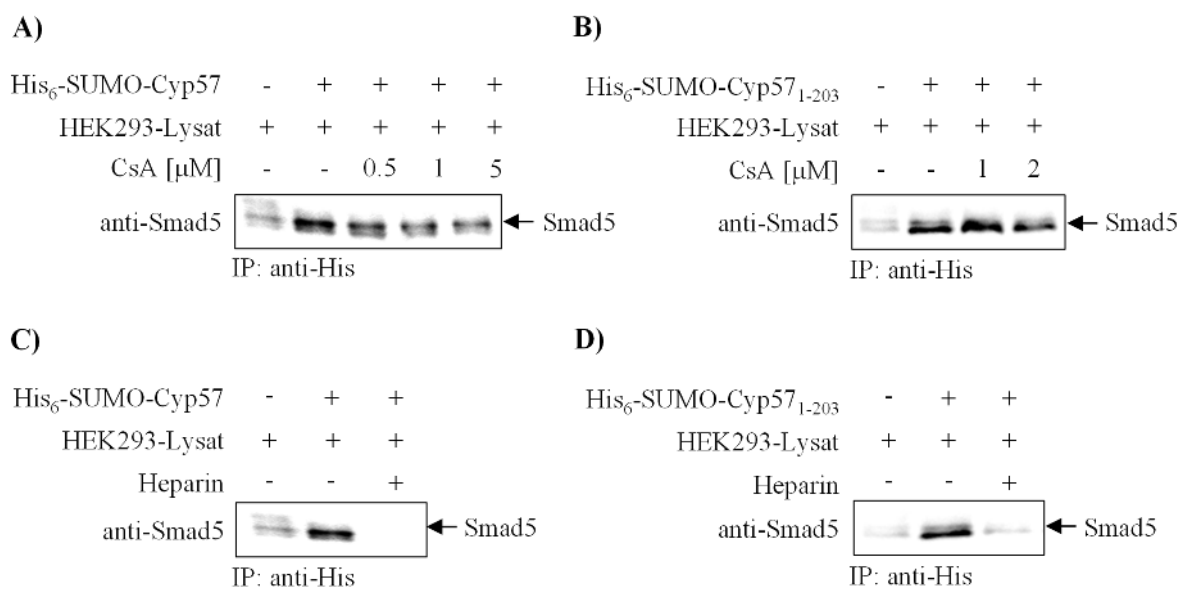


Abbildung 43: Interaktionsstudien von Smad5 und Cyp57 in Gegenwart von CsA oder Heparin. A) und C) 50 μg His₆-SUMO-Cyp57 und HEK293-Zellysate wurden separat mit den angegebenen CsA-Konzentrationen oder Heparin (2 mg ml⁻¹) für 1 h bei 4°C vorinkubiert. Dann wurde das HEK293-Zellysate und His₆-SUMO-Cyp57 für 4 h bei 4°C gemixt. Anschließend wurde Ni-NTA-Sepharose zum Mix für 1 h (4°C) gegeben. Gebundenes Material wurde mit 500 mM Imidazol eluiert und im Western-Blot mit Anti-Smad5-Antikörper analysiert. B) und D) wie bei A und C, abweichend wurde hier His₆-SUMO-Cyp57₁₋₂₀₃ verwendet.

3.10.3 Wechselwirkung von Cyp57 mit CHERP

Neben Smad5 ist noch ein weiteres Protein als möglicher Interaktionspartner von Cyp57 in den Interaktionsdatenbanken MINT (Licata *et al.*, 2012) und STRING (Jensen *et al.*, 2009) beschrieben. CHERP wurde als weiteres Kandidatenprotein für die Interaktion mit Cyp57 im Hefe-2-Hybrid-System bei der Untersuchung von Komponenten des Spliceosoms ermittelt (Hegele *et al.*, 2012).

CHERP wird als Kernprotein beschrieben, dass mit SR-Proteinen interagiert (Lin-Moshier *et al.*, 2013). Strukturelle Daten legen nahe, dass CHERP mit seiner SR-Domäne am humanen Spliceosom und mit seiner CTD-bindende Domäne an der RNA-Polymerase II binden kann.

Um die Cyp57-CHERP-Interaktion *in vitro* zu untersuchen, wurden die Proben der Interaktionsexperimente mit verschiedenen in *E. coli* rekombinant erzeugten His₆-SUMO-Cyp57-Varianten, wie oben beschrieben, im Western-Blot analysiert (Abbildung 44).

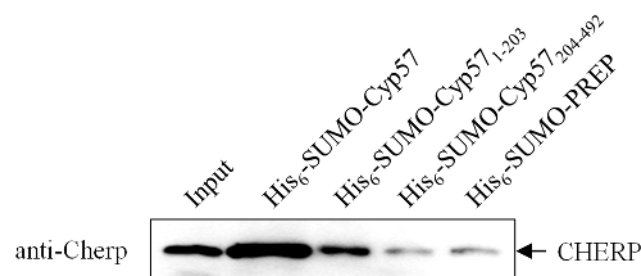


Abbildung 44: Interaktionsstudien von CHERP mit verschiedenen His₆-SUMO-Cyp57-Varianten. Eine 1 ml HisTrap HP-Säule wurde mit einer der His₆-SUMO-Cyp57-Varianten oder His₆-SUMO-PREP, als Kontrolle, beladen. Dann mit HEK293-Zelllysat inkubiert und anschließend mit 500 mM Imidazol eluiert. Der Input und die Elutionsfraktionen wurden mit Anti-CHERP-Antikörper im Western-Blot analysiert.

Hierbei wurde eine Wechselwirkung von CHERP mit dem Volllängenprotein Cyp57 beobachtet. CHERP interagiert mit der PPIase-Domäne Cyp57¹⁻²⁰³, wie der Vergleich der Menge an gebundenem CHERP gegenüber der verwendeten Kontrolle His₆-SUMO-PREP verdeutlichte. Dagegen war keine Bindung von CHERP an die RRM-Lys-Domäne Cyp57²⁰⁴⁻⁴⁹² erkennbar.

Zusätzlich wurde untersucht, ob CHERP als möglicher Interaktionspartner bei der Isolierung von Cyp57-*Strep* aus HEK293-Zellen ko-präzipitiert wird. Dazu wurden ca. 4×10^7 transfizierte HEK293-Zellen, die Cyp57-*Strep* transient exprimierten, geerntet und lysiert. Das Zelllysat wurde auf eine Säule, die Streptactin-Sepharose enthält, geladen. Nach gründlichem Waschen wurden die gebundenen Proteine mit D-Desthiobiotin eluiert und im Western-Blot mit Anti-Cyp57- und Anti-CHERP-Antikörper analysiert (Abbildung 45).

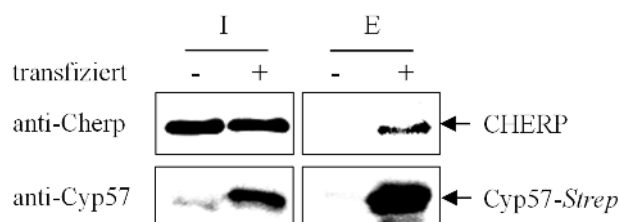


Abbildung 45: Western-Blot-Analyse der Ko-Präzipitation von CHERP mit Cyp57-*Strep* aus HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit pE-Cyp57 transfiziert und nach 48 h wurden 4×10^7 Zellen geerntet. Transfizierte und nicht-transfizierte Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen. Das Zelllysat wurde auf eine 1 ml Streptactin-Sepharose Säule geladen, gespült und mit D-Desthiobiotin eluiert. Die Elutionsfraktionen (E) der transfizierten (+) und nicht-transfizierten (-) Zellen wurden zusammen mit dem Gesamt-Zelllysat (I) im Western-Blot mit Anti-Cyp57- und Anti-CHERP-Antikörper untersucht.

Es zeigte sich, dass CHERP gemeinsam mit rekombinantem Cyp57-*Strep* durch die Streptactin-Affinitätsmatrix angereichert wurde, es befand sich in der Elutionsfraktion von Cyp57. Wie in der Kontrolle mit nicht-transfizierten HEK293-Zellen ersichtlich wurde, hatte CHERP nicht unspezifisch am Säulenmaterial gebunden, sondern wurde nur in der Elutionsfraktion detektiert, wenn Cyp57-*Strep* zugegen war.

Außerdem wurde auch hier der Einfluss des immunsuppressiven Cyclophilin-Inhibitors CsA auf die Cyp57-CHERP-Interaktion analysiert. Dazu wurden Interaktionsanalysen in Gegenwart verschiedener CsA-Konzentrationen durchgeführt. Die gebundene CHERP-Menge wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht (**Abbildung 46A und B**). Es wurde deutlich, dass die an Cyp57 gebundene CHERP-Menge erst ab einer CsA-Konzentration von 5 μM verringert wurde. Bei niedrigeren Konzentrationen war kein Einfluss auf die Interaktion detektierbar (**Abbildung 46A**). Dagegen war die Bindung von CHERP an Cyp57₁₋₂₀₃ schon bei einer CsA-Konzentration von 1 μM verringert. Jedoch konnte auch hier die Cyp57-CHERP-Interaktion nicht vollständig durch CsA mit Konzentrationen bis 2 μM verhindert werden (**Abbildung 46B**).

Zudem wurde der Einfluss von Heparin auf die Cyp57-CHERP-Interaktion untersucht. Dazu wurden Ko-Präzipitationsversuche von His₆-SUMO-Cyp57 mit endogenem CHERP aus HEK293-Zelllysat in Gegenwart von Heparin durchgeführt. In der folgenden Western-Blot-Analyse wurde deutlich, dass die Bindung von CHERP an das Volllängenprotein Cyp57 verringert war, aber nicht vollständig verloren geht (**Abbildung 46C**). Als Kontrolle für eine Beteiligung der RRM-Domäne wurde nur die PPIase-Domäne Cyp57₁₋₂₀₃ eingesetzt (**Abbildung 46D**). Ebenso wurde in Gegenwart von Heparin die Interaktion zwischen Cyp57₁₋₂₀₃ und CHERP herabgesetzt. Scheinbar handelt es sich auch hier nicht um einen Einfluss des Nukleinsäure-Analogons durch die spezifische Bindung an Cyp57. CHERP besitzt keine Nukleinsäure-bindende-Domäne, vermutlich ist daher der Einfluss von Heparin auf die Interaktion mit Cyp57 geringer als bei Smad5.

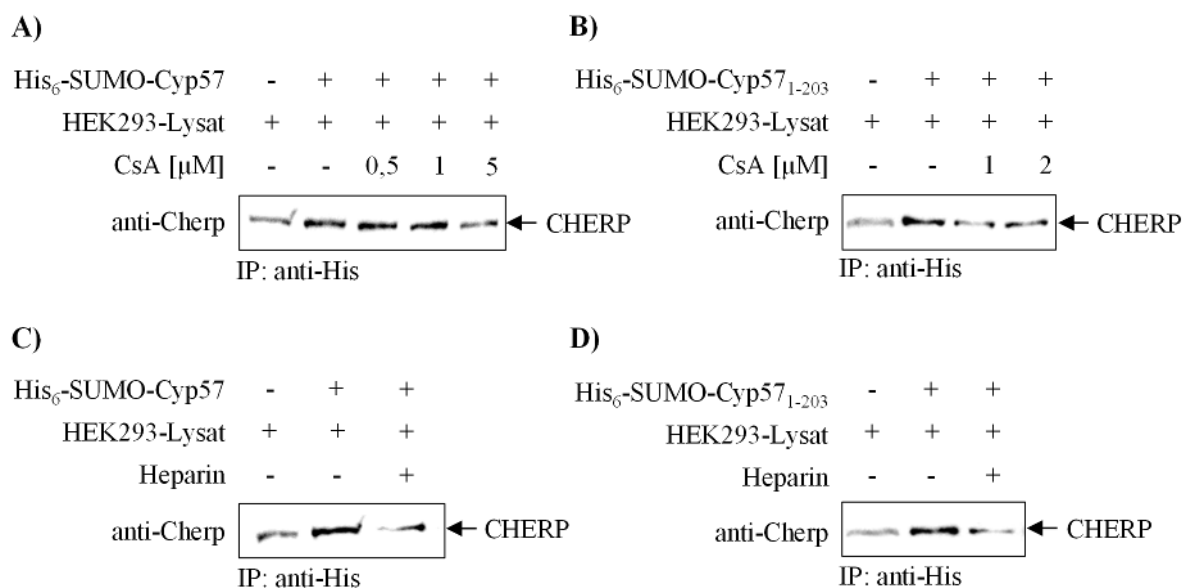


Abbildung 46: Interaktionsstudien von CHERP und Cyp57 in Gegenwart von CsA oder Heparin. A) und C) 50 μg His₆-SUMO-Cyp57 und HEK293-Zelllysat wurden separat mit den angegebenen CsA-Konzentrationen oder Heparin (2 mg ml⁻¹) für 1 h bei 4°C vorinkubiert. Dann wurde das HEK293-Zelllysat und His₆-SUMO-Cyp57 für 4 h bei 4°C gemixt. Anschließend wurde Ni-NTA-Sepharose zum Mix für 1 h (4°C) gegeben. Gebundenes Material wurde mit 500 mM Imidazol eluiert und im Western-Blot mit Anti-CHERP-Antikörper analysiert. B) und D) wie bei A und C, abweichend wurde hier His₆-SUMO-Cyp57₁₋₂₀₃ verwendet.

Daraufhin wurde untersucht, ob CHERP und Cyp57 aufgrund ihrer intrazellulären Lokalisationen räumlich dazu in der Lage sind, auch *in vivo* miteinander zu interagieren. Dazu wurden HEK293-Zellen transient mit pEGFP-N3_Cyp57 transfiziert, fixiert, permeabilisiert und mit Fluoreszenzfarbstoff und Anti-CHERP-Antikörper analysiert. Dann wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie Aufnahmen von den Zellen erstellt.

Die konfokalen Bilder zeigten, dass Cyp57-eGFP in Substrukturen des Zellkerns lokalisiert ist (**Abbildung 47**). Die Immunfluoreszenzfärbung von endogenem CHERP zeigte ebenfalls eine dem Cyp57 ähnliche Verteilung im Zellkern. Bei der Überlagerung der Cyp57-eGFP/ CHERP-Immunfluoreszenz zeigte sich eine deutliche Ko-Lokalisation beider Proteine im Kern. Dies deutet auf eine mögliche Interaktion der beiden Proteine in HEK293-Zellen hin.

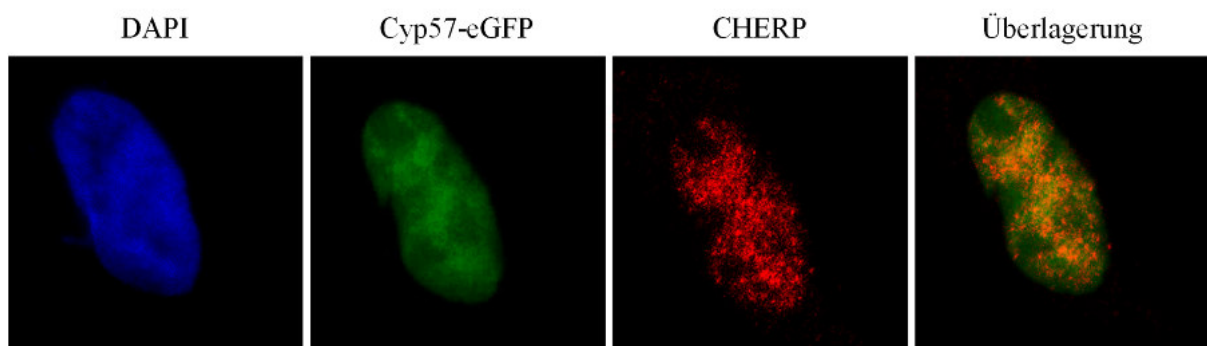


Abbildung 47: Lokalisationsstudie von CHERP und Cyp57-eGFP in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit pEGFP-N3_Cyp57 transfiziert und in IBIDI-Kavitäten kultiviert. Für die konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Dann wurden die Zellen mit Anti-CHERP-Antikörper inkubiert und die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt. Anschließend wurden Bilder mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop D-Eclipse C1 Si (Nikon) erstellt.

Um zu untersuchen, ob Cyp57 und dessen Überexpression die Lokalisation von CHERP beeinflusst, wurde auch die Lokalisierung von endogenem CHERP in HEK293-Zellen ohne Cyp57-Überexpression untersucht. In diesen Zellen wurden jedoch im Vergleich zu Zellen, die Cyp57-eGFP exprimierten, keine Unterschiede in der CHERP-Lokalisierung im Zellkern gefunden (**Abbildung 62**, siehe Anhang). Es wurde bereits von Lin-Moshier *et al.*, (2013) gezeigt, dass CHERP mit dem Splicing-Faktor SC35 in *nuclear speckles* ko-lokalisiert. In diesem Zusammenhang wurde analysiert, ob Cyp57 ebenfalls mit SC35 in *nuclear speckles* ko-lokalisiert ist (**Abbildung 48**). Dazu wurden HEK293-Zellen transient mit pEGFP-N3_Cyp57 transfiziert, fixiert, permeabilisiert, mit Fluoreszenzfarbstoff gefärbt und Anti-pSC35-Antikörper inkubiert. Dann wurden mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie Aufnahmen von den Zellen erstellt. Es wurde deutlich, dass einige Bereiche im Zellkern eine schwache Ko-Lokalisierung von SC35 und Cyp57-eGFP aufwiesen (**Abbildung 48**). Dagegen konnte keine Ko-Lokalisation zwischen Cyp57-eGFP und *Cajal*-Körpern nachgewiesen werden. Fibrillarin wurde als charakteristisches Markerprotein der *Cajal*-Körper zur Identifizierung verwendet (**Abbildung 61**, siehe Anhang).

Da bekannt ist, dass in *nuclear speckles* Splicing-Faktoren lokalisiert sind und sich nach Inhibition der Transkription dort anreichern (Fu, 1995), wurde untersucht, ob sich Cyp57 nach der Inhibition der Transkription ähnlich zu Splicing-Faktoren verhält. In Zellen die mit einem RNA-Polymerase II Inhibitor, wie 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB) behandelt werden, ändert sich die Morphologie der *nuclear speckles* und es bilden sich Cluster, in denen sich Komponenten des Splicing-Komplexes sammeln (Spector, 1993; Spector & Lamond, 2011). Es zeigte sich, dass Cyp57 wie auch CHERP in DRB-induzierten HEK293-Zellen, in vergrößerten Clustern, die SC35 enthalten angereichert wurden (**Abbildung 48**, DRB (+) und **Abbildung 63**, siehe Anhang).

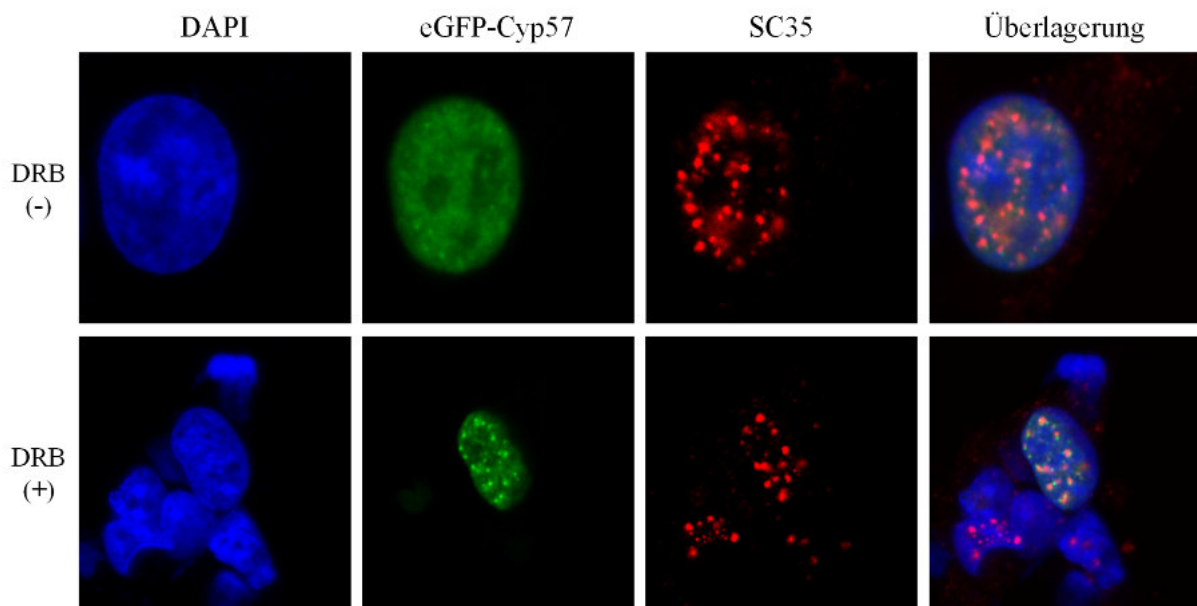


Abbildung 48: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Cyp57-eGFP in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden transient mit pEGFP-N3_Cyp57 transfiziert. Vor den konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden die Zellen für 2 h mit 100 μ M DRB (+) behandelt. Die Zellen wurden mit dem Anti-pSC35-Antikörper inkubiert und die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt. Anschließend wurden Bilder mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop D-Eclipse C1 Si (Nikon) erstellt.

3.10.4 Zelluläre Lokalisation von Smad5 und CHERP in HEK293-Zellen

Neben den Ko-Lokalisierungsstudien mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie wurde auch die subzelluläre Verteilung von Smad5 und CHERP durch differentielle Zentrifugation untersucht (**Abbildung 49**). Dafür wurde Zelllysat von HEK293-Zellen durch differentielle Zentrifugation in verschiedene Fraktionen aufgeteilt. Nach der Homogenisierung der Zellen wurden die Zellkerne durch Zentrifugation bei 600 x g abgetrennt. Im entstandenen Pellet P_{0.6} befanden sich hauptsächlich Kernproteine, wie durch das Markerprotein Histon H3 angezeigt wurde. Durch die erneute Zentrifugation des Überstandes bei 10 000 x g wurden ER-Membranen pelletiert und befanden sich im entstandenen Pellet P₁₀. In diesem Pellet war das ER-typische Protein Calnexin nachweisbar. Die weitere Fraktionierung des verbliebenen Überstandes durch Zentrifugation bei 100 000 x g resultierte in der Pelletierung von weiteren Zellmembranen mit dem Pellet P₁₀₀ unter Zurücklassen der löslichen cytosolischen Proteine im Überstand S₁₀₀. Im Überstand war nur noch das cytosolische Protein GAPDH nachweisbar. Die erhaltenen Zellfraktionen wurden mit Anti-Smad5- und Anti-CHERP-Antikörper in Western-Blot-Analysen untersucht (**Abbildung 49**).

Smad5 verhielt sich bei der Zellfraktionierung zu keinem der Markerproteine ähnlich. Es wurde in dem Überstand S₁₀₀, in dem sich die cytosolischen Proteine, als auch im Pellet P_{0.6} und Pellet P₁₀, in denen sich Kernproteine befanden, gefunden. Demzufolge war Smad5 im Cytosol lokalisiert, aber auch im Zellkern aufzufinden.

CHERP verhielt sich bei der Zellfraktionierung ähnlich zu Smad5. Es war hauptsächlich im Pellet P_{0.6} aufzufinden. Jedoch wurde auch eine schwache Bande im S₁₀₀ detektiert. CHERP war also überwiegend im Zellkern lokalisiert aber auch im Cytoplasma anzutreffen.

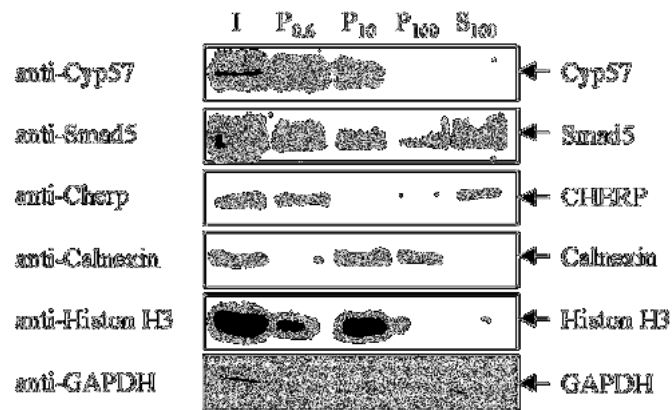


Abbildung 49: Differentielle Zentrifugation von HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden homogenisiert und durch differentielle Zentrifugation bei 4°C fraktioniert. Die Pellets der verschiedenen Fraktionen: 600 x g (P_{0.6}), 10 000 x g (P₁₀), 100 000 x g (P₁₀₀) und der finale Überstand von 100 000 x g (S₁₀₀) wurden im Western-Blot mit spezifischem Anti-Cyp57-, Anti-CHERP-, Anti-Smad5-, Anti-Calnexin-, Anti-Histon H3- und Anti-GAPDH-Antikörper analysiert.

4. Diskussion

Das für Cyp57 kodierende Gen PPIL4 wurde erstmals 2001 in einer cDNA-Bibliothek vom humanen fötalen Gehirn entdeckt (Zeng *et al.*, 2001). Eine Sequenzanalyse des putativen Proteins ergab, dass das von PPIL4 codierende Protein einen Aminosäureabschnitt besitzt, der homolog zu anderen Cyclophilinen ist. Das 492 Reste umfassende Cyp57 besitzt eine konservierte PPIase-Domäne, die N-terminal gelegen die Aminosäuren 1-161 umfasst. C-terminal davon befinden sich von einer Linker-Region getrennt, eine RNA-bindende-Domäne, ein bipartite-Kernlokalisierungssignal sowie eine Lysinreiche Region. Bisher ist nur wenig über das Multidomänen-Cyclophilin Cyp57 bekannt. Aus diesem Grund wurde der Fokus dieser Arbeit auf die Charakterisierung der proteinbiochemischen Eigenschaften von Cyp57 gelegt. Dafür musste das Volllängeprotein zunächst rekombinant in *E. coli* hergestellt und gereinigt werden.

4.1 Charakterisierung von Cyp57

Obwohl verschiedene Methoden bekannt sind, große Proteine (> 50 kDa) in *E. coli* herzustellen, stellte sich die lösliche Expression des Multidomänen-Cyclophilins Cyp57 als schwierig heraus. Erst die Kombination von mehreren Methoden zur Verbesserung der Expression und der Löslichkeit von Proteinen ermöglichte die lösliche Expression und anschließende Reinigung von rekombinantem Cyp57 unter nativen Bedingungen (**Abbildung 8B**). So wurde der *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3) pLysS verwendet, der zusätzliche tRNAs für sechs seltene Codons besitzt, die häufig in humanen Proteinen auftreten, wodurch die Ausbeuten der Proteinexpression gesteigert werden können (Novy *et al.*, 2001). Außerdem wurde das SUMO-Fusionssystem verwendet, das eine native Faltung von Proteinen begünstigt. Diese Methode wurde mit der Anzucht bei niedrigen Temperaturen kombiniert. Unter diesen Bedingungen war es möglich, dass Cyp57 löslich exprimiert wurde. Ein zusätzlicher Vorteil des SUMO-Fusionssystems ist der Erhalt des natürlichen N-Terminus (Malakhov *et al.*, 2004) von Cyp57. Trotz des SUMO-Fusionssystems war die Ausbeute von rekombinantem Cyp57 mit ca. 4 mg Protein aus 6 l *E. coli*-Kultur gering. Durch den Einsatz verschiedener stabilisierender Substanzen und Pufferbedingungen während der Reinigung konnte die Ausbeute nicht erhöht werden.

Zur Aufklärung der Organisation der Domänen von Cyp57 wurden die Domänengrenzen der PPIase-Domäne und der RRM-Domäne genau bestimmt. Eine generelle Methode zur Identifizierung von Domänen als konservierte Teile der Polypeptidkette, die funktional und in ihrer Faltungsstruktur unabhängig von benachbarten Abschnitten innerhalb von Proteinen existieren können, ist die limitierte Proteolyse. Durch limitierte Proteolyse werden Bereiche in der Polypeptidkette mit einer erhöhten Flexibilität spezifisch hydrolisiert, während die Bereiche, die eine globuläre Einheit bilden, nicht angegriffen werden (Fontana *et al.*, 2004). Die limitierte Proteolyse von Cyp57 mit der Serinprotease Trypsin resultierte in mehreren Fragmenten (**Abbildung 10**). Nach der chromatographischen Trennung und folgender massenspektrometrischer Analyse konnte ein Fragment dem N-terminalen Teil des Proteins und damit der PPIase-Domäne (Cyp57₁₋₂₀₃) von Cyp57 zugeordnet werden. Dem anderen Bereich des Proteins konnte weder mittels SDS-PAGE noch Massenspektrometrie ein Fragment zugeordnet werden. Aus diesem Grund wurde mit dem restlichen Protein C-terminal der Spaltstelle als RRM-Domäne (Cyp57₂₀₄₋₄₉₂) weitergearbeitet. Typischerweise umfasst die RRM-Domäne rund 90 Aminosäuren mit zwei konservierten Sequenzabschnitten RNP1 und RNP2 (Maris *et al.*, 2005) (**Abbildung 50**). In diesen Regionen befinden sich meistens drei konservierte aromatische Aminosäuren, die wichtig für die RRM-RNA-Bindung sind (Daubner *et al.*, 2013). Am Beispiel der limitierten Proteolyse von TLS zeigt sich, dass jede RRM-Domäne, unabhängig von den anderen Domänen, allein stabil ist (Iko *et al.*, 2004).

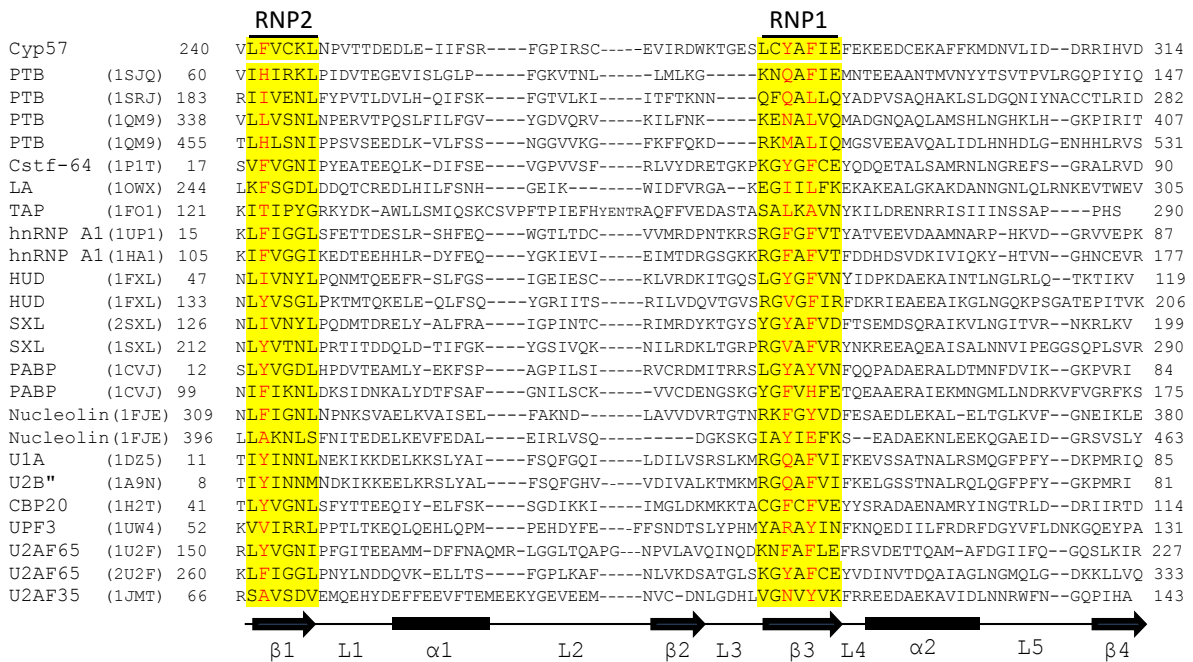


Abbildung 50: Sequenz-Alignment von RRM-Domänen. Gezeigt ist eine Auswahl von RRM-Domänen deren Struktur gelöst wurde im Vergleich zur RRM-Domäne von Cyp57. In Klammern sind die PDB-IDs angegeben. Das Alignment wurde mit dem Programm CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) erstellt. Die konservierten Sequenzabschnitte RNP2 und RNP1 sind gelb hinterlegt. Die aromatischen Aminosäuren die für die RNA-Bindung wichtig sind wurden rot markiert. Unter dem Alignment ist schematisch die Struktur dargestellt mit β -Faltblättern (β 1-4), Loop-Regionen (L1-5) und α -Helices (α 1-2). Abbildung nach Maris *et al.*, (2005).

Die ermittelten Grenzen für die PPIase-Domäne weichen deutlich von den hinterlegten Grenzen der UniProtKB-Datenbank für die PPIase-Domäne (AS 1-161) ab. Dementsprechend umfasst die experimentell bestimmte stabile Domäne, die die PPIase-Domäne enthält, mit 203 Aminosäuren zusätzlich 42 Reste. Mit dem Programm Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015) wurde die Sekundärstruktur für Cyp57₁₋₂₀₃ vorhergesagt (Abbildung 64, siehe Anhang). Für die 42 zusätzlichen Reste wurde eine flexible Loop-Region gefolgt von zwei α -Helices modelliert.

Die Analyse mit dem Programm Peptidcutter (ExpASY, Artimo *et al.*, 2012) ergab für Cyp57 über 80 gleichmäßig über alle Bereiche des Proteins verteilte Trypsin-Schnittstellen, von denen über 50% mit einer 100%igen Wahrscheinlichkeit hydrolysiert werden können. Cyp57 wurde mit hoher Wahrscheinlichkeit zwischen Arginin 203 und Serin 204 von Trypsin hydrolysiert. Das ergab zum einen die *in silico* Analyse und zum anderen wurde ein Peptid mittels ESI-MS gefunden, das dem neu entstandenen C-Terminus der PPIase-Domäne entspricht (Abbildung 51).

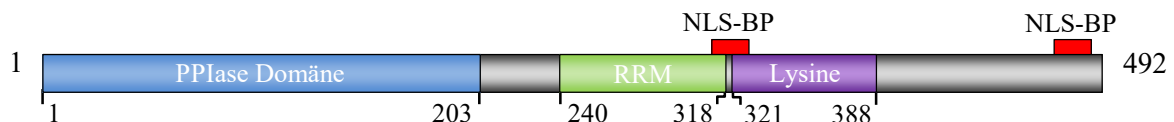


Abbildung 51: Ermittelte Domänenstruktur von Cyp57. Experimentell bestimmte Domänengrenzen von Cyp57. Ermittelt durch molekulare Massenbestimmung mittels RP-HPLC/ ESI-MS und *de novo* Peptidsequenzierung.

Zur weiteren funktionalen Untersuchung wurden die individuellen Cyp57-Fragmente kloniert, exprimiert und gereinigt. Während Cyp57₁₋₁₆₁ nicht löslich exprimierbar war, konnte Cyp57₁₋₂₀₃ als lösliches Protein gewonnen werden.

Die anschließende Untersuchung der Sekundärstrukturmerkmale von Cyp57 und von den Cyp57-Varianten durch Fern-UV CD-Spektroskopie bestätigt die Ausbildung von Sekundärstrukturelementen in den rekombinant exprimierten Proteinen (**Abbildung 13** und **14**). Das Fern-UV CD-Spektrum der PPIase-Domäne Cyp57₁₋₂₀₃ ähnelt dabei stark dem der prototypischen PPIase Cyp18 (**Abbildung 21B**). Charakteristisch für die Struktur der PPIase-Domäne von Cyclophilinen ist ein geschlossenes β -Fass, um das zwei α -Helices angeordnet sind. Da beide Proteine ein ähnliches Fern-UV CD-Spektrum besitzen, kann eine korrekte Ausbildung der Sekundärstrukturelemente der PPIase-Domäne von Cyp57 angenommen werden.

Dagegen unterscheidet sich das Fern-UV CD-Spektrum des Volllängenproteins Cyp57 von dem anderer Multidomänen-Cyclophiline, wie Cyp40 und Cyp58 deutlich (Pirkl & Buchner, 2001; Träger, 2015). Diese beiden Cyclophiline besitzen neben der PPIase-Domäne zusätzliche funktionale Domänen, die sich von denen in Cyp57 unterscheiden. Cyp40 hat eine TPR-Domäne bestehend aus drei TPR-Motiven, worüber es Hsp90 und Hsc70 bindet (Carrello *et al.*, 2004; Hoffmann & Handschumacher, 1995; Kieffer *et al.*, 1992). Cyp58 besitzt eine U-Box-Domäne, die eine E3-Ligase-Aktivität zeigte (Hatakeyama *et al.*, 2001). Diese funktional und strukturell nicht verwandten Domänen zusätzlichen zur PPIase-Domäne des jeweiligen Cyclophilins bilden wahrscheinlich die Ursache für die Unterschiede in den CD-Spektren der Multidomänen-Cyclophiline.

Die RRM-Domäne Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ zeigt ein ähnliches Fern-UV CD-Spektrum, wie es für andere RRM-Domänen bzw. RRM-Domänen enthaltende Proteine beschrieben ist. Es wies ein typisches absolutes Minimum bei ca. 205 nm auf (**Abbildung 14B**). Ähnliche Fern-UV CD-Spektren sind bereits für die dritte RRM-Domäne von Nucleolin (AS 486-560) (Manival *et al.*, 2001), für die RNA-bindenden Proteine AUF1 (AS 69-229) (DeMaria *et al.*, 1997) und TLS (AS 266-375) (Iko *et al.*, 2004) dargestellt. Das macht wahrscheinlich, dass die RRM-Domäne Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ in einer ähnlichen Struktur vorliegt, wie sie für andere RRM-Domänen beschrieben wurde. RRM-Domänen besitzen eine typische Faltung mit vier antiparallelen β -Faltblättern und zwei α -Helices die in einer $\beta 1 \alpha 1 \beta 2 \beta 3 \alpha 2 \beta 4$ -Topologie angeordnet sind (Maris *et al.*, 2005).

An dieser Stelle ist besonders herauszuheben, dass das CD-Spektrum des Volllängenproteins Cyp57 annähernd deckungsgleich zu der Summe der beiden CD-Spektren der einzelnen Domänen Cyp57₁₋₂₀₃ und Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ war (**Abbildung 15**). Daher ist davon auszugehen, dass das gemeinsame Vorliegen der beiden Domänen und ihre kovalenten Verknüpfung, wie sie im Volllängenprotein Cyp57 auftritt, die Sekundärstruktur der einzelnen Domänen nicht signifikant beeinflusst. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass Cyp57 aus zwei unabhängigen gefalteten Domänen zusammengesetzt ist, deren Struktur sich nicht gegenseitig beeinflusst.

Zudem wurde die Stabilität von Cyp57 durch thermische Denaturierung und in Gegenwart des Denaturierungsmittels Guanidiniumchlorid untersucht (**Abbildung 13**). Der Übergangsmittelpunkt der thermischen Denaturierung von Cyp57 bei 46°C ist vergleichbar mit denen anderer Multidomänen-Cyclophiline, wie Cyp54 (45°C) und Cyp58 (51°C) sowie vom prototypischen Cyp18 (46°C) (Davis *et al.*, 2010). Verglichen mit Cyp57 und Cyp18 war der Übergangsmittelpunkt der Denaturierung von Cyp57₁₋₂₀₃ um 6°C verringert (**Abbildung 57**, siehe Anhang). Wahrscheinlich trägt die veränderte Aminosäuresequenz der PPIase-Domäne Cyp57₁₋₂₀₃ im Vergleich zu Cyp18 zur Verringerung der thermischen Stabilität von Cyp57₁₋₂₀₃ bei.

Bei der Rückfaltung aus denaturierenden Bedingungen zeigten sich im CD-Spektrum von Cyp57₁₋₂₀₃ Veränderungen der Intensitäten der Minima im Vergleich zum Spektrum des Proteins vor der Denaturierung. Auch bei der Rückfaltung des Volllängenproteins kam es zu Veränderungen im

CD-Spektrum im Vergleich zum Spektrum des Proteins vor der Denaturierung, wobei sich das absolute Minimum um 2 nm verschob. Ebenso war nach der Rückfaltung der RRM-Domäne Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ eine Verschiebung des Minimums um 2 nm festzustellen (**Abbildung 13** und **14**). Da alle CD-Spektren von Cyp57 nach der Rückfaltung Unterschiede zu den CD-Spektren der nativen Proteine aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass die Proteine nach der Entfaltung nicht mehr ihre ursprüngliche Konformation einnehmen können. Daher war die Gleichgewichtsthermodynamische Analyse der Stabilität von Cyp57 und der erzeugten Varianten nicht möglich.

4.2 Cyp57 ist eine aktive PPIase

Cyclophiline gehören zur Enzymklasse der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen, die durch ihre Fähigkeit charakterisiert sind, die *cis/trans*-Isomersierung von Prolyl-Bindungen zu katalysieren (Fischer *et al.*, 1984). Allerdings konnte für die PPIase-Domäne von Cyp57 in einer NMR-basierten Untersuchung unter Benutzung der Tetrapeptid-Substrate Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA und Suc-Ala-Gly-Pro-Phe-pNA bisher noch keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden (Davis *et al.*, 2010). In dieser Arbeit wurde die enzymatische Aktivität von Cyp57 gegenüber verschiedenen Substraten mittels eines fluoreszenzbasierten PPIase-Aktivitäts-Assays detailliert untersucht.

Dieser Assay bietet den Vorteil einer hohen Sensitivität und ermöglicht die Untersuchung Protease-sensitiver PPIasen, da die Peptid-Proteolyse nicht wie bei der Analyse durch isomerspezifische Proteolyse nach Fischer *et al.*, (1984) an eine Hilfsprotease gekoppelt ist (Zoldák *et al.*, 2009). Im fluoreszenzbasierten PPIase-Assay wurde für Cyp57 eine katalytische Aktivität von $1.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ gegenüber dem Tetrapeptid-Substrat Abz-Ala-Met-Pro-Phe-pNA bestimmt. Damit besitzt Cyp57 nur eine geringe PPIase-Aktivität. Dennoch zählt Cyp57 zu den aktiven PPIasen. Es ist bekannt, dass Cyclophiline die Prolyl-Isomerisierung mit für sie charakteristischen $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Werten zwischen 10^4 und $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ beschleunigen (Fanghänel & Fischer, 2004). Andere Multidomänen-Cyclophiline wie Cyp40, Cyp58 und Cyp165 haben katalytische Effizienzen im Bereich von 10^5 bis $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, die damit 10fach höher als die von Cyp57 sind (Kieffer *et al.*, 1992; Mortillaro & Berezney, 1998; Träger, 2015). Das prototypische Cyp18 besitzt mit einem $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von $1.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ sogar eine 400fach höhere katalytische Effizienz als Cyp57 (Liu *et al.*, 1990). Die geringere katalytische Effizienz scheint typisch für Cyp57-homologe Cyclophiline zu sein. So weist das Cyp57-Orthologe aus *A. thaliana* AtCyp59 mit einem $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von $3.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für das Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA sogar eine etwas geringere katalytische Effizienz als Cyp57 auf (Bannikova *et al.*, 2012). Auch die anderen PPIase-like-Cyclophiline, Cyp18.1 und Cyp18.2a besitzen mit einem $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ von 1.1×10^5 bzw. $9.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ relativ geringe katalytische Effizienzen, die jedoch deutlich höher als die von Cyp57 und seinen Orthologen sind (Frost, 2010; Liefke, 2003).

Für Cyp18 sind 13 Aminosäuren beschrieben (Kallen & Walkinshaw, 1992; Ke *et al.*, 1994; Pflügl *et al.*, 1993), die an der Ausbildung des aktiven Zentrums bzw. der CsA-Bindungsstelle beteiligt sind. Von diesen Aminosäureresten ist Arg55 direkt am Katalysemechanismus des Enzyms beteiligt. In einer Cyp18-Variante, bei der Arg55 gegen Alanin ausgetauscht ist, verringert sich die PPIase-Aktivität auf unter 0.1% (Zydowsky *et al.*, 1992). Der Austausch von Trp121 gegen Alanin verursacht eine starke Verringerung der Affinität von Cyp18 zu CsA, während die katalytische Aktivität von Cyp18 zu etwa 9% erhalten bleibt. Der Austausch von Phe113 in Cyp18 mit Alanin führt zu einer Reduktion der PPIase-Aktivität auf 3% (Fanghänel & Fischer, 2004). In Cyp57 liegen an den Positionen, die den drei Aminosäureresten Arg55, Phe113 und Trp121 in Cyp18 entsprechen, andere Aminosäurereste vor. Dabei sind in Cyp57 Arginin (Arg55) gegen Asparagin (Asn44), Phenylalanin (Phe113) gegen Leucin (Leu109) und Tryptophan (Trp121) gegen Tyrosin (Tyr118) ausgetauscht. Der Vergleich der katalytischen Effizienzen der Varianten von Cyp18 mit Cyp57 macht wahrscheinlich, dass das Fehlen des katalytisch wichtigen Arginin-Restes für die geringe Aktivität von Cyp57 verantwortlich ist.

Daher wurde untersucht, ob durch den Austausch des Asparagins in Position 44 zu Arginin eine Cyp57-Variante erzeugt werden kann, die eine gesteigerte PPIase-Aktivität besitzt. Es zeigte sich, dass Cyp57₁₋₂₀₃ Asn44Arg im Vergleich zu Cyp57₁₋₂₀₃ keine erhöhte PPIase-Aktivität aufwies (**Abbildung 16**). Ein Arginin-Rest in der der Position 55 von Cyp18 entsprechenden Position von Cyp57 allein ist also nicht ausreichend, um eine hohe katalytische Effizienz zu induzieren. Entweder sind andere Aminosäurereste, die in Cyp57 ausgetauscht sind, ebenfalls direkt am Mechanismus beteiligt, oder die genaue Positionierung von Substrat und Aminosäureresten des aktiven Zentrums in der räumlichen Struktur des aktiven Zentrums spielt ebenfalls eine wichtige Rolle für eine hohe katalytische Effizienz. Interessanterweise wurde bereits am Beispiel eines FKBP's gezeigt, dass es möglich ist, durch ortsspezifische Mutagenese die enzymatische Aktivität einer PPIase zu steigern. Ein Aminosäureaustausch im aktiven Zentrum von FKBP36 zu einem in FKBP12 vorhandenen Rest konnte die PPIase-Aktivität in ein völlig PPIase-inaktives Enzym implizieren (Jarczowski, 2008).

Um die PPIase-Aktivität von Cyp57 näher zu charakterisieren, wurde die Substratspezifität von Cyp57 gegenüber verschiedenen Tetrapeptid-Derivaten untersucht. Die Substratspezifität wird bei PPIasen hauptsächlich durch die Aminosäure in der Position N-terminal zum Prolin (P1-Position) bestimmt (Schmidpeter *et al.*, 2011). Anders als bei den meisten Cyclophilinen bevorzugte Cyp57 ein Peptid-Substrat mit der unpolaren Aminosäure Methionin in P1-Position. Außerdem zeigte Cyp57 eine Präferenz für die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, das unpolare Leucin und das polare Serin. Deutlich schlechter wurden Substrate mit verzweigten Aminosäuren Valin und Isoleucin, die positiv geladenen Aminosäuren Lysin und Arginin sowie die negativ geladenen Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure und dessen Derivat Asparagin umgesetzt. Nahezu keine Aktivität wurde für das Tetrapeptid-Derivat mit Prolin in P1-Position bestimmt. Ein Vergleich der Substratspezifität von Cyp57, die durch Untersuchung der PPIase-Domäne Cyp57₁₋₂₀₃ analysiert wurde, mit der Spezifität der prototypischen PPIase Cyp18 zeigt bestimmte Ähnlichkeiten, aber auch charakteristische Unterschiede (**Abbildung 52**).

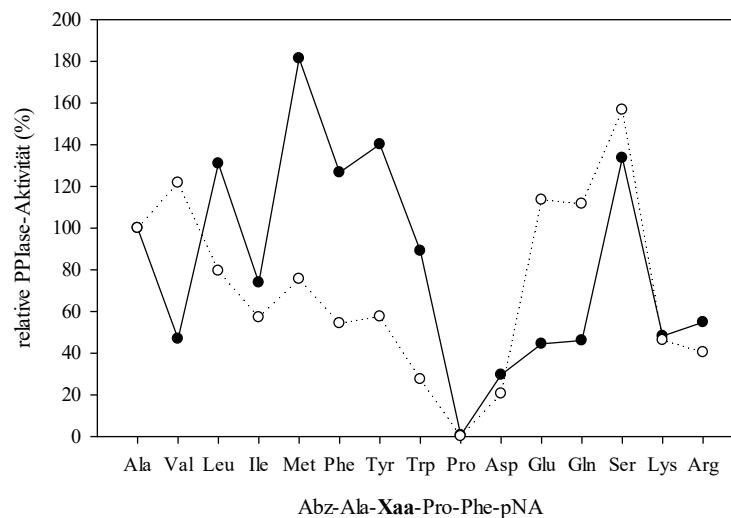


Abbildung 52: Vergleich der Substratspezifität von Cyp57₁₋₂₀₃ und Cyp18. Die relative PPIase-Aktivität wurde für die Substrate Abz-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA für Cyp57₁₋₂₀₃ (●) im Protease-freien PPIase-Test bestimmt und für das Substrat Abz-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA auf 100% gesetzt. Die Aktivitäten von Cyp18 (○) wurden aus der Publikation von Zoldák *et al.*, (2009) übernommen.

Beide Proteine weisen eine nahezu identische relative PPIase-Aktivität gegenüber Substraten mit den polaren Aminosäureresten Asparaginsäure, Serin, Lysin, Arginin und den unpolaren Resten Isoleucin und Prolin auf. Unterschiede in den relativen PPIase-Aktivitäten von Cyp57 und Cyp18 zeigen sich bei den anderen untersuchten Aminosäureresten in P1-Position der Tetrapeptid-Substrate. Während Cyp57 die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, sowie Methionin in P1-Position bevorzugt, zeigt Cyp18 eine Präferenz für das unpolare verzweigte Valin und die polaren Aminosäurereste Glutamin bzw. Glutaminsäure. Bei diesen Substraten unterscheidet sich die Substratspezifität von Cyp57 deutlich von Cyp18.

Ein weiterer Vergleich der Substratspezifität von Cyp57 wurde neben Cyp18 auch mit Mitgliedern anderer PPIase-Familien, mit FKBP12, SlyD und Par14 durchgeführt. Für 15 verschiedene Substrate zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Aktivitätsprofilen der verschiedenen PPIasen (Abbildung 53).

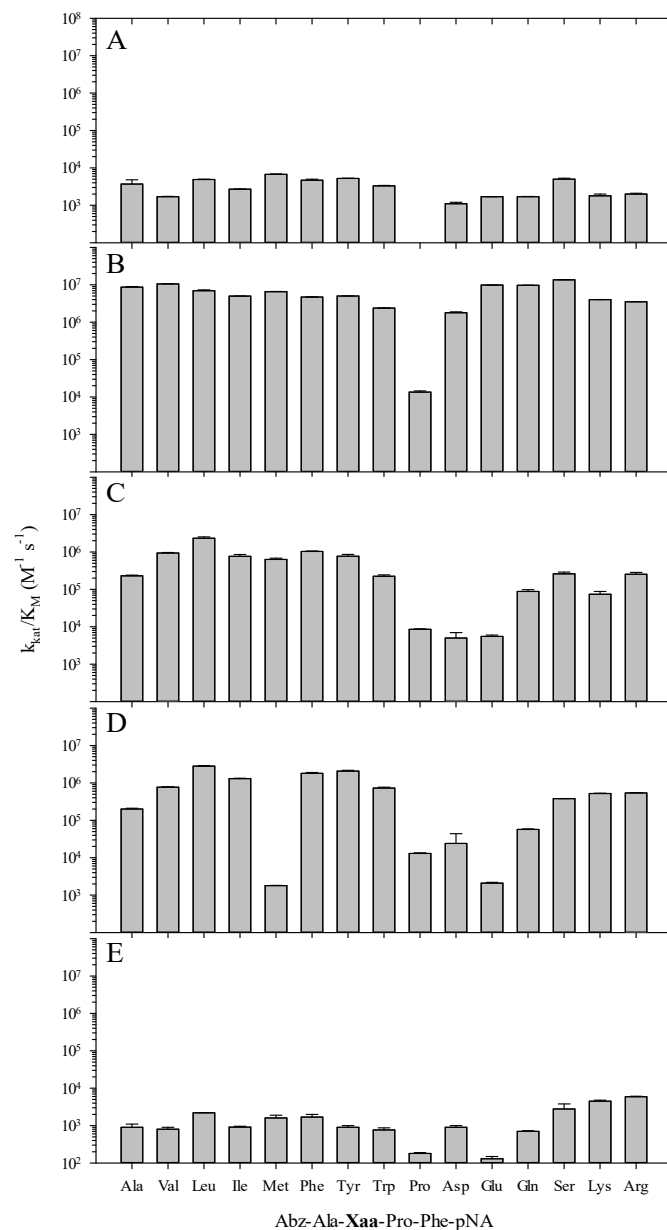


Abbildung 53: Katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) der *cis/trans*-Isomerisierung von Abz-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA von Cyp57 (A), Cyp18 (B), FKBP12 (C), SlyD (D), Par14 (E). Die katalytische Effizienz von Cyp57₁₋₂₀₃ wurde im Protease-freien PPIase-Assay in 50 mM Tris/ HCl pH 8.0, 500 mM NaCl bei 10°C bestimmt. Die Werte der anderen Proteine (B-E) und die Abbildung sind nach Zoldák *et al.*, (2009) abgeleitet.

Cyp18 zeigt eine hohe Aktivität mit einer niedrigen Substratspezifität. Die höchste Aktivität wurde für Serin und die niedrigste für Prolin in P1-Position gefunden. FKBP12 ist weniger aktiv als Cyp18. Es bevorzugt hydrophobe und aromatische Aminosäuren in P1-Position. Der höchste Wert wurde für Leucin und der geringste für Prolin-Peptide bestimmt. SlyD als *E. coli* FKBP zeigt eine ähnliche Substratspezifität wie FKBP12, jedoch wurde die geringste Aktivität für das Substrat mit Methionin in P1-Position gemessen. Die katalytische Aktivität von Par14 ist sehr niedrig. Dennoch unterscheidet sich dessen Aktivitätsprofil deutlich von Cyp18 und FKBP12. Die höchste Aktivität wurde für positiv geladene Rest, wie Arginin und Lysin bestimmt (Zoldák *et al.*, 2009). Im Vergleich wird deutlich, dass typisch für die gezeigten Cyclophiline ein relativ ausgeglichenes Aktivitätsprofil vorliegt. Nur ein Prolin-Rest in Position P1 führt zu einem starken Aktivitätsverlust. Die anderen dargestellten PPIasen besitzen mindestens zwei Aminosäurereste, die in P1-Position als Substrat schlecht toleriert werden, so sind für die PPIase-Aktivität von Par14 Glu und Pro in P1 des Substrates ungünstig.

Der Vergleich der Aktivitätsprofile zeigt, dass Cyp57 eine ähnliche Spezifität zu Cyclophilinen besitzt, sich jedoch deutlich von der Substratspezifität der FKBP's und von Parvulin unterscheidet. Der Vergleich der Substratspezifitäten und der Inhibitionseigenschaften lässt Rückschlüsse auf mögliche Verunreinigungen des präparierten Cyp57-Proteins mit anderen PPIasen, die von der heterologen Expression und der Präparation stammen, zu. Eine bereits beschriebene Verunreinigung bei der Trennung von Proteinen aus *E. coli* mittels IMAC, ist das *E. coli* FKBP SlyD, das durch einen Histidin-haltigen Sequenzabschnitt an Ni-NTA-Säulen bindet (Wülfing *et al.*, 1994). Unverkennbar ist die geringe Aktivität von SlyD für das Methionin-Peptid. Sowohl die charakteristisch einzigartige Substratspezifität von Cyp57 als auch die Unwirksamkeit der gegen andere PPIasen gerichteten Inhibitoren FK506 und NiCl₂ bei den Aktivitätsuntersuchungen machen deutlich (**Abbildung 17**), dass die gemessenen Aktivitäten von Cyp57 und nicht von Verunreinigungen mit PPIasen aus *E. coli* resultieren.

Neben der Substratkatalyse ist auch eine hochaffine Bindung an CsA und die damit einhergehende Inhibition der PPIase-Aktivität durch dieses zyklische Undekapeptid charakteristisch für viele Cyclophiline. Zur Untersuchung der CsA-Bindung von Cyp57 wurde eine CsA-Affinitätsmatrix verwendet. Im Gegensatz zu endogenem Cyp18 wurde weder endogenes Cyp57 aus HEK293-Zellen, noch rekombinantes Cyp57 aus *E. coli* durch die Affinitätsmatrix angereichert (**Abbildung 18**). Diese Experimente zeigen, dass weder rekombinantes Cyp57 aus *E. coli* noch endogen in humanen Zellen vorliegendes Cyp57 eine ähnlich hohe Affinität zu CsA besitzen, wie Cyp18.

Neben dieser Untersuchungsmethode wurde auch im Protease-freien PPIase-Assay die Inhibition der PPIase-Aktivität von Cyp57 durch CsA analysiert, wobei ein IC₅₀-Wert von 6 µM berechnet werden konnte. Dieser Wert wurde nur abgeschätzt, da Cyp57 durch die eingesetzten Konzentrationen an CsA nicht vollständig inhibiert werden konnte. CsA-Konzentrationen höher als 5 µM führten zur Aggregation von Cyp57 in der Messküvette. Auch hier zeigte sich, dass CsA nicht hochaffin an Cyp57 bindet. Während die meisten Cyclophiline ähnlich zu Cyp18 mit einem K_i-Wert im nanomolaren Bereich sehr hohe Affinitäten zu CsA besitzen, sind ähnliche Inhibitionskonstanten im mikromolaren Bereich bereits für Cyp18.1 mit 14 µM und das Multidomänen-Cyclophilin Cyp58 mit 11 µM beschrieben (Fanghänel, 2005; Träger, 2015).

Die Ursache für die schwache Inhibition von Cyp57 durch CsA kann auf Unterschiede in einigen Aminosäureseitenketten, die in Zusammenhang mit der CsA-Bindung diskutiert werden, zurückgeführt werden. In Cyp57 ist nur etwa die Hälfte der bei Cyp18 an der CsA-Bindung beteiligten Aminosäuren konserviert (Zeng *et al.*, 2001). Eine besondere Rolle bei der CsA-Bindung kommt dem Trp121 in Cyp18 zu. Durch die Mutation von Trp121 zu Alanin in Cyp18 ist eine Verringerung der Sensitivität gegenüber Cyclosporin um das 200fache beschrieben (Liu *et al.*, 1991; Zydowsky *et al.*, 1992). In Cyp57 ist Trp121 gegen Tyrosin (Tyr118) ausgetauscht. Neben Cyp57 gibt es mit Cyp35 und Cyp58 noch

weitere Cyclophiline, die an dieser Position ein Tyrosin besitzen. Während über die CsA-Bindung an Cyp35 noch nichts bekannt ist, wurde für Cyp58 eine Inhibitionskonstante mit 11 μM bestimmt (Träger, 2015). Auch humane Cyclophiline, die einen Histidin-Rest anstelle des Trp121 von Cyp18 tragen, binden mit deutlich geringerer Affinität an CsA. Für die Inhibition von Cyp18.1, Cyp40, Cyp88 und Cyp165 durch CsA sind IC_{50} -Werte von 14 μM , 0,25 μM , 0,22 μM und 0,77 μM beschrieben (persönliche Mitteilung Dr. C. Schiene-Fischer; Mortillaro & Berezney, 1998; Rinfret *et al.*, 1994). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Tryptophan an dieser Position optimal für die CsA-Bindung ist.

Abschließend konnte nicht geklärt werden, ob die ermittelte PPIase-Aktivität von Cyp57 der tatsächlichen Aktivität entspricht oder ob nur ein Teil des eingesetzten Cyp57 enzymatisch aktiv ist. Aufgrund des Austausches von Tryptophan zu Tyrosin im aktiven Zentrum von Cyp57 und die schwache Bindung von CsA an Cyp57 war eine Titration des aktiven Zentrums zur Bestimmung des Anteils an aktivem Enzym nicht möglich. Das Vorliegen eines Anteils nicht PPIase-aktiven Enzyms geht aber wahrscheinlich nicht mit dem Vorliegen eines Anteils fehlgefaltetem Proteins einher. Die Tatsache, dass die PPIase-Domäne während der limitierten Proteolyse nicht von der Serinprotease Trypsin hydrolysiert wurde, spricht für eine korrekte Faltung der Domäne. Die Kristallisierbarkeit und die Strukturaufklärung eines Cyp57-Fragmentes mit ähnlichen PPIase-Eigenschaften, wie das Vollängenprotein sprechen auch für eine korrekte globale Faltung des Proteins.

Die geringe Aktivität von Cyp57 kann unterschiedliche Funktionen und Ursachen haben. Es zeigte sich bereits, dass Cyp57 eine andere Substratspezifität als Cyp18 aufweist. Vermutlich wurde noch nicht das natürliche Substrat von Cyp57 gefunden, für das die geringe katalytische Aktivität ausreichend ist. Das Vorhandensein einer zusätzlichen Domäne zusätzlich zur PPIase-Domäne bietet die Möglichkeit, die PPIase-Domäne intrazellulär in einem Protein-Komplex oder einem Protein-RNA-Komplex nahe zum endogenen Substrat zu positionieren. Dabei könnte neben der sequenzabhängigen Substratspezifität auch der Faltungszustand eines Substratproteins in der Nachbarschaft der katalytischen Bindung eine kritische Rolle spielen. Bereits bei der Inhibition von EGFR durch FKBP12 zeigt sich, dass keine anderen PPIasen (Cyp18, andere FKBP) in der Lage sind, den Effekt nachzuahmen (Fischer *et al.*, 1998). Denkbar wäre auch die Bindung von entsprechenden Substraten mit hoher Affinität, ohne diese anschließend zu katalysieren. Dadurch könnte die Bindestelle für andere Effektoren blockiert sein, wodurch beispielsweise eine Signalweiterleitung verhindert wird. Ähnlich verhält es sich bei der Bindung des TGF β -I-Rezeptors durch FKBP12, das zu einer Inhibierung der Signalweiterleitung führt (Chen *et al.*, 1997).

4.3 Strukturaufklärung der PPIase-Domäne

Anhand der dreidimensionalen Struktur der PPIase-Domäne von Cyp57 sollte geklärt werden, ob sich neben dem Vorhandensein anderer Aminosäuren auch die räumlich Zuordnung der Aminosäuren in der Struktur des aktiven Zentrums von Cyp57 von Cyp18 unterscheidet. Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der PPIase-Domäne von Cyp57 erfolgte mittels Röntgenstrukturanalyse. Hierfür sollte die PPIase-Domäne Cyp57₁₋₂₀₃ kristallisiert werden, was jedoch nicht gelang. Eine Vorhersage der Sekundärstruktur von Cyp57₁₋₂₀₃ zeigte eine flexible Region am C-Terminus mit einer Loop-Region die 20 Aminosäuren umfasst und zwei α -Helices, die vermutlich die Kristallisation störten (**Abbildung 64**, siehe Anhang). Daher wurde eine verkürzte Variante der PPIase-Domäne Cyp57₁₋₁₆₈ verwendet. Wie bei Cyp57₁₋₂₀₃ ergaben die Analyse der Sekundärstrukturelemente und der Aktivität von Cyp57₁₋₁₆₈ sehr ähnliche Eigenschaften (**Abbildung 21**, **Tabelle 14**).

Die Struktur von Cyp57₁₋₁₆₈ ähnelt der von Cyp18 stark. Cyp57₁₋₁₆₈ besteht wie Cyp18 aus einem geschlossenem β -Fass, das aus acht antiparallelen β -Faltblättern gebildet wird und zwei α -Helices, die darum angeordnet sind (**Abbildung 23**) (Ke *et al.*, 1991). Die Hauptunterschiede in der Tertiärstruktur

von Cyp18 und Cyp57 liegen in den Loop-Bereichen zwischen β 1- β 2, α 1- β 3, α 3- β 8 und β 4- β 5. Die Loop-Bereiche zwischen β 1- β 2 und α 1- β 3 sind in Cyp57 fünf bzw. drei Aminosäuren kürzer als bei Cyp18 (**Abbildung 54**, grün) (Davis *et al.*, 2010). Zudem kommt es zur Ausbildung einer zusätzlichen α -Helix (α 2) zwischen β 4- β 5 bei Cyp57, die durch sieben zusätzliche Aminosäuren gebildet wird (**Abbildung 54**, blau). Damit besitzt Cyp57 große Ähnlichkeit zu Cyp18.1, das ebenfalls um fünf bzw. drei Aminosäuren kürzere Loop-Bereiche zwischen β 1- β 2 und α 1- β 3 aufweist.

In **Abbildung 54** ist ein Sequenzvergleich zwischen Cyp57 und Cyp18 dargestellt, wobei die Aminosäuren, die in Cyp18 für die PPIase-Aktivität und die CsA-Bindung verantwortlich sind, farblich markiert wurden. Es handelt sich dabei um die Aminosäurereste Arg55, Phe60, Met61, Gln63, Gly72, Ala101, Asn102, Ala103, Gln111, Phe113, Trp121, Leu122, His126 in Cyp18 (Ke *et al.*, 1994). 6 dieser 13 Aminosäuren, Arg55-Asn44, Met61-Ile50, Ala101-Val97, Ala103-Asn99, Phe113-Leu109 und Trp121-Tyr118, liegen bei Cyp57 verändert vor (Zeng *et al.*, 2001).

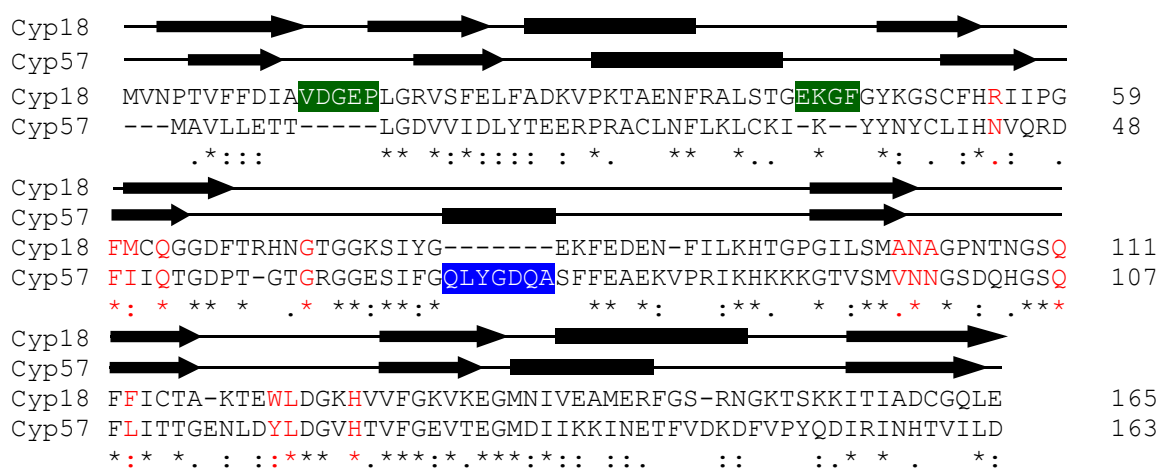


Abbildung 54: Sequenzvergleich zwischen Cyp57₁₋₁₆₈ und Cyp18. Sequenz-Alignment der PPIase-Domänen von Cyp57 (UniProtKB Nummer: Q8WUA2) und Cyp18 (P62937). Dargestellt sind in rot die Reste, die für eine Beteiligung bei der Substratbindung und CsA-Inhibition beschrieben wurden (Ke *et al.*, 1994). Blau hinterlegt ist die Region in Cyp57, die zu einer zusätzlichen α -Helix (α 2) zwischen β 4- β 5 führt. Grün hinterlegt sind in Cyp18 die längeren Loop-Bereiche zwischen β 1- β 2 und α 1- β 3. Die Pfeile stellen β -Faltblätter und die Rechtecke α -helikale-Bereiche dar.

Bei der Überlagerung der Kristallstrukturen von Cyp18 und der PPIase-Domäne von Cyp57₁₋₁₆₈ (**Abbildung 55**) wird deutlich, dass die meisten Reste von Cyp57₁₋₁₆₈ in ähnlicher Orientierung wie in Cyp18 vorliegen. Deutliche Unterschiede sind in der Ausrichtung für Phe49 und Tyr118 feststellbar. Die diesen beiden Resten entsprechenden Phe60- und Trp121-Reste in Cyp18 spielen eine wichtige Rolle bei der Koordinierung des Substrates (Fanghänel & Fischer, 2004). Die Überlagerung der Kristallstrukturen von Cyp18 mit dem gebundenen Inhibitor CsA und der PPIase-Domäne von Cyp57₁₋₁₆₈ zeigt, dass Tyr118 im Gegensatz zu Trp121 in Cyp18 sehr weit in die Substratbindetasche des Cyclophilins hinein ragt (**Abbildung 56A**). Diese Orientierung könnte damit zu einer sterischen Hinderung bei der Bindung des Inhibitors führen und eine Ursache für die schwache Inhibition sein. Auch die Orientierung von Phe49 nach außen im Unterschied zu der zum aktiven Zentrum gerichteten Ausrichtung von Phe60 in Cyp18 könnte zu einer schlechteren Koordinierung von Methylleucin 9 des CsAs führen und so die Interaktion zusätzlich schwächen. Anders als bei Cyp57 ist bei Cyp58 Tyr389, das sich an der Position des Phe60 von Cyp18 befindet, nach außen gerichtet, wodurch es möglicherweise zu einer noch schlechteren Bindung von CsA kommt (Davis *et al.*, 2010; Träger, 2015). Das deutet darauf, dass die Orientierung der Reste wichtig für die Interaktion ist. Die aus der

ungünstigen Orientierung der Reste im aktiven Zentrum und der Abwesenheit des entscheidenden Tryptophan-Restes resultierenden schwachen CsA-Bindung stellt wahrscheinlich einen Grund dafür dar, dass die Experimente zur Ko-Kristallisation von Cyp57₁₋₁₆₈ und CsA nicht zu Kristallen des Cyp57₁₋₁₆₈-CsA-Komplexes führten.

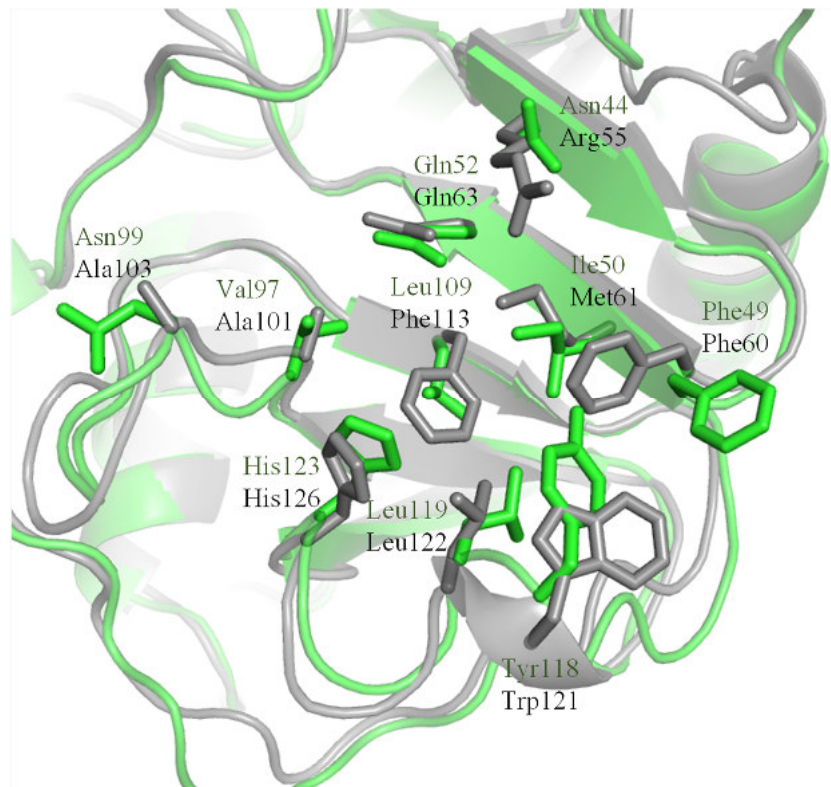


Abbildung 55: Orientierung der Aminosäuren des aktiven Zentrums von Cyp57₁₋₁₆₈ und Cyp18. Cartoon-Darstellung der Überlagerung der Kristallstrukturen von Cyp57₁₋₁₆₈ (grün) und Cyp18 (grau) (PDB Code: 2CPL). Stabdarstellung der Aminosäurereste der aktiven Zentren.

Bei der Überlagerung der Kristallstrukturen der PPIase-Domäne von Cyp57₁₋₁₆₈ und Cyp18 mit dem im aktiven Zentrum gebundenem Substrat Suc-Ala-Gly-Pro-Phe-pNA ist eine geringe sterische Hinderung bei der Substratbindung von Tyr118 zu erkennen (**Abbildung 56B**). Die wichtigere Ursache für die geringe katalytische Aktivität stellt wahrscheinlich Asn44 dar, da es in der Überlagerung mit rund 8 Å fast dreimal weiter von der Peptidyl-Prolyl-Amid-Bindung des Substrates entfernt ist als Arg55 von Cyp18 mit 3 Å (Kallen & Walkinshaw, 1992). Asparagin ist wie Arginin eine polare Aminosäure, aber im Unterschied zu Arginin ist sie neutral und ungeladen. Dennoch ist die polare Seitenkette für die Interaktion mit polaren oder geladenen Atomen geeignet (Betts & Russell, 2003). Wahrscheinlich kann Asn44 durch die große Entfernung und durch seine chemischen Eigenschaften nicht den Übergangszustand durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zum Substrat stabilisieren (McGowan & Hamelberg, 2013) und führt deshalb zu der geringen katalytischen Aktivität von Cyp57. Dabei muss aber beachtet werden, dass die hier gezeigte Kristallstruktur von Cyp18 nur den Grundzustand vom Protein und gebundenem Substrat wiedergibt (Ke & Huai, 2004) und die PPIase-Domäne von Cyp57 in seiner Konformation ohne gebundenes Substrat dargestellt ist. Ob während der Katalyse konformationelle Änderungen bei Cyp57 im aktiven Zentrum oder dem Substrat auftreten ist nicht bekannt. Die Überlagerung der Kristallstrukturen von Cyp18 mit und ohne gebundenem Substrat zeigt keine wesentlichen Änderungen in der Konformation weder im Rückgrat noch bei den Seitenketten von Cyp18 (Ke *et al.*, 1993).

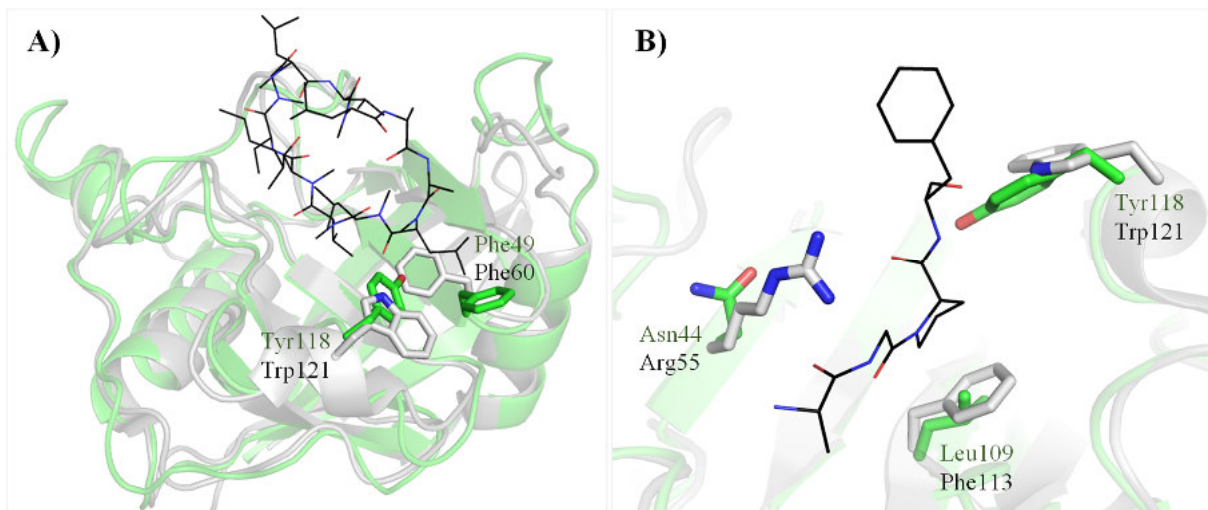


Abbildung 56: Inhibition und Substratbindung von Cyp18 im Vergleich zu Cyp57₁₋₁₆₈. Alignment der Kristallstruktur von Cyp57₁₋₁₆₈ und Cyp18 mit CsA (PDB 1CWA) (A) oder dem Substrat Suc-Ala-Gly-Pro-Phe-pNA (PDB 1ZKF) (B). Die Kristallstrukturen von Cyp57 (grün) und Cyp18 (grau) sind als Cartoon dargestellt. A) Orientierung der Aminosäurereste Phe49/ Phe60, Tyr118/ Trp121 (Stabdarstellung, N-Atome blau, O-Atome rot) von Cyp57₁₋₁₆₈/ Cyp18 und CsA (Bänderdarstellung, C-Atome schwarz, N-Atome blau, O-Atome rot). B) Orientierung der Aminosäurereste Asn44/ Arg55, Leu109/ Phe113, Tyr118/ Trp121 (Stabdarstellung, N-Atome blau, O-Atome rot) von Cyp57₁₋₁₆₈/ Cyp18 und dem Substrat -Ala-Gly-Pro-Phe- (Bänderdarstellung, C-Atome schwarz, N-Atome blau, O-Atome rot).

4.4 Cyp57 bindet Ribonukleinsäuren

Neben der PPIase-Domäne ist für Cyp57 aus der Sequenz des Proteins noch eine RRM-Domäne und daran angeschlossen eine Lysin-reiche Region vorhergesagt worden. RRM-Domänen bestehen aus rund 90 Aminosäuren und binden einzelsträngige RNA (Swanson & Dreyfuss, 1988). RRM-Domänen sind aus einem antiparallelen β -Faltblatt mit vier Strängen aufgebaut, das mit zwei α -Helices beladen ist (Maris *et al.*, 2005). Die Domäne umfasst zwei Consensus-Sequenzen RNP1 und RNP2 (Query *et al.*, 1989). Die RNP-Consensus-Sequenz von RNP1, die sich am C-terminalen Teil der RRM-Domäne befindet, ist Lys/Arg-Gly-Phe/Tyr-Gly/Ala-Phe/Tyr-Val/Ile/Leu-Xaa-Phe/Tyr (Maris *et al.*, 2005). Damit entspricht das als RNP1 für Cyp57 vorhergesagte Sequenz-Motiv der Aminosäurereste 281-288 in wesentlichen Kriterien dieser Consensus-Sequenz. Die RNP-Consensus-Sequenz von RNP2, die sich am N-terminalen Teil der RRM-Domäne befindet, ist durch Ile^{Val}Leu-Phe^{Tyr}Ile^{Val}Leu-Xaa-Asn-Leu definiert (Maris *et al.*, 2005). Damit entspricht auch das als RNP2 für Cyp57 vorhergesagte Sequenz-Motiv der Aminosäurereste 242-247 in wesentlichen Kriterien dieser Consensus-Sequenz. Beide Sequenzmotive bilden die grundlegende Bindungsplattform für die Erkennung eines Dinukleotides (Maris *et al.*, 2005). Dabei sind die aromatischen Reste in Position 5 von RNP1 und in Position 2 von RNP2 für die Bindung der Basen über Stapelung verantwortlich. Beide Positionen sind in Cyp57 durch Phenylalanin besetzt. Ein hydrophober Rest in Position 3 von RNP1 wird für die Bindung der zwei Zuckerringe des zentralen Dinukleotides verantwortlich gemacht (Maris *et al.*, 2005). Dieser Rest ist in Cyp57 ein Tyrosin-Rest. Aufgrund der Eigenschaften der RNP-Motive von Cyp57 ist also eine effektive Bindung des Proteins mit einzelsträngiger RNA zu erwarten.

Für RNA-bindende Proteine sind eine Vielzahl von Funktionen beschrieben, wie z.B. die Regulation des Splicings und der RNA-Stabilität (Chambers *et al.*, 1988). In einer globalen Studie zu Protein-RNA-

Interaktionen wurde Cyp57 bereits als mRNA-bindendes Protein in HEK293-Zellen gefunden (Baltz *et al.*, 2012).

Deshalb wurde die Fähigkeit von Cyp57 zur Bindung von Nukleinsäuren näher untersucht. Initial wurde die Fähigkeit von Cyp57, mit Nukleinsäuren zu interagieren, mittels Heparin-Sepharose überprüft (**Abbildung 26A**). Charakteristisch für Heparin ist neben seinen negativen Ladungen auch die strukturelle Ähnlichkeit zu DNA- bzw. RNA-Molekülen. Die polyanionische Struktur der Nukleinsäuren wird durch das sulfatierte Glykosaminoglykan in Heparin nachgeahmt. (Capila & Linhardt, 2002). Die Interaktion von Cyp57 und Heparin wurde mit unterschiedlichen Varianten der RRM-Domäne von Cyp57 untersucht. Analysiert wurden der komplette C-terminale Bereich von Cyp57, der die RRM-Domäne mit Lysin-reicher-Region und C- und N-terminalen Erweiterungen enthielt (Cyp57₂₀₄₋₄₉₂), die RRM-Domäne mit Lysin-reicher-Region (Cyp57₂₄₀₋₃₈₈) und die RRM-Domäne ohne zusätzliche Erweiterungen (Cyp57₂₄₀₋₃₁₈).

Bei der Affinitätschromatographie mittels Heparin-Sepharose wurde deutlich, dass mit der Länge auch die Affinität der RRM-Domänen-Varianten zu Heparin-Sepharose abnahm. Eine starke Bindung wurde für die RRM-Domäne Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ bestimmt, schon deutlich schwächer war die Bindung für His₆-Cyp57₂₄₀₋₃₈₈. Für die RRM-Domäne ohne zusätzliche Erweiterungen (Cyp57₂₄₀₋₃₁₈) war keine Interaktion mit Heparin-Sepharose nachweisbar (**Abbildung 26A**). Vermutlich ist der Teil des Proteins direkt N-terminal von der RRM-Domäne (AS 204-239) oder der Teil des Proteins direkt am C-Terminus von Cyp57 (AS 389-492) für eine starke Bindung erforderlich. Möglicherweise werden noch flankierende Aminosäuren zusätzlich zur RRM-Domäne für die Bindung von Nukleinsäuren benötigt (Kenan *et al.*, 1991). Ähnlich dazu sind weitere Aminosäurereste oder Proteinbereiche zusätzlich zur RRM-Domäne für die RNA-Bindung von Tra2-β1 (Tsuda *et al.*, 2011), CBP20 (Mazza *et al.*, 2002), U1A und SRSF2 (Daubner *et al.*, 2012) notwendig. U1A hat als flankierende RRM-Sequenz eine zusätzliche α-Helix, Helix C (Allain *et al.*, 1996; Avis *et al.*, 1996). In der freien Form von U1A verdeckt Helix C das β-Faltblatt um unspezifische RNA-Bindungen zu verhindern. Bei der Bindung kommt es zur Verschiebung der Helix C, die zu einer kooperativen Erkennung der Ziel-RNA durch das β-Faltblatt und Helix C führt (Mittermaier *et al.*, 1999). In einer U1A-Variante ohne Helix C geht die Fähigkeit zur Bindung von RNA verloren (Scherly *et al.*, 1990). Dementsprechend können auch die umgebenden Sequenzen einen Einfluss auf die Affinität haben. Dagegen lagern sich bei SRSF2 die N- und C-terminalen Erweiterungen der RRM-Domäne bei der Bindung von RNA um und bilden so eine positiv geladene Furche, wodurch SRSF2 zwei Sequenzen gleich gut erkennen kann (Daubner *et al.*, 2012). Im Fall von Tra2-β1 sind einige flankierende Aminosäuren an der spezifischen Erkennung der Consensus-Sequenz beteiligt, dabei induziert die Bindung der RNA eine Umlagerung von einer ungeordneten zu einer geordneten Struktur der Termini. Diese Umlagerung scheint wichtig für die Anlagerung weiterer Proteine an Tra2-β1 zu sein (Cléry *et al.*, 2011; Tsuda *et al.*, 2011). Zudem kann der C-Terminus durch die Bindung der 2'OH-Gruppe des Zuckerrings der RNA zur Unterscheidung zwischen RNA und DNA beitragen, wie bei PABP (Deo *et al.*, 1999). Allerdings verstärken N- und C-terminale Erweiterungen nicht immer die RNA-Bindung, bei CBP20 bilden zwei Reste am C-Terminus eine Salzbrücke und verhindern dadurch die Bindung der RNA am Rest in Position 5 von RNP1 (Mazza *et al.*, 2002).

Die Ergebnisse des Affinitäts-Assays mit Heparin-Sepharose weisen darauf hin, dass Cyp57 in der Lage ist, mit Nukleinsäuren zu interagieren. Durch diese Experimente konnte jedoch nicht geklärt werden, ob bestimmte Nukleinsäuren bevorzugt durch Cyp57 gebunden werden. RRM-Domänen sind dafür bekannt, dass sie sowohl Einzel-Strang-RNA als auch einzelsträngige RNA in Haarnadelstrukturen (*stem-loop*) erkennen können. U1A erkennt beispielsweise eine Bindesequenz in einer Loop-Struktur 2000-mal besser als in einem Einzel-Strang (Law *et al.*, 2006). Dagegen ist die Bindungsaffinität von Fox1 für eine Einzel-Strang-RNA ähnlich hoch wie bei U1A für RNA *stem-loops* (Auweter *et al.*, 2006). RRM-Domänen gehören zu den kleinen Einzel-Strang-RNA-bindenden-Domänen, die ssRNA sequenzspezifisch binden können, da die RNA-Protein-Interaktion durch die Wechselwirkung der Ringe

der Nukleinsäure-Basen mit aromatischen Aminosäureseitenketten vermittelt wird, ohne dass das Phosphatrückgrat der RNA an der Interaktion beteiligt ist (Auweter *et al.*, 2006).

Zur Analyse der Bindung von Cyp57 an RNA und der Spezifität dieser Interaktion wurden die Bindeeigenschaften von Cyp57 und der RRM-Domänen-Varianten von Cyp57 an Ribohomopolymere bestimmt. Ribohomopolymere sind Modell-Verbindungen, die Einzel-Strang-RNA ähneln und damit eine gute Möglichkeit bieten, die Bindeeigenschaften von RNA-bindenden Proteinen zu untersuchen (Swanson & Dreyfuss, 1988). Diese Technik wurde bereits eingesetzt, um die Bindeeigenschaften des Multidomänen-Cyclophilins Cyp33 und des Cyp57-Orthologen AtCyp59 zu charakterisieren (Gullerova *et al.*, 2006; Mi *et al.*, 1996). Cyp57 und alle untersuchten Varianten der RRM-Domäne (Cyp57₂₀₄₋₄₉₂, Cyp57₂₄₀₋₃₁₈, His₆-Cyp57₂₄₀₋₃₈₈) banden bevorzugt an poly(G) und poly(U) (**Abbildung 26B**). Damit unterscheiden sich die Bindeeigenschaften von Cyp57 deutlich von denen von Cyp33, das eine Präferenz für poly(A) und poly(U) hat und von AtCyp59, das bevorzugt poly(G) und poly(C) bindet (Gullerova *et al.*, 2006; Mi *et al.*, 1996). Da Cyp57 bevorzugt mit poly(G) Purin-Reste und mit poly(C) Pyrimidin-Rest erkennt, ist es im Gegensatz zu den anderen beiden RNA-bindenden Cyclophilinen nicht Basen spezifisch.

In beiden Affinitäts-Assays konnte gezeigt werden, dass die Cyp57-Varianten die RNA-Modell-Verbindungen Heparin als auch Ribohomopolymere unterschiedlich stark in Abhängigkeit ihrer Länge binden. Demnach konnte unter Verwendung von Ribohomopolymeren eine deutlich Bindung des RRM-Motivs Cyp57₂₄₀₋₃₁₈ nachgewiesen werden, die bei Verwendung von Heparin-Sepharose nicht bestand. Möglicherweise eignet sich Heparin mit seinen Eigenschaften nur als Modell-Substanz für relativ starke Interaktionen mit RNA. Wahrscheinlich benötigt Cyp57 wie U1A neben der RRM-Domäne noch zusätzlich flankierende Aminosäuren für eine hochaffine RNA-Bindung. Bereits in den CD-Spektren der RRM-Domänen-Varianten zeigten sich unterschiedliche Anteile von Sekundärstrukturelementen. Dabei war der Anteil des β -Faltblatts unabhängig von der Fragment-Länge und nur der α -helikale Anteil nahm im CD-Spektrum mit der Länge der Fragmente ab (**Abbildung 25**). Vermutlich besitzen die zusätzlichen α -Helices einen stabilisierenden Effekt auf die Nukleinsäure-Bindung.

Für die Analyse der Cyp57-RNA-Interaktionen wurde die CD-Spektroskopie verwendet, wobei zwei Wellenlängenbereiche genutzt werden können, um Informationen über die Konformation der Interaktionspartner im Komplex zu erhalten. Im Bereich von 180–230 nm werden CD-Spektren durch die Konformation des Proteinrückgrates bestimmt, während im Wellenlängenbereich oberhalb 240 nm Nukleinsäuren starke CD-Signale im Vergleich zu den relativ schwachen Signalen der aromatischen Seitenketten von Proteinen aufweisen (Woody, 1995). CD-Spektren sind im Nah-UV Bereich von 250-300 nm sehr sensitiv für strukturelle Veränderungen in der Basenstapelung (*base stacking*, Stapelwechselwirkung) der RNA bei der Bindung von Proteinen (Harris *et al.*, 2011).

Die Fern-UV CD-spektroskopischen Untersuchungen zeigten, dass es zu konformationellen Änderungen bei Cyp57 und Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ durch Bindung des Ribohomopolymers poly(G) kam (**Abbildung 27**). Für Cyp57 waren nur geringe Veränderungen im CD-Spektrum mit und ohne poly(G) feststellbar, sodass wahrscheinlich keine globalen konformationellen Änderungen im Gesamtprotein bei der RNA-Bindung auftraten. Im Gegensatz dazu trat bei der Verwendung der RRM-Domäne eine deutliche Veränderung im CD-Spektrum von poly(G) auf. So wurde eine deutliche Abnahme der Signalintensität der molaren Elliptizität am Minimum bei 204 nm sichtbar, was für eine konformationelle Änderung dieser Domäne bei RNA-Bindung spricht.

RNA-Moleküle, die aus drei oder mehr aufeinanderfolgenden Guanosinen aufgebaut sind, können in wässrigen Lösungen einzel- und doppelsträngige helikale Strukturen ausbilden (Antonyan *et al.*, 2015). Daneben können sich Guanosin-reiche Sequenzen wie poly(G) aber auch in G-Quadruplexe zusammenlagern (Sen & Gilbert, 1988). Die Nukleinsäure-Ketten können unterschiedliche Topologien einnehmen und in unterschiedlichen Orientierungen (parallel oder antiparallel) angeordnet sein (Burge

et al., 2006). RNA-Quadruplexe bevorzugen eine parallele Konformation (Brázda *et al.*, 2014). Die Struktur wird von monovalenten Metallionen wie K^+ bzw. Na^+ stabilisiert (Renčiuk *et al.*, 2009), wobei die Stabilität und die Faltung auch von der RNA-Konzentration abhängig ist (Kejnovská *et al.*, 2014). Bei der Untersuchung der Strukturveränderung der RNA bei Bindung des Proteins durch Titration des 10-meren RNA-Oligonukleotids G_{10} mit Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ wurde eine deutliche Abnahme der molaren Elliptizität bei 260 nm sichtbar (**Abbildung 28A**). Das deutet auf eine Abnahme der Stapelwechselwirkungen der RNA hin (Martino *et al.*, 2012). Dagegen führte die Titration von G_{10} mit Cyp57₂₄₀₋₃₁₈ zu einer Zunahme der molaren Elliptizität bei 265 nm (**Abbildung 28B**) und damit zu einer Erhöhung der intra-/ intermolekularen Stapelwechselwirkungen der RNA (Manival *et al.*, 2001). Möglicherweise ist die Sekundärstruktur der gebundenen RNA abhängig von der Länge der verwendeten Domäne, wobei die komplette RRM-Lys-Domäne Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ bei der Bindung der RNA eine andere Struktur als die verkürzte Domäne Cyp57₂₄₀₋₃₁₈ induziert. Durch die Änderung der Intensität am Maximum konnten Dissoziationskonstanten für die G_{10} -Cyp57-Interaktion im mikromolaren Bereich abgeleitet werden.

Die thermodynamische Charakterisierung der Interaktion zwischen der RRM-Domäne und dem 10-meren RNA-Oligonukleotid G_{10} mittels isothermaler Titrationskalorimetrie ergab mit Gleichgewichtsdissoziationskonstanten von 3.4 und 8.7 μM für Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ bzw. Cyp57₂₄₀₋₃₁₈ moderate Bindungsaffinitäten. ITC-Messungen mit einem zweiten RNA-Oligonukleotid (GUGGCCG) ergaben Dissoziationskonstanten von 6.3 und 16.6 μM für Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ bzw. Cyp57₂₄₀₋₃₁₈. Damit wurde gezeigt, dass die Dissoziationskonstanten der ITC-Messungen ähnlich zu den bestimmten Werten in den Titrationsmessungen der CD-Spektroskopie sind. Die Dissoziationskonstanten für das RNA-Oligonukleotid GUGGCCG sind im Vergleich zum Orthologen AtCyp59 bei Cyp57 50fach höher (Bannikova *et al.*, 2012), damit weist diese Interaktion eine deutlich geringere Affinität auf.

Die Bindung der RNA (G_{10} bzw. GUGGCCG) und Cyp57₂₄₀₋₃₁₈ ist durch seine endotherme Natur (+6.7 und +11.7 kJ mol^{-1}) charakterisiert. Die ungünstige Enthalpie wird jedoch durch einen deutlich günstigeren entropischen Term bei der Bildung eines Cyp57-RNA-Komplexes kompensiert. Dagegen ist die bevorzugte Bindung der RNA und Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ exotherm (-18.4 und -9.6 kJ mol^{-1}), zudem besitzt der gebildete Komplex einen günstigeren entropischen Term. Untersuchungen mit Polypeptiden und RNA zeigen, dass die antreibende Kraft für die Bildung von Protein-RNA-Komplexen auf entropischen Effekten beruht (Mascotti & Lohman, 1997), die vermutlich durch die Freisetzung von Wasser und Kationen bei der Bindung verursacht werden. Zusammenfassend deuten die spektroskopischen Ergebnisse und thermodynamischen Parameter auf unterschiedliche Bindungsarten der RNA zu Cyp57₂₄₀₋₃₁₈ und Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ hin, obwohl die Dissoziationskonstanten sehr ähnlich sind. Entscheidend für die Unterschiede in der RNA-Bindung ist anscheinend die Länge der verwendeten RRM-Domänen von Cyp57.

Neben den thermodynamischen Parametern wurde untersucht, ob die Bindung der RNA an Cyp57 einen Einfluss auf die PPIase-Aktivität von Cyp57 besitzt (**Abbildung 30**). Dabei wurde als interagierende RNA das RNA-Oligonukleotid G_{10} genutzt, das eine definierte Länge besitzt. Um größere RNA-Moleküle einschätzen zu können, wurde außerdem poly(G) eingesetzt. Als Kontrolle wurde poly(A) verwendet, für das keine Bindung an Cyp57 feststellbar war. Keine der eingesetzten RNAs zeigte bei einer Konzentration von 5 μM einen Einfluss auf die Aktivität von Cyp57. Erst bei einer Konzentration von 20 μM poly(G) wurde eine leichte Erhöhung der relativen PPIase-Aktivität um ca. 20% bestimmt. Damit verhält sich Cyp57 ähnlich zu Cyp33. Dieses Protein zeigt nach Bindung AU-reicher mRNA ebenfalls eine Erhöhung der PPIase-Aktivität (Wang *et al.*, 2008). Gegensätzlich zu Cyp57 verhält sich AtCyp59, durch die Bindung eines spezifischen RNA-Bindungsmotivs verringert sich die PPIase-Aktivität von AtCyp59 (Bannikova *et al.*, 2012). Höhere Konzentrationen konnten aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht eingesetzt werden.

4.5 Zelluläre Lokalisierung von Cyp57

Cyclophiline treten ubiquitär in allen Domänen des Lebens auf, sind meist strukturell konserviert und sie werden in Verbindung mit vielen zellulären Funktionen gebracht (Galat, 1993, 2003). Cyp57-Orthologe wurden in allen Reichen der Eukaryoten gefunden, was auf eine wichtige Funktion eines Cyclophilins mit einer RRM-Domäne hindeutet (**Tabelle 16**) (Zeng *et al.*, 2001).

Tabelle 16: Orthologe humane Cyclophiline mit RRM-Domäne in ausgewählten Eukaryoten. In Klammern sind die Gen-Namen angegeben und darunter die NCBI-Accession-Nummer.

	<i>H.</i> <i>sapiens</i>	<i>M.</i> <i>musculus</i>	<i>C.</i> <i>elegans</i>	<i>D.</i> <i>melanogaster</i>	<i>A.</i> <i>thaliana</i>	<i>S.</i> <i>pombe</i>	<i>P.</i> <i>tetraurelia</i>
RRM- Domäne	Cyp33 (PPIE) NP_006103	MmCyp33 (Ppie) NP_062362	CeCyp36 (Cyn-13) NP_001255925	DmCyp33 (PPIE) NP_523773	-	-	-
	Cyp57 (PPIL4) NP_624311	MmCyp57 (Ppil4) NP_080417	CeCyp50 (Sig-7) NP_492343	DmCyp75 (CG5808) NP_651291	AtCyp59 NP_175776	Ret1 (ret1) CAB52803	Kin241p (KIN241) CAC35733

Verschiedene Cyclophiline treten spezifisch in bestimmten Kompartimenten von Zellen auf (Galat, 1993). Das Multidomänen-Cyclophilin Cyp57 ist hinsichtlich seiner Lokalisierung und physiologischen Relevanz wenig charakterisiert. Mittels RT-PCR wurde herausgefunden, dass Cyp57-mRNA die höchste Genexpression in Nierengewebe aufweist, aber generell in allen Geweben gebildet wird (Zeng *et al.*, 2001). Über die Expression und Nachweisbarkeit des Proteins in endogenen Geweben war bisher nichts bekannt. Die Analyse der Proteinexpression von Cyp57 in humanen Zelllinien verschiedenen Ursprungs ergab, dass in allen untersuchten Zelllinien HeLa (Gebärmutterhals Epithelzellen), Jurkat (T-Lymphozyten), A431 (epidermoide Zellen), HEK293 (embryonale Nierenzellen) und SH-SY5Y (Neuroblastoma-Zellen) endogenes Cyp57 nachweisbar war (**Abbildung 31**). Der hohe Gehalt an Cyp57 in der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 stimmt mit dem Befund überein, dass die mRNA von Cyp57 besonders stark in Nierengewebe gebildet wird (Zeng *et al.*, 2001). Möglicherweise gibt es gewebespezifische Unterschiede in der Stabilität des Proteins. Gestützt werden die Ergebnisse der hohen Expression von Cyp57 in diesen Zelllinien durch Proteom-Analysen, bei denen hohe Konzentrationen von Cyp57 in der Nierenzelllinie HEK293 und in der Jurkat-Zelllinie gefunden wurden (Geiger *et al.*, 2012).

Durch die Analyse der Sequenz von Cyp57 ist bekannt, dass dieses Cyclophilin ein bipartite-Kernlokalisierungssignal besitzt. Daher wurde vermutet, dass das Protein hauptsächlich im Nukleus lokalisiert ist. Die subzelluläre Verteilung von Proteinen kann anhand der differentiellen Zentrifugation von Zelllysaten untersucht werden (Sasaki-Osugi *et al.*, 2013). Die hier gezeigten Ergebnisse der differentiellen Zentrifugation mit Lysat von HEK293-Zellen belegen die überwiegende Kernlokalisierung von Cyp57 (**Abbildung 35**). Verschiedene Studien mit Cyp57-Orthologen zeigen ebenfalls deren bevorzugte Lokalisation im Zellkern, so wurde Ret1 aus *S. pombe*, AtCyp59 aus *A. thaliana* und Kin241p aus *P. tetraurelia* im Zellkern gefunden (Matsuyama *et al.*, 2006; Gullerova *et al.*, 2006; Krzywicka *et al.*, 2001). Zusätzlich wurde in dieser Arbeit für Cyp57 durch die transiente Expression einer eGFP-Fusion in HEK293-Zellen die subzelluläre Lokalisation im Nukleus gezeigt (**Abbildung 37**). Das wird ebenfalls durch die Ergebnisse der subzellulären Lokalisation von endogenem Cyp57 mit einem spezifischen Anti-Cyp57-Antikörper bestätigt (Uhlén *et al.*, 2015). Darüber hinaus zeigte sich bei einer genaueren Betrachtung der Verteilung von Cyp57 im Zellkern (**Abbildung 37**), dass es zu einer Anreicherung von Cyp57-eGFP in DAPI-lichten Regionen aber nicht im Nukleolus kam. DAPI-lichte

Regionen sind charakteristisch für Euchromatin. Im Unterschied zum Heterochromatin befindet sich in diesen Bereichen das aufgelockerte Chromatin mit der höchsten Genaktivität (Huisinga *et al.*, 2006). Für AtCyp59 wurde gezeigt, dass es die C-terminale Domäne der RNA-Polymerase II bindet und deren Aktivität beeinflusst (Bannikova *et al.*, 2012). Möglicherweise ist auch Cyp57 an für Euchromatin typischen Prozessen wie der Replikation oder Transkription beteiligt.

Die Depletion von endogenem Cyp57 durch RNA-Interferenz war weder durch die Verwendung von pSUPERIOR-RNAi noch von siRNA möglich, mit beiden Methoden wurde keine deutliche Reduktion des Cyp57-Gehalts erreicht. Möglicherweise ist das Protein sehr stabil oder wird in einer hohen Rate von wenigen mRNA-Molekülen translatiert. Auch eine fehlende Spezifität der siRNA/ RNAi kann ein möglicher Grund für das Ausbleiben einer Reduktion des Cyp57-Gehaltes sein.

4.6 Interaktionspartner von Cyp57

Für die Bestimmung der physiologischen Funktion von Cyp57 sollten Proteine identifiziert und charakterisiert werden, mit denen Cyp57 interagiert. Ko-Präzipitationsversuche waren nicht erfolgreich, daher wurden potenzielle Interaktionspartner von Cyp57 über eine Datenbankanalyse ermittelt. Darunter befanden sich einige nukleäre Proteine, wie zum Beispiel der Transkriptionsfaktor Smad5 und der Splicing-Faktor CHERP. Sowohl die Smad5- als auch die CHERP-Bindung wurde mit dem Hefe-2-Hybrid-System identifiziert. Smad5 wurde als Interaktionspartner von Cyp57 in einer globalen Studie zur Kartierung der humanen Smad-Signalwege entdeckt (Colland *et al.*, 2004). In einer anderen Studie wurden die dynamischen Protein-Protein-Interaktionen des humanen Spliceosoms untersucht, wobei die CHERP-Cyp57-Interaktion gefunden wurde (Hegele *et al.*, 2012). Das lässt eine Funktion von Cyp57 beim Splicing und der Genregulation vermuten. Für AtCyp59 wurde bereits ein regulatorischer Einfluss auf die Transkription und die Bindung zu SR-Proteinen gezeigt (Bannikova *et al.*, 2012; Gullerova *et al.*, 2006). SR-Proteine sind Komponenten des Spliceosoms und am Splicing von prä-mRNA beteiligt (Zahler *et al.*, 1992).

Die Interaktion von Cyp57 mit Smad5 und CHERP wurde näher charakterisiert, um Hinweise auf eine mögliche Bedeutung von Cyp57 im biologischen System zu bekommen. Beide Proteine wiesen den höchsten Score in den Datenbanken MINT bzw. STRING (Jensen *et al.*, 2009; Licata *et al.*, 2012) auf (Colland *et al.*, 2004; Hegele *et al.*, 2012).

Smad5 als Signalprotein einer interzellulären Kommunikations-Kaskade wirkt durch seine Funktion als Transkriptionsfaktor regulatorisch auf die Zelle. Smad5 zählt zu den Rezeptor-regulierten Smads (R-Smads). Es besteht aus zwei konservierten Domänen, MH1 (N-terminal) und MH2 (C-terminal), die durch eine Linker-Region miteinander verbunden sind. Die MH1-Domäne besitzt eine β -Schleife zur Bindung von DNA. In der MH2-Domäne ist eine hydrophobe Region für Protein-Protein-Interaktionen lokalisiert. C-terminal besitzt Smad5 ein Ser-X-Ser-Motiv, das durch den aktivierten BMP-Rezeptor Typ I phosphoryliert wird (Massagué *et al.*, 2005). Bei dem BMP-Rezeptor Typ I handelt es sich um einen Serin/ Threonin-Kinase-Rezeptor, der durch BMP-2 aktiviert wird (Koenig *et al.*, 1994). Durch die Phosphorylierung kommt es zu strukturellen Veränderungen in Smad5, wodurch sich ein heterooligomerer Komplex bildet, der in den Kern transloziert und BMP-regulierte Gene aktiviert (Feng & Derynck, 2005).

BMP-2 gehört zu einer Familie von Wachstumsfaktoren innerhalb der *transforming growth factor*- β (TGF β)-Superfamilie (Ducy & Karsenty, 2000). BMPs sind entwicklungsbiologisch von hoher Bedeutung, da BMPs neben der Ausbildung der Körperachsen unter anderem auch die Differenzierung bzw. das Wachstum von Organen und Gliedmaßen während der Embryonalentwicklung steuern (Hogan, 1996). Die Deletion von BMP-2 führt zur embryonalen Letalität (Zhang & Bradley, 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bindung von Cyp57 an Smad5 durch Präzipitationsanalysen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Smad5 aus HEK293-Zellen an rekombinantes Cyp57 aus *E. coli* und HEK293-Zellen bindet (**Abbildung 39A** und **40**). Der inverse Versuch mit rekombinantem Smad5 bestätigte diese Ergebnisse (**Abbildung 39B**). Somit konnte bestätigt werden, dass Cyp57 und Smad5 *in vitro* direkt physisch miteinander interagieren. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob *in vivo* die Möglichkeit einer Interaktion besteht. Es ist bekannt, dass nicht aktivierte Smad-Proteine überwiegend im Cytoplasma vorliegen (Pierreux *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2002). Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von Smad5 zeigten eine Verteilung über die gesamte Zelle (**Abbildung 41**), mit einer überwiegenden Lokalisation des Proteins im Cytoplasma. Auch die Ergebnisse der differentiellen Zentrifugation mit HEK293-Zellen belegten die überwiegende Lokalisation im Cytoplasma (**Abbildung 49**). Erst durch die Stimulation mit BMP-2 ist die Möglichkeit gegeben, dass Smad5 in den Kern transferiert wird (Nishimura *et al.*, 1998) und daher beide Proteine Smad5 und Cyp57 im Kern nebeneinander vorliegen können. Die Ergebnisse der BMP-2 induzierten HEK293-Zellen bestätigten, dass Smad5 vermehrt in den Kern transloziert (**Abbildung 41**). Zudem lassen sie eine deutliche Ko-Lokalisation von Cyp57 und Smad5 im Kern erkennen. Dies weist darauf hin, dass beide Proteine im Zellkern miteinander interagieren können.

Das *Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein* (kurz CHERP) wurde ursprünglich als Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums identifiziert, das intrazelluläre Ca²⁺-Kanäle reguliert (LaPlante *et al.*, 2000). Eine Re-Evaluierung der zellulären Funktion von CHERP zeichnete jedoch ein komplett anderes Bild. Darin wird CHERP als Kernprotein beschrieben, das mit SR-Proteinen interagiert (Lin-Moshier *et al.*, 2013). Mehrere globale Studien zeigen bereits eine Beteiligung von CHERP am humanen Spliceosom (Deckert *et al.*, 2006; Hegele *et al.*, 2012; Jurica & Moore, 2003). Strukturell ist bisher wenig über CHERP bekannt, außer dass es eine SR-reiche Region und eine CTD-bindende Domäne besitzt, worüber es mit der RNA-Polymerase II interagiert. Untypisch für CHERP ist die fehlende RNA-bindende Domäne, die gewöhnlich in SR-Proteinen für eine direkte RNA-Bindung vorkommt. Möglicherweise kann die RNA-Bindung durch die Interaktion mit einem Protein, das eine RRM-Domäne besitzt, vermittelt werden (Sasaki-Osugi *et al.*, 2013).

Präzipitationsanalysen belegten, dass CHERP aus HEK293-Zellen an rekombinantes Cyp57 aus *E. coli* und HEK293-Zellen bindet (**Abbildung 45**). Somit konnte gezeigt werden, dass Cyp57 und CHERP *in vitro* physisch miteinander interagieren. Anfänglich wird CHERP als Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums beschrieben (LaPlante *et al.*, 2000). Dadurch wäre eine *in vivo* Interaktion zwischen CHERP und Cyp57 von vornherein ausgeschlossen. Erst die Ergebnisse von Lin-Moshier *et al.*, (2013) weisen auf eine deutlich Kernlokalisierung von CHERP hin. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Ergebnisse durch Immunfluoreszenz-Untersuchungen bestätigt (**Abbildung 62**, siehe Anhang). Auch die Ergebnisse der differentiellen Zentrifugation mit HEK293-Zellen zeigten die überwiegende Lokalisation von CHERP im Zellkern (**Abbildung 49**) (Sasaki-Osugi *et al.*, 2013). Zudem zeigte sich bei der Überlagerung der Immunfluoreszenz eine deutliche Ko-Lokalisation von Cyp57-eGFP und CHERP im Kern (**Abbildung 47**). Dies deutet auf eine mögliche Interaktion der beiden Proteine in diesem Kompartiment hin.

CHERP ko-lokalisiert in *nuclear speckles* mit dem Splicing-Faktor SC35 und bindet SR140, eine Komponente des U2 *small nuclear ribonucleoprotein* Spliceosomen-Komplexes (Lin-Moshier *et al.*, 2013). Viele Splicing-Faktor sammeln sich in *nuclear speckles* darunter snRNPs und SR-Proteine (Fu, 1995). Als *speckle*-Erkennungssignal wird eine geladene Proteinregion mit basischen Aminosäuren vermutet (Spector & Lamond, 2011). Cyp57 besitzt mit seiner Lysin-reichen Region ein eben solches Erkennungssignal. Bei Analyse der Ko-Lokalisierung von Cyp57 mit SC35 zeigte sich eine schwache Überlagerung beider Proteine (**Abbildung 48**). Die Ko-Lokalisierung wurde verstärkt durch die Behandlung der Zellen mit 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB) in vergrößerten *speckles* (**Abbildung 48**). DRB als Inhibitor der Transkription führt zur Verlagerung von Splicing

Proteinen (u. a. SC35) zurück zu vergrößerten *speckles* (Bregman *et al.*, 1995). Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen machen deutlich, dass Cyp57 angereichert in Substrukturen des Zellkerns im Euchromatin vorkommt und auch in *nuclear speckles* vorliegt.

Es ist beschrieben, dass CHERP eine Komponente des B-Komplex-Spliceosoms ist (Hegele *et al.*, 2012). Auch Cyp57 wurde als Komponente oder temporäres Protein im B-Komplex-Spliceosom gefunden (Deckert *et al.*, 2006). Daneben sind noch weitere Cyclophiline beschrieben, die beim Splicing von Bedeutung sind (Adams *et al.*, 2015; Frausto *et al.*, 2013). Jedoch muss durch weitere Studien geklärt werden, welche Funktion Cyp57 im Spliceosom ausübt. Denkbar wäre zum Beispiel die Bindung von Cyp57 an Nukleinsäuren in einem Komplex oder eine Protein-Protein-Interaktion, wodurch Cyp57 Zugang zu einem Liganden bzw. Substrat erhält. Durch die CLIP-Methode wurde gezeigt, dass Cyp57 in der Lage ist, *in vivo* mit RNA zu interagieren (**Abbildung 38**). Aufgrund der geringen Präzipitation der Immunkomplexe von Cyp57 gelang es nicht, eine RNA-Consensus-Sequenz zu ermitteln. Interessanterweise spielen jedoch poly(G)-Sequenzen an die Cyp57 spezifisch bindet, beim Splicing verschiedener zellulärer und viraler Gene eine wichtige Rolle. Für sie wird eine Funktion bei der Rekrutierung von Splicing-Regulatoren diskutiert. G-Triplets treten abundant in Introns von Säugern auf, wo sie häufig als intronische Splicing-Enhancer fungieren (Xiao *et al.*, 2009).

Cyp57 als Multidomänen-Cyclophilin besitzt mehrere Domänen, die für eine Interaktion mit anderen Proteinen in Frage kommt. Durch Pulldown-Experimente wurde evaluiert, welche Domäne von Cyp57 an der Bindung mit Smad5 und CHERP beteiligt ist. Sowohl für Smad5 als auch für CHERP wurde gezeigt, dass die PPIase-Domäne von Cyp57 (Cyp57₁₋₂₀₃) entscheidend für die Interaktion ist (**Abbildung 42** und **44**). Ob das aktive Zentrum des Cyclophilins innerhalb der PPIase-Domäne als Stelle der Interaktion mit Smad5 und CHERP dient, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Kristallstrukturen von Cyp18 mit Substratproteinen wie CD147 und dem HIV-1 Capsid Protein p24 zeigen eine Bindung des Substrates im aktiven Zentrum (Gamble *et al.*, 1996; Schlegel *et al.*, 2009). Für eine andere PPIase, FKBP12, ist auch eine Interaktion mit einem Protein innerhalb der TGF β -Superfamilie belegt (Okadome *et al.*, 1996). Die PPIase-Domäne von FKBP12 erkennt das Leu-Pro-Motiv im TGF β Typ I-Rezeptor und verhindert dadurch dessen Phosphorylierung (Chen *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1996). Dadurch wird eine Signalweiterleitung zu den Smad-Proteinen weitestgehend verhindert (Massagué *et al.*, 2005). Es kann daher auch eine Interaktion von Smad5 und CHERP im aktiven Zentrum von Cyp57 vermutet werden. Einen experimentellen Hinweis darauf erlaubten die Kompetitions-Experimente mit CsA (**Abbildung 43** und **46**). In Gegenwart von CsA war die Menge an von Cyp57 gebundenem Partnerprotein deutlich reduziert. Jedoch konnte die Interaktion zwischen Cyp57 und Smad5 bzw. CHERP durch CsA nicht vollständig inhibiert werden (**Abbildung 43** und **46**). Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass CsA die Bindung von VirD2 und Cyp18, sowie dem HIV Gag Protein verhindern kann (Deng *et al.*, 1998; Luban *et al.*, 1993). Vermutlich waren die verwendeten CsA-Konzentrationen bei einer Affinität von Cyp57 zu CsA mit einem IC₅₀-Wert von etwa 6 μ M zu gering, um eine Bindung der Interaktionspartner im aktiven Zentrum von Cyp57 unterbinden zu können. Zur Identifizierung der Interaktionsstellen zwischen Cyp57 und Smad5/ CHERP sind deshalb weitere Untersuchungen erforderlich. Unter der Annahme, dass Cyp57 mit seinem aktiven Zentrum mit den Partnerproteinen interagiert, bieten sich in Smad5 mit 47 Prolyl-Bindungen und in CHERP mit 129 Prolyl-Bindungen eine Vielzahl potentieller Targetstellen in der Aminosäuresequenz der Partnerproteine an, deren Prolyl-Isomerisierung von Cyp57 beschleunigt werden könnte. In Smad5 befinden sich drei Met-Pro-Bindungen, die als bevorzugte Substrate von Cyp57 möglicherweise besonders wichtig für die Interaktion sein könnten, während die vier enthaltenen Pro-Pro-Bindungen in Smad5 aufgrund der Substratspezifität von Cyp57 wahrscheinlich kein Ziel der Katalyse darstellen. In CHERP befinden sich neben einer Prolin-reichen Region (AS 355-682), auch sechs Met-Pro-Bindungen, die entscheidend für die Interaktion mit Cyp57 sein könnten.

Für die Bindung von Smad5 und Cyp57 wurde eine fast vollständige Inhibierung der Interaktion durch Heparin gezeigt (**Abbildung 43**). Wie bereits in Kapitel 4.2.4 beschrieben, ahmt das polyanionische Heparin die Struktur von Nukleinsäuren nach. Heparin stellte sich als ein Ligand heraus, der spezifisch mit der RRM-Lys-Domäne von Cyp57, aber nicht mit der PPIase-Domäne interagiert. Da Heparin jedoch die Smad5-Interaktion sowohl mit Cyp57 als auch mit der isolierten PPIase-Domäne von Cyp57 inhibierte, ist die Suppression der Interaktion nicht auf einen spezifischen Einfluss von Heparin auf Cyp57 zurückzuführen. Möglicherweise hat Smad5 das stark negativ geladene Heparin als DNA-Analogon gebunden. Es ist bekannt, dass Smad5 spezifisch doppelstränge DNA im niedrigen nanomolaren Bereich bindet (Shi *et al.*, 1998). Möglicherweise kompetitiert Cyp57 mit Heparin um die Bindestelle an Smad5, durch die höhere Affinität von Smad5 zu Heparin als Nukleinsäure-Mimikry wurde Cyp57 schließlich verdrängt. Kaum einen Einfluss schien Heparin auf die Bindung von Cyp57 und CHERP zu haben (**Abbildung 46**). Das legt nahe, dass die Inhibierung der Interaktion von Cyp57 mit Smad5 durch Heparin tatsächlich auf der Interaktion des Heparins mit dem zugänglichen Partnerprotein Smad5 beruht und nicht auf einer Wirkung auf Cyp57.

Eine Beteiligung der RRM-Domäne von Cyp57 an der Bindung von anderen Interaktionspartnern ist ebenfalls denkbar. Neben der spezifischen Bindung von RNA wurde auch eine Protein-Protein-Wechselwirkung für die RRM-Domäne von Cyp33 und der PHD3-Domäne von MLL1 gezeigt (Park *et al.*, 2010). Um eine solche Möglichkeit genauer einschätzen zu können, fehlen aber Strukturdaten vom Vollängen-Cyp57 und der RRM-Domäne.

4.7 Mögliche Funktionen von Cyp57 *in vivo*

Viele RNA-bindende Proteine besitzen wichtige Funktionen in Zellen der Keimbahn und bei der frühen Embryonalentwicklung. In dieser Phase der Entwicklung gilt die post-transkriptionelle Kontrolle der mRNA als wichtiger Mechanismus für die zeitliche und räumliche Regulation der Genexpression (Kuersten & Goodwin, 2003; de Moor & Richter, 2001; Wickens *et al.*, 2002). Dazu zählen die Prozessierung, der Transport, die Stabilität aber auch die Translation der mRNA (Siomi & Dreyfuss, 1997). Auch Cyp57 könnte eine regulatorische Funktion während der Embryonalentwicklung besitzen, schließlich wurde Cyp57 zum ersten Mal im Gehirn von humanen Föten und Maus-Embryonen gefunden (Zeng *et al.*, 2001; Carninci *et al.*, 2000).

Auch der Fund von Cyp57 als Komponente oder temporäres Protein im B-Komplex-Spliceosom sind ein Indiz für eine mögliche Beteiligung an der post-transkriptionellen Kontrolle der mRNA (Deckert *et al.*, 2006). Dazu kommt, dass hier gezeigt wurde, dass Cyp57 über seine RRM-Domäne in der Lage ist, RNA *in vitro* und *in vivo* zu binden und mit dem Spliceosom-Protein CHERP interagiert, dem eine Nukleinsäure-bindende Domäne fehlt (Lin-Moshier *et al.*, 2013). CHERP könnte als Plattform für die Interaktion mit dem Spliceosom-Komplex dienen oder selbst durch Cyp57 zu den entsprechenden Zielsequenzen geleitet werden. Wie sich zeigte, bindet Cyp57 spezifisch Guanin-reiche RNA-Sequenzen. RNA-Moleküle mit Guanin-*repeats* können G-Quadruplexe ausbilden. Diese G-Quadruplexe in RNAs können in verschiedenen zellulären Prozessen eine regulatorische Rolle spielen, wie beispielsweise bei der Termination der Transkription, des alternativen Splicings und der Modulation der Translation (Ji *et al.*, 2011). Für RNA G-Quadruplex-Strukturen in Introns wurde bereits ein Einfluss auf das Splicing und die Expression der humanen Gene FMR1 und TP53 gezeigt (Didiot *et al.*, 2008; Marcel *et al.*, 2011). Möglicherweise kann Cyp57 unter bestimmten Voraussetzungen regulatorisch auf das Splicing wirken, dies muss jedoch in weiteren Studien untersucht werden.

Es wurde bereits dargelegt, dass mehrere Cyclophiline einen Einfluss auf das Splicing und die Spliceosom-Zusammensetzung besitzen (Adams *et al.*, 2015). So wurde für Cyp33 und Cyp58 in Abhängigkeit ihrer Konzentration ein negativer Einfluss sowohl auf die Splicing-Reaktion, als auch die Bildung des C- bzw. B-Komplex-Spliceosoms *in vitro* festgestellt (Adams *et al.*, 2015). Außerdem stellt

sich die Frage, welche Funktion die PPIase-Domäne mit ihrer enzymatischen Aktivität in diesem Umfeld spielen könnte. Mutationen im aktiven Zentrum der Spliceosom-assoziierten Cyclophiline zeigten im Falle von Cyp88 nur einen geringen Einfluss auf die Splicing-Effizienz im Modell-System und im Falle von Cyp18.1, Cyp33, Cyp18.2a bzw. Cyp73 gar keinen Einfluss auf die Effizienz (Adams *et al.*, 2015). Es lässt sich jedoch vermuten, dass die Spliceosom-assoziierten Cyclophiline, darunter auch Cyp57, unter bestimmten Bedingungen während des Splicings die Prolyl-Isomerisierung in bestimmten Substratproteinen katalysieren und auf diese Weise das Splicing beeinflussen. Durch die mögliche Redundanz in den Funktionen der Cyclophiline und der Tatsache, dass einige der Cyclophiline nicht durch CsA inhibierbar sind, ist es schwierig, eine experimentelle Bestätigung dieser Vermutung zu erhalten. Die Tatsache, dass Cyp57 mit seiner PPIase-Domäne und dabei wahrscheinlich mit seinem aktiven Zentrum mit dem Spliceosomen-Protein CHERP interagiert, weist darauf hin, dass bestimmte Cyclophiline im Spliceosom mit spezifischen Partnerproteinen interagieren und diese beeinflussen können.

Smad5 als Signalprotein der BMP-Kaskade ist ebenfalls entwicklungsbiologisch von großer Bedeutung für die Embryonalentwicklung (Hogan, 1996). Als Transkriptionsfaktor bindet Smad5 Sequenzspezifisch am RNA-Polymerase II *core* Promoter. Dieser Bereich gilt als Schlüsselkomponente für die Regulation der Genexpression (Butler & Kadonaga, 2002). Für die Cyp57-Orthologen Proteine AtCyp59 und Rct1 wurde bereits die Bindung der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II gezeigt (Bannikova *et al.*, 2012). Interessant ist, dass die CTD der RNA-Polymerase II als Plattform für die ko-transkriptionelle mRNA-Prozessierung dient (Zorio & Bentley, 2004). Für die Polyadenylierung der mRNA wird ein Komplex gebildet, der das Polyadenylierungssignal strangaufwärts der poly(A)-Schnittstelle erkennt. Strangabwärts befindet sich ein GU-reiches Sequenzelement, das von regulatorischen Proteinen erkannt wird und (Colgan & Manley, 1997; Wahle & Keller, 1996) dadurch zu einer alternativen Polyadenylierung der mRNA führen kann (Beaudoing *et al.*, 2000). In diesem Zusammenhang ist besonders interessant, dass die RRM-Domäne von Cyp57 bevorzugt an G- und U-reiche Sequenzen bindet, sodass Cyp57 als potentieller Interaktionspartner dieser Sequenzbereiche in Frage kommt. Der Phosphorylierungsstatus der CTD spielt dabei auch eine wichtige Rolle für die Rekrutierung vieler verschiedener Proteine zur CTD und zum Transkriptionskomplex (Lima, 2005; Meinhart *et al.*, 2005). Cyp57 könnte ähnlich, wie AtCyp59 und Rct1 die Heptapetid-*repeats* der CTD umordnen und dadurch den Phosphorylierungsstatus der CTD beeinflussen, wie die PPIase Pin1 im Menschen bzw. Ess1 in *S. cerevisiae* (Ma *et al.*, 2012; Werner-Allen *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2012). Alternativ kann aber auch die Aktivität verschiedener Kinasen oder Phosphatasen, die einen Einfluss auf die CTD haben durch PPIasen reguliert werden (Bannikova *et al.*, 2012). Daher könnte es sich bei der Interaktion von Cyp57 und Smad5 um eine regulatorische Funktion von Cyp57 auf Smad-Proteine bei der Signalweiterleitung handeln. Wie Cyp33, könnte Cyp57 mit seiner PPIase-Domäne aber auch spezifisch eine Prolyl-Bindung in Smad5 katalysieren und dadurch Konformationsänderungen bewirken, die eine Rekrutierung weiterer regulatorischer Proteine begünstigen. Möglicherweise interagiert Cyp57 mit Smad5 aber auch im Spliceosom. Für Smad5 wurden mit dem Hefe-2-Hybrid-System Interaktionen mit Komponenten des Spliceosoms wie snRNP70 oder SF3B1 gefunden, ohne jedoch genauer die Funktion zu untersuchen (Colland *et al.*, 2004).

Für PPIasen ist bereits bekannt, dass durch eine funktionelle Kopplung verschiedener Domänen die enzymatische Aktivität durch die Bindung eines Liganden reguliert werden kann (Schiene-Fischer, 2015). Entsprechend wurde für Cyp33 eine gesteigerte PPIase-Aktivität durch die Bindung an mRNA gezeigt (Wang *et al.*, 2008). Wiederum wurde für AtCyp59 eine Reduktion der PPIase-Aktivität durch die Bindung spezifischer RNA gefunden (Bannikova *et al.*, 2012). Für Cyp57 wurde ebenfalls eine leichte Steigerung der Aktivität festgestellt. Diese Art der allosterischen Regulation der katalytischen Aktivität deutet auf eine funktionelle Kopplung der Domänen hin. Für AtCyp59 wird vermutet, dass die PPIase-Aktivität durch die Bindung *nascenter* RNA reguliert wird und dadurch die RNA-Polymerase II Aktivität beeinflusst wird. Eine ähnliche Steuerung seiner Funktion ist auch für Cyp57 denkbar.

5. Zusammenfassung

Cyclophiline sind Faltungshelferenzyme, die an einer Vielzahl zellulärer regulatorischer Prozesse beteiligt sind. Cyp57 ist ein in höheren Eukaryoten konserviertes Multidomänen-Cyclophilin, das aus einer N-terminalen PPIase-Domäne und einer C-terminalen RRM-Domäne besteht. Das Ziel dieser Arbeit war eine proteinbiochemische Charakterisierung von Cyp57 sowie die Identifizierung von physiologischen Interaktionspartnern des Proteins.

- In der vorliegenden Arbeit wurde Cyp57 rekombinant in *E. coli* exprimiert und gereinigt.
- Nach Bestimmung der Domänengrenzen von Cyp57 durch limitierte Proteolyse wurden Cyp57-Varianten, die die separate PPIase- und RRM-Lys-Domäne enthalten, rekombinant in *E. coli* exprimiert und gereinigt.
- Die Sekundärstrukturanalyse von Cyp57 ergab, dass Cyp57 aus zwei unabhängig gefalteten Domänen besteht, deren Strukturen sich nicht gegenseitig beeinflussen.
- Für Cyp57 konnte erstmals eine PPIase-Aktivität mit einer katalytischen Effizienz von $1.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ gegenüber dem Substrat Abz-Ala-Met-Pro-Phe-pNA gezeigt werden.
- Cyp57 bevorzugte sowohl Substrate mit ungeladenen aliphatischen als auch mit aromatischen Resten N-terminal zur Prolyl-Bindung.
- Die PPIase-Aktivität von Cyp57 konnte mit einem IC_{50} -Wert von 6 μM nur sehr schwach durch Cyclosporin A inhibiert werden.
- Für Cyp57 konnte erstmals die Struktur der PPIase-Domäne (Cyp₁₋₁₆₈) mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden. Die Struktur ist sehr ähnlich zu der von Cyp18 ist, mit einigen unterschieden in der Tertiärstruktur und der Orientierung einiger Reste im aktiven Zentrum von Cyp57.
- Für die RRM-Domäne von Cyp57 konnte die Bindung von den Nukleinsäure-Modell-Verbindungen Heparin sowie den Ribohomopolymeren poly(G) und poly(U) gezeigt werden. Zudem wurde die Bindung von Cyp57₂₀₄₋₄₉₂ bzw. Cyp57₂₄₀₋₃₁₈ für das 10-mere RNA-Oligonukleotid G₁₀ und das Hepta-RNA-Oligonukleotid GUGGCCG thermodynamisch charakterisiert.
- Mittels transienter Expression einer eGFP-Fusion in HEK293-Zellen und differentieller Zentrifugation wurde eine Lokalisation für Cyp57 im Zellkern ermittelt.
- Durch Datenbankanalysen wurden Smad5 und CHERP als Interaktionspartner von Cyp57 ermittelt.
- Die PPIase-Domäne von Cyp57 wurde als entscheidend für die Bindung von Smad5 und CHERP identifiziert.
- Die Interaktion von Smad5 und CHERP kann im aktiven Zentrum von Cyp57 vermutet werden.
- Cyp57 zeigte eine Ko-Lokalisation mit Smad5 im Zellkern nach der Behandlung der HEK293-Zellen mit BMP-2. Zudem ko-lokalisiert CHERP mit Cyp57 im Zellkern, durch die Behandlung mit dem Transkriptions-Inhibitor DRB wurde eine verstärkte Ko-Lokalisierung von Cyp57 und CHERP in *nuclear speckles* beobachtet.

Literatur

- Adams, B., Musiyenko, A., Kumar, R., and Barik, S. (2005). A Novel Class of Dual-family Immunophilins. *J. Biol. Chem.* *280*, 24308–24314.
- Adams, B.M., Coates, M.N., Jackson, S.R., Jurica, M.S., and Davis, T.L. (2015). Nuclear cyclophilins affect spliceosome assembly and function *in vitro*. *Biochem. J.* *469*, 223–233.
- Adams, P.D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.-W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., et al. (2010). “PHENIX”: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D* *66*, 213–221.
- Ahern, G.P., Junankar, P.R., and Dulhunty, A.F. (1994). Single channel activity of the ryanodine receptor calcium release channel is modulated by FK-506. *FEBS Lett.* *352*, 369–374.
- Albert, A., Lavoie, S., and Vincent, M. (1999). A hyperphosphorylated form of RNA polymerase II is the major interphase antigen of the phosphoprotein antibody MPM-2 and interacts with the peptidyl-prolyl isomerase Pin1. *J. Cell Sci.* *112*, 2493–2500.
- Alkhatib, G., Murata, K., and Roder, J.C. (1997). Cellular distribution of a natural killer cell tumour recognition-related surface antigen in purified human lymphocytes. *Immunology* *92*, 173–179.
- Allain, F.H., Gubser, C.C., Howe, P.W., Nagai, K., Neuhaus, D., and Varani, G. (1996). Specificity of ribonucleoprotein interaction determined by RNA folding during complex formulation. *Nature* *380*, 646–650.
- Allan, R.K., and Ratajczak, T. (2011). Versatile TPR domains accommodate different modes of target protein recognition and function. *Cell Stress Chaperones* *16*, 353–367.
- Anderson, S.K., Gallinger, S., Roder, J., Frey, J., Young, H.A., and Ortaldo, J.R. (1993). A cyclophilin-related protein involved in the function of natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 542–546.
- Antonyan, A.P., Minasyants, M. V., and Vardevanyan, P.O. (2015). Ethidium Bromide binding to poly(G): Dependence on Na⁺-concentration. *Proc. Yerevan State Univ.* *2*, 34–39.
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., et al. (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res.* *40*, W597–W603.
- Auweter, S.D., Oberstrass, F.C., and Allain, F.H.-T. (2006). Sequence-specific binding of single-stranded RNA: is there a code for recognition? *Nucleic Acids Res.* *34*, 4943–4959.
- Avis, J.M., Allain, F.H., Howe, P.W., Varani, G., Nagai, K., and Neuhaus, D. (1996). Solution structure of the N-terminal RNP domain of U1A protein: the role of C-terminal residues in structure stability and RNA binding. *J. Mol. Biol.* *257*, 398–411.
- Baltz, A.G., Munschauer, M., Schwanhäusser, B., Vasile, A., Murakawa, Y., Schueler, M., Youngs, N., Penfold-Brown, D., Drew, K., Milek, M., et al. (2012). The mRNA-bound proteome and its global occupancy profile on protein-coding transcripts. *Mol. Cell* *46*, 674–690.
- Banerjee, A., Periyasamy, S., Wolf, I.M., Hinds, T.D., Yong, W., Shou, W., and Sanchez, E.R. (2008). Control of Glucocorticoid and Progesterone Receptor Subcellular Localization by the Ligand-Binding Domain Is Mediated by Distinct Interactions with Tetratricopeptide Repeat Proteins. *Biochemistry* *47*, 10471–10480.
- Bannikova, O., Zywicki, M., Marquez, Y., Skrahina, T., Kalyna, M., and Barta, A. (2012). Identification of RNA targets for the nuclear multidomain cyclophilin AtCyp59 and their effect on PPIase activity. *Nucleic Acids Res.* *41*, 1783–1796.
- Barent, R.L., Nair, S.C., Carr, D.C., Ruan, Y., Rimerman, R.A., Fulton, J., Zhang, Y., and Smith, D.F. (1998). Analysis of FKBP51/FKBP52 chimeras and mutants for Hsp90 binding and association with progesterone receptor complexes. *Mol. Endocrinol.* *12*, 342–354.
- Baum, N., Schiene-Fischer, C., Frost, M., Schumann, M., Sabapathy, K., Ohlenschläger, O., Grosse, F., and Schlott, B. (2009). The prolyl cis/trans isomerase cyclophilin 18 interacts with the tumor suppressor p53 and modifies its functions in cell cycle regulation and apoptosis. *Oncogene* *28*, 3915–3925.
- Beaudoing, E., Freier, S., Wyatt, J.R., Claverie, J.M., and Gautheret, D. (2000). Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes. *Genome Res.* *10*, 1001–1010.
- Behzadnia, N., Golas, M.M., Hartmuth, K., Sander, B., Kastner, B., Deckert, J., Dube, P., Will, C.L., Urlaub, H., Stark, H., et al. (2007). Composition and three-dimensional EM structure of double affinity-purified, human prespliceosomal A complexes. *EMBO J.* *26*, 1737–1748.
- Bendak, K., Loughlin, F.E., Cheung, V., O’Connell, M.R., Crossley, M., and Mackay, J.P. (2012). A rapid method for assessing the RNA-binding potential of a protein. *Nucleic Acids Res.* *40*, e105.

- Bessonov, S., Anokhina, M., Will, C.L., Urlaub, H., and Lührmann, R. (2008). Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature* *452*, 846–850.
- Bessonov, S., Anokhina, M., Krasauskas, A., Golas, M.M., Sander, B., Will, C.L., Urlaub, H., Stark, H., and Lührmann, R. (2010). Characterization of purified human B act spliceosomal complexes reveals compositional and morphological changes during spliceosome activation and first step catalysis. *RNA* *4*, 2384–2403.
- Betts, M.J., and Russell, R.B. (2003). Amino-Acid Properties and Consequences of Substitutions. *Bioinforma. Genet. A Bioinforma. Prim. Anal. Genet. Data Second Ed.* *4*, 311–342.
- Blatch, G.L., and Lässle, M. (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* *21*, 932–939.
- Borel, J.F., Feurer, C., Gubler, H.U., and Stähelin, H. (1976). Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* *6*, 468–475.
- Bourquin, J.P., Stagljar, I., Meier, P., Moosmann, P., Silke, J., Baechi, T., Georgiev, O., and Schaffner, W. (1997). A serine/arginine-rich nuclear matrix cyclophilin interacts with the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nucleic Acids Res.* *25*, 2055–2061.
- Braaten, D., and Luban, J. (2001). Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells. *EMBO J.* *20*, 1300–1309.
- Brandts, J.F., Halvorson, H.R., and Brennan, M. (1975). Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. *Biochemistry* *14*, 4953–4963.
- Brázda, V., Hároníková, L., Liao, J., and Fojta, M. (2014). DNA and RNA Quadruplex-Binding Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* *15*, 17493–17517.
- Bregman, D.B., Du, L., Van der Zee, S., and Warren, S.L. (1995). Transcription-dependent redistribution of the large subunit of RNA polymerase II to discrete nuclear domains. *J. Cell Biol.* *129*, 287–298.
- Brown, N.R., Noble, M.E., Endicott, J.A., and Johnson, L.N. (1999). The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases. *Nat. Cell Biol.* *1*, 438–443.
- Brown, V., Small, K., Lakkis, L., Feng, Y., Gunter, C., Wilkinson, K.D., and Warren, S.T. (1998). Purified Recombinant Fmrp Exhibits Selective RNA Binding as an Intrinsic Property of the Fragile X Mental Retardation Protein. *J. Biol. Chem.* *273*, 15521–15527.
- Burge, S., Parkinson, G.N., Hazel, P., Todd, A.K., and Neidle, S. (2006). Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res.* *34*, 5402–5415.
- Butler, J.E.F., and Kadonaga, J.T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.* *16*, 2583–2592.
- Callebaut, I., Renoir, J.M., Lebeau, M.C., Massol, N., Burny, A., Baulieu, E.E., and Moron, J.P. (1992). An immunophilin that binds M(r) 90,000 heat shock protein: main structural features of a mammalian p59 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 6270–6274.
- Cameron, A.M., Steiner, J.P., Sabatini, D.M., Kaplin, A.I., Walensky, L.D., and Snyder, S.H. (1995). Immunophilin FK506 binding protein associated with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates calcium flux. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 1784–1788.
- Capila, I., and Linhardt, R.J. (2002). Heparin-protein interactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *41*, 391–412.
- Carninci, P., Shibata, Y., Hayatsu, N., Sugahara, Y., Shibata, K., Itoh, M., Konno, H., Okazaki, Y., Muramatsu, M., and Hayashizaki, Y. (2000). Normalization and subtraction of cap-trapper-selected cDNAs to prepare full-length cDNA libraries for rapid discovery of new genes. *Genome Res.* *10*, 1617–1630.
- Carrello, A., Allan, R.K., Morgan, S.L., Owen, B.A.L., Mok, D., Ward, B.K., Minchin, R.F., Toft, D.O., and Ratajczak, T. (2004). Interaction of the Hsp90 cochaperone cyclophilin 40 with Hsc70. *Cell Stress Chaperones* *9*, 167–181.
- Cavaloc, Y., Bourgeois, C.F., Kister, L., and Stévenin, J. (1999). The splicing factors 9G8 and SRp20 transactivate splicing through different and specific enhancers. *RNA* *5*, 468–483.
- Chambers, C.A., Gallinger, S., Anderson, S.K., Giardina, S., Ortaldo, J.R., Hozumi, N., and Roder, J. (1994). Expression of the NK-TR gene is required for NK-like activity in human T cells. *J. Immunol.* *152*, 2669–2674.
- Chambers, J.C., Kenan, D., Martin, B.J., and Keene, J.D. (1988). Genomic structure and amino acid sequence domains of the human La autoantigen. *J. Biol. Chem.* *263*, 18043–18051.
- Chatterji, U., Bobardt, M., Selvarajah, S., Yang, F., Tang, H., Sakamoto, N., Vuagniaux, G., Parkinson, T., and Gallay, P. (2009). The Isomerase Active Site of Cyclophilin A Is Critical for Hepatitis C Virus Replication. *J. Biol. Chem.* *284*, 16998–17005.

- Chen, Y.-G., Liu, F., and Massagué, J. (1997). Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J.* *16*, 3866–3876.
- Chen, Y.-I.G., Moore, R.E., Ge, H.Y., Young, M.K., Lee, T.D., and Stevens, S.W. (2007). Proteomic analysis of *in vivo*-assembled pre-mRNA splicing complexes expands the catalog of participating factors. *Nucleic Acids Res.* *35*, 3928–3944.
- Cléry, A., Jayne, S., Benderska, N., Dominguez, C., Stamm, S., and Allain, F.H.-T. (2011). Molecular basis of purine-rich RNA recognition by the human SR-like protein Tra2-β1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 443–450.
- Clipstone, N.A., and Crabtree, G.R. (1992). Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* *357*, 695–697.
- Colgan, D.F., and Manley, J.L. (1997). Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev.* *11*, 2755–2766.
- Colgan, J., Asmal, M., Neagu, M., Yu, B., Schneidkraut, J., Lee, Y., Sokolskaja, E., Andreotti, A., and Luban, J. (2004). Cyclophilin A Regulates TCR Signal Strength in CD4+ T Cells via a Proline-Directed Conformational Switch in Itk. *Immunity* *21*, 189–201.
- Colland, F., Jacq, X., Trouplin, V., Mougin, C., Groizeleau, C., Hamburger, A., Meil, A., Legrain, P., and Gauthier, J.-M. (2004). Functional Proteomics Mapping of a Human Signaling Pathway. *Genome Res.* 1324–1332.
- Daubner, G.M., Cléry, A., Jayne, S., Stevenin, J., and Allain, F.H.-T. (2012). A syn - anti conformational difference allows SRSF2 to recognize guanines and cytosines equally well. *EMBO J.* *31*, 162–174.
- Daubner, G.M., Cléry, A., and Allain, F.H.-T. (2013). RRM-RNA recognition: NMR or crystallography...and new findings. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *23*, 100–108.
- Daum, S., Schumann, M., Mathea, S., Aumüller, T., Balsley, M.A., Constant, S.L., Lacroix, B.F. de, Kruska, F., Braun, M., and Schiene-Fischer, C. (2009). Isoform-specific Inhibition of Cyclophilins. *Biochemistry* *48*, 6268–6277.
- Davis, I.W., Leaver-Fay, A., Chen, V.B., Block, J.N., Kapral, G.J., Wang, X., Murray, L.W., Arendall, W.B., Snoeyink, J., Richardson, J.S., et al. (2007). MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* *35*, W375–W383.
- Davis, T.L., Walker, J.R., Ouyang, H., MacKenzie, F., Butler-Cole, C., Newman, E.M., Eisenmesser, E.Z., and Dhe-Paganon, S. (2008). The crystal structure of human WD40 repeat-containing peptidylprolyl isomerase (PPWD1). *FEBS J.* *275*, 2283–2295.
- Davis, T.L., Walker, J.R., Campagna-Slater, V., Finerty, P.J., Paramanathan, R., Bernstein, G., MacKenzie, F., Tempel, W., Ouyang, H., Lee, W.H., et al. (2010). Structural and biochemical characterization of the human cyclophilin family of peptidyl-prolyl isomerases. *PLoS Biol.* *8*, e1000439.
- Deckert, J., Hartmuth, K., Boehringer, D., Behzadnia, N., Will, C.L., Kastner, B., Stark, H., Urlaub, H., and Lührmann, R. (2006). Protein composition and electron microscopy structure of affinity-purified human spliceosomal B complexes isolated under physiological conditions. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 5528–5543.
- DeMaria, C.T., Sun, Y., Long, L., Wagner, B.J., and Brewer, G. (1997). Structural determinants in AUF1 required for high affinity binding to A + U-rich elements. *J. Biol. Chem.* *272*, 27635–27643.
- Deng, W., Chen, L., Wood, D.W., Metcalfe, T., Liang, X., Gordon, M.P., Comai, L., and Nester, E.W. (1998). Agrobacterium VirD2 protein interacts with plant host cyclophilins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 7040–7045.
- Deo, R.C., Bonanno, J.B., Sonenberg, N., and Burley, S.K. (1999). Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell* *98*, 835–845.
- Didiot, M.-C., Tian, Z., Schaeffer, C., Subramanian, M., Mandel, J.-L., and Moine, H. (2008). The G-quartet containing FMRP binding site in FMR1 mRNA is a potent exonic splicing enhancer. *Nucleic Acids Res.* *36*, 4902–4912.
- Ding, J., Hayashi, M.K., Zhang, Y., Manche, L., Krainer, A.R., and Xu, R.M. (1999). Crystal structure of the two-RRM domain of hnRNP A1 (UP1) complexed with single-stranded telomeric DNA. *Genes Dev.* *13*, 1102–1115.
- Dominguez, C., Fiset, J.-F., Chabot, B., and Allain, F.H.-T. (2010). Structural basis of G-tract recognition and encaging by hnRNP F quasi-RRMs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 853–861.
- Doyle, V., Virji, S., and Crompton, M. (1999). Evidence that cyclophilin-A protects cells against oxidative stress. *Biochem. J.* *341*, 127–132.
- Ducy, P., and Karsenty, G. (2000). The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int.* *57*, 2207–2214.
- Edlich, F., Weiwad, M., Erdmann, F., Fanghänel, J., Jarczowski, F., Rahfeld, J.-U., and Fischer, G. (2005). Bcl-2 regulator FKBP38 is activated by Ca²⁺/calmodulin. *EMBO J.* *24*, 2688–2699.

- Edlich, F., Erdmann, F., Jarczowski, F., Moutty, M.-C., Weiwad, M., and Fischer, G. (2007). The Bcl-2 Regulator FKBP38-Calmodulin-Ca²⁺ Is Inhibited by Hsp90. *J. Biol. Chem.* *282*, 15341–15348.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., and Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. Sect. D* *66*, 486–501.
- Espeseth, A.S., Huang, Q., Gates, A., Xu, M., Yu, Y., Simon, A.J., Shi, X.-P., Zhang, X., Hodor, P., Stone, D.J., et al. (2006). A genome wide analysis of ubiquitin ligases in APP processing identifies a novel regulator of BACE1 mRNA levels. *Mol. Cell. Neurosci.* *33*, 227–235.
- Fabrizio, P., Dannenberg, J., Dube, P., Kastner, B., Stark, H., Urlaub, H., and Lührmann, R. (2009). The evolutionarily conserved core design of the catalytic activation step of the yeast spliceosome. *Mol. Cell* *36*, 593–608.
- Fanghänel, J. (2005). Untersuchungen zum Katalysemechanismus von Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Fanghänel, J., and Fischer, G. (2004). Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. *Front. Biosci.* *9*, 3453–3478.
- Feng, X.-H., and Derynck, R. (2005). Specificity and Versatility in Tgf-B Signaling Through Smads. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *21*, 659–693.
- Fischer, G., and Schmid, F.X. (1990). The mechanism of protein folding. Implications of *in vitro* refolding models for de novo protein folding and translocation in the cell. *Biochemistry* *29*, 2205–2212.
- Fischer, G., Bang, H., Berger, E., and Schellenberger, A. (1984). Conformational specificity of Chymotrypsin toward proline-containing substrates. *Biochim. Biophys. Acta* *791*, 87–97.
- Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., and Schmid, F.X. (1989). Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* *337*, 476–479.
- Fischer, G., Tradler, T., and Zarnt, T. (1998). The mode of action of peptidyl prolyl cis/trans isomerases *in vivo*: binding vs. catalysis. *FEBS Lett.* *426*, 17–20.
- Fontana, A., De Laureto, P.P., Spolaore, B., Frare, E., Picotti, P., and Zamboni, M. (2004). Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochim. Pol.* *51*, 299–321.
- Frausto, S.D., Lee, E., and Tang, H. (2013). Cyclophilins as modulators of viral replication. *Viruses* *5*, 1684–1701.
- Frost, M. (2010). Charakterisierung der humanen prototypischen Cyclophiline COAS2 und Cyp18.2a. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Fu, X.D. (1995). The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *RNA* *1*, 663–680.
- Galat, A. (1993). Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins. *Eur. J. Biochem.* *216*, 689–707.
- Galat, A. (2003). Peptidylprolyl cis/trans isomerases (Immunophilins): biological diversity-targets-functions. *Curr. Top. Med. Chem.* *3*, 1315–1347.
- Galat, A., and Bua, J. (2010). Molecular aspects of cyclophilins mediating therapeutic actions of their ligands. *Cell. Mol. Life Sci.* *67*, 3467–3488.
- Gamble, T.R., Vajdos, F.F., Yoo, S., Worthylake, D.K., Houseweart, M., Sundquist, W.I., and Hill, C.P. (1996). Crystal Structure of Human Cyclophilin A Bound to the Amino-Terminal Domain of HIV-1 Capsid. *Cell* *87*, 1285–1294.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M., Appel, R., and Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *Proteomics Protoc. Handbook*, Humana Press 571–607.
- Geiger, T., Madden, S.F., Gallagher, W.M., Cox, J., and Mann, M. (2012). Proteomic portrait of human breast cancer progression identifies novel prognostic markers. *Cancer Res.* *72*, 2428–2439.
- Gill, S.C., and von Hippel, P.H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* *182*, 319–326.
- Glisovic, T., Bachorik, J.L., Yong, J., and Dreyfuss, G. (2008). RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett.* *582*, 1977–1986.
- Göthel, S.F., and Marahiel, M.A. (1999). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell. Mol. Life Sci.* *55*, 423–436.
- Goto, K., Watashi, K., Inoue, D., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (2009). Identification of cellular and viral factors related to anti-hepatitis C virus activity of cyclophilin inhibitor. *Cancer Sci.* *100*, 1943–1950.
- Grow, E.J., and Wysocka, J. (2010). Flipping MLL1's switch one proline at a time. *Cell* *141*, 1108–1110.
- Gullerova, M., Barta, A., and Lorkovic, Z.J. (2006). AtCyp59 is a multidomain cyclophilin from *Arabidopsis thaliana* that interacts with SR proteins and the C-terminal domain of the RNA polymerase II. *RNA* *12*, 631–643.

- Gullerova, M., Barta, A., and Lorkovic, Z.J. (2007). Rct1, a nuclear RNA recognition motif-containing cyclophilin, regulates phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 3601–3611.
- Gwinn, W.M., Damsker, J.M., Falahati, R., Okwumabua, I., Kelly-Welch, A., Keegan, A.D., Vanpouille, C., Lee, J.J., Dent, L.A., Leitenberg, D., et al. (2006). Novel approach to inhibit asthma-mediated lung inflammation using anti-CD147 intervention. *J. Immunol.* *177*, 4870–4879.
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In DNA Cloning, D. Glover, ed. (Oxford: IRL Press), pp. 109–135.
- Handa, N., Nureki, O., Kurimoto, K., Kim, I., Sakamoto, H., Shimura, Y., Muto, Y., and Yokoyama, S. (1999). Structural basis for recognition of the tra mRNA precursor by the Sex-lethal protein. *Nature* *398*, 579–585.
- Handschumacher, R.E., Harding, M.W., Rice, J., and Drugge, R.J. (1984). Cyclophilin: A Specific Cytosolic Binding Protein for Cyclosporin A. *Science* *226*, 544–547.
- Hanes, S.D., Shank, P.R., and Bostian, K.A. (1989). Sequence and mutational analysis of ESS1, a gene essential for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *5*, 55–72.
- Hardin, J.W., Hu, Y.X., and McKay, D.B. (2010). Structure of the RNA binding domain of a DEAD-box helicase bound to its ribosomal RNA target reveals a novel mode of recognition by an RNA recognition motif. *J. Mol. Biol.* *402*, 412–427.
- Harding, M.W., Galat, A., Uehling, D.E., and Schreiber, S.L. (1989). A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* *341*, 758–760.
- Harris, K.A., Jones, V., Bilbille, Y., Swairjo, M.A., and Agris, P.F. (2011). YrdC exhibits properties expected of a subunit for a tRNA threonylcarbamoyl transferase. *RNA* *17*, 1678–1687.
- Hatakeyama, S., Yada, M., Matsumoto, M., Ishida, N., and Nakayama, K.I. (2001). U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J. Biol. Chem.* *276*, 33111–33120.
- Hegele, A., Kamburov, A., Grossmann, A., Sourlis, C., Wowro, S., Weimann, M., Will, C.L., Pena, V., Lührmann, R., and Stelzl, U. (2012). Dynamic protein-protein interaction wiring of the human spliceosome. *Mol. Cell* *45*, 567–580.
- Hennig, L., Christner, C., Kipping, M., Schelbert, B., Rücknagel, K.P., Grabley, S., Küllertz, G., and Fischer, G. (1998). Selective inactivation of parvulin-like peptidyl-prolyl cis/trans isomerases by juglone. *Biochemistry* *37*, 5953–5960.
- Hoffmann, H., and Schiene-Fischer, C. (2014). Functional aspects of extracellular cyclophilins. *Biol. Chem.* *395*, 721–735.
- Hoffmann, K., and Handschumacher, R.E. (1995). Cyclophilin-40: evidence for a dimeric complex with hsp90. *Biochem. J.* *307*, 5–8.
- Hogan, B.L. (1996). Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* *10*, 1580–1594.
- Horowitz, D.S., Lee, E.J., Mabon, S. a, and Misteli, T. (2002). A cyclophilin functions in pre-mRNA splicing. *EMBO J.* *21*, 470–480.
- Huang, H.K., Forsburg, S.L., John, U.P., O’Connell, M.J., and Hunter, T. (2001). Isolation and characterization of the Pin1/Ess1p homologue in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* *114*, 3779–3788.
- Huisinga, K.L., Brower-Toland, B., and Elgin, S.C.R. (2006). The contradictory definitions of heterochromatin: Transcription and silencing. *Chromosoma* *115*, 110–122.
- Huppertz, I., Attig, J., D’Ambrogio, A., Easton, L.E., Sibley, C.R., Sugimoto, Y., Tajnik, M., König, J., and Ule, J. (2014). iCLIP: Protein–RNA interactions at nucleotide resolution. *Methods* *65*, 274–287.
- Iko, Y., Kodama, T.S., Kasai, N., Oyama, T., Morita, E.H., Muto, T., Okumura, M., Fujii, R., Takumi, T., Tate, S.I., et al. (2004). Domain architectures and characterization of an RNA-binding protein, TLS. *J. Biol. Chem.* *279*, 44834–44840.
- Itoh, S., and Navia, M.A. (1995). Structure comparison of native and mutant human recombinant FKBP12 complexes with the immunosuppressant drug FK506 (tacrolimus). *Protein Sci.* *4*, 2261–2268.
- Jarczowski, F. (2008). Biochemie und Protein-Protein Wechselwirkungen des humanen FK506-bindenden Proteins 36. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Jensen, L.J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J., Doerks, T., Julien, P., Roth, A., Simonovic, M., et al. (2009). STRING 8 - a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res.* *37*, D412–D416.
- Ji, X., Sun, H., Zhou, H., Xiang, J., Tang, Y., and Zhao, C. (2011). Research progress of RNA quadruplex. *Nucleic Acid Ther.* *21*, 185–200.

- Jordan, M., and Wurm, F. (2004). Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. *Methods* 33, 136–143.
- Jurica, M.S., and Moore, M.J. (2003). Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol. Cell* 12, 5–14.
- Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 66, 125–132.
- Kadlec, J., Izaurralde, E., and Cusack, S. (2004). The structural basis for the interaction between nonsense-mediated mRNA decay factors UPF2 and UPF3. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 330–337.
- Kalab, P., and Heald, R. (2008). The RanGTP gradient - a GPS for the mitotic spindle. *J. Cell Sci.* 121, 1577–1586.
- Kallen, J., and Walkinshaw, M.D. (1992). The X-ray structure of a tetrapeptide bound to the active site of human cyclophilin A. *FEBS Lett.* 300, 286–290.
- Ke, H., and Huai, Q. (2004). Crystal Structures of Cyclophilin and its Partners. *Front. Biosci.* 9, 2285–2296.
- Ke, H., Mayrose, D., and Cao, W. (1993). Crystal structure of cyclophilin A complexed with substrate Ala-Pro suggests a solvent-assisted mechanism of cis-trans isomerization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 3324–3328.
- Ke, H., Mayrose, D., Belshaw, P.J., Alberg, D.G., Schreiber, S.L., Chang, Z.Y., Etkorn, F.A., Ho, S., and Walsh, C.T. (1994). Crystal structures of cyclophilin A complexed with cyclosporin A and N-methyl-4-[(E)-2-butenyl]-4,4-dimethylthreonine cyclosporin A. *Structure* 2, 33–44.
- Ke, H.M., Zydowsky, L.D., Liu, J., and Walsh, C.T. (1991). Crystal structure of recombinant human T-cell cyclophilin A at 2.5 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 9483–9487.
- Kejnovská, I., Vorlíčková, M., Brázdová, M., and Sagi, J. (2014). Stability of human telomere quadruplexes at high DNA concentrations. *Biopolymers* 101, 428–438.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J.E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* 10, 845–858.
- Kenan, D.J., Query, C.C., and Keene, J.D. (1991). RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem. Sci.* 16, 214–220.
- Kieffer, L.J., Thalhammer, T., and Handschumacher, R.E. (1992). Isolation and characterization of a 40-kDa cyclophilin-related protein. *J. Biol. Chem.* 267, 5503–5507.
- Kielkopf, C.L., Lücke, S., and Green, M.R. (2004). U2AF homology motifs: protein recognition in the RRM world. *Genes Dev.* 18, 1513–1526.
- Kino, T., Hatanaka, H., Miyata, S., Inamura, N., Nishiyama, M., Yajima, T., Goto, T., Okuhara, M., Kohsaka, M., and Aoki, H. (1987). FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Immunosuppressive effect of FK-506 *in vitro*. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 40, 1256–1265.
- Koenig, B.B., Cook, J.S., Wolsing, D.H., Ting, J., Tiesman, J.P., Correa, P.E., Olson, C.A., Pecquet, A.L., Ventura, F., and Grant, R.A. (1994). Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5961–5974.
- Kofron, J.L., Kuzmic, P., Kishore, V., Colón-Bonilla, E., and Rich, D.H. (1991). Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl cis-trans isomerases by an improved spectrophotometric assay. *Biochemistry* 30, 6127–6134.
- Kops, O., Zhou, X.Z., and Lu, K.P. (2002). Pin1 modulates the dephosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain by yeast Fcp1. *FEBS Lett.* 513, 305–311.
- Krzywicka, A., Beisson, J., Keller, A.-M., Cohen, J., Jerka-Dziadosz, M., and Klotz, C. (2001). KIN241: a gene involved in cell morphogenesis in *Paramecium tetraurelia* reveals a novel protein family of cyclophilin-RNA interacting proteins (CRIPs) conserved from fission yeast to man. *Mol. Microbiol.* 42, 257–267.
- Kuersten, S., and Goodwin, E.B. (2003). The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat. Rev. Genet.* 4, 626–637.
- Kumari, S., Roy, S., Singh, P., Singla-pareek, S.L., and Pareek, A. (2013). Proteins in search of function Cyclophilins. *Plant Signal. Behav.* 8, 25–32.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- LaPlante, J.M., O'Rourke, F., Lu, X., Fein, A., Olsen, A., and Feinstein, M.B. (2000). Cloning of human CHERP: regulated expression of antisense cDNA depletes CHERP, inhibits intracellular Ca²⁺ mobilization and decreases cell proliferation. *Biochem. J.* 348, 189–199.

- Law, M.J., Linde, M., Chambers, E., Oubridge, C., Katsamba, P., Nilsson, L., Haworth, I., and Laird-Offringa, I. (2006). The role of positively charged amino acids and electrostatic interactions in the complex of U1A protein and U1 hairpin II RNA. *Nucleic Acids Res.* *34*, 275–285.
- Li, H., and Luan, S. (2011). The cyclophilin AtCYP71 interacts with CAF-1 and LHP1 and functions in multiple chromatin remodeling processes. *Mol. Plant* *4*, 748–758.
- Li, H., He, Z., Lu, G., Lee, S.C., Alonso, J., Ecker, J.R., and Luan, S. (2007). A WD40 domain cyclophilin interacts with histone H3 and functions in gene repression and organogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* *19*, 2403–2416.
- Licata, L., Briganti, L., Peluso, D., Perfetto, L., Iannuccelli, M., Galeota, E., Sacco, F., Palma, A., Nardoza, A.P., Santonico, E., et al. (2012). MINT, the molecular interaction database: 2012 update. *Nucleic Acids Res.* *40*, D857–D861.
- Liefke, R. (2003). Untersuchungen zur Charakterisierung der prototypischen Cyclophiline COAS2 und Cyclophilin J. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Lima, C.D. (2005). Inducing interactions with the CTD. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 102–103.
- Lin, C.L., Leu, S., Lu, M.C., and Ouyang, P. (2004). 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.
- Lin-Moshier, Y., Sebastian, P.J., Higgins, L., Sampson, N.D., Hewitt, J.E., and Marchant, J.S. (2013). Re-evaluation of the role of calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP) in cellular calcium signaling. *J. Biol. Chem.* *288*, 355–367.
- Linnert, M. (2012). Struktur und Funktion der humanen FK506-bindenden Proteins 37.7. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Liu, J., Albers, M.W., Chen, C.M., Schreiber, S.L., and Walsh, C.T. (1990). Cloning, expression, and purification of human cyclophilin in *Escherichia coli* and assessment of the catalytic role of cysteines by site-directed mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 2304–2308.
- Liu, J., Chen, C.M., and Walsh, C.T. (1991). Human and *Escherichia coli* cyclophilins: sensitivity to inhibition by the immunosuppressant cyclosporin A correlates with a specific tryptophan residue. *Biochemistry* *30*, 2306–2310.
- Long, F., Vagin, A.A., Young, P., and Murshudov, G.N. (2008). BALBES: a molecular-replacement pipeline. *Acta Crystallogr. Sect. D* *64*, 125–132.
- Lorkovic, Z.J., Lopato, S., Pexa, M., Lehner, R., and Barta, A. (2004). Interactions of Arabidopsis RS domain containing cyclophilins with SR proteins and U1 and U11 small nuclear ribonucleoprotein-specific proteins suggest their involvement in pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.* *279*, 33890–33898.
- Lu, Z., and Hunter, T. (2014). Prolyl isomerase Pin1 in cancer. *Cell Res.* *24*, 1033–1049.
- Lu, K.P., Hanes, S.D., and Hunter, T. (1996). A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* *380*, 544–547.
- Lu, K.P., Lu, K.P., Finn, G., Finn, G., Lee, T.H., Lee, T.H., Nicholson, L.K., and Nicholson, L.K. (2007). Prolyl cis-trans Isomerization As a Molecular Timer. *Nat. Chem. Biol.* *3*, 619–629.
- Lu, P.-J., Wulf, G., Zhou, X.Z., Davies, P., and Lu, K.P. (1999a). The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* *399*, 784–788.
- Lu, P.-J., Zhou, X.Z., Shen, M., and Lu, K.P. (1999b). Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science* *283*, 1325–1328.
- Luban, J., Bossolt, K.L., Franke, E.K., Kalpana, G. V, and Goff, S.P. (1993). Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* *73*, 1067–1078.
- Lunde, B.M., Moore, C., and Varani, G. (2007). RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 479–490.
- Ma, Z., Atencio, D., Barnes, C., DeFiglio, H., and Hanes, S.D. (2012). Multiple roles for the Ess1 prolyl isomerase in the RNA polymerase II transcription cycle. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 3594–3607.
- Mahadevan, K., Zhang, H., Akef, A., Cui, X.A., Guerousov, S., Cenik, C., Roth, F.P., and Palazzo, A.F. (2013). RanBP2/Nup358 potentiates the translation of a subset of mRNAs encoding secretory proteins. *PLoS Biol.* *11*, e1001545.
- Makarova, O. V, Makarov, E.M., Urlaub, H., Will, C.L., Gentzel, M., Wilm, M., and Lührmann, R. (2004). A subset of human 35S U5 proteins, including Prp19, function prior to catalytic step 1 of splicing. *EMBO J.* *23*, 2381–2391.

- Malakhov, M.P., Mattern, M.R., Malakhova, O. a, Drinker, M., Weeks, S.D., and Butt, T.R. (2004). SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J. Struct. Funct. Genomics* 5, 75–86.
- Maleszka, R., Hanes, S.D., Hackett, R.L., de Couet, H.G., and Miklos, G.L. (1996). The *Drosophila melanogaster* dodo (dod) gene, conserved in humans, is functionally interchangeable with the ESS1 cell division gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 447–451.
- Manival, X., Ghisolfi-Nieto, L., Joseph, G., Bouvet, P., and Erard, M. (2001). RNA-binding strategies common to cold-shock domain- and RNA recognition motif-containing proteins. *Nucleic Acids Res.* 29, 2223–2233.
- Marcel, V., Tran, P.L.T., Sagne, C., Martel-Planche, G., Vaslin, L., Teulade-Fichou, M.-P., Hall, J., Mergny, J.-L., Hainaut, P., and Van Dyck, E. (2011). G-quadruplex structures in TP53 intron 3: role in alternative splicing and in production of p53 mRNA isoforms. *Carcinogenesis* 32, 271–278.
- Maris, C., Dominguez, C., and Allain, F.H.-T. (2005). The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS J.* 272, 2118–2131.
- Martinez, N.J., Chang, H.-M., Borrajo, J. d. R., and Gregory, R.I. (2013). The co-chaperones Fkbp4/5 control Argonaute2 expression and facilitate RISC assembly. *RNA* 19, 1583–1593.
- Martino, L., Pennell, S., Kelly, G., Bui, T.T.T., Kotik-Kogan, O., Smerdon, S.J., Drake, A.F., Curry, S., and Conte, M.R. (2012). Analysis of the interaction with the hepatitis C virus mRNA reveals an alternative mode of RNA recognition by the human la protein. *Nucleic Acids Res.* 40, 1381–1394.
- Mascotti, D.P., and Lohman, T.M. (1997). Thermodynamics of oligoarginines binding to RNA and DNA. *Biochemistry* 36, 7272–7279.
- Massagué, J., Seoane, J., and Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev.* 19, 2783–2810.
- Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto, A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y., et al. (2006). ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Biotechnol.* 24, 841–847.
- Mazza, C., Segref, A., Mattaj, I.W., and Cusack, S. (2002). Large-scale induced fit recognition of an m(7)GpppG cap analogue by the human nuclear cap-binding complex. *EMBO J.* 21, 5548–5557.
- McGowan, L.C., and Hamelberg, D. (2013). Conformational plasticity of an enzyme during catalysis: Intricate coupling between cyclophilin a dynamics and substrate turnover. *Biophys. J.* 104, 216–226.
- Meinhart, A., Kamenski, T., Hoepfner, S., Baumli, S., and Cramer, P. (2005). A structural perspective of CTD function. *Genes Dev.* 19, 1401–1415.
- Melchior, F., Schergaut, M., and Pichler, A. (2003). SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends Biochem. Sci.* 28, 612–618.
- Mi, H., Kops, O., Zimmermann, E., Jäschke, A., and Tropschug, M. (1996). A nuclear RNA-binding cyclophilin in human T cells. *FEBS Lett.* 398, 201–205.
- Michnick, S.W., Rosen, M.K., Wandless, T.J., Karplus, M., and Schreiber, S.L. (1991). Solution structure of FKBP, a rotamase enzyme and receptor for FK506 and rapamycin. *Science* 252, 836–839.
- Min, S.-H., Lau, A.W., Lee, T.H., Inuzuka, H., Wei, S., Huang, P., Shaik, S., Lee, D.Y., Finn, G., Balastik, M., et al. (2012). Negative regulation of the stability and tumor suppressor function of Fbw7 by the Pin1 prolyl isomerase. *Mol. Cell* 46, 771–783.
- Mishra, A.K., Puranik, S., Bahadur, R.P., and Prasad, M. (2012). The DNA-binding activity of an AP2 protein is involved in transcriptional regulation of a stress-responsive gene, SiWD40, in foxtail millet. *Genomics* 100, 252–263.
- Mittermaier, A., Varani, L., Muhandiram, D.R., Kay, L.E., and Varani, G. (1999). Changes in side-chain and backbone dynamics identify determinants of specificity in RNA recognition by human U1A protein. *J. Mol. Biol.* 294, 967–979.
- Mok, D., Allan, R.K., Carrello, A., Wangoo, K., Walkinshaw, M.D., and Ratajczak, T. (2006). The chaperone function of cyclophilin 40 maps to a cleft between the prolyl isomerase and tetratricopeptide repeat domains. *FEBS Lett.* 580, 2761–2768.
- de Moor, C.H., and Richter, J.D. (2001). Translational control in vertebrate development. *Int. Rev. Cytol.* 203, 567–608.
- Moore, J.M., Peattie, D.A., Fitzgibbon, M.J., and Thomson, J.A. (1991). Solution structure of the major binding protein for the immunosuppressant FK506. *Nature* 351, 248–250.
- Morris, D.P., Phatnani, H.P., and Greenleaf, A.L. (1999). Phospho-carboxyl-terminal domain binding and the role of a prolyl isomerase in pre-mRNA 3'-End formation. *J. Biol. Chem.* 274, 31583–31587.

- Mortillaro, M.J., and Berezney, R. (1998). Matrillin CYP, an SR-rich cyclophilin that associates with the nuclear matrix and splicing factors. *J. Biol. Chem.* *273*, 8183–8192.
- Myers, J.K., Morris, D.P., Greenleaf, A.L., and Oas, T.G. (2001). Phosphorylation of RNA polymerase II CTD fragments results in tight binding to the WW domain from the yeast prolyl isomerase Ess1. *Biochemistry* *40*, 8479–8486.
- Nahreini, P., Hovland, A.R., Kumar, B., Andreatta, C., Edwards-Prasad, J., and Prasad, K.N. (2001). Effects of altered cyclophilin A expression on growth and differentiation of human and mouse neuronal cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* *21*, 65–79.
- Nestel, F.P., Colwill, K., Harper, S., Pawson, T., and Anderson, S.K. (1996). RS cyclophilins: identification of an NK-TR1-related cyclophilin. *Gene* *180*, 151–155.
- Newman, A.J., and Nagai, K. (2010). Structural studies of the spliceosome: blind men and an elephant. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *20*, 82–89.
- Nishimura, R., Kato, Y., Chen, D., Harris, S.E., Mundy, G.R., and Yoneda, T. (1998). Smad5 and DPC4 are key molecules in mediating BMP-2-induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *J. Biol. Chem.* *273*, 1872–1879.
- Novy, R., Drott, D., Yaeger, K., and Mierendorf, R. (2001). Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. *Innovations* 4–6.
- O’Keefe, S.J., Tamura, J., Kincaid, R.L., Tocci, M.J., and O’Neill, E.A. (1992). FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* *357*, 692–694.
- Okadome, T., Oeda, E., Saitoh, M., Ichijo, H., Moses, H.L., Miyazono, K., and Kawabata, M. (1996). Characterization of the interaction of FKBP12 with the transforming growth factor-beta type I receptor *in vivo*. *J. Biol. Chem.* *271*, 21687–21690.
- Okamoto, T., Nishimura, Y., Ichimura, T., Suzuki, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Moriishi, K., and Matsuura, Y. (2006). Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J.* *25*, 5015–5025.
- Pal, D., and Chakrabarti, P. (1999). Cis peptide bonds in proteins: residues involved, their conformations, interactions and locations. *J. Mol. Biol.* *294*, 271–288.
- Pardali, E., Xie, X.Q., Tsapogas, P., Itoh, S., Arvanitidis, K., Heldin, C.H., Ten Dijke, P., Grundström, T., and Sideras, P. (2000). Smad and AML proteins synergistically confer transforming growth factor β 1 responsiveness to human germ-line IgA genes. *J. Biol. Chem.* *275*, 3552–3560.
- Pare, J.M., LaPointe, P., and Hobman, T.C. (2013). Hsp90 cochaperones p23 and FKBP4 physically interact with hAgo2 and activate RNA interference-mediated silencing in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* *24*, 2303–2310.
- Park, S., Osmers, U., Raman, G., Schwantes, R.H., Diaz, M.O., and Bushweller, J.H. (2010). The PHD3 domain of MLL acts as a CYP33-regulated switch between MLL-mediated activation and repression. *Biochemistry* *49*, 6576–6586.
- Pflügl, G., Kallen, J., Schirmer, T., Jansonius, J.N., Zurini, M.G.M., and Walkinshaw, M.D. (1993). X-ray structure of a decameric cyclophilin-cyclosporin crystal complex. *Nature* *361*, 91–94.
- Pierreux, C.E., Nicolás, F.J., and Hill, C.S. (2000). Transforming growth factor beta-independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 9041–9054.
- Piñol-Roma, S., Choi, Y.D., Matunis, M.J., and Dreyfuss, G. (1988). Immunopurification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles reveals an assortment of RNA-binding proteins. *Genes Dev.* *2*, 215–227.
- Pirkel, F., and Buchner, J. (2001). Functional analysis of the Hsp90-associated human peptidyl prolyl cis/trans isomerases FKBP51, FKBP52 and Cyp40. *J. Mol. Biol.* *308*, 795–806.
- Pirkel, F., Fischer, E., Modrow, S., and Buchner, J. (2001). Localization of the chaperone domain of FKBP52. *J. Biol. Chem.* *276*, 37034–37041.
- Pratt, W.B., and Toft, D.O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* *18*, 306–360.
- Pushkarsky, T., Yurchenko, V., Vanpouille, C., Brichacek, B., Vaisman, I., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I., Sherry, B., and Bukrinsky, M.I. (2005). Cell surface expression of CD147/EMMPRIN is regulated by cyclophilin 60. *J. Biol. Chem.* *280*, 27866–27871.
- Query, C.C., Bentley, R.C., and Keene, J.D. (1989). A common RNA recognition motif identified within a defined U1 RNA binding domain of the 70K U1 snRNP protein. *Cell* *57*, 89–101.
- Rahfeld, J.-U., Schierhorn, A., Mann, K., and Fischer, G. (1994). A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* *343*, 65–69.

- Ramachandran, G.N., and Mitra, A.K. (1976). An explanation for the rare occurrence of cis peptide units in proteins and polypeptides. *J. Mol. Biol.* *107*, 85–92.
- Ramachandran, G.N., and Sasisekharan, V. (1968). Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* *23*, 283–438.
- Ranganathan, R., Lu, K.P., Hunter, T., and Noel, J.P. (1997). Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent. *Cell* *89*, 875–886.
- Renčiuk, D., Kejnovská, I., Školáková, P., Bednářová, K., Motlová, J., and Vorlíčková, M. (2009). Arrangements of human telomere DNA quadruplex in physiologically relevant K⁺ solutions. *Nucleic Acids Res.* *37*, 6625–6634.
- Riley, M., Maling, B., and Chamberlin, M.J. (1966). Physical and chemical characterization of two- and three-stranded adenine-thymine and adenine-uracil homopolymer complexes. *J. Mol. Biol.* *20*, 359–389.
- Rinfret, A., Collins, C., Ménard, R., and Anderson, S.K. (1994). The N-terminal cyclophilin-homologous domain of a 150-kilodalton tumor recognition molecule exhibits both peptidylprolyl cis-trans-isomerase and chaperone activities. *Biochemistry* *33*, 1668–1673.
- Ritchie, D.B., Schellenberg, M.J., and MacMillan, A.M. (2009). Spliceosome structure: Piece by piece. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* *1789*, 624–633.
- Rosenwirth, B., Billich, A., Datema, R., Donatsch, P., Hammerschmid, F., Harrison, R., Hiestand, P., Jaksche, H., Mayer, P., and Peichl, P. (1994). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive cyclosporine analog. *Antimicrob. Agents Chemother.* *38*, 1763–1772.
- Ryffel, B., Woerly, G., Greiner, B., Haendler, B., Mihatsch, M.J., and Foxwell, B.M. (1991). Distribution of the cyclosporine binding protein cyclophilin in human tissues. *Immunology* *72*, 399–404.
- Saitoh, H., Pu, R., Cavenagh, M., and Dasso, M. (1997). RanBP2 associates with Ubc9p and a modified form of RanGAP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 3736–3741.
- Salim, N.N., and Feig, A.L. (2009). Isothermal Titration Calorimetry of RNA. *Methods* *47*, 198–205.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (CSHL Press).
- Sasaki-Osugi, K., Imoto, C., Takahara, T., Shibata, H., and Maki, M. (2013). Nuclear ALG-2 protein interacts with Ca²⁺ homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP) Ca²⁺-dependently and participates in regulation of alternative splicing of inositol trisphosphate receptor type 1 (IP3R1) pre-mRNA. *J. Biol. Chem.* *288*, 33361–33375.
- Savintsev, I. V., and Vekshin, N.L. (2002). Nonstacking binding of 7-aminoactinomycin D and actinomycin D to DNA and model nucleotide systems in solutions. *Mol. Biol.* *36*, 575–580.
- Schaller, T., Ocwieja, K.E., Rasaiyaah, J., Price, A.J., Brady, T.L., Roth, S.L., Hué, S., Fletcher, A.J., Lee, K., KewalRamani, V.N., et al. (2011). HIV-1 Capsid-Cyclophilin Interactions Determine Nuclear Import Pathway, Integration Targeting and Replication Efficiency. *PLoS Pathog.* *7*, e1002439.
- Schechter, I., and Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *27*, 157–162.
- Scherly, D., Boelens, W., Dathan, N.A., van Venrooij, W.J., and Mattaj, I.W. (1990). Major determinants of the specificity of interaction between small nuclear ribonucleoproteins U1A and U2B'' and their cognate RNAs. *Nature* *345*, 502–506.
- Schiene, C., and Fischer, G. (2000). Enzymes that catalyse the restructuring of proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *10*, 40–45.
- Schiene-Fischer, C. (2015). Multidomain Peptidyl Prolyl cis/trans Isomerases. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* *1850*, 2005–2016.
- Schlegel, J., Redzic, J.S., Porter, C.C., Yurchenko, V., Bukrinsky, M., Labeikovskiy, W., Armstrong, G.S., Zhang, F., Isern, N.G., DeGregori, J., et al. (2009). Solution Characterization of the Extracellular Region of CD147 and Its Interaction with Its Enzyme Ligand Cyclophilin A. *J. Mol. Biol.* *391*, 518–535.
- Schmidpeter, P.A.M., Jahreis, G., Geitner, A.-J., and Schmid, F.X. (2011). Prolyl isomerases show low sequence specificity toward the residue following the proline. *Biochemistry* *50*, 4796–4803.
- Schreiber, S.L. (1991). Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* *11*, 283–287.
- Seidler, J., Zinn, N., Boehm, M.E., and Lehmann, W.D. (2010). De novo sequencing of peptides by MS/MS. *Proteomics* *10*, 634–649.
- Selenko, P., Gregorovic, G., Sprangers, R., Stier, G., Rhani, Z., Krämer, A., and Sattler, M. (2003). Structural basis for the molecular recognition between human splicing factors U2AF65 and SF1/mBBP. *Mol. Cell* *11*, 965–976.

- Sen, D., and Gilbert, W. (1988). Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* 334, 364–366.
- Shi, Y., Wang, Y.F., Jayaraman, L., Yang, H., Massagué, J., and Pavletich, N.P. (1998). Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* 94, 585–594.
- Siekierka, J.J., Hung, S.H.Y., Poe, M., Lin, S.C., and Sigal, N.H. (1989). A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature* 341, 755–757.
- Sinars, C.R., Cheung-Flynn, J., Rimerman, R.A., Scammell, J.G., Smith, D.F., and Clardy, J. (2003). Structure of the large FK506-binding protein FKBP51, an Hsp90-binding protein and a component of steroid receptor complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 868–873.
- Singh, M., Wang, Z., Koo, B.-K., Patel, A., Cascio, D., Collins, K., and Feigon, J. (2012). Structural basis for telomerase RNA recognition and RNP assembly by the holoenzyme La family protein p65. *Mol. Cell* 47, 16–26.
- Siomi, H., and Dreyfuss, G. (1997). RNA-binding proteins as regulators of gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 7, 345–353.
- Skerra, A., and Schmidt, T.G. (2000). Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol.* 326, 271–304.
- Skrahina, T. (2009). The role of *Schizosaccharomyces pombe* cyclophilin Rct1 in RNA polymerase II transcription. Dissertation. Universität Wien.
- Spector, D.L. (1993). Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9, 265–315.
- Spector, D.L., and Lamond, A.I. (2011). Nuclear speckles. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, 1–12.
- Staley, J.P., and Guthrie, C. (1998). Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* 92, 315–326.
- Stegmann, C.M., Seeliger, D., Sheldrick, G.M., de Groot, B.L., and Wahl, M.C. (2009). The thermodynamic influence of trapped water molecules on a protein-ligand interaction. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48, 5207–5210.
- Stewart, D.E., Sarkar, A., and Wampler, J.E. (1990). Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures. *J. Mol. Biol.* 214, 253–260.
- Stirnimann, C.U., Petsalaki, E., Russell, R.B., and Müller, C.W. (2010). WD40 proteins propel cellular networks. *Trends Biochem. Sci.* 35, 565–574.
- Stukenberg, P.T., and Kirschner, M.W. (2001). Pin1 acts catalytically to promote a conformational change in Cdc25. *Mol. Cell* 7, 1071–1083.
- Swanson, M.S., and Dreyfuss, G. (1988). Classification and purification of proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles by RNA-binding specificities. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2237–2241.
- Taylor, P., Dornan, J., Carrello, A., Minchin, R.F., Ratajczak, T., and Walkinshaw, M.D. (2001). Two structures of cyclophilin 40: folding and fidelity in the TPR domains. *Structure* 9, 431–438.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Träger, M. (2015). Biochemie und Protein-Protein-Interaktionen des Multidomänen-Cyclophilins Cyp58. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Tsuda, K., Someya, T., Kuwasako, K., Takahashi, M., He, F., Unzai, S., Inoue, M., Harada, T., Watanabe, S., Terada, T., et al. (2011). Structural basis for the dual RNA-recognition modes of human Tra2-β RRM. *Nucleic Acids Res.* 39, 1538–1553.
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Kampf, C., Sjostedt, E., Asplund, A., et al. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347, 1260419–1260419.
- Ule, J., Jensen, K.B., Ruggiu, M., Mele, A., Ule, A., and Darnell, R.B. (2003). CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science* 302, 1212–1215.
- Ule, J., Jensen, K., Mele, A., and Darnell, R.B. (2005). CLIP: a method for identifying protein-RNA interaction sites in living cells. *Methods* 37, 376–386.
- Urabe, M., Kume, A., Tobita, K., and Ozawa, K. (2000). DNA/Calcium phosphate precipitates mixed with medium are stable and maintain high transfection efficiency. *Anal. Biochem.* 278, 91–92.
- Wahl, M.C., Will, C.L., and Lührmann, R. (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136, 701–718.
- Wahle, E., and Keller, W. (1996). The biochemistry of polyadenylation. *Trends Biochem. Sci.* 21, 247–250.

- Wang, C., Shang, J.-X., Chen, Q.-X., Osés-Prieto, J. a, Bai, M.-Y., Yang, Y., Yuan, M., Zhang, Y.-L., Mu, C.-C., Deng, Z., et al. (2013). Identification of BZR1-interacting proteins as potential components of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis* through tandem affinity purification. *Mol. Cell. Proteomics* *12*, 3653–3665.
- Wang, J., Tong, W., Zhang, X., Chen, L., Yi, Z., Pan, T., Hu, Y., Xiang, L., and Yuan, Z. (2006). Hepatitis C virus non-structural protein NS5A interacts with FKBP38 and inhibits apoptosis in Huh7 hepatoma cells. *FEBS Lett.* *580*, 4392–4400.
- Wang, T., Donahoe, P.K., and Zervos, A.S. (1994). Specific interaction of type I receptors of the TGF-beta family with the immunophilin FKBP-12. *Science* *265*, 674–676.
- Wang, T., Li, B.Y., Danielson, P.D., Shah, P.C., Rockwell, S., Lechleider, R.J., Martin, J., Manganaro, T., and Donahoe, P.K. (1996). The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF beta family type I receptors. *Cell* *86*, 435–444.
- Wang, Y., Han, R., Zhang, W., Yuan, Y., Zhang, X., Long, Y., and Mi, H. (2008). Human CyP33 binds specifically to mRNA and binding stimulates PPIase activity of hCyP33. *FEBS Lett.* *582*, 835–839.
- Wang, Z., Song, J., Milne, T. a, Wang, G.G., Li, H., Allis, C.D., and Patel, D.J. (2010). Pro isomerization in MLL1 PHD3-bromo cassette connects H3K4me readout to CyP33 and HDAC-mediated repression. *Cell* *141*, 1183–1194.
- Wang, Z., Liu, X., Zhao, Z., Xu, C., Zhang, K., Chen, C., Sun, L., Gao, G.F., Ye, X., and Liu, W. (2011). Cyclophilin E functions as a negative regulator to influenza virus replication by impairing the formation of the viral ribonucleoprotein complex. *PLoS One* *6*, e22625.
- Watanabe, M., Masuyama, N., Fukuda, M., and Nishida, E. (2000). Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal. *EMBO Rep.* *1*, 176–182.
- Weiwad, M., Werner, A., Rücknagel, P., Schierhorn, A., Küllertz, G., and Fischer, G. (2004). Catalysis of proline-directed protein phosphorylation by peptidyl-prolyl cis/trans isomerases. *J. Mol. Biol.* *339*, 635–646.
- Werner, A., Flotho, A., and Melchior, F. (2012). The RanBP2/RanGAP1*SUMO1/Ubc9 complex is a multisubunit SUMO E3 ligase. *Mol. Cell* *46*, 287–298.
- Werner-Allen, J.W., Lee, C.-J., Liu, P., Nicely, N.I., Wang, S., Greenleaf, A.L., and Zhou, P. (2011). cis -Proline-mediated Ser(P) 5 Dephosphorylation by the RNA Polymerase II C-terminal Domain Phosphatase Ssu72. *J. Biol. Chem.* *286*, 5717–5726.
- Wickens, M., Goodwin, E.B., Kimble, J., Strickland, S., and Hentze, M.W. (2002). Translational control of developmental decisions. In *In Translational Control of Gene Expression*, N. Sorenberg, J. Hershey, and M. Mathews, eds. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 295–370.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F., and Lin, L.N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* *179*, 131–137.
- Woody, R.W. (1995). Circular Dichroism. *Methods Enzymol.* *246*, 34–71.
- Wu, B., Li, P., Liu, Y., Lou, Z., Ding, Y., Shu, C., Ye, S., Bartlam, M., Shen, B., and Rao, Z. (2004). 3D structure of human FK506-binding protein 52: implications for the assembly of the glucocorticoid receptor/Hsp90/immunophilin heterocomplex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 8348–8353.
- Wu, J., Matunis, M.J., Kraemer, D., Blobel, G., and Coutavas, E. (1995). 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.
- Wu, X., Wilcox, C.B., Devasahayam, G., Hackett, R.L., Arévalo-Rodríguez, M., Cardenas, M.E., Heitman, J., and Hanes, S.D. (2000). The Ess1 prolyl isomerase is linked to chromatin remodeling complexes and the general transcription machinery. *EMBO J.* *19*, 3727–3738.
- Wülfing, C., Lombardero, J., and Plückthun, A. (1994). An *Escherichia re* protein consisting of a domain homologous to FK506-binding proteins (FKBP) and a new metal binding motif. *J. Biol. Chem.* *269*, 2895–2901.
- Xiao, X., Wang, Z., Jang, M., Nutiu, R., Wang, E.T., and Burge, C.B. (2009). Splice site strength-dependent activity and genetic buffering by poly-G runs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 1094–1100.
- Xu, L., Kang, Y., Cöl, S., and Massagué, J. (2002). Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGFbeta signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. *Mol. Cell* *10*, 271–282.
- Xu, Y.-X., Hirsoe, Y., Zhou, X.Z., Lu, K.P., and Manley, J.L. (2003). Pin1 modulates the structure and function of human RNA polymerase II. *Genes Dev.* *17*, 2765–2776.
- Yaffe, M.B., Schutkowski, M., Shen, M., Zhou, X.Z., Stukenberg, P.T., Rahfeld, J.U., Xu, J., Kuang, J., Kirschner, M.W., Fischer, G., et al. (1997). Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science* *278*, 1957–1960.

- Yang, Y., Lu, N., Zhou, J., Chen, Z.-N., and Zhu, P. (2008). Cyclophilin A up-regulates MMP-9 expression and adhesion of monocytes/macrophages via CD147 signalling pathway in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. *47*, 1299–1310.
- Yokoyama, N., Hayashi, N., Seki, T., Panté, N., Ohba, T., Nishii, K., Kuma, K., Hayashida, T., Miyata, T., Aebi, U., et al. (1995). A giant nucleopore protein that binds Ran/TC4. *Nature* *376*, 184–188.
- Zahler, M.A., Lane, S.W., Stolk, A.J., and Roth, B.M. (1992). SR proteins: A conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev.* *6*, 837–847.
- Zeng, L., Zhou, Z., Xu, J., Zhao, W., Wang, W., Huang, Y., Cheng, C., Xu, M., Xie, Y., and Mao, Y. (2001). 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.
- Zhang, C., and Zhang, F. (2015). The Multifunctions of WD40 Proteins in Genome Integrity and Cell Cycle Progression. *J. Genomics* *3*, 40–50.
- Zhang, H., and Bradley, A. (1996). Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* *122*, 2977–2986.
- Zhang, M., Wang, X.J., Chen, X., Bowman, M.E., Luo, Y., Noel, J.P., Ellington, A.D., Etkorn, F.A., and Zhang, Y. (2012). Structural and Kinetic Analysis of Prolyl-isomerization/Phosphorylation Cross-Talk in the CTD Code. *ACS Chem. Biol.* *7*, 1462–1470.
- Zhou, Z., Licklider, L.J., Gygi, S.P., and Reed, R. (2002). Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* *419*, 182–185.
- Zoldák, G., Aumüller, T., Lücke, C., Hritz, J., Oostenbrink, C., Fischer, G., and Schmid, F.X. (2009). A library of fluorescent peptides for exploring the substrate specificities of prolyl isomerases. *Biochemistry* *48*, 10423–10436.
- Zorio, D., and Bentley, D. (2004). The link between mRNA processing and transcription: communication works both ways. *Exp. Cell Res.* *296*, 91–97.
- Zydowsky, L.D., Etkorn, F.A., Chang, H.Y., Ferguson, S.B., Stolz, L. a, Ho, S.I., and Walsh, C.T. (1992). Active site mutants of human cyclophilin A separate peptidyl-prolyl isomerase activity from cyclosporin A binding and calcineurin inhibition. *Protein Sci.* *1*, 1092–1099.

Anhang

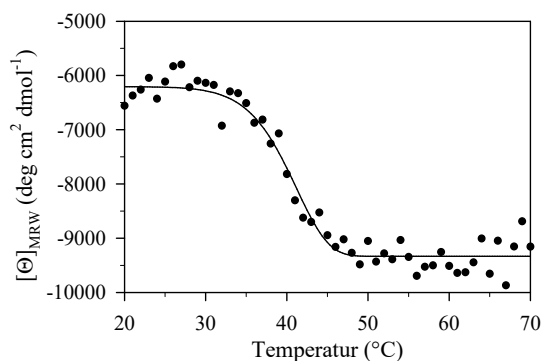


Abbildung 57: Thermische Stabilität von Cyp57₁₋₂₀₃. Die Entfaltung von 15 μM Cyp57₁₋₂₀₃ wurde bei 208 nm in 5 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.4 verfolgt (\bullet). Der Temperaturübergang von 40°C wurde über nicht-lineare Regression bestimmt.

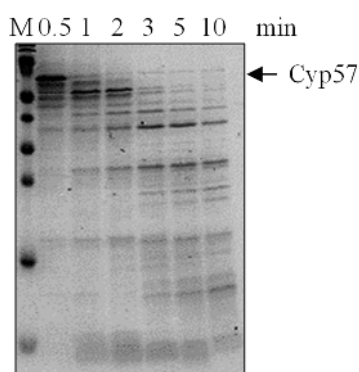


Abbildung 58: Proteolyse von Cyp57 mit Chymotrypsin. 15 μg Cyp57 wurden zusammen mit 2 U ml^{-1} Chymotrypsin bei RT in Puffer (50 mM Tris/ HCl pH 7.8, 200 mM NaCl) inkubiert. Die Reaktion wurde zu den angegebenen Zeitpunkten durch Zugabe von 1 mM PMSF abgestoppt. Die Proben wurden mittels 15%iger SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Größenstandard (M).

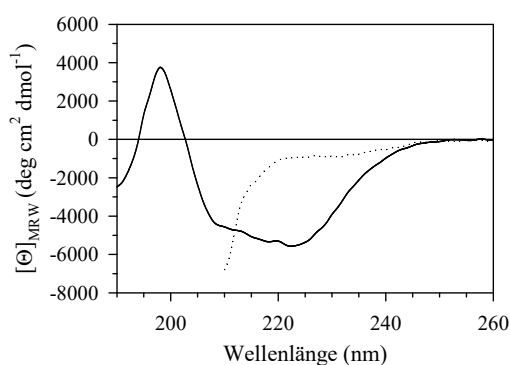


Abbildung 59: Fern-UV CD-Spektren vom rekombinanten Protein Cyp57₁₋₁₆₈. CD-Spektren von 15 μM Cyp57₁₋₁₆₈ in 5 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.4 (—) und in 6 M Guanidiniumchlorid, 5 mM Na-Phosphatpuffer pH 7.4 (---) bei 20°C aufgenommen. Dargestellt ist die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure aus 25 Akkumulationen.

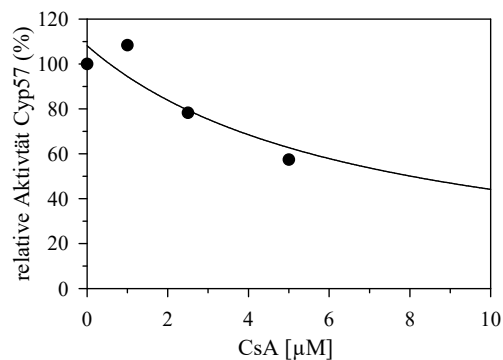


Abbildung 60: Inhibition der PPIase-Aktivität von Cyp57₁₋₂₀₃. Die Inhibition von Cyp57₁₋₂₀₃ wurde im Protease-freien PPIase-Test mit 1 μM Cyp57₁₋₂₀₃ und 1 μM Abz-Ala-Met-Pro-Phe-pNA als Substrat bei 10°C untersucht. Die Messung erfolgte nach 10-minütiger Vorinkubation mit 1-5 μM CsA. Aufgetragen ist die relative Aktivität von Cyp57₁₋₂₀₃ gegen die CsA-Konzentration. Mittels nicht-linearer Regression wurde für die Inhibition ein IC₅₀-Wert von ca. 6 μM bestimmt.

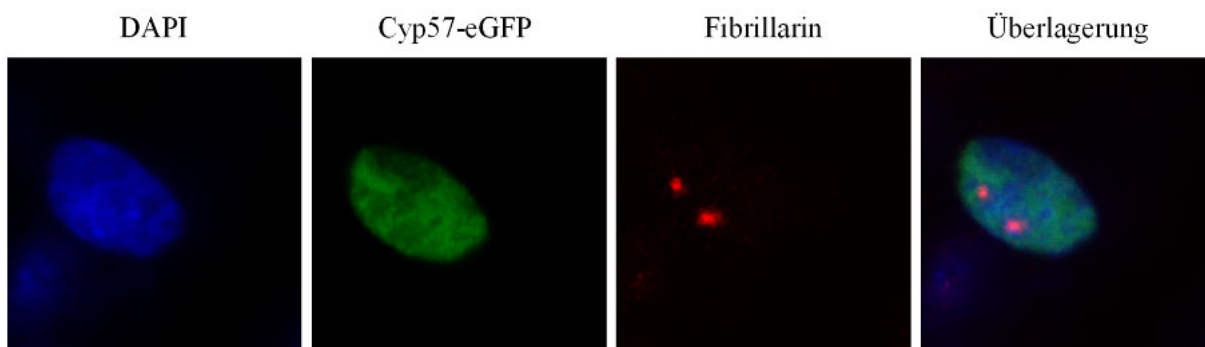


Abbildung 61: Kernlokalisierung von Cajal-Körpern in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit pEGFP-N3_Cyp57 transfiziert und in IBIDI-Kavitäten kultiviert. Für die konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Dann wurden die Zellen mit Anti-Fibrillarin-Antikörper inkubiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Anschließend wurden Bilder mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop D-Eclipse C1 Si (Nikon) erstellt.

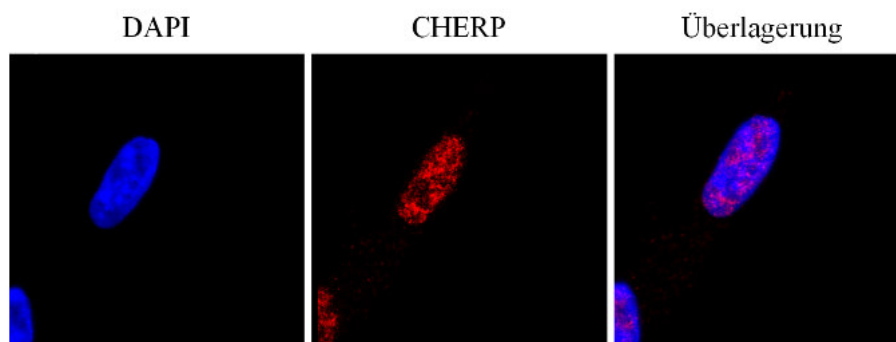


Abbildung 62: Lokalisationsstudie von CHERP in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden in IBIDI-Kavitäten kultiviert. Vor den konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Dann wurden die Zellen mit Anti-CHERP-Antikörper inkubiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Anschließend wurden Bilder mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop D-Eclipse C1 Si (Nikon) erstellt.

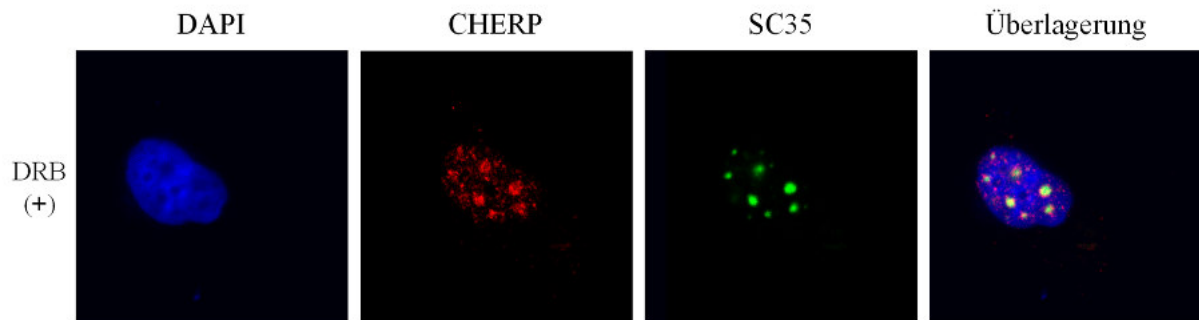


Abbildung 63: Lokalisation von CHERP in DRB-behandelten HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden vor den konfokalmikroskopischen Aufnahmen für 2 h mit 100 μ M DRB (+) behandelt. Die Zellen wurden mit dem Anti-CERP- und Anti-pSC35-Antikörper inkubiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Anschließend wurden Bilder mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop D-Eclipse C1 Si (Nikon) erstellt.

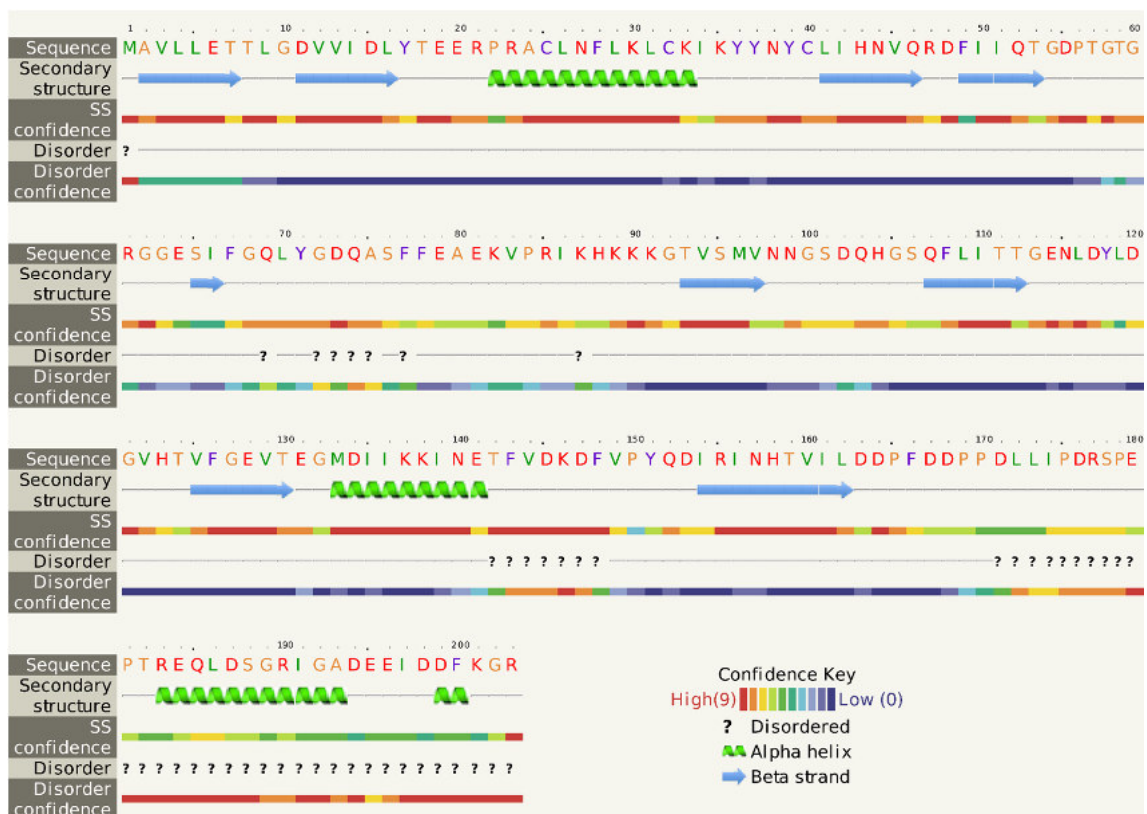


Abbildung 64: Sekundärstrukturvorhersage von Cyp571-203. Die Vorhersage der Sekundärstruktur von Cyp571-203 wurde mit der Phyre2-Software über Homologien zu anderen Proteinen berechnet (Kelly *et al.*, 2015).

Tabelle 17: Relative katalytische Effizienz der *cis/trans*-Isomerisierung dargestellt für die Substrate Abz-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA für Cyp57, Cyp18, FKBP12, SlyD, Par14. Die katalytische Effizienz von Cyp57₁₋₂₀₃ wurde im Protease-freien PPIase-Assay in 50 mM Tris/ HCl pH 8.0, 500 mM NaCl bei 10°C bestimmt. Die Werte der anderen Proteine wurden aus der Publikation von Zoldák *et al.*, (2009) entnommen. Die relative Aktivität ist auf 100% Abz-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA bezogen.

Xaa	Cyp57₁₋₂₀₃	Cyp18	FKBP12	SlyD	Par14
Ala	100 ± 29	100 ± 3	100 ± 4	100 ± 5	100 ± 22
Val	47 ± 2	122 ± 1	409 ± 3	385 ± 3	89 ± 13
Leu	131 ± 3	80 ± 6	1014 ± 9	1400 ± 4	244 ± 1
Ile	74 ± 1	57 ± 1	333 ± 12	650 ± 2	101 ± 5
Met	181 ± 10	76 ± 1	275 ± 8	1 ± 1	178 ± 19
Phe	127 ± 6	54 ± 1	449 ± 3	900 ± 6	189 ± 18
Tyr	140 ± 2	58 ± 1	335 ± 12	1035 ± 5	100 ± 11
Trp	89 ± 2	28 ± 2	97 ± 9	365 ± 5	86 ± 13
Pro	1 ± 1	0 ± 7	4 ± 2	7 ± 4	20 ± 6
Asp	30 ± 8	21 ± 6	2 ± 40	12 ± 83	100 ± 11
Glu	44 ± 0	114 ± 0	2 ± 9	1 ± 5	14 ± 15
Gln	46 ± 1	112 ± 1	38 ± 11	29 ± 4	78 ± 4
Ser	134 ± 5	157 ± 1	113 ± 12	190 ± 1	311 ± 36
Lys	48 ± 12	46 ± 0	32 ± 19	260 ± 2	500 ± 7
Arg	55 ± 4	40 ± 1	111 ± 12	270 ± 2	656 ± 3

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Gunter Fischer für die Anfertigung meiner Dissertation in seiner Arbeitsgruppe, die Überlassung des interessanten Themas und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Cordelia Schiene-Fischer für die konstruktiven Anregungen und Hilfestellungen sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken. Die zahlreiche Unterstützung hat sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Dem Graduiertenkolleg 1026 „conformational transitions in macromolecular interactions“ und seinen Mitgliedern, besonders Prof. Milton Stubbs, danke ich für die Förderung, die vielfältige Unterstützung und die stete Diskussionsbereitschaft.

Ebenfalls ganz herzlich möchte ich Dr. Christoph Parthier und Dr. Michael Schöpfel für die Kooperation, die stetige Hilfe bei der Kristallisation meiner Proteine, für die Röntgenstrukturanalyse und für die Auflösung der Struktur von Cyp57 danken.

Dr. Elisabeth Schwarz danke ich für die Bereitstellung von BMP-2 und ihrer Diskussionsbereitschaft.

Dr. Angelika Schierhorn danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen.

Michael Schumann, Marten Villmow, Erik Hinze, Dr. Mario Träger, Martin Theuerkorn und Dr. Christian Beyer danke ich für die enge Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe und darüber hinaus für die andauernde Hilfsbereitschaft.

Barbara Korge danke ich für die praktische Unterstützung im Laboralltag, stete Hilfsbereitschaft, die wertvollen Hinweise und das gute Arbeitsklima.

Ich danke allen anderen Mitarbeitern der Forschungsstelle und der Projektgruppe gFP5 für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meiner Familie, meinen Freunden und ganz besonders Melanie danke ich für die viele Geduld und die ständige Unterstützung, ohne die diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Henrik Hoffmann
Akademischer Grad: Diplom Biologe
Geburtsdatum: 30.06.1985
Geburtsort: Luckau
Geschlecht: männlich
Wohnort: Goethestraße 24
52062 Aachen

Ausbildung

Seit 10/2011 **Promotionsstudium Biochemie** an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg am Institut für Biochemie und Biotechnologie betreut durch Prof. Dr. Gunter Fischer und Dr. Cordelia Schiene-Fischer zum Thema: „Konformationelle Regulation des RNA-bindenden Cyclophilins Cyp57“

10/2005 – 10/2010 **Studium zum Dipl.-Biologen** an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Diplomarbeit am Institut für Genetik, Abteilung Molekulargenetik zum Thema: „Analyse des Einflusses der Elongator-abhängigen tRNA-Modifikation auf die Translation.“ betreut durch Prof. Dr. Karin Breunig

09/1998 – 06/2005 **Abitur** am Bohnstedt-Gymnasium in Luckau

Stipendien

01/2015 - 04/2015 Graduiertenförderung durch die Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

10/2011 - 12/2014 Stipendiat im Graduiertenkolleg-1026 der DFG

Publikationen

Hoffmann, H., and Schiene-Fischer, C. (2014). Functional aspects of extracellular cyclophilins. *Biol. Chem.* 395, 721–735.

Tagungsbeiträge

Hoffmann, H., and Schiene-Fischer, C. - *Cyp57 - A human multidomain cyclophilin complemented with different functional domains* - Poster
3rd International Meeting "Conformational Transitions in Macromolecular Interactions"; Halle/ Saale (2013)

Hoffmann, H., Träger, M., and Schiene-Fischer, C. - *Cyp60 and Cyp57 - Human multidomain cyclophilins complemented with different functional domains* - Poster
International Symposium: Cyclophilins and other Foldases: Cell Signaling Catalysts and Drug Targets"; Halle/ Saale (2013)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht. Ferner erkläre ich, dass ich mich mit dieser Dissertation an keiner anderen Hochschule oder Universität um die Erlangung eines akademischen Grades beworben habe.

Aachen, den

Henrik Hoffmann