

**Reinigung, Klonierung und Charakterisierung einer
phospho-spezifischen Peptidyl-Prolyl-cis/trans-
Isomerase aus Proembryogenen Massen (PEMs) von
Digitalis lanata EHRH.**

Dissertation



zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

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

von Herrn Martin Metzner
geb. am 12.01.1970 in Erfurt

Gutachterin/Gutachter:

1. Prof. Dr. Martin Luckner
2. PD Dr.habil. Gerhard Küllertz
3. Prof. Dr. Maximilian Tropschug

Halle/Saale, den 20.03.2000

verteidigt am 04.07.2000

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------------|---|----|
| A | Einleitung | |
| A 1. | Prolin und die Peptidbindung | 1 |
| A 2. | Peptidyl-prolyl-cis/trans-Isomerasen (PPlasen) | 2 |
| A 2.1. | <i>Klassifizierung der PPlasen</i> | 3 |
| A 2.1.1. | Cyclophiline und ihre zellulären Funktionen..... | 3 |
| A 2.1.2. | FK 506 bindende Proteine und ihre zellulären Funktionen..... | 5 |
| A 2.1.3. | Parvuline und ihre Funktionen in der Zelle..... | 6 |
| A 2.1.3.1. | Die Subfamilie der phospho-spezifischen-Parvuline und ihre Bedeutung..... | 7 |
| A 3. | Peptidyl-prolyl-cis/trans-Isomerasen in Pflanzen | 9 |
| A 3.1 | <i>Peptidyl-prolyl-cis/trans-Isomerasen in Digitalis lanata Ehrh</i> | 11 |
| A 4. | Juglon als spezifischer Inhibitor der Parvuline | 12 |
| A 5. | Zielstellung der Arbeit | 13 |
| B | Materialien und Methoden | |
| B 1. | Materialien | 14 |
| B 1.1. | <i>Materialien (nach Firmen geordnet)</i> | 14 |
| B 1.2. | <i>Häufig verwendete Lösungen, Medien, Puffer und Kits</i> | 16 |
| B 1.3. | <i>Geräte</i> | 18 |
| B 1.4. | <i>Bakterienstämme, Vektoren und Oligonukleotide</i> | 19 |
| B 1.5. | <i>Pflanzenmaterial</i> | 21 |
| B 1.5.1. | Kultivierung der Suspensionszellen von <i>D. lanata</i> | 21 |
| B 2. | Proteinchemische Methoden | 22 |
| B 2.1. | <i>Enzymassay der Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase (PPlase)</i> | 22 |
| B 2.1.1. | Grundlagen des Protease-gekoppelten PPlase-Assays..... | 22 |
| B 2.1.2. | Protease-gekoppelter PPlase-Assay am MR 7000..... | 22 |
| B 2.1.3. | Protease-gekoppelter PPlase-Assay am HP 8452A UVVIS-Diodenarray-Spektrophotometer..... | 23 |
| B 2.2. | <i>Bestimmung der Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M</i> | 24 |
| B 2.3. | <i>Hemmung der PPlase-Aktivität</i> | 25 |
| B 2.4. | <i>Homogenisation des verwendeten Zellmaterials</i> | 25 |
| B 2.5. | <i>Proteinbestimmung</i> | 26 |

| | | |
|-------------|--|----|
| B 2.6. | <i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i> | 26 |
| B 2.6.1. | Allgemeines..... | 26 |
| B 2.6.2. | Silberfärbung der SDS-PAGE-Gele..... | 27 |
| B 2.6.3. | Coomassie-Färbung der SDS-PAGE-Gele..... | 27 |
| B 2.7. | <i>Western Blot-Analyse</i> | 27 |
| B 2.8. | <i>Konzentrierung von Proteinproben</i> | 28 |
| B 2.9. | <i>Chromatographische Reinigung der Isomerase</i> | 28 |
| B 2.9.1. | Allgemeines..... | 28 |
| B 2.9.2. | Anionenaustausch-Chromatographie..... | 29 |
| B 2.9.3. | Affinitätschromatographie..... | 30 |
| B 2.9.4. | Umkehrphasen-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatography (RP-HPLC).... | 30 |
| B 2.9.5. | Größenausschlußchromatographie zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes..... | 30 |
| B 2.9.6. | Reinigung des rekombinanten Proteins rDLPar12.8a..... | 31 |
| B 2.10. | <i>Bestimmung des Molekulargewichtes durch MALDI-TOF-MS</i> | 32 |
| B 2.11. | <i>Lys-C Spaltung der Isomerase und Sequenzierung durch Edman-Abbau</i> | 32 |
| B 2.12. | <i>Auswertung von Proteinsequenzen</i> | 32 |
| B 2.13. | <i>Gewinnung von polyklonalen Antikörpern gegen rDLPar12.8a</i> | 33 |
| B 3. | Molekularbiologische Methoden | 33 |
| B 3.1. | <i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i> | 33 |
| B 3.1.1. | Allgemeines zur Polymerasekettenreaktion..... | 33 |
| B 3.1.2. | Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)..... | 34 |
| B 3.1.3. | PCR als Methode für Selektion und Kontrolle..... | 34 |
| B 3.1.4. | Einführung von Restriktionsschnittstellen mittels PCR..... | 34 |
| B 3.2. | <i>Elektrophoretischer Trennung von DNA</i> | 34 |
| B 3.3. | <i>Reinigung von DNA-Fragmenten</i> | 35 |
| B 3.4. | <i>Herstellung kompetenter Zellen</i> | 35 |
| B 3.5. | <i>Isolierung von Plasmid-DNA (Midi-Präparation)</i> | 35 |
| B 3.6. | <i>Spektrophotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration</i> | 36 |
| B 3.7. | <i>Enzymatische Modifikation von DNA</i> | 36 |
| B 3.7.1. | <i>Restriktionsverdau von Plasmid-DNA</i> | 36 |
| B 3.7.2. | Klonierung von PCR-Fragmenten mit Hilfe des TOPO-T/A-Cloning Kit..... | 36 |
| B 3.7.3. | Ligation von DNA..... | 37 |
| B 3.8. | <i>Selektion rekombinanter Klone</i> | 37 |
| B 3.9. | <i>Sequenzierung nach Sanger mittels A.L.F. Sequenzer</i> | 37 |

| | | |
|-----------|--|----|
| B 3.10. | Sequenzauswertung..... | 37 |
| B 3.11. | Screening einer Phagen-cDNA-Bibliothek aus PEMs..... | 38 |
| B 3.11.1. | cDNA-Bank und deren Titerbestimmung..... | 38 |
| B 3.11.2. | Durchführung des Primärscreening..... | 38 |
| B 3.11.3. | Blotten der Nylon-Membranen..... | 38 |
| B 3.11.4. | Herstellung radioaktiv markierter Hybridisierungs sonden..... | 39 |
| B 3.11.5. | Hybridisierungsreaktion..... | 39 |
| B 3.11.6. | Abnehmen der Phagen..... | 39 |
| B 3.11.7. | Durchführung des Sekundärscreening..... | 40 |
| B 3.11.8. | Durchführung des Tertiärscreening..... | 40 |
| B 3.11.9. | In vivo-Excision von Plasmid-DNA..... | 40 |
| B 3.12. | Überexpression von <i>dlpar12.8a</i> in <i>E. coli</i> | 40 |
| B 3.12.1. | Subklonierung von <i>dlpar12.8a</i> in den Expressionsvektor pQE 30..... | 40 |
| B 3.12.2. | Durchführung der heterologe Überexpression von <i>dlpar12.8a</i> | 41 |
| B 3.13. | Northern Blot-Analyse..... | 41 |

C Ergebnisse

| | | |
|-------------|--|-----------|
| C 1. | Ergebnisse der chromatographischen Reinigung..... | 42 |
| C 1.1. | Allgemeine Bemerkungen zur Reinigungsstrategie..... | 42 |
| C 1.2. | Chromatographische Reinigung von <i>DLPAr12.8</i> | 42 |
| C 1.2.1. | Reinigungsschritt 1: Fractogel EMD-DEAE-Anionentauscher..... | 42 |
| C 1.2.2. | Reinigungsschritt 2: Fractogel TSK AF-Blue..... | 43 |
| C 1.2.3. | Reinigungsschritt 3: Nuc C18 RP-HPLC..... | 44 |
| C 1.2.4. | Reinigungsschema für <i>DLPAr12.8</i> | 46 |
| C 1.2.5. | Bestimmung des nativen Molekulargewichtes mittels Größenausschlußchromatographie..... | 47 |
| C 1.3. | Bestimmung des Molekulargewichtes von <i>DLPAr12.8</i> mittels MALDI-TOF-MS..... | 47 |
| C 1.4. | Partielle Sequenzierung von <i>DLPAr12.8</i> | 47 |
| C 2. | Molekularbiologische Bearbeitung von <i>DLPAr12.8</i>..... | 48 |
| C 2.1. | Ableitung von Oligonukleotidprimern für die PCR..... | 48 |
| C 2.2. | Amplifizierung von PCR-Fragmenten mittels RT-PCR..... | 49 |
| C 2.3. | Isolierung von <i>dlpar12.8a</i> aus einer cDNA-Bank von PEMs..... | 50 |
| C 2.4. | Der vollständige cDNA-Klon <i>dlpar12.8a</i> | 51 |
| C 2.5. | Überexpression von <i>dlpar12.8a</i> in <i>E. coli</i> | 55 |

| | | |
|-------------|---|----|
| C 2.5.1. | Subklonierung von <i>dlpar12.8a</i> in den Expressionsvektor pQE 30..... | 55 |
| C 2.5.2. | Expression von <i>dlpar12.8a</i> in <i>E. coli</i> | 56 |
| C 2.5.3. | Reinigung des überexprimierten Proteins rDLPa12.8a..... | 57 |
| C 2.6. | <i>Gewinnung des anti-rDLPa12.8-Antikörpers</i> | 57 |
| C 2.6.1. | Reinigung von rDLPa12.8a zur Antikörpergewinnung..... | 57 |
| C 2.6.2. | Überprüfung der Qualität des Antikörpers..... | 59 |
| C 3. | Charakterisierung von rDLPa12.8a | 60 |
| C 3.1. | <i>Bestimmung der k_{cat}/K_M - Werte für Oligopeptide</i> | 60 |
| C 3.2. | <i>Inhibierung von rDLPa12.8 durch Juglon</i> | 61 |
| C 4. | Die Gewebespezifität von DLPa12.8/DLPa12.8a | 61 |
| C 4.1. | <i>Untersuchung zur Verteilung von DLPa12.8 in <i>D. lanata</i> durch Western Blot-Analyse</i> | 62 |
| C 4.2. | <i>Northern Blot-Analyse von <i>dlpar12.8a</i></i> | 63 |
| C 4.3. | <i>Untersuchung zur zellulären Lokalisation von DLPa12.8/DLPa12.8a</i> | 64 |
| C 4.4. | <i>Konzentrationsbestimmung von DLPa12.8/DLPa12.8a in PEMs</i> | 65 |
| C 5. | In vivo Untersuchungen an PEMs | 65 |
| C 5.1. | <i>Inkubation von PEMs mit Juglon und Plumbagin</i> | 65 |
| C 6. | Untersuchungen zur Funktion von DLPa12.8a | 66 |
| | | |
| D | Diskussion | |
| | | |
| D 1. | Allgemeine Bemerkungen zu Strategie und Problemen während der chromatographischen Reinigung von DLPa12.8 | 70 |
| D 2. | Die cDNA-Sequenz <i>dlpar12.8a</i> | 72 |
| D 2.1. | <i>Die aus <i>dlpar12.8a</i> abgeleitete Aminosäuresequenz DLPa12.8a</i> | 72 |
| D 2.2. | <i>Vergleich von DLPa12.8a mit anderen Parvulinen</i> | 73 |
| D 2.2.1. | Diskussion des Aminosäuresequenzvergleiches..... | 73 |
| D 2.2.2. | <i>DLPa12.8a und die WW-Domäne</i> | 76 |
| D 2.2.3. | <i>Vergleich von DLPa12.8a mit dem homologen pflanzlichen Vertreter aus <i>A. thaliana</i></i> | 78 |
| D 2.2.4. | Diskussion der Differenzen von DLPa12.8 und DLPa12.8a..... | 79 |
| D 2.3. | <i>Der nicht kodierende Bereich von <i>dlpar12.8a</i></i> | 81 |
| D 2.4. | <i>Diskussion der Überexpression von <i>dlpar12.8a</i> in <i>E. coli</i></i> | 82 |
| D 3. | Eigenschaften von rDLPa12.8 | 82 |
| D 3.1. | <i>Diskussion der Substratspezifität von DLPa12.8a</i> | 82 |
| D 3.2. | <i>Inhibierung von DLPa12.8a durch Juglon und Plumbagin</i> | 83 |

| | | |
|------|--|----|
| D 4. | Diskussion der Lokalisation von <i>DLP</i> ar12.8/ <i>DLP</i> ar12.8a in PEMs und <i>D. lanata</i> -Pflanzen..... | 84 |
| D 5. | Diskussion des Einflusses von Juglon und Plumbagin auf PEMs in vivo..... | 85 |
| D 6. | Untersuchungen zur Funktion von <i>DLP</i> ar12.8a..... | 86 |
| D 7. | Diskussion von weiteren Aufgaben..... | 88 |
| E | Zusammenfassung | 89 |
| F | Literaturverzeichnis | 93 |

Abkürzungen

| | |
|--------------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| Ac | Acetyl-Rest |
| AC | Registriernummer für Sequenzeinträge in Datenbanken (Accession Number) |
| ACBP | Acyl-CoA-bindendes Protein |
| AK | Antikörper |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| <i>atpar13</i> | cDNA-Klon, der für <i>ATPar13</i> kodiert |
| <i>ATPar13</i> | phospho-spezifisches Parvulin aus <i>A. thaliana</i> , 13 kDa |
| AU | Absorptionseinheit |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin (<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin) |
| CTP | Cytidintriphosphate |
| cDNA | komplementäre DNA (copy DNA) |
| cpm | Zerfälle pro Minute (<u>c</u> ounts <u>p</u> er <u>m</u> inute) |
| CsA | Cyclosporin A |
| Cyp | Cyclophilin |
| DEAE-EMD | Diethylaminoethyl-Derivat |
| <i>dl128bp</i> | PCR-Fragment 1, 128 bp |
| <i>dl104bp</i> | PCR-Fragment 2, 104 bp |
| <i>dlpar12.8a</i> | vollständiger cDNA-Klon, der für <i>DLPPar12.8a</i> kodiert |
| <i>DLPPar12.8</i> | authentisches phospho-spezifisches Parvulin aus PEMs von <i>D. lanata</i> , 12.8 kDa; chromatographisch gereinigt |
| <i>DLPPar12.8a</i> | aus <i>dlpar12.8a</i> abgeleitete Aminosäuresequenz |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP's | Desoxynucleosidtriphosphate |
| DTT | 1,4-Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EMBL | Europäisches Molekularbiologisches Laboratorium (<u>E</u> uropean <u>M</u> olecular <u>B</u> iology <u>L</u> aboratory) |
| FKBP | Fk 506 bindendes Protein |
| FPLC | schnelle Protein-Flüssigkeits-Chromatographie (<u>F</u> ast <u>P</u> rotein <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography) |

| | | |
|-----------------|------|---|
| GTP | | Guanidintriphosphate |
| HEPES | | [4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure |
| HSP | | Hitzeschockprotein |
| IP | | Isoelektrischer Punkt |
| IPTG | | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |
| K_M | | Michaelis-Menten-Konstante |
| LB-Medium | | Luria-Bertani-Medium |
| M | | molar |
| MALDI-TOF-MS | | Matrix-unterstützte Laser Desorption Ionisations-Flugzeit Massenspektrometrie (<u>M</u> atrix- <u>A</u> ssisted- <u>L</u> aser- <u>D</u> esorption- <u>I</u> onisation <u>T</u> ime-of- <u>F</u> light <u>M</u> ass- <u>S</u> pectrometry) |
| MES | | 2-Morpholinoethansulfonsäure |
| M_G | | molekulare Masse |
| mRNA | | Boten-RNA (<u>m</u> essenger RNA) |
| S/m | | Siemens/Meter (Einheit der Leitfähigkeit) |
| Nm I | | Nährmedium I |
| OD _x | | optische Dichte bei x nm |
| ORF | | offener Leserahmen (<u>O</u> pen <u>R</u> eadin <u>G</u> <u>F</u> rame) |
| PAGE | | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | | Phosphate Buffered Saline |
| PCR | | Polymerasekettenreaktion (<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction) |
| PEMs | | Proembryogene Massen |
| PDB | | Protein Datenbank (<u>P</u> rotein <u>D</u> ata <u>B</u> ank) |
| pfu | | Plaque bildende Einheiten (<u>p</u> laque <u>f</u> orming <u>u</u> nits) |
| -NH-Np | | 4-Nitroanilid-Rest |
| PPIase | | Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase |
| pSer- | | Ser(OPO ₃ H ₂)-Rest |
| pThr- | | Thr(OPO ₃ H ₂)-Rest |
| PVP | | Polyvinylpyrolidin |
| rDLPar | 12.8 | rekombinantes DLPar12.8a mit N-terminalem 6xHis-Anhang |
| RT | | Raumtemperatur |
| RT-PCR | | Reverse Transkriptase PCR |
| RNA | | Ribonukleinsäure |
| RNase | | Ribonuklease |
| RP-HPLC | | Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (<u>R</u> eversed- <u>P</u> hase <u>H</u> igh <u>P</u> ressure <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography) |
| SDS | | Natriumduodecylsulfat (<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate) |

| | |
|--------------|---|
| SDS-PAGE-Gel | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese-Gel |
| SSC | Standard Saline Citrate |
| Suc- | Succinyl-Rest |
| SWISS-Prot | Proteinsequenzdatenbank |
| Tab. | Tabelle |
| TBS | Tris Buffered Saline (Tris-HCL) |
| TBT | Tris Buffered Saline (Tris-HCL) mit Tween 20 |
| TE | Tris-EDTA |
| TEMED | N, N, N', N'-Tetramethyl-Ethylendiamin |
| Tris | Tris-(Hydroxymethyl)-aminoethan |
| TTP | Thymidintriphosphat |
| U | Units (Enzym-Einheiten) |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| UV | Ultraviolett |
| VT | Volumenteile |
| Xaa | variable proteinogene Aminosäure (Dreibuchstabencode) |
| X-Gal | 5-Brom-4-chlor-indolyl- β -D-galactopyranosid |

A Einleitung

1. Prolin und die Peptidbindung

Proteinogene Aminosäuren, als die einzelnen Bausteine der Proteine, haben mit der α -ständigen Aminogruppe und der Carboxylfunktion ein gemeinsames Merkmal. Die Verknüpfung des Stickstoff der Aminogruppe mit dem α -C-Atom der N-terminal nächsten Aminosäure bezeichnet man als Peptidbindung (CO-NH). Der Stickstoff liegt in der Amidbindung sekundär gebunden vor; die Peptidbindung erweist sich aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters als relativ unbewegliche Bindung. Die sterische Hinderung der Rotation führt zum Auftreten von zwei Werten für den Torsionswinkel ω (C_{α} -N): 0° (*cis*) und 180° (*trans*). Dabei liegen die meisten Peptidbindungen in der energetisch günstigeren *trans*-Form vor.

Eine Sonderstellung unter den proteinogenen Aminosäuren nimmt das Prolin ein. Durch den Ringschluß des Stickstoffatoms mit dem δ -C-Atom der Seitenkette liegt hier eine α -Iminosäure vor (Fischer, 1994; Galat und Metcalfe, 1995). Die Rotation der C_{α} -N Bindung ist noch stärker eingeschränkt: der Torsionswinkel ω umfaßt nur einen Bereich von etwa 65° . Die freie Reaktionsenthalpie der *cis/trans* Isomerisierung (ΔG_0) nimmt Werte unter 8.4 kJ/mol an. Durch diese zusätzliche sterische Hinderung liegen etwa 30% der Peptidylprolylbindungen in Proteinen in der *cis*-Konformation (30 %) vor (Wüthrich et al., 1974; Kern et al., 1997). Im Gegensatz dazu beträgt der Anteil der *cis*-Konformation in der Peptidbindung anderer Aminosäuren in Proteinen nur 0.1-1 % (Scherer et al., 1998).

Ein weitere Besonderheit ist das Vorliegen eines sekundären N-Atoms, welches damit nicht als Wasserstoffdonator in Frage kommt.

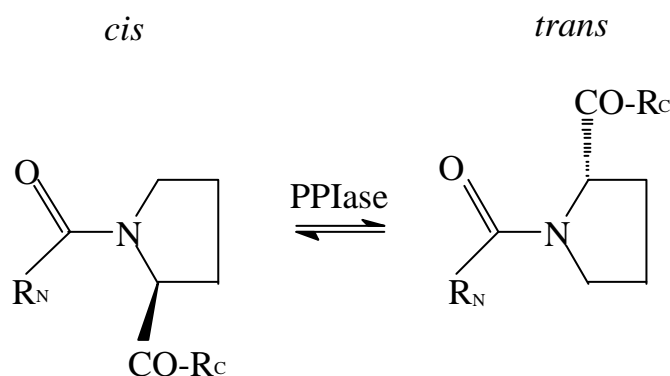


Abb. A-1: Schema einer *cis/trans*-Isomerisierung, welche durch PPIasen katalysiert wird. R_N und R_C stellen die N- bzw. C-terminalen Reste des Prolins dar (nach Fischer, 1984).

Bedingt durch die beschriebenen Eigenschaften des Prolins wird ihm eine Rolle als Strukturbrecher für Sekundär- und Tertiärstrukturen von Proteinen zugeschrieben. Diskutiert wird weiterhin die Rolle eines molekularen Schalters in biologischen Erkennungsprozessen (*Fischer et al.*, 1994).

Im Laufe der Evolution haben sich verschiedene Enzyme herausgebildet, die sich auf Prolinpeptidbindung und ihre Besonderheiten spezialisiert haben. Diese sind zum einen Proteinkinasen, Amidohydrolasen und die Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerasen [EC 5.2.1.8.], die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen sollen.

2. Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPlasen)

Die *cis/trans*-Isomerisierung stellt aufgrund der hohen Aktivierungsenergie von 80 kJ/mol häufig einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Faltung von Proteinen dar (*Kern et al.*, 1997; *Scherer et al.*, 1998; *Schmid et al.*, 1993). Enzyme, die selektiv diese Reaktion katalysieren, konnten 1984 erstmals von *Fischer et al.* isoliert und nachgewiesen werden (*Fischer et al.*, 1984). Sie wurden entsprechend der durch sie katalysierten Reaktion als Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerasen bezeichnet. Ihre Verbreitung kann als ubiquitär eingeschätzt werden. Sowohl aus Prokaryoten als auch aus Eukaryoten wurden Vertreter dieser Enzymklasse isoliert und beschrieben (*Galat*, 1993; *Fischer*, 1994; *Galat und Metcalfe*, 1995; *Hacker und Fischer*, 1993; *Hemenway und Heitman*, 1993). Auch innerhalb der Zelle ist ihr Vorkommen nicht auf einen bestimmten Ort beschränkt. Sie wurden in allen Kompartimenten, wie Cytosol, Mitochondrien, endoplasmatischem Retikulum, Golgi-Apparat oder assoziiert an Membranen nachgewiesen. Die breite Verteilung der PPlasen sowie die in der folgenden Beschreibung der einzelnen PPlase-Familien aufgezeigten Funktionen lassen für die PPlasen eine Schlüsselrolle bei wichtigen zellulären Prozessen vermuten.

Durch biochemische und molekularbiologische Methoden, wie z.B. die Suche nach zellulären Bindungspartnern für die verschiedenen PPlasen, Gendelektion oder die Generierung ortsspezifische Mutationen tragenden Varianten von PPlasen sowie deren anschließende Charakterisierung wurde und wird versucht, genauere Einsichten über die physiologische Bedeutung der verschiedenen PPlasen und ihr Zusammenspiel mit anderen Proteinen innerhalb der Zelle zu erfahren.

2.1. Klassifizierung der PPlasen

PPlasen werden bisher in drei Familien eingeteilt, die sich auf Aminosäureebene in ihrer Konsensussequenz deutlich voneinander unterscheiden: Cyclophiline (CYPs, 18-150 kDa), Fk506 bindende Proteine (FKBPs, 12-73 kDa) und Parvuline (10-47 kDa) (Übersicht: Kay, 1996). Innerhalb der Familien jedoch zeigt sich eine starke Konservierung bestimmter Aminosäuren. An eine PPlase-Domäne können noch weitere Module, wie z.B. die WW-Domäne (Sudol et al., 1995), andere Domänen oder Signalsequenzen angefügt sein. Auch die Aneinanderreihung von mehreren PPlase-Domänen innerhalb eines Proteins wurde beschrieben (Kay, 1996).

Häufig findet man in einem Organismus Vertreter aller drei Familien nebeneinander. Z.B. sind für *Arabidopsis thaliana* mittlerweile sechs Cyclophiline, vier FKBPs und zwei Parvuline nachgewiesen worden, für *Sacharomyces cerevisiae* dagegen acht Cyclophiline, vier FKBPs und ein Parvulin (Chou et al., 1997; Luan et al. 1996; Vuvich et al., 1996; Babiychuk et al., 1997; Lin et al., 1999; Hani et al., 1995; Dolinski et al., 1997).

2.1.1. Cyclophiline und ihre zellulären Funktionen

Namensgebend für die Cyclophiline ist ihre spezifische Wechselwirkung mit dem zyklischen Undecapeptid Cyclosporin A (CsA), welches aus *Tolypocladium inflatum* erstmals isoliert wurde (Borel et al., 1976) und zu einer Inhibierung der PPlase-Aktivität führt. Handschumacher et al. isolierten 1984 aufgrund dieser Wechselwirkung ein 18 kDa Protein aus Rinder-Thymozyten, ohne dessen PPlase-Aktivität zu erkennen. Sie bezeichneten es wegen seiner Affinität zu CsA als Cyclophilin.

Zur gleichen Zeit wurde von Fischer et al. (1984) ein neues, bisher unbekanntes Enzym aus Schweinenieren isoliert, welches eine Isomerisierung katalysierte und als Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerase bezeichnet wurde. Später wurde unabhängig voneinander von Fischer et al. (1989) und Takahashi et al. (1989) nachgewiesen, daß es sich bei Cyclophilin und der neu beschriebenen Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerase um das gleiche Enzym handelt, welches den cytosolische Rezeptor dieser immunsuppressiven Substanz darstellt. Dabei wurden für die reversible Bindung von CsA an Cyp18 eine Inhibitorkonstante (K_i) von 2.6 ± 0.4 nm ermittelt (Fischer et al., 1989).

CsA (Sandimmun®) hat in der Medizin als Therapeutikum zur Behandlung von Autoimmunerkrankheiten sowie als Immunsuppressivum zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen große Bedeutung erlangt. Die Unterdrückung der Immunantwort basiert jedoch nicht auf einer Hemmung der PPlase-Aktivität, sondern auf einer Beeinflussung

der T-Zell-Rezeptor gekoppelten Signaltransduktionskaskade durch den Cyp-CsA-Komplex (Liu et al. 1991, McCaffrey et al. 1993). Dieser biologisch aktive Komplex bindet an Calcineurin, eine Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Serin-Threonin-Phosphatase und inhibiert dadurch deren Phosphataseaktivität. Die cytosolische Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF-AT (nuclear factor of activated T-cells) kann nicht mehr dephosphoryliert werden und damit nicht mehr durch die Kernmembran transportiert werden. Die NF-AT vermittelte Interleukin-2 Genexpression unterbleibt durch die fehlende Assoziation der cytosolischen mit der kernlokalisierten Untereinheit von NF-AT (Schreiber und Crabtree, 1992).

Mit dem Cyp27mem aus *Drosophila melanogaster* konnte die Interaktion eines Cyp mit seinem zellulären Target, dem Pigmentfarbstoff Rhodopsin I, gezeigt werden. Cyp27mem erwies sich als essentiell für dessen korrekte Faltung und dessen Transport in die Rhabdomere der Ommatidien der Fruchtfliege (Schneuwly et al., 1989; Shieh et al., 1989; Stamnes et al., 1991). Mutationen bzw. die Deletion des für Cyp27mem kodierenden *ninA*-Gen führten zu einer Anreicherung von Rhodopsin I im endoplasmatischen Retikulum und zu einer Abnahme von reifen Rhodopsin I in den Photorezeptorzellen (Colley et al., 1991).

Eine spezifische Interaktion von humanem Cyp A und Cyp B mit dem *gag* kodierten Kapsidprotein (CA) des HIV-I-Virus, welche zur Bildung eines stabilen Komplexes führt, konnte von Luban et al. (1993, 1996) gezeigt werden. Die Inkorporation des Cyp in die Virionen erfolgt über eine Wechselwirkung mit der prolinreichen Region des CA-Proteins. Die Zugabe von CsA bzw. Mutationen in den Positionen Pro⁹⁰ und Gly⁸⁹ sind in der Lage, diesen infolge der Interaktion entstandenen Komplex zu zerstören. Dieses führt zu einer verminderten Infektösität der Virionen, während die Bildung neuer Virionen davon nicht beeinflusst wird (Braaten et al., 1997). Wiegers et al. (1999) berichteten kürzlich, daß CypA keinen Einfluß auf die Viren-Reifung besitzt und wahrscheinlich auch nicht auf die Freisetzung der Virionen.

Humanes Cyp40, verschiedene Vertebraten-FKBPs (51-59 kDa) sowie ein pflanzliches FKBP55 binden über eine Tetratricopeptid-Domäne (TPR-Domäne) an das Hitzeschockprotein Hsp90, welches eines der Hauptbestandteile eines Multiprotein-Chaperon-Systems darstellt (Hoffmann und Handschumacher, 1995; Yokoi et al., 1996; Owens-Grillo et al., 1996). Dabei wurden sie gleichfalls als Bestandteile verschiedener nicht aktivierter Steroid-Rezeptorkomplexe beschrieben (Progesteronrezeptor: Smith et al., 1993; Glucocorticoidrezeptor: Owens-Grillo et al., 1995; Östrogenrezeptor: Ratajczak et al., 1993; Ratajczak und Carello, 1996). Owens-Grillo beschreibt für die Interaktion des FKPB55 mit Hsp90, daß zugegebenes humanes Cyp40, welches ebenfalls an eine TPR-Domäne gebunden ist, mit

dem pflanzlichen FKBP55-TPR um die Bindung an Hsp90 konkurriert. Die genaue Funktion der PPlasen innerhalb dieser Komplexe ist jedoch noch unbekannt.

2.1.2. FK506 bindende Proteine und ihre zellulären Funktionen

Ähnlich den Cyclophilinen wurde der erste Vertreter (FKBP12) aus der Familie der FK506 bindenden Proteine (FKBPs) aufgrund seiner Wechselwirkung mit zwei ebenfalls immunsuppressiven spezifischen Peptidmakroliden, FK506 und Rapamycin, identifiziert (*Harding et al., 1989, Siekierka et al., 1989a, 1989b*).

Dabei beruht die immunsuppressive Wirkung von FK506 auf dem gleichen Wirkmechanismus wie dem der Cyclophiline. Der reversible Komplex aus FK506 und FKBP12 interagiert, wie bereits bei den Cyclophilinen beschrieben, mit Calcineurin.

Dagegen beruht die Wirkung des Rapamycin/FKBP-Komplexes auf einer Blockade verschiedener Signalkaskaden und der daraus resultierenden Blockade der T-Zell-Proliferation und -Differenzierung (*Galat, 1993; Heitman et al., 1992; 1994*).

SlyD (sensitive to lysis), ein Ni²⁺ reguliertes FKBP (*Hottenrott et al., 1997*) aus *Escherichia coli*, wurde durch seine Wechselwirkung mit Protein E des Bakteriophagen entdeckt ϕ X174. Entsprechende Mutationen des *SlyD*-Gens verhinderten die Lyse der Bakterien (*Roof et al., 1994*).

Ebenfalls in *E. coli* wurde mit dem Triggerfaktor eine PPlase identifiziert, die, wahrscheinlich einer 1:1 Stöchiometrie folgend, spezifisch mit der 50S-Untereinheit des Ribosoms assoziiert ist. Eine katalytische Funktion in der Proteinbiogenese läßt sich hier vermuten (*Stoller, Dissertation, 1998*). In vitro konnte gezeigt werden, daß der Triggerfaktor die Rückfaltung der RNase T1 stark beschleunigt (*Scholz et al., 1997, Stoller et al., 1995*). Die katalytischen Eigenschaften und geringe Sequenzhomologien ermöglichen die Zuordnung des Triggerfaktors zur Familie der FKBPs (*Stoller et al., 1996; Tradler et al., 1997*), obwohl eine Inhibierbarkeit durch FK506 in den üblichen Konzentrationen nicht gegeben ist. Ursprünglich wurde der Triggerfaktor durch seine Wechselwirkung mit proOmpA (pro outer membran protein A), einer Vorläuferform von OmpA, entdeckt. Durch die Übernahme von proOmpA am Ribosom durch den Triggerfaktor, kann dieser dessen translationskompetente Konformation aufrecht erhalten (*Lill et al., 1988*). *Kandror et al. (1997)* konnten zeigen, daß der Triggerfaktor naszierende Polypeptidketten am Ribosom binden kann und mit dem Chaperonin GroEL assoziieren kann.

Eine dem Triggerfaktor vergleichbare PPlase aus Eukaryoten konnte bisher nicht isoliert werden.

Eine Interaktion mit Calmodulin regulierten Ca²⁺-Kanälen des sarkoplasmatischen Retikulums von Skelettmuskelzellen wurde für hFKBP12 und FKBP12.6 beschrieben (*Lam et al., 1995; Qi*

et al., 1998). Durch in vivo und in vitro Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die PPlase durch ihre Bindung an den Ryanodin-Rezeptor den Ca^{2+} -Flux kontrolliert (Timerman et al., 1996; Wagenknecht et al., 1997; Chen et al., 1994). Timerman et al. (1995) konnten mit inaktiven FKBP12-Varianten zeigen, daß das Vorhandensein von PPlase-Aktivität dafür eine entscheidende Rolle spielt.

2.1.3. Parvuline und ihre Funktionen in der Zelle

Parvuline bilden neben Cyclophilinen und FKBP's die dritte Familie der PPlasen. Rahfeld et al. (1994a, b) gelang es, aus dem Cytosol von *E. coli* mit Par10 einen ersten Vertreter dieser neuen Familie zu isolieren. Auf Grund der Größe von 10.1 kDa wurde es Parvulin genannt (lat.: parvulus, sehr klein) und stellt die bisher kleinste bekannte PPlase dar. Die aus 92 Aminosäuren bestehende PPlase-Domäne zeigt keine Homologien zu den beiden anderen PPlase-Familien und ist im nanomolaren Bereich auch nicht durch CsA oder FK506 und Rapamycin inhibierbar. Die Werte für die *cis/trans*-Isomerisierung liegen mit einem $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von $1.69 \cdot 10^{-7} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ für das Substrat Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-NH-Np in einer Größenordnung, die der von Cyclophilinen aus *E. coli* entspricht (Rahfeld et al., 1994a).

Mittlerweile sind aus den verschiedensten pro- und eukaryotischen Organismen weitere Vertreter dieser PPlase-Familie als Proteine bzw. offene Leserahmen isoliert, sequenziert oder beschrieben wurden. Bei einigen dieser Parvulin-Homologen gelang die Aufklärung physiologischer Funktionen in der Zelle.

Für SurA, einen 47 kDa großen Vertreter der Parvulinfamilie aus dem Periplasma von *E. coli* mit zwei PPlase-Domänen, konnte eine Beteiligung an der Faltung von Proteinen der äußeren Membran nachgewiesen werden (Lazar und Kolter, 1996, Lazar et al., 1998). Seine PPlase-Aktivität liegt mit einem $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von $19 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ für das Substrat Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-NH-Np ungefähr um Faktor 1000 niedriger als dem von Par10 (Rouviere und Gross, 1996, Rahfeld et al., 1994a).

PrsA aus *Bacillus subtilis*, ein 33 kDa Parvulin-Homologes, ist ein mit der äußeren Cytoplasmamembran assoziiertes Lipoprotein. Seine Funktion wurde von Kontinen et al. (1991) in einer Beeinflussung des Proteinexports in einer späten Phase gesehen. Weiterführende Untersuchungen von Jacobs et al. (1993) kamen zu dem Resultat, daß PrsA eine essentielle Funktion bei der Reifung von verschiedenen Exoproteinen hat, die in den extracytoplasmatischen Raum sekretiert werden. Eine Deletion des Gens für PrsA resultierte in nicht mehr lebensfähigen Zellen (Kontinen et al., 1991). PPlase-Aktivität konnte für dieses Parvulin in einer ähnlichen Größenordnung wie für SurA nachgewiesen werden (Schelbert, Dissertation, 1998).

Für das 33 kDa Parvulin PrtM aus *Lactobacillus lactis* bzw. *Lactobacillus paracasei*, ebenfalls ein Lipoprotein und auf der äußeren Cytoplasmamembran lokalisiert, konnte eine Beteiligung an der Reifung zweier Serinproteasen nachgewiesen werden. Erst durch Induktion der autokatalytischen Abspaltung einer N-terminalen Peptidsequenz unter Beteiligung von PrtM erhalten beide Serinproteasen ihre katalytische Aktivität. Die Zuordnung von PrtM zur Parvulin-Familie erfolgte aufgrund der vorhandenen Sequenzhomologie. PrtM wurde bisher nicht auf vorhandene PPlase-Aktivität untersucht

Mit dem NifM-Protein aus *Azotobacter chroococcum* und anderen Stickstoff fixierenden Spezies wurden Parvulin-Homologe beschrieben, welche neben anderen *nif*-kodierten Proteinen am Aufbau eines aktiven Nitrogenase-Komplexes in diesen Mikroorganismen beteiligt sind (Paul et al., 1987; Paul et al., 1989; Evans et al., 1991).

Im Gegensatz zu den Cyps und FKBP's scheinen die Vertreter der Parvulinfamilie eine essentielle Bedeutung für die Vitalität der Zelle bzw. des Organismus zu besitzen. Die Deletion aller für Cyps und FKBP's kodierenden Genen (je acht bzw. vier Vertreter) in *S. cerevisiae* (Dolinski et al., 1997) führte nicht zum Tod der Hefe, woraus auf eine nicht essentielle Funktion für diese beiden PPlase-Familien in Hefe geschlossen wurde. Ähnliches konnte auch in *Neurospora crassa* von Barthelmess und Tropschug (1993) und für *B. subtilis* von Herrler et al. (1992) nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu beschrieben Hanes et al. bereits 1989 ein Protein (Ess1), welches für das Wachstum von Hefe essentiell ist. Später konnte dieses Protein als Parvulin identifiziert werden und wurde als Ptf1 bezeichnet (Hani et al., 1995). Seine Deletion in Hefezellen führt zu einem mitotischen Arrest der Zellen und zur Fragmentierung der Zellkerne und damit letztlich zum Absterben der Zelle (Hanes et al., 1989; Hani et al., 1995; Lu et al. 1996).

Kürzlich wurde von Uchida et al. (1999) ein humanes Parvulin mit einem Molekulargewicht von 14 kDa beschrieben. Es ist damit neben dem phospho-spezifischen Parvulin Pin1 (siehe nächstes Kapitel) das zweite beschriebene Parvulin menschlicher Herkunft, zeigt jedoch nicht die Substratspezifität wie Pin1.

2.1.3.1. Die Subfamilie der phospho-spezifischen Parvuline und ihre Bedeutung

Einige der zuletzt erwähnten eukaryotischen Vertreter der Parvulinfamilie sind gekennzeichnet durch eine Präferenz für Peptidsubstrate mit einer Phosphorylierung der Seitenkette der Aminosäuren Threonin oder Serin in der Position P₁ zu Prolin (AS N-terminal neben Prolin, Nomenklatur nach Schechter und Berger, 1968). Die Präferenz für derartige Substrate zeigt sich in sehr großen k_{cat}/K_M -Werten für phosphorylierte Substrate. Bei Fehlen einer derartigen Phosphorylierung verringern sich die k_{cat}/K_M -Werte dramatisch. Diese Gemeinsamkeit teilen

die Parvuline Ess1/Ptf1 aus *S. cerevisiae* (Hani et al 1995), Ssp1 aus *N. crassa* (Kops et al., 1998) sowie das humane Pin1 (hPin1, Lu et al., 1996). Im Gegensatz dazu zeigen Vertreter der Cyps und FKBP's für an der Seitenkette von Ser/Thr phosphorylierte Substrate nur kleine k_{cat}/K_M -Werte, während hier das Fehlen der Phosphorylierung zu einer Erhöhung der k_{cat}/K_M -Werte führt.

Die PPIase-Domäne dieser oben erwähnten Proteine zeigt eine hohe Homologie zum *E. coli* Par10. Weiteres gemeinsames Merkmal ist das Vorhandensein einer N-terminalen WW-Domäne neben der Parvulin-homologen PPIase-Domäne. Die aus etwa 35-40 Aminosäuren bestehende WW-Domäne wurde beschrieben als eine für Protein-Protein-Interaktionen wichtige Domäne, die auch bei anderen, nicht mit PPIasen verwandten Proteinen zu finden ist. Sie ist charakterisiert durch vier hochkonservierte aromatische Aminosäurereste, von denen zwei Tryptophanreste (WW) sind (Bork und Sudol, 1994; Sudol et al., 1995; Sudol, 1996; Einbond und Sudol, 1996).

Lu et al. berichteten 1996 über die Existenz eines neuen, humanen, kernlokalisierten, aus 163 Aminosäuren bestehenden Parvulins, Pin1 genannt, welches an der Regulation der Mitose beteiligt ist. Es wurde mittels Two Hybrid Screening als Interaktionspartner der NIMA-Kinase (Never In Mitosis Mutant A; Lu et al., 1995) gefunden und scheint durch diese Interaktion deren Mitose-fördernde Aktivität zu schwächen. Die Deletion des Pin1-Gens in HeLa-Zellen führt schließlich zur Arretierung der Mitose, während die Überexpression von Pin1 in HeLa-Zellen zu einem G₂-Arrest führt.

Die Kristallstruktur des hPin1 im Komplex mit dem Dipeptid Ala-Pro brachte neue Erkenntnisse. So wurden Lys⁶³, Arg⁶⁸ und Arg⁶⁹ als vermutliche Bindungsstelle für Substrate mit einer sauren Aminosäure N-terminal zum Prolin identifiziert. Da hPin1, wie auch die anderen phospho-spezifischen Parvuline, eine starke Präferenz für Substrate mit sauren Seitenketten N-terminal zum Prolin zeigt, ließ sich anstelle des Alanins im Dipeptids Ala-Pro ebenfalls ein phosphoryliertes Serin oder Threonin in die Bindungstasche modellieren. Die Mitose regulierende Funktion von Pin1 könnte dahingehend wirksam werden, daß sich *cis-trans* Xaa-Pro-Konformere in ihrer biologischen Aktivität stark unterscheiden, und hPin1 durch Umwandlung der beiden Konformere ineinander die biologische Aktivität des Interaktionspartners bestimmt. (Raganathan et al., 1997).

Shen et al. (1997) konnte zeigen, daß hPin1 mit einigen an der Mitose beteiligten Proteinen interagiert und deren Aktivität in einer vom Phosphorylierungsstatus abhängigen Art und Weise reguliert.

Den Einfluß der Phosphorylierung von Ser/Thr-Pro Motiven in Peptidsubstraten auf die PPIase-Aktivität von hPin1, Cyclophilinen und FKBP's untersuchten Yaffe et al. (1997). Dabei konnten sie feststellen, daß unphosphorylierte Substrate sowohl von hPin1 als auch von Cyclophilinen und FKBP's etwa ähnlich schlecht erkannt werden. Bei vorhandener Phosphory-

lierung des Motivs (pSer/pThr-Pro) war eine starke Bevorzugung (bis zu 300-fach höhere PPlase-Aktivität) der Substrate durch hPin1 zu erkennen. Mutationen von hPin1 im Bereich der Substratbindungsstelle (Lys⁶³, Arg⁶⁸ und Arg⁶⁹) führten zu hPin1 Varianten, die im Vergleich zum Wildtyp eine starke Abnahme der PPlase-Aktivität (bis zu 500-fach) für Substrate zeigten, die das Motiv pSer/pThr-Pro aufwiesen.

Crenshaw et al. (1998) konnten zeigen, daß die Deletion von Pin1 bindenden Proteinen aus Extrakten von *Xenopus* Eiern in einer Hyperphosphorylierung und Inaktivierung der Ser/Thr-Kinase Cdc 2/Cyclin B resultieren. Cdc 2/Cyclin B spielt eine Schlüsselrolle bei der Zellteilung, in dem es den Eintritt von eukaryotischen Zellen in die Mitose reguliert.

3. Peptidyl-prolyl *cis/trans* Isomerasen in Pflanzen

Ein erster Hinweis auf pflanzliche cytosolische Cyclophiline war bei Koletsky et al. (1986) zu finden. Es gelang, ein Cyp18 aus Zucchini (*Curcubita pepo*) zu detektieren. Die erste Isolation pflanzlicher Cyp-cDNAs mit einer hohen Homologie zu hCypA gelang Gasser et al. (1990) aus *Lycopersicon esculentum*, *Zea mays* und *Brassica napus*. Alle drei kodieren für 18 kDa Proteine, welche im Cytosol lokalisiert sind.

Ein gemeinsames Sequenzmerkmal pflanzlicher cytosolischer Cypps ist eine Insertion von 7 Aminosäuren an Position 48-54 in Bezug auf hCypA, welches bereits von Gasser et al. (1990) beschrieben worden ist. Man muß jedoch die Einschränkung machen, daß dieser Einschub auch bei anderen eukaryotischen Cypps vorhanden ist und nicht auf Pflanzen beschränkt ist. Einige höhermolekulare Cypps zeigen z.B. einen 8 Aminosäuren umfassenden Einschub in ihrer Proteinsequenz (Chou und Gasser, 1997).

Für *A. thaliana* sind mittlerweile 6 Cypps beschrieben worden, von denen 5 cytosolischer Natur sind, während eines im Chloroplasten gefunden wurde. Dieses im Stroma von Chloroplasten lokalisierte Cyp28 (ROC4) besitzt eine N-terminale Präsequenz, die Eigenschaften von chloroplastidären Transitpeptiden aufweist. Der 7 bzw. 8 Aminosäuren umfassend Einschub fehlt dagegen. Die Transkriptmenge der cyp28 mRNA wird vom Licht reguliert (Lippuner et al., 1994; Chou und Gasser, 1997).

Lichtabhängige Expression und Lokalisation lassen eine Funktion eines CypB/C (21 kDa) aus *Vicia faba* beim Aufbau des Photosyntheseapparates in Verbindung mit einer Chaperonfunktion vermuten (Luan et al., 1994).

Breimann et al. (1992) konnten in *Pisum sativum* unter anderem in Mitochondrien und in Chloroplasten detektierbare PPlase-Aktivität nachweisen, die mit CsA inhibierbar war.

Umfangreiche Untersuchungen existieren über die Rolle von Cypps bei der pflanzlichen Stressantwort. Erhöhte Transkriptmengen für Cypps wurden bei Behandlung der Pflanzen mit

Hitzestreß, Kältestreß, Verwundung, osmotischem Streß, hormonellem Streß, UV-Licht, Schwermetallstreß und bei Virusinfektion gefunden (*Marivet et al.*, 1992; 1994; 1995; *Luan et al.*, 1994a; *Chou und Gasser*, 1997).

Neben unterschiedlichen Transkriptmengen, bedingt durch verschiedenste Arten von Streß, wurde von den verschiedensten Autoren berichtet, daß auch während der Embryonalentwicklung von Pflanzen unterschiedliche Transkriptmengen gefunden wurden. Grundsätzlich wurden hier bei jungen wachsenden Geweben höhere Werte, als bei älteren, nichtwachsenden Geweben gemessen (*Gasser et al.*, 1990; *Marivet et al.*, 1995).

Hierbei ist zu beachten, daß die verschiedene Isoformen in gleichen Geweben unterschiedlich transkribiert werden können, was für *A. thaliana* *Lippuner et al.* (1994) sowie *Chou und Gasser* (1997) zeigen konnten.

In diesem Zusammenhang sind auch die Ergebnisse von *Scholze* (Dissertation, 1998; *Scholze et al.*, 1999) zu sehen, die die von *Gasser und Marivet* beobachtete Verteilung in jungem und alten Gewebe der Cyp-Transkripte für *DLCyp18.0* mRNA in *Digitalis lanata* nicht beobachten konnte.

Über FKBP's aus Pflanzen berichteten *Breimann et al.* (1992). Dabei konnte eine mit Rapamycin inhibierbare PPLase-Aktivität aus Mitochondrien von *Pisum sativum* detektiert werden.

Luan et al. (1993, 1994b) beschrieben die Inhibierung von Calcineurin durch einen FK506-FKBP-Komplex (mit zugegebenem humanem FKBP13) und die damit verbundene Inaktivierung von K⁺-Kanälen in Schließzellen von *Vicia faba*. Weiterhin gelang ihnen die Isolierung von pflanzlichen FKBP12 und FKBP13 aus *V. faba*, deren vorhandene geringe zelluläre Mengen aber nicht zur ausreichenden Bildung des FK506-FKBP-Komplex führen, der wiederum für die Inhibierung von Calcineurin notwendig ist. Ihre zelluläre Lokalisation wurde als cytosolisch und chloroplastidär beschrieben. Eine Regulation der Expression durch Licht legt ebenso wie bei Cyp B/C die Vermutung nahe, am Aufbau des Photosyntheseapparates beteiligt zu sein (*Luan et al.*, 1994b).

Blecher et al. (1996) berichten über ein hochmolekulares pflanzliches FKPB73 aus *Triticum aestivum*, welches in *E. coli* überexprimiert werden konnte. Es besteht aus drei FKBP-Domänen und einer Calmodulin-Bindungsstelle.

Über pflanzliche Parvuline ist bisher so gut wie nichts berichtet worden. Von *A. thaliana* sind die Existenz eines 25 kDa großen Parvulins sowie eines 13 kDa großen phospho-spezifischen Parvulins in Form von Sequenzdatenbank-Einträgen bekannt (Sequenzeinträge Z86095, AAD20122).

3.1. Peptidyl-prolyl *cis/trans* Isomerasen in *Digitalis lanata* Ehrh.

Im Laufe der Jahre wurden auch in *D. lanata* eine ganze Reihe von Cyclophilinen beschrieben. *Liebau* gelang 1995 die Isolierung von zwei Cyclophilinen (*DLCyp18.0* und *DLCyp18.1*) aus Proembryogenen Massen (PEMs) von *D. lanata* (*Liebau*, Dissertation 1995; *Küllertz et al.*, 1999). *DLCyp18.0* ist das von den beiden, wahrscheinlich im Cytosol lokalisierten, Cyclophilinen das stärker vertretene. Durch Streß-Behandlung mit 0.5 M Sorbitol und 100 µM ABA war nach 4 d eine verstärkte PPLase-Aktivität detektierbar, was vermuten läßt, daß dieses Cyps eine Rolle bei der Streßantwort spielen.

Scholze gelang es, den vollständigen cDNA-Klon von *DLCyp18.0* zu isolieren und nachzuweisen, daß es sich bei *DLCyp18.0* um ein CypA-Homologes handelt, welches keine N-terminale Signalsequenz für den Transport in subzelluläre Kompartimente besitzt (*Scholze*, Dissertation, 1998; *Scholze et al.*, 1999). *DLCyp18.0* mRNA konnte in allen Pflanzengewebe nachgewiesen werden, jedoch war die Menge in den einzelnen Geweben unterschiedlich. So war die Transkriptmenge in Blüten doppelt so hoch wie in der Sproßachse, dagegen in PEMs auffallend gering. Sie betrug nur ein 1/9 der Menge in den Blüten bzw. 1/4 der Menge in der Sproßachse. Eine erhöhte Transkriptmenge von *DLCyp18.0* in PEMs war weder durch Hitzestreß noch durch bestimmten Schwermetallstreß (HgCl_2 , CdCl_2) oder die gleichen Streßbedingungen (0.5 M Sorbitol, 100 µM Abscisinsäure), die *Liebau* verwendete, nachweisbar (*Küllertz et al.*, 1999). Allerdings konnte durch $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ eine starke Anreicherung der *DLCyp18.0* mRNA beobachtet werden. Erwähnt werden sollte hier jedoch auch, daß bereits der Zusatz von 170 mM NaCl die Transkriptmenge erhöhte.

Peterson gelang es, einen genomischen Klon aus einer genomischen Bank von *D. lanata* zu isolieren, der für ein drittes Cyp18 kodiert (Sequenzeintrag Y08273). Er wies keine Exon/Intronstruktur auf.

Durch Southern-Blot-Analyse konnte *Scholze* zeigen, daß mindestens 3 Cyp-Isogene in *D. lanata* vorliegen müssen. Mit dem von *Peterson* isolierten genomischen Klon und den beiden von *Liebau* isolierten Cyclophilinen wurden bisher auch tatsächlich 3 verschiedene Vertreter der Cyclophiline isoliert

Ein weiteres bisher nicht veröffentlichtes Cyp18.2 aus *D. lanata* konnte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit isoliert werden. Seine Masse wurde mit 18170 Da bestimmt. Die partielle Peptidsequenz (unveröffentlicht: M?NPKVFFDIAV) unterscheidet sich nur geringfügig von den bisher gefundenen Vertretern aus *D. lanata*.

Ergebnisse zur Transkription von *DLCyp18.0* mRNA während der frühen somatischen Embryogenese zeigen, daß hier eine verstärkte Akkumulation auftritt. Eine Erklärung für diesen Effekt wäre die Annahme, daß die Embryogenese bei PEMs eine Form der Stress-

antwort ist. Ein anderer Grund könnte in einem verstärkten Bedarf an Faltungshelfern wegen einer verstärkten Proteinbiosynthese gesehen werden (*Scholze, Dissertation, 1998*).

Vertreter der anderen beiden PPlase-Familien konnten bisher nicht aus *D. lanata* isoliert werden, was wohl eher an den geringen Mengen an FKBP und Parvulin liegen sollte, als am Fehlen dieser Enzyme.

4. Juglon als spezifischer Inhibitor der Parvuline

Mit Juglon (5-Hydroxy-1,4-Naphthochinon), einem braunen Farbstoff, der in verschiedenen *Juglans*-Spezies vorkommt, wurde durch *Hennig et al. (1998)* der erste spezifische irreversible Inhibitor für die PPlase-Familie der Parvuline beschrieben. Cyclophiline oder FKBP's werden durch diesen Inhibitor nicht gehemmt. Aus Ergebnissen der Modifizierung des Aminosäurerestes Cys⁴¹ des *E. coli* Par10 wurde als entscheidendes Kriterium für die Inhibierung durch Juglon das Vorhandensein, die Reaktivität und die Zugänglichkeit dieses Cysteinrestes gefunden. Ein Angriff des Juglons an diesem Cysteinrest führt zu einer partiellen Entfaltung des aktiven Zentrum des Parvulins und damit zu einer erhöhten proteolytischen Sensitivität. Die konformationellen Veränderungen in der Tertiärstruktur des aktiven Zentrum korrelieren dabei mit einer Abnahme des β -Faltblattanteils, die wiederum im Einklang mit einer Verminderung der PPlase-Aktivität steht. Die Inhibierung entspricht einer 1:1 Stöchiometrie (*Hennig, Diplomarbeit, 1996*).

Die Zeitdauer für die Inhibierung der einzelnen Vertreter der phospho-spezifischen Parvuline variiert dabei von 30 min für *E. coli* Par10 bis 150 min für Ess1/Ptf1 aus Hefe bei Anwendung eines 10 fach molaren Überschusses von Juglon (*Hennig et al., 1998; Christner, Dissertation, 1998*).

Andere Untersuchungen zu Juglon zeigen, daß nicht nur Parvuline mit Juglon interagieren bzw. durch Juglon inhibiert werden. Weitere beschriebene, durch Juglon hemmbare, Enzyme sind die 3 α -Hydroxysteroidtranshydrogenase, die Pyruvatdecarboxylase und die Glutathion-S-Transferrase (*Webb, 1966*). Dabei ist der Mechanismus der Inhibierung nicht genau bekannt, jedoch wird eine Modifizierung spezifischer Cysteine vermutet (*Vos et al., 1989*).

Auch seine cytotoxischen Eigenschaften sind schon länger bekannt. Es ist in der Lage, Keimung zu unterdrücken, als auch das Wachstum von Konkurrenzpflanzen zu hemmen.

5. Zielstellung der Arbeit

Das Auffinden der bereits erwähnten phospho-spezifischen Parvuline hPin1, Ess1/Ptf1 und Dodo (Maleszka et al., 1996) sowie die Existenz einer partiellen Parvulin-cDNA-Sequenz aus *A. thaliana* (Sequenzeintrag F13919) legten den Schluß nahe, daß auch in Pflanzen diese Subfamilie der Parvuline existieren könnte. Da die phospho-spezifischen Parvuline eine große Rolle bei der Zellvitalität zu spielen scheinen, war es von großem Interesse, auch auf dem Gebiet der Pflanzen nähere Aussagen zu Vorkommen, Struktur, Funktion und Regulierung eines Vertreters dieser Subfamilie der Parvuline zu erhalten.

Ziel dieser Arbeit war die Detektion einer entsprechenden Enzymaktivität für ein in Position P₁ zum Prolin phosphoryliertes Peptidsubstrat in *D. lanata* und bei deren Vorhandensein, die chromatographische Reinigung der pflanzlichen PPlase. Sämtliche sich daraus ergebenden Schritte, wie die Klonierung der PPlase, deren heterologe Überexpression und die anschließende Charakterisierung des überexprimierten Enzyms sollten eine genauere Beschreibung des pflanzlichen Vertreters der phospho-spezifischen Parvuline ermöglichen. Erste nähere Aussagen, z. B. über Substratspezifität, Inhibierbarkeit und Verteilung in der Pflanze sollten einen Vergleich mit bereits bekannten Vertretern der phospho-spezifischen Parvuline ermöglichen und vielleicht erste Hinweise auf eine mögliche Funktion dieses Enzyms erlauben. Noch erwähnt werden sollte, daß im gleichen Zeitraum, in dem der cDNA-Klon *dlpar12.8a* isoliert wurde, im Rahmen des *A. thaliana*-Genom-Projektes die vollständige cDNA-Sequenz des homologen phospho-spezifischen Parvulins aus *A. thaliana* veröffentlicht wurde. Jedoch war die *A. thaliana* Sequenz erst nach Isolierung von *dlpar12.8a* als Sequenz-Eintrag in den einschlägigen Datenbanken zugänglich.

B Materialien und Methoden

1. Materialien

1.1. Materialien (nach Firmen geordnet)

| | |
|-------------------------------------|---|
| Amersham, Braunschweig: | ECL western blotting detection reagents |
| AppliChem, Darmstadt: | Trypton |
| Biometra, Göttingen: | Cellophan |
| Boehringer Mannheim, Mannheim: | Ampicillin, dNTP's (je 25 mM), EDTA, High Prime DNA Labeling Kit, Kanamycin, MgCl ₂ (25 mM), molekularer Massenstandard für die Gelfiltration (BSA, Ovalbumin, Chymotrypsinogen A, Cytochrom C), SDS, Trypsin, T4-Ligase und Ligationspuffer |
| Difco, Augsburg: | Agar noble |
| GibcoBRL, Karlsruhe: | Benchmark TM Prestained Protein Ladder, IPTG, Superscript Preamplification System, X-Gal |
| ICN, Eschwege: | Glycin, Tris |
| Invitrogen, Groningen, Niederlande: | One Shot kompetente Zellen TOP10, TOPO-T/A-Cloning Kit |
| Merck, Darmstadt: | α-Chymotrypsin (Rinderpankreas), Formaldehyd 37 %, Fractogel EMD-DEAE (M), Fractogel AF-Blue, Natriumcarbonat, Natriumchlorid, Natriumthiosulfat, Phosphorsäure, Silbernitrat |
| Milchwerke Mittelelbe, Stendal: | Instant Magermilchpulver |
| NEB, Boston, USA: | Restriktionsenzyme und Puffer |
| NEN, Köln: | dATP[α- ³² P] 3000 Ci/mmol, NEF585 X-Omat Blue Film |
| Pab productions, Hebertshausen: | polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen rDLPar12.8a |
| Pall Filtron, USA: | Nanosep Mikrokonzentrator (Ausschlussgröße 3000 Da) |
| Pharmacia Biotech, Freiburg: | ALFexpress AutoRead Sequencing Kit, 100 Base-Pair Ladder, Blue-Sepharose CL-6B, Primer für PCR, Superdex 75 (300 x 10 mm, ÄKTA-System) |

| | |
|----------------------------------|---|
| Peqlab Polymerase, Erlangen: | Taq-Polymerase (5 U/μl) |
| Polaroid, Offenbach: | Polaroid Filme 3 ¼ x 4 ¼, |
| Qiagen, Hilden: | QIABRANE, Nylonmembranen, ungeladen, 0.2 μm, QIAEX II Gel Extraction Kit, QIAexpress Kit Type III, Qiagen Plasmid Midi Kit |
| Roth, Karlsruhe: | Acetonitril (HPLC-rein), Dextransulfat; Dithiothreitol, Rotiphorese™ (30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid), TFA (HPLC-rein) |
| Sartorius, Göttingen: | Cellulose Acetat Filter 1.2 μm |
| Schleicher und Schuell, Einbeck: | Gel-Blotting-Papier GB003 |
| Serva, Heidelberg: | Agarose für DNA-Gelelektrophorese, Ammoniumpersulfat, Coomassie Brilliant Blau G 250, Coomassie Brilliant Blau R 250, DEAE-EMD-Fractogel, DMSO, EDTA, Glycerin, HEPES, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid, MES, Natrium-Azid, Nitrocellulose Membranen NC45, Protein Test Marker 4 und 5 für SDS-PAGE, Ribonuklease A, Spectra/Por®, MCWO 3500, Triton X-100, Tween 20, Yeast Extract, Rinder-serumalbumin (BSA) |
| Sigma, Deisenhofen: | Anti-Kaninchen IgG (Konjugat mit Meerrettich-Peroxidase) aus Ziegen |
| Stratagene, Heidelberg: | NucTrap Probe Purification Columns, Exassist Interference-Resistant Helper Phage |

Alle verwendeten synthetischen Peptidsubstrate für den PPIase-Assay wurden freundlicherweise von *Dr. M. Schutkowski* (M. Planck-Arbeitsgruppe "Enzymologie der Peptidfaltung" Halle/Saale) zur Verfügung gestellt (*Schutkowski et al.*, 1998). Wenn im folgenden von Substraten oder Peptidsubstraten die Rede ist, so sind immer synthetische Tetra- oder Pentapeptidsubstrate gemeint. Die einzelnen Aminosäurepositionen wurden nach der von *Schechter* und *Berger* (1968) für Proteasesubstrate verwendeten Nomenklatur bezeichnet, was bedeutet, daß die Aminosäure N-terminal zum Prolin als P₁-Position bezeichnet wird. Wenn von phosphorylierten Substraten geschrieben wird, so sind damit Phosphorylierungen in der Seitenkette der Aminosäuren Ser oder Thr gemeint, die in der Position P₁ bezogen auf Prolin stehen und als pSer oder pThr abgekürzt werden.

1.2. Häufig genutzte Lösungen, Medien, Puffer und Kits

Lösungen

Wasser

Für proteinchemische Arbeiten wurde membranfiltriertes, deionisiertes und pyrogenfreies Wasser verwendet; für die molekularbiologische Arbeiten wurde dies zusätzlich sterilisiert.

Heringssperma-DNA (10 mg/ml)

Die Lösung wurde 30 min im Ultraschallbad inkubiert und anschließend 30 min gekocht. Aliquote wurden bei -20°C eingefroren. Vor Gebrauch wurde die Lösung 10 min gekocht und anschließend 2 min in Eis inkubiert.

Phenol

gesättigt mit 100 mM Tris/HCl, pH 8.0, und Zusatz von 0.1 % 8-Hydroxychinolin

RNase A (10 mg/ml)

Ribonuklease A gelöst in TE-Puffer; zur Beseitigung der DNase-Aktivität wurde die Lösung 30 min in kochendem Wasser inkubiert.

X-Gal Stammlösung (40 mg/ml)

400 mg X-Gal wurden in 10 ml Dimethylformamid gelöst. Von dieser Lösung wurden 40 µl auf eine LB-Platte (100 mm) ausplattiert.

Medien

LB-Medium (steril)

| | |
|-------------|-------|
| Hefeextrakt | 0.5 % |
| NaCl | 1 % |
| Trypton | 1 % |

LB-Agar

| | |
|-------------|-------|
| Hefeextrakt | 0.5 % |
| NaCl | 1 % |
| Trypton | 1 % |
| Agar noble | 1.5 % |

SOC-Medium

| | |
|-------------------|--------|
| Hefeextrakt | 0.5 % |
| Tryptone | 2 % |
| KCl | 2.5 mM |
| NaCl | 10 mM |
| MgSO ₄ | 10 mM |
| Glucose | 20 mM |

Nährmedium I für PEMs (Konzentrationen in mM)

Saccharose 90; KNO₃ 19; NH₄NO₃ 20; KH₂PO₄ 5; CaCl₂ 3; MgSO₄ 1,5; FeSO₄ 0.2; H₃BO₃ 0.1; MnSO₄ 0,1; EDTA 0,1; ZnSO₄ 0.03; KI 5 x 10⁻³; Na₂MoO₄ 1 x 10⁻³; myo-Inositol 0.5; Nicotinsäureamid 8,2 x 10⁻³; Pyridoxin 2,5 x 10⁻³; Thiamin 1,5 x 10⁻³; 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) 5 x 10⁻³; Kinetin 1 x 10⁻⁴; L-Ala 0.33; L-Arg 0,02; L-Asn 0.03; L-Asp 0.01; L-Gln 2 x 10⁻³; L-Glu 0,1; L-Gly 0.06; L-His 3 x 10⁻⁴; L-Hydroxyprolin 9 x 10⁻³; L-Leu 0.04; L-Lys HCl 0.01; L-Met 3 x 10⁻⁴; L-Phe 3 x 10⁻⁴; L-Pro 0.02; L-Ser 0.1; D,L-Thr 0.03; L-Tyr 3 x 10⁻⁴; L-Val 0.02

Puffer

| | |
|----------------------|--|
| Laufpuffer SDS-PAGE: | Glycin 28.80 g/l, Tris-Base 3.02 g/l, SDS 1.00 g/l |
| TE-Puffer: | 10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8.0 |
| 10 x TAE-Puffer: | 0.4 M Tris, 0.2 M Natriumacetat, 0.01 M EDTA, pH 7.5 |
| 20 x SSC: | 3 M NaCl, 0.3 M Natriumcitrat, pH 7.0 |
| SM-Puffer | 50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO ₄ (wasserfrei), 0.1 % Gelatine, pH 7.5 |
| TBT-Puffer | 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.2 % Tween 20, pH 7.5 |
| PBS-Puffer | 0.15 M NaCl, 0.01 M H ₃ PO ₄ , 0.2 % Tween 20, pH 7.4 |

Kits

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| ALFexpress AutoRead Sequencing Kit | Pharmacia |
| ECL western blotting analysis system | Amersham |
| Plasmid Midi Kit | Qiagen |
| QIAEX II Gel Extraction Kit | Qiagen |

| | |
|---|------------|
| QIAexpress Type III Kit | Qiagen |
| Superscript Preamplification System Kit | GibcoBRL |
| TOPO-T/A-Cloning Kit | Invitrogen |

1.3. Geräte

| | |
|--|---|
| Brutschrank/Schüttler | GFL, Burgwedel |
| Chromatographie und Zubehör: | |
| – Fractogel TSK AF-Blue | Merck, Darmstadt |
| – Fractogel EMD-DEAE | |
| – Nuc C18 RP-HPLC-Säule (125/3) | Macherey-Nagel, Düren |
| – Nuc C3 RP-HPLC-Säule (125/4) | |
| – Schlauchpumpe P-1: | Pharmacia Biotech, Freiburg |
| – UV-Meßzelle Uvicord SII: | |
| – Schreiber REC 102: | |
| – Äkta-System | |
| – Fraktionssammler Redifrac | |
| – HPLC-Anlage (LC-10A) | Kyoto, Japan |
| DNA-Speed-Vac DNA 110 | Savant Instruments, Farmingdale, USA |
| Elektrophorese: | |
| – Phero-stab 550 | Biotec-Fischer, Reiskirchen |
| – Minikammer Phero-sub 1 | |
| – Minikammer PHERO-minivert | |
| Fastblot, Blotting Apparatur | Biometra, Göttingen |
| French Press | SLM Aminco, Büttelborn |
| Gene Quant | Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Mastercycler 5330 + 5330 Plus (Deckel) | Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg |
| Mikrotiterplattenreader MR 7000 | Dynatech, Denkendorf |
| Potter Homogenisator | Glass Col, Terre Haute, IN, USA |
| Rundschüttler KS 501 D | IKA, Staufen |
| Sofortbildkamera Polaroid MP 4 | Polaroid, Offenbach |
| Thermomixer 5437: | Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg |
| Transilluminator TC-312 A/F | Spectronics Corporation, Westbury, USA |
| UV Crosslinker | Stratagene, Heidelberg |

UV/VIS-Dioden-Array-

Spektrophotometer 8452A

Hewlett-Packard, Waldbronn

Vakuumkonzentrationszentrifuge Univapo

100H

UniEquip, Martinsried

Waagen:

– Analysenwaage

Sartorius, Göttingen

– Laborwaage MC1

Zentrifugen:

– Laborzentrifuge 3K18:

Sigma, Osterode/Harz

– Biofuge fresco

Heraeus Instruments, Hanau

– Ultrazentrifuge LE-80 K

Beckman, Unterschleissheim

1.4. Bakterienstämme, Vektoren und Oligonukleotide

E. coli-Stämme

XL1-Blue MRF'

(*mcrA*)183, (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173, *endA1*, *supE44*, *thi-1*,
recA1, *gyrA96*, *relA1*, *lac* [F', *proAB*, *lacIqZ*(M15, Tn10, (Tetr))
(Stratagene)

SOLR

e14-(mcrA), (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)171, *sbcC*, *recB*, *recJ*,
umuC:Tn5(Kan^r), *uvrC*, *lac*, *gyrA96*, *relA1*, *thi-1*, *endA1*, (R, [F', *proAB*,
lacIqZ(M15)], Su- (nonsuppressing)
(Stratagene)

One Shot TOP10

F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*Δ M15 Δ*lacX74recA1 deoR*
araD139 Δ(*araleu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*
(Invitrogen)

SG13009[pREP4]

(Nal^S, Str^S, Rif^S, Lac⁻, Ara⁻, Gal⁻, Mtl⁻, F⁻, RecQA⁺, Uvr⁺, Lon⁺)
(Qiagen)

Vektoren

Als Vektoren kamen der pCR 2.1 TOPO-Vektor (Invitrogen) für Klonierungen und der pQE30 Expressionsvektor (Qiagen) für die heterologe Überexpression zur Anwendung. Die

verwendete cDNA-Bank von *Dr. A. Peterson* (Scholze et al., 1999) war in einen pBluescript(SK(+/-)-Vektor (Stratagene) kloniert. Alle Angaben zu den Vektoren wurde den entsprechenden Manuals entnommen.

| | |
|--------------------------|-------------------------------|
| pCR 2.1 TOPO T/A | Amp ^r (Invitrogen) |
| pBluescript SK(+/-) | Amp ^r (Stratagene) |
| pQE 30 Expressionsvektor | Amp ^r , (Qiagen) |

Oligonukleotide

Sämtliche verwendeten Primer wurden von der Firma Pharmacia synthetisiert.

- RT-PCR und Kontroll-PCR

| | | | | | | | | |
|---------------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| MM11/98 (sense) | 5´ | | N | F | E | E | V | A |
| | | AAT | TTC | GAY | GAY | GTN | GC | |
| MM12/98 (anitsense) | 5´ | | P | K | Q | M | Q | G |
| | | GG | YTT | YTG | CAT | YTG | NCC | |
| MM13/98 (sense) | 5´ | | R | G | G | D | L | G |
| | | CGN | GGC | GGN | GAY | CTN | GG | |
| MM14/98 (antisense) | 5´ | | | I | H | V | G | |
| | | TT | RAT | GAT | GTG | NAC | KCC | |
| MM15/98 (sense) | 5´ | | G | R | G | Q | M | Q |
| | | GGN | AGA | GGN | CAR | ATG | CA | |
| MM16/98 (antisense) | 5´ | | | I | H | V | G | |
| | | TT | RAT | GAT | GTG | NAG | KCC | |
| MM17/98 (sense) | 5´ | | | | V | K | H | |
| | | AYC | TBC | TSG | TNA | AGC | ACA | |

- Vektorprimer für pBluescript SK(+/-)

Vektorprimer 1: 5´ CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG

Vektorprimer 2: 5´ GTT GTA AAA CGA CGG CCA GT

- Überexpression von *dIpar12.8a* in *E. coli*

MM11/99 (sense) 5´ GGT ACC ATG TCA TCG GAG AAG GTT

MM02/99 (antisense) 5´ AAG CTT CTA TCC TGT TCT CTT GAT GAT GTG

- Sequenzierprimer (Cy5-Fluoreszenz markiert)

| | |
|-----------------------|-------------------------------|
| pQE-Primer Typ III/IV | 5` GAATTCATTAAAGAGGAGAAA 3` |
| pQE-Reverser Primer | 5` CATTACTGGATCTATCAACAGG 3` |
| T7-Promotor-Primer | 5` TAATACGACTCACTATAGGGAGA 3` |
| T7-Terminator-Primer | 5` GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3` |

1.5. Pflanzenmaterial

Für die Reinigung der Parvulin-homologen Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase *DLP*ar12.8 wurden Proembryogene Massen (PEM's) des Stammes VIII von *Digitalis lanata* EHRH. verwendet (Thomar et al., 1998). Der Stamm VIII wurde aus späten Embryonalstadien angelegt, die durch somatische Embryogenese aus einer Suspensionskultur des embryogenen Stammes VII (Tewes et al., 1982) gewonnen wurden.

1.5.1. Kultivierung der Suspensionszellen von *D. lanata*

Die undifferenzierten, somatischen Zellen wurden in modifizierten Nährmedien nach *Murashige* und *Skoog* (1962) kultiviert. Die Nährmedien wurden mit KOH (1 mol/l) bzw. HCl (1 mol/l) vor dem Autoklavieren auf den pH-Wert 6.0 eingestellt. Die Suspensionszellkultur des Stammes VIII wurde in 500 ml Standrundkolben in 125 ml Nährmedium I (Nm I) im Dämmerlicht (0.5 W/m²) auf Rundschüttlern (KS 501 D, IKA, 130 U/min 23 °C) kultiviert. Die Passage der Kulturen erfolgte wöchentlich durch Übertragung von 25 ml Zellsuspension in 125 ml frisches Nm I. Die Zellen wurden geerntet, indem das Nährmedium über einen Filter abgesaugt und die Zellen mit flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Bis zur Weiterverwendung erfolgte die Lagerung der Zellen bei -20 °C.

2. Proteinchemische Methoden

2.1. Enzymassay der Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase (PPIase)

2.1.1. Grundlagen des Protease-gekoppelten PPIase-Assays

Die Enzym-Aktivität der PPIasen wurde mit Hilfe eines Protease-gekoppelten Tests nach *Fischer et al.* (1984) bestimmt. Zur Verwendung kamen dabei je nach verwendetem Substrat die Proteasen Trypsin und Chymotrypsin. Diese spalten bevorzugt Peptide und Proteine carboxy-seitig der basischen Aminosäure-Reste L-Lysin und L-Arginin bzw. spezifisch an der Carboxy-Gruppe hydrophober Aminosäuren, wobei das trans-Konformer in Bezug auf die Pro-Xaa-Bindung (Xaa: eine beliebige Aminosäure) bevorzugt ist. Dadurch erfolgt die Abspaltung des 4-Nitroanilins bei dem in *trans*-Konformation vorliegenden Anteils des Substratpeptids. Durch Verwendung eines großen Überschusses an Protease wird der größte Teil des Substrates innerhalb der ersten 10 sec. gespalten (burst-Phase). Die *cis/trans* Isomersisierung des restlichen Substratpeptids erfolgt in einer langsameren Reaktion, die letztlich den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des gekoppelten Testes darstellt. Sie folgt einer Reaktion erster Ordnung unter der folgende Bedingung gilt: $[S_0] \ll K_M$. Die Freisetzung des 4-Nitroanilins (NH-Np) wird bei 390 nm gemessen.

$$V = k_{obs} * [Substrat] \quad (1)$$

Bei Anwesenheit von PPIasen im Reaktionsansatz erfolgte eine schnellere *cis/trans*-Isomerisierung. Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante k_{obs} setzt sich damit additiv aus den Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung von unkatalysierter Isomerisierung k_{unkat} und enzymatisch katalysierter Reaktion k_{kat} zusammen.

$$k_{obs} = k_{unkat} + k_{kat} \quad (2)$$

2.1.2. Protease-gekoppelter PPIase-Assay am MR 7000

Für die chromatographische Aufreinigung von *DLP*12.8 aus dem Enzymrohextrakt wurde ausschließlich der Mikrotiterplattenreader MR 7000 (Dynatech) verwendet. Dabei kam als Standardsubstrat das Oligopeptid Ac-Ala-Ala-Ser(OPO₃H₂)-Pro-Arg-NH-Np zur Anwendung. Es ist charakterisiert durch eine Phosphorylierung der Seitenkette des Serins. Als

konformerspezifische Protease für das Substrat Ac-Ala-Ala-Ser(OPO₃H₂)-Pro-Arg-NH-Np kam Trypsin (0.25 mg/ml, Boehringer Mannheim) zur Anwendung. Bei Verwendung des Substrates Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-NH-Np für verschiedene Kontrollbestimmungen diente α -Chymotrypsin (1 mg/ml, Merck) als Hilfsprotease. Grundsätzlich wird durch das verwendete Substrat bestimmt, welche Hilfsprotease zu verwenden ist.

Messansatz für PPlase-Assay am MR 7000

| | |
|------------|---|
| 30 μ l | PPlase (z. B. DLPar12.8) |
| 40 μ l | Substrat (0.25 mg/ml) |
| 80 μ l | Hilfsprotease (Trypsin, α -Chymotrypsin) gelöst in 35 mM HEPES pH 7.8 |

Proben und Substrat wurden in eine bei 4°C vorgekühlte Titerplatte (96 Kavitäten, Bibby Sterilin Ltd.) pipettiert und die Reaktion durch Zugabe der Protease (80 μ l) gestartet. Gemischt wurde berührungsfrei durch einen in die Kavität geblasenen diskontinuierlichen Luftstrom. Die Reaktion wurde über einen Zeitraum von 70 Meßwerten im Abstand von 10 s bei 390 nm verfolgt. Die Auswertung erfolgte mit einem von *Dr. G. Küllertz* (M.-Planck-Arbeitsgruppe "Enzymologie der Peptidfaltung" Halle/Saale) entwickelten Programm (Küllertz et al. (1998)).

Zur Vereinfachung der Enzymreinigung wurde der Beschleunigungsfaktor *K* eingeführt. Er zeigt das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten der katalysierten und unkatalysierten *cis/trans*-Isomerisierung bezogen auf das Volumen an und ist wie folgt definiert:

$$K = \frac{k_{obs} - k_{unkat}}{k_{unkat}} = \frac{k_{obs}}{k_{unkat}} - 1 \quad (3)$$

Bei zu hohen Isomerasekonzentrationen, die die *cis/trans* Isomerisierung komplett in der Totzeit der Messung ablaufen lassen würden, wurden die Proben mit HEPES-Puffer (35 mM, pH 7.8) entsprechend verdünnt.

2.1.3. Protease-gekoppelter PPlase-Assay am HP 8452A UV/VIS-Diodenarray-Spektrophotometer

Der Protease-gekoppelte Test am HP 8452A UV/VIS-Diodenarray-Spektrophotometer wurde bei einer Temperatur von 10°C in 35 mM HEPES (pH 7.8), 1 mM DTT 1 μ M BSA

durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Hilfsprotease gestartet. Peptidsubstrate wurden in DMSO (20 mg/ml) gelöst. Die Messung der PPlase-Aktivität erfolgte bei 390 nm für 240 sec. Zur Berechnung der PPlase-Aktivität wurde die Differenz der Werte von Meß- und Referenzwellenlänge (510 nm) genutzt. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden mit einem von *Dr. S. Panzner* (Martin-Luther-Universität/Halle-Wittenberg) entwickelten Programm ermittelt.

2.2. Bestimmung der Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M

Die Geschwindigkeit enzymkatalysierter Reaktionen V_{enz} läßt sich nach der Michaelis-Menten-Gleichung berechnen. Unter der Bedingung $[S_0] \ll K_M$ kann die Gleichung

$$V_{enz} = \frac{k_{kat} * E_0 * S_0}{S_0 + K_M} \quad (4)$$

zu folgender Gleichung vereinfacht werden:

$$k_{enz} = \frac{k_{kat}}{K_M} * E_0 \quad (5)$$

Die Berechnung der Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M erfolgte ausschließlich mit den am HP 8452A UV/VIS-Diodenarray-Spektrophotometer bestimmten Werten von k_{enz} bei definierter Konzentration von *rDLPar12.8a*. Die Substrate, die entsprechenden Hilfsproteasen sowie die verschiedenen Enzymkonzentrationen, die verwendet wurden, sind in Tabelle 1 dargestellt.

| Substrat | Hilfsprotease | Konzentration von <i>rDLPar12.8a</i> in μM |
|----------------|---------------|---|
| AcApSPY-NH-Np | Chymotrypsin | $1.93 * 10^{-4}$ |
| AcASPY-NH-Np | Chymotrypsin | 3.6 |
| AApSPF-NH-Np | Chymotrypsin | $1.93 * 10^{-4}$ |
| AASPF-NH-Np | Chymotrypsin | 3.6 |
| SucAEPF-NH-Np | Chymotrypsin | $3.35 * 10^{-3}$ |
| SucAFPF-NH-Np | Chymotrypsin | 3,88 |
| AcAApSPR-NH-Np | Trypsin | $3.35 * 10^{-2}$ |
| WYpSPR-NH-Np | Trypsin | $4.18 * 10^{-2}$ |

Tab. B-1: Übersicht über die, für die Bestimmung der Substratspezifität verwendeten

Substrate, die zugehörige Hilfsprotease und die entsprechende Konzentration von rDLPar12.8a.

2.3. Hemmung der PPlase-Aktivität

Die Hemmung der PPlase-Aktivität von rDLPar12.8a durch den Parvulin-spezifischen, irreversiblen Inhibitor Juglon (5-Hydroxy-1,4-naphthochinon) wurde ebenfalls bei 10°C am HP 8452A UV/VIS-Diodenarray-Spektrophotometer mittels des Protease-gekoppelten PPlase-Assay gemessen. Als Substrat wurde Suc-Ala-Glu-Pro-Phe-NH-Np verwendet. Auf DTT-Zusatz im verwendeten Puffer mußte bei der Inhibierung verzichtet werden. Juglon wurde dabei im 10-fachen molaren Überschuß eingesetzt. Die Inhibierung wurde verfolgt, bis keine PPlase-Aktivität mehr detektierbar war. Messwerte wurden etwa alle 8 bis 9 min aufgenommen. Es erfolgten Doppelbestimmungen. Unter den gleichen Bedingungen wurde auch der Einfluß von Plumbagin (2-Methyl-5-Hydroxy-1,4-naphthochinon) auf rDLPar12.8a untersucht.

2.4. Homogenisation des verwendeten Zellmaterials

Jeweils 30 g bei -20°C gelagerte PEM's wurden für 10 min mit folgendem Puffer versetzt:

Aufarbeitungspuffer:

| | |
|---------------|-------|
| MES (pH 6.75) | 2 mM |
| EDTA | 1 mM |
| DTT | 1 mM |
| Triton X-100 | 0.3 % |

Die Aufschließung der Zellen erfolgte mit einem Potter als Homogenisator (Glass Col) bei 1000 U/min für jeweils 2 min (*Provost et al.*, 1996). Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, wobei auf eine ausreichende Kühlung (4 °C) der Suspension geachtet wurde. Die Suspension wurde anschließend für 45 min mit 25000 x g bei 4°C zentrifugiert (L8 60 M, Beckman) und der Überstand über Nacht gegen 2 mM MES, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 8.0, dialysiert (Spectra/Por[®], MCWO 3500, Serva). Die Leitfähigkeit wurde nach der Dialyse auf etwa 300 µS/cm und einen pH-Wert von 8.0 eingestellt.

2.5. Proteinbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Proteingemischen wurde spektrophotometrisch nach *Bradford* et al. (1976) durchgeführt. Vermessen wurden die Proben bei 590 nm an einem Mikrotiterplattenreader MR 7000 (Dynatech). Die Auswertung erfolgte mit einem von *Dr. G. Küllertz* (M.-Planck-Arbeitsgruppe "Enzymologie der Peptidfaltung" Halle/Saale) entwickelten Computerprogramm. Als Standard für die Berechnung einer Eichgeraden diente Rinderserumalbumin (BSA) im Bereich von 10-2500 µg/ml.

Bei gereinigten Proteinen erfolgte die Aufnahme eines Spektrums der Lösung (210-400 nm) an einem HP 8452A UV/VIS-Diodenarray-Spektrophotometers gegen den Leerwert des Lösungsmittels.

Die Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ bei 280 nm des zu vermessenden Proteins erfolgte nach *Gill* und *von Hippel* (1989). Dieser wurde aus der Anzahl der enthaltenen Tryptophan-, Tyrosin- und Phenylalaninreste und deren Einzelextinktionskoeffizienten mit Hilfe des Programms *Protparam* bestimmt (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>).

2.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

2.6.1. Allgemeines

Zur Analyse der Proteine wurde routinemäßig eine vertikale diskontinuierliche SDS-PAGE nach *Laemmli* (1970) bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA durchgeführt. Es wurden 17.5 % bzw. 20 % Trenngel (pH 8.8) und ein 5 % Sammelgel (pH 6.8) verwendet. Die Minikammer "PHERO-minivert" (Biotech-Fischer) diente dabei als Standardapparatur. Die Proben wurden in Probenpuffer (50 % (v/v) Glycerol, 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 2 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) Bromphenolblau (1% ethanolische Lösung), 125 mM Tris-HCl pH 6.8) aufgenommen und 5 min bei 95°C inkubiert. Als Molekulargewichtsmarker wurde eine Mischung aus folgenden Proteinen (Serva) verwendet: Trypsin-Inhibitor (Rinderlunge, 6.5 kDa), Cytochrom C (12.5 kDa), Trypsin-Inhibitor (Sojabohnen, 21.0 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Ei-Albumin (45.0 kDa), BSA (67.0 kDa) und Phosphorylase B (92.5 kDa).

2.6.2. Silberfärbung der SDS-PAGE-Gele

Zur Färbung der Gele mit Silbernitrat wurde die Methode von *Heukeshoven* und *Dernick* (1985) angewendet. Die Gele wurden nach 1-stündiger Fixierung (Methanol 50 % (v/v), Essigsäure 12 % (v/v), Formaldehyd 0.02 % (v/v)) dreimal 20 min mit 50 % Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgte die einminütige Vorbehandlung mit einer 0.02 % (w/v) Natriumthiosulfatlösung. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser (jeweils 20 sec) wurde das Gel 20 min mit folgender Lösung imprägniert (0.2 % (w/v) Silbernitrat, 0.025 % (v/v) Formaldehyd). Die Gelentwicklung erfolgte nach dreimaligem Waschen mit Wasser (20 sec), mit 6 % (w/v) Natriumcarbonat, 0.5 % (w/v) Natriumthiosulfat, 0.02 % (v/v) Formaldehyd. Nach dem Sichtbarwerden der Proteinbanden wurde das Gel erneut mit Wasser gespült und die Entwicklung mit folgender Lösung abgestoppt (50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Essigsäure). Zur Aufbewahrung wurden die Gele 20 min in Trocknungslösung (Methanol 40 % (v/v), Essigsäure 10 % (v/v), Glycerol 6 % (v/v)) inkubiert und anschließend zwischen Cellophan (Biometra) gespannt und getrocknet.

2.6.3. Coomassie-Färbung der SDS-PAGE-Gele

War die aufgetragene Proteinmenge ausreichend groß, wurden Proteinbanden durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht. Dazu wurden die Gele in Coomassie-Färbelösung (Ethanol 42.5 % (v/v), Essigsäure 10 % (v/v), Methanol 5 % (v/v), Coomassie-Brillantblau R-250 2 % (w/v), Coomassie-Brillantblau G-250 0.5 % (w/v)) über Nacht gefärbt und anschließend mit Entfärber (Methanol 45 % (v/v), Essigsäure 10 % (v/v)) sichtbar gemacht. Die Aufbewahrung der Gele erfolgte entsprechend den Angaben unter B 2.6.2..

2.7. Western Blot-Analyse

Der Transfer der Proteine erfolgte nach der Methode des *semi dry electroblotting* (*Kyse-Andersen*, 1984, *Towbin* et al., 1979). Dazu erfolgte die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE. Anschließend wurde das Gel 40 min bei einer Stromstärke von 196 mA auf Nitrocellulosemembranen (NC 45, Serva) unter Verwendung eines Transferpuffers (25 mM Tris, 150 mM Glycin, 10 % Methanol, pH 8.3) geblottet (FastBlot-Apparatur, Biometra). Um den Erfolg des Proteintransfers überprüfen zu können, wurde ein vorgefärbter Molekulargewichtsmarker (BenchmarkTM Prestained Protein Ladder, GibcoBRL) verwendet. Die geblottete Membran wurde 2 h in Blocklösung (TBT-Puffer, pH 7.5, 3 % Milchpulver)

bewegt und anschließend über Nacht mit dem entsprechenden Antikörper (anti-rDLPar12.8a-AK aus Kaninchen, Titer 1:1000, pab-productions) und 0.02 % Natriumazid (Serva) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 5 min wurde die Membran wiederum mit Blocklösung versetzt. Nach 20 min wurde der sekundäre Antikörper (Anti-Kaninchen IgG aus Ziege, Konjugat mit Meerrettich-Peroxidase, Titer 1:1000, Sigma) zugegeben und für eine Stunde mit dem Blot inkubiert. Nach dreimaligem 5 min Waschen wurde der Blot mit ECL-Lösung (Amersham) versetzt und über Chemilumineszenz detektiert. Die Filme (Xomat, NEN) wurden dazu über unterschiedliche Zeiten dem Blot ausgesetzt.

Gewebespezifische Proteinproben aus der Gesamtpflanze von *D. lanata* wurden aus einer zweijährigen, bei -80°C gelagerten Pflanze gewonnen. Die verschiedenen, tiefgefrorenen Pflanzenteile wurden zusammen mit flüssigem Stickstoff gemörsert bis ein feines Pulver entstanden war. Dieses wurde mit Aufarbeitungspuffer (B 2.4.) versetzt und 2 min bei 1000 U/min und 4°C mittels Potter homogenisiert. Die Proben wurden abzentrifugiert, vom Überstand eine Proteinbestimmung nach *Bradford* durchgeführt und anschließend die Proteine mittels SDS-PAGE getrennt.

2.8. Konzentrierung von Proteinproben

Proteinproben wurden durch zwei verschiedene Methoden aufkonzentriert. Zum einen wurde eine Vakuumkonzentrationszentrifuge Univapo 100H verwendet, bei der jedoch mit der Proteinkonzentrierung auch eine Konzentrierung der Puffer und Salze stattfand. Die andere Möglichkeit bestand in der Verwendung eines Nanosep Mikrokonzentratoren mit einer Ausschlussgröße von 3000 Da (Pall, USA), bei der theoretisch alle Teilchen über 3000 Da zurückgehalten werden. Nachteil dieser Methode war jedoch Proteinverlust und eine langsamere Geschwindigkeit der Konzentrierung.

2.9. Chromatographische Reinigung der Isomerase

2.9.1. Allgemeines

Zur chromatographischen Reinigung diente eine FPLC-Anlage, bestehend aus den folgenden Komponenten:

Schlauchpumpe P-1

UV-Meßzelle Uvicord SII

Schreiber REC 102
Fraktionssammler Redifrac

Für die Größenausschlußchromatographie wurde der ÄKTA-Explorer 100 (Pharmacia) verwendet. Die RP-HPLC wurde an einer Anlage der Firma Shimadzu (LC-10A, Kyoto, Japan) durchgeführt. Die Detektion der Proteine erfolgte grundsätzlich bei 280 nm, lediglich bei der RP-HPLC wurde bei 215 nm detektiert.

Alle Substanzen hatten den Reinheitsgrad pro analysi (p.A.). Für die RP-HPLC und FPLC wurden nur Lösungsmittel in Gradient Grade Qualität (Roth) verwendet. Die für die FPLC genutzten Puffer wurden grundsätzlich filtriert (1.2 µm Porengröße, Sartorius) und entgast.

2.9.2. Anionenaustausch-Chromatographie

Für die Anionenaustausch-Chromatographie wurde als Säulenmaterial der starke Anionentauscher Fractogel EMD-DEAE (Merck) eingesetzt. Der Enzymrohextrakt wurde wie unter B 2.4. beschrieben aufgearbeitet. Die Chromatographiesäule (250 x 20 mm, Pharmacia) wurde mit folgendem Puffer equilibriert: (2 mM MES, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 8.0). Das Homogenat wurde auf die Säule mit einer Flußrate von 1.5 ml/min aufgetragen und mit Equilibrierungspuffer gespült, bis alle ungebundenen Proteine von der Säule gewaschen waren. Dabei wurden Fraktionen zu je 10 ml gesammelt. Anschließend wurden PPlase-Aktivität mit den beiden Substraten Ac-Ala-Ala-Ser(OPO₃H₂)-Pro-Arg-NH-Np und Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-NH-Np sowie der Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen bestimmt. Die Proben, welche das höchste Verhältnis (höchste spezifische Aktivität) aus Beschleunigung K (vgl. B 2.1.3.) des Substrates und Proteingehalt sowie eine geringe PPlase-Aktivität für das Substrat Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-NH-Np aufwiesen, wurden vereinigt und für den nächsten Reinigungsschritt verwendet.

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{K}{\text{Proteinmenge}} \quad [\text{K/mg Protein}] \quad (6)$$

Die Säule wurde mit 1 M NaCl regeneriert. Im Eluat war mit dem Substrat Ac-Ala-Ala-Ser(OPO₃H₂)-Pro-Arg-NH-Np keine PPlase-Aktivität meßbar.

2.9.3. Affinitätschromatographie

Für die Affinitätschromatographie wurde eine Fractogel AF-Blue (80 x 15 mm, Merck) verwendet.

Die Säule wurde mit folgendem Puffer equilibriert: (2 mM MES, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 8.0). Die vereinigten Fraktionen des vorigen Reinigungsschrittes (ca. 60 ml, pH ca. 7.5, < 800 $\mu\text{S}/\text{cm}$) wurden mit einer Flußrate von 1.0 ml/min auf die Säule aufgetragen. Gebundene Proteine wurden mit einem gepufferten Gradient von 0 - 3 M NaCl in 50 ml eluiert und in 2 ml Fraktionen aufgefangen. Es wurden PPlase-Aktivität mit den beiden Substraten Ac-Ala-Ala-Ser(OPO₃H₂)-Pro-Arg-NH-Np und Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-NH-Np sowie der Proteingehalt bestimmt. Die aktivsten Proben wurden für die weitere Reinigung verwendet.

2.9.4. Umkehrphasen-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (RP-HPLC)

Als Trennmaterial für die RP-HPLC diente eine Nuc 300-5 C18 RP-HPLC-Säule (125 x 3 mm, Macherey-Nagel). Detektiert wurden die Proben mit einem Photodiodenarray Detektor. Das Puffersystem bestand aus membranfiltriertem, bidestiliertem Wasser (Puffer A) und Acetonitril (Puffer B), jeweils mit 0.1 % TFA versetzt. Die Flußrate betrug 0.5 ml/min, das aufgetragene Volumen 1 ml. Folgendes Programm kam zur Anwendung:

| Zeit in min. | Acetonitril in % mit 0.1 % TFA |
|--------------|--------------------------------|
| 0.0 | 2 |
| 1.9 | 2 |
| 2.0 | 30 |
| 40.0 | 50 |

Sämtliche Peaks wurden gesammelt und mit Ac-Ala-Ala-Ser(OPO₃H₂)-Pro-Arg-NH-Np auf PPlase-Aktivität untersucht. Die Probe, bei der Aktivität detektierbar war, wurde für weitere Untersuchungen verwendet.

2.9.5. Größenausschlußchromatographie zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes

Zur Bestimmung des ungefähren, nativen Molekulargewichtes kam eine Superdex 75 Säule (300 x 10 mm, Pharmacia) für den ÄKTA-Explorer 100 (Pharmacia) zur Anwendung, die mit

10 mM HEPES, 150 mM KCL, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7.8 equilibriert und mit verschiedenen Markerproteinen geeicht wurde.

Da nach der Affinitätschromatographie ein relativ großes Probenvolumen mit geringer Proteinmenge und relativ geringer PPlase-Aktivität anfiel, war eine Konzentrierung der Probe auf 1 bis 2 ml nötig, um nach der Gelfiltration auch PPlase-Aktivität nachweisen zu können. Hierbei wurde, wie unter Punkt B 2.8. beschrieben, verfahren. Ein Aliquot der so aufkonzentrierten Probe (50 µl) wurde auf die Superdex 75 Säule aufgetragen und mit einer Flußrate von 0.04 ml/min aufgetrennt. Das Fraktionsvolumen betrug 35 µl. Die Fraktionen wurden mit Ac-Ala-Ala-Ser(OPO₃H₂)-Pro-Arg-NH-Np als Substrat auf PPlase-Aktivität vermessen. Aus der bestimmten Elutionszeit wurde unter Anwendung einer Eichgeraden für die Superdex 75 Säule das ungefähre Molekulargewicht bestimmt.

2.9.6. Reinigung des rekombinanten Proteins *rDLPar12.8a*

Ein durch Plasmid-DNA-Sequenzierung, SDS-PAGE und PPlase-Assay für positiv befundener Klon wurde in einer 1 Liter LB-Kultur, welche 50 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin enthielt, mit 10 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C und 250 U/min bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur mit 1 mM IPTG für weitere 8 h inkubiert. Die Zellen wurden bei 4200 x g durch 20 minütige Zentrifugation (J6-MC, Beckman) bei 4°C geerntet, gewaschen und in 20 ml PBS-Puffer (0.15 M NaCl, 0.01 M H₃PO₄, pH 7.4) suspendiert. Um Proteolyse vorzubeugen, wurde der gekühlten Suspension 1 Tablette eines Proteaseinhibitormixes (completeTM, Boehringer Mannheim) zugesetzt. Diese Suspension wurde zweimal mittels einer French Press (SLM Aminco) bei einem Druck von 20000 psi schonend aufgeschlossen. Die nicht löslichen Zellbestandteile wurde durch Zentrifugation (15000 x g, 20 min, 4 °C) entfernt.

Der Überstand wurde auf eine Ni²⁺ NTA-Agarose-Säule (100 x 10 mm, Qiagen) aufgetragen und mit einem Gradient von 0 -500 mM Imidazol in 5 Säulenvolumen eluiert. Die eluierten Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und den PPlase-Assay analysiert.

Ein Aliquot der *rDLPar12.8a* enthaltenden Fraktionen wurde mittels RP-HPLC zur Homogenität gereinigt, wobei eine C3-Säule (125 mm x 4 mm, Macherey-Nagel) zur Anwendung kam.

Die erhaltene Fraktion wurde nochmals mittels SDS-PAGE und MALDI-TOF-MS auf Identität und Reinheit geprüft.

2.10. Bestimmung des Molekulargewichtes durch MALDI-TOF-MS

Die Bestimmung des Molekulargewichtes erfolgte durch MALDI-TOF Massenspektroskopie und wurde freundlicherweise von *Dr. A. Schierhorn* und *Marc Kipping* (M.-Planck-Arbeitsgruppe "Enzymologie der Peptidfaltung" Halle/Saale) durchgeführt.

2.11. Lys-C Spaltung der Isomerase und Sequenzierung durch *Edman-Abbau*

Eine direkte Sequenzierung der gereinigten Isomerase war nicht möglich, da eine N-terminale Blockierung vorlag. Deshalb wurde *DLP*12.8 (30 pmol) in 25 mM Tris, pH 8.5 gelöst und mit 0.1 mg Endoprotease Lys-C (Boehringer Mannheim) verdaut. Mittels MALDI-TOF-MS wurde das Molekulargewicht der erhaltenen Spaltstücke bestimmt. Die erhaltenen Fragmente wurde durch RP-HPLC auf einer C3-Säule (125 x 2 mm, Macherey-Nagel) aufgetrennt. Ein Fragment konnte durch *Edman-Abbau* sequenziert werden, wobei ein Applied Biosystems Sequencer 476A (Foster City, USA) nach der Vorschrift des Herstellers zur Anwendung kam. Lys-C-Spaltung und Sequenzierung wurden freundlicherweise von *Dr. K. P. Rücknagel* (M.-Planck-Arbeitsgruppe "Enzymologie der Peptidfaltung" Halle/Saale) durchgeführt.

2.12. Auswertung von Proteinsequenzen

Proteinsequenzen wurden durch Nutzung von Online-Angeboten verschiedener Datenbank-Institute innerhalb des World Wide Web (WWW) ausgewertet. Dafür wurden sie mit Einträgen von Protein- und DNA-Datenbanken verglichen. Genutzt wurden die Programme *BLASTp* 2.0.10 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast>; *Altschul* et al., 1990, 1997) und *FASTA* 3.2 (<http://www2.ebi.ac.uk/fasta3>; *Pearson* und *Lipman*, 1998), die auf Einträge der SWISS-Prot Datenbank (Proteinsequenzen) sowie auf in Proteinsequenzen übersetzte DNA-Datenbankeinträge zugreifen.

Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm *ClustalW* (Thompson et al., 1994; <http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>) durchgeführt. Die Bestimmung des theoretischen isoelektrischen Punktes, des theoretischen Molekulargewichtes und des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ erfolgte mit dem Programm *Protparam* (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>).

2.13. Gewinnung von polyklonalen Antikörpern gegen rDLPar12.8a

450 µg zur Homogenität gereinigtes rDLPar12.8a wurden zur Gewinnung von polyklonalen Antikörpern aus Kaninchen an die Firma pab productions (Martinsried) geschickt. Die verschiedenen Abnahmen der Antiseren wurden im Westernblot (B 2.7.) auf ihre Spezifität getestet.

3. Molekularbiologische Methoden

3.1. Polymerasekettenreaktion

3.1.1. Allgemeines zur Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde in der Regel im 50 µl-Maßstab mit dem Mastercycler 5330 (mit beheizbarem Deckel 5330 plus, Eppendorf) durchgeführt. Als DNA-Polymerase wurden je PCR-Ansatz 1 µl Taq-Polymerase (2.5 U/µl, Peqlab) eingesetzt. Die abgeleiteten sense und antisense Primer (Pharmacia) wurden mit Wasser auf eine Konzentration von 20 µM eingestellt. Folgender Standard-PCR-Ansatz (Endkonzentration) wurde verwendet:

| | |
|---|-------------|
| Primer | 50 µM |
| PCR-Puffer 10 x (ohne MgCl ₂) | 5 µl |
| dNTP's | 100 µM (je) |
| MgCl ₂ | 2 mM |
| Matrix (cDNA, Plasmid) | 1 µl |
| Aqua bidest. | 36 µl |

Folgende PCR-Bedingungen wurden gewählt:

- Denaturierung: 5 min bei 95°C
- Anzahl der Zyklen: 35
- Denaturierung: 1 min bei 95°C
- Primer-Anlagerung: 1 min bei entsprechender Temperatur
- Kettenverlängerung: 1 min bei 72 °C
- abschließende Kettenverlängerung: 10 min bei 72°C

3.1.2. Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Als Matrix wurde aus PEM's isolierte RNA verwendet, die mit dem Superscript Preamplification System Kit (GibcoBRL) in cDNA umgeschrieben wurde. Die PCR wurde durchgeführt, wie es unter Punkt B 4.1.1. beschrieben ist. Als Primeranlagerungstemperatur wurden 54°C gewählt.

3.1.3. PCR als Methode für Selektion und Kontrolle

Zum Nachweis rekombinanter Klone oder positiver Phagenpools beim Durchsuchen einer cDNA-Bank wurde ebenfalls die Methode der PCR verwendet.

Bei Bakterien wurde hierzu die DNA einschließlich der Plasmide durch einmalige Hitzedenaturierung für die PCR zugänglich gemacht (10 min bei 95 °C).

Bei Phagen wurde nach jeder Runde des Screenings aus jedem Phagenpool ein Aliquot (50 µl) abgenommen und 1 min in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde die Probe 2 min durch Hitze (95 °C) denaturiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt.

Die PCR erfolgte wie unter B 3.1.1. angegeben. Es wurden die Primer MM 14/98 und MM 15/98 verwendet. Jedoch wurde anstelle der cDNA jeweils eine der oben erwähnten Matrices benutzt. Die Primeranlagerungstemperatur betrug 55 °C.

3.1.4. Einführung von Restriktionsschnittstellen mittels PCR

An die codierende Sequenz von *dIpar12.8a* wurden jeweils am 5'- und 3' Ende mittels PCR Restriktionsschnittstellen generiert, sodaß die kodierende Sequenz *dIpar12.8a* im richtigen Leserahmen in den pQE 30 Expressionsvektor (Qiagen) einkloniert werden konnte. Als Matrix diente der aus einer cDNA-Bank isolierte vollständige cDNA-Klon.

3.2. Elektrophoretische Trennung von DNA

PCR-Produkte oder Plasmid-DNA wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Verwendet wurden je nach zu erwartender Fragmentgröße 1.0 - 2.0 % Agarosegele. Die Agarose (Serva) wurde mit Ethidiumbromid (0.5 µg/ml Gel) versetzt, um eine Detektion der

DNA-Fragmente unter UV-Licht zu ermöglichen.

Die aufzutrennende Probe wurden mit 2 µl Stopplösung (200 mM EDTA, 0.2% Bromphenolblau, 50% Glycerol) gemischt und in die Geltaschen gegeben. Als DNA-Standard wurde ein 100 Basenpaar-Leiter (Pharmacia) verwendet. Der Elektrophoreselauf erfolgte konstant bei 60 V ca. 1 h. Die Detektion der DNA erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm) am Transilluminator TC-312 A/F (Spectronics). Zur Dokumentation wurde ein Bild des mit UV-Licht bestrahlten Gels angefertigt.

3.3. Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung erfolgte durch Extraktion von DNA aus Agarosegelen nach erfolgter elektrophoretischer Trennung. Dazu wurde die gewünschte Bande unter UV-Licht aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten (ca. 100 mg Gel). Die DNA wurde mit Hilfe des QIAEX II-Kits (Qiagen) nach der Vorschrift des Herstellers aus dem Gel extrahiert. Die eluierte DNA wurde in 20 µl TE-Puffer aufgenommen und für weitere Untersuchungen (Ligation mit anderen Vektoren, Herstellen von Hybridisierungssonden) verwendet.

3.4. Herstellen kompetenter Zellen

SG13009 [pREP4] Zellen wurden nach einer Vorschrift der Firma Qiagen kompetent gemacht (The QIAexpressionist™, 1998). Die Zellen wurden aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.5. Isolierung von Plasmid-DNA (Midi-Präparation)

Von einem rekombinanten Klon wurde eine 50 ml LB-Kultur mit 50 µg/ml Ampicillin angeimpft und über Nacht bei 37°C und 150 U/min inkubiert. Die Isolierung der DNA erfolgte mit Hilfe des Plasmid Midi Kits (Qiagen) nach Vorschrift des Herstellers. Die über eine Säule gereinigte und ausgefällte DNA wurde in einer Speed Vac (Savant) getrocknet und in 60 µl TE-Puffer aufgenommen. Die DNA wurde vermessen und sequenziert.

3.6. Spektrophotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte durch Absorption (Gene Quant II, Pharmacia) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer Konzentration an doppelsträngiger DNA von 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Für die Bestimmung der Konzentration wurden 5 μl der isolierten DNA mit Wasser auf 1 ml verdünnt, gemischt und anschließend gegen Wasser als Leerwert vermessen.

3.7. Enzymatische Modifikation von DNA

3.7.1. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Die Spaltung von Plasmid-DNA wurde sowohl zur Identifizierung rekombinanter Klone herangezogen, als auch zur Isolierung von DNA-Sonden verwendet.

Dem jeweiligen Verwendungszweck entsprechend wurden 0.5 - 2 μg cDNA mit 0.5 - 2 U des Restriktionsenzym für 1 - 3 h bei 37°C inkubiert (*Sambrook et al.*, 1989). Der Ansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine Analyse der Fragmentgrößen und bei Bedarf eine Eluierung der Fragmente aus dem Gel mittels QIAEX II (Qiagen).

Restriktionsansatz 1 h bei 37 °C

| | |
|---------------------------|-------------------|
| Eco RI 5 U/ μl | 1.0 μl |
| Puffer 10 x | 1.5 μl |
| DNA | 5.0 μl |
| H ₂ O (bidest) | 7.5 μl |

3.7.2. Klonierung von PCR-Fragmenten mit Hilfe des TOPO T/A-Cloning Kit

Durch PCR erhaltene Produkte wurden, wie unter B 3.3. beschrieben, aufgereinigt. Für eine weitere Vervielfachung der DNA wurde diese entsprechend den Anweisung des Herstellers mit dem TOPO-Vektor ligiert und anschließend in kompetente One Shot *E.coli* Zellen transformiert.

Verwendet wurde dazu der TOPO-T/A-Kloning Kit (Invitrogen). Zu 1 μl pCR 2.1 TOPO-Vektor wurden 2 μl des gereinigtes PCR-Produkts sowie 2 μl Wasser gegeben. Die Ligation erfolgte 5 min bei Raumtemperatur.

3.7.3. Ligation von DNA

Zum Einfügen eines DNA-Fragments in einen zuvor mit Restriktionsenzymen gespaltenen Vektor wurden 50-200 ng mit QIAEX II gereinigtes Plasmid und etwa der 5-fache molare Überschuß des entsprechenden Fragments in 1 x Ligationspuffer mit 4 U T4-Ligase (Boehringer Mannheim) gemischt und über Nacht bei 15°C inkubiert. Ein Aliquot des Ligationsansatzes wurde dann zur Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen verwendet.

3.8. Selektion rekombinanter Klone

Die Selektion von rekombinanten Klonen erfolgte grundsätzlich durch das dem Vektor entsprechende selektive Medium. Beim pCR 2.1 TOPO-Vektor wurde zusätzlich noch eine α -Kompletion (*Sambrook et al., 1989*) als Selektionskontrolle verwendet. Klone wurden mit 3 ml selektivem LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 150 U/min kultiviert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach einer modifizierten Methode der alkalische Lyse (*Sambrook et al., 1989*). Durch anschließende Restriktionsanalyse bzw. PCR wurden rekombinante Klone identifiziert.

Die Selektion rekombinanter Klone mittels PCR war die Methode der Wahl und wurde bereits unter Punkt B 3.1.3. beschrieben.

3.9. Sequenzierung nach *Sanger* mittels A.L.F. Sequencer (Pharmacia)

Die DNA-Sequenzierungsreaktion erfolgte nach *Sanger et al. (1977)* unter Verwendung Cy5-markierter Oligonukleotide und des ALFexpress AutoRead Sequencing Kits (Pharmacia). Die Sequenzierungsansätze wurden auf ALF Grade ReadyMix Gels (Pharmacia) aufgetragen. In einem automatischen A.L.F. Sequenzierungsgerät (ALFexpress, Pharmacia) erfolgte die Auftrennung und Detektion der einzelnen DNA-Fragmente. Die Sequenzierung wurde freundlicherweise von *Dr. A. Peterson* (Biozentrum Halle/S.) durchgeführt.

3.10. Sequenzauswertung

DNA-Sequenzen und aus der DNA abgeleitete Proteinsequenzen wurden, wie schon unter Punkt B 2.12. abgehandelt, ausgewertet. Für die Schnittstellenanalyse, die Ableitung von Proteinsequenzen und die Organisation der Sequenzen wurde das Programm OMIGA 1.2

(Oxford Molecular Ltd.) verwendet.

3.11. Screening einer Phagen-cDNA-Bibliothek aus PEM's

3.11.1. cDNA-Bank und deren Titerbestimmung

Für das Durchsuchen (Screening) wurde eine von Dr. A. Peterson (Biozentrum Halle/S., *Scholze et al.* 1999) hergestellte cDNA-Bank der embryogenen Suspensionszellkultur des Stammes VIII von *D. lanata* Ehrh. verwendet. Die Bestimmung des Titers der cDNA-Bank erfolgte nach dem Protokoll des ZAP-cDNA Synthesis Kit der Firma Stratagene.

3.11.2. Durchführung des Primärscreening

Es wurden je 50000 pfu auf 5 Petrischalen (135 mm) ausplattiert. Die Herstellung der Phagenplatten und die darauffolgende Kultivierung erfolgten ebenfalls nach dem Protokoll des ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene).

3.11.3. Blotten der Nylon-Membranen

Die Übertragung der Phagenplaques auf Nylonmembranen erfolgte durch aufeinanderfolgendes Auflegen zweier Qiabran-Nylonmembranen (Qiagen) für 1 min bzw. 3 min auf eine Phagenplatte. Die Lage der Membranen wurde durch mehrere Punkte eindeutig markiert. Die vorsichtig von der Phagenplatte abgezogenen Membranen wurden auf Filterpapier getrocknet, wobei sich die Phagenseite oben befand. Danach wurden die Membranen mit der geblocteten DNA für 5 min auf mit Denaturierungslösung (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) getränktem Filterpapier inkubiert, gefolgt von einer 5 min Inkubation mit Neutralisierungslösung (0.5 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, pH 7.4). Den Abschluss bildete die 15 minütige Inkubierung mit 20 x SSC (3 M NaCl, 0.3 M Natriumcitrat, pH 7.0). Die Phagen-DNA wurde durch UV-Licht (120 mJ) dauerhaft auf den Membranen fixiert (UV Crosslinker, Stratagene).

3.11.4. Herstellung radioaktiv markierter Hybridisierungssonden

Für das Durchsuchen (Screening) einer cDNA-Bibliothek wurde eine radioaktiv markierte Sonde genutzt. Mit dem Restriktionsenzym Eco RI (Boehringer) wurde ein Fragment aus dem pCR 2.1 TOPO-Vektor herausgeschnitten und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Bande wurde ausgeschnitten und, wie unter B 3.3. beschrieben, gereinigt. Das erhaltene DNA-Fragment wurde mit dem High Prime Labeling Kit (Boehringer-Mannheim) nach den Anweisung des Herstellers radioaktiv markiert. Als radioaktives Nukleotid wurde dATP[α - 32 P] 3000 Ci/mmol (NEN) verwendet. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Benutzung von NucTrap Probe Purification Columns (Stratagene) abgetrennt. Ein Aliquot der gereinigten Sonde wurde vermessen, um die Qualität der radioaktiven Markierung einzuschätzen. Die Markierung erfolgte immer unmittelbar vor der Zugabe der Sonde zur jeweiligen Hybridisierungslösung.

3.11.5. Hybridisierungsreaktion

Die folgenden Arbeitsschritte wurden in Anlehnung an die Methode von *Luo et al.* (1994) durchgeführt, wobei als Kontrolle des Screeningserfolges keine Southern-Blot-Analyse, sondern eine Kontroll-PCR durchgeführt wurde. Die Vorhybridisierung von 10 Nylonmembranen ($d = 132$ mm) erfolgte 4 h in 30 ml Hybridisierungslösung (6 x SSC, 10 mM EDTA, 5 x Denhardt's-Lösung, 0.5 % SDS, 100 μ g/ml Heringssperma-DNA) bei 65°C im Wasserbad. Dieser Lösung wurde die radioaktiv markierte Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65 °C. Die Membranen wurden anschließend wie folgt gewaschen:

1. zweimal 15 min bei RT in 2 x SSC, 0.1 % SDS
2. einmal 20 min bei 55 °C in 1x SSC, 0.1 % SDS
3. einmal 15 min bei 55 °C in 0.1 x SSC, 0.1 % SDS

Die feuchten Membranen wurden in Folie eingeschweißt und ihrer radioaktiven Strahlung entsprechend einem Röntgenfilm (NEN) exponiert.

3.11.6. Abnehmen der Phagen

Kleine Bereiche der Agarplatten (1-2 cm² um positive Plaques) wurden in jeweils 500 μ l SM-

Puffer (50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄ (wasserfrei), 0.1 % Gelatine, pH 7.5) gegeben und mindestens eine halbe Stunde bei RT geschüttelt. Nach Zugabe von jeweils 20 µl Chloroform waren die erhaltenen Phagen bei 4°C lagerbar und konnten für PCR-Versuche bzw. das Sekundär- oder Tertiärscreening eingesetzt werden.

3.11.7. Durchführung des Sekundärscreening

Von den im Primärscreening erhaltenen Phagenpools, die in der Kontroll-PCR positiv waren, wurde der Titer bestimmt. Die Phagen wurden, wenn nötig, mit SM-Puffer verdünnt und 500 pfu wurden auf 85 mm Petrischalen ausplattiert. Die weiteren Arbeitsschritte waren analog zu denen des Primärscreenings.

3.11.8. Durchführung des Tertiärscreening

Das Tertiärscreening erfolgte analog dem Sekundärscreening, jedoch wurden höchstens 100 pfu der abgenommenen und mittels PCR getesteten Phagenpools des Sekundärscreenings ausplattiert.

3.11.9. In vivo-Excision von Plasmid-DNA

Aus λ-ZAP-Phagen wurden entsprechend dem in vivo-Excisionsprotokoll des Herstellers λ-ZAP-cDNA (Synthesis Kit, Stratagene) korrespondierende pBlueScript-Phagemide mit integrierter cDNA ausgeschnitten. Phagemide, die die gesuchte cDNA enthielten, wurden nach Denaturierung der DNA durch PCR (siehe Punkt B 3.1.3.) identifiziert. Plasmid-Präparation, Sequenzierung und Auswertung erfolgten wie bereits beschrieben.

3.12. Überexpression von *dlpar12.8a* in *E. coli*

3.12.1. Subklonierung von *dlpar12.8a* in den pQE 30 Expressionsvektor

Durch die mittels PCR eingeführten Restriktionsenzymststellen für Kpn I und Hind III konnte durch Restriktion mit den Enzymen Kpn I und Hind III die kodierende Sequenz *dlpar12.8a* aus dem pCR 2.1 TOPO-Vektor ausgeschnitten werden. Parallel dazu wurde der

pQE 30-Vektor mit der gleichen Kombination von Restriktionsenzymen geschnitten. Beide Restriktionen wurden im Agarosegel aufgetrennt und gereinigt. Anschließend erfolgte die Ligation mit dem pQE 30 Expressionsvektor wie unter Punkt B 3.7.4 beschrieben.

Die Transformation von kompetenten *E. coli* SG13009 [pREP4] Zellen erfolgte mit 2 µl des Ligationsansatzes. Einige der selektierten Klone wurden durch Restriktionsanalyse, PCR und Sequenzierung analysiert.

3.12.2. Durchführung der heterologen Überexpression von *dIpar12.8a*

3 ml Kulturen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 angezogen und für 8 h mit 1 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, in SDS-PAGE Proben-Puffer aufgenommen, 5 min bei 95°C inkubiert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele mittels Coomassie gefärbt. Im erwarteten Molekulargewichtsbereich war gegenüber einer Negativkontrolle (Vektor ohne Insert) und einer nicht induzierten Kontrolle eine verstärkte Proteinbande zu beobachten.

Zusätzlich wurde zur Kontrolle der Expression der PPlase-Assay mit Ac-Ala-Ala-Ser(OPO₃H₂)-Pro-Arg-NH-Np als Substrat herangezogen. Da andere PPlasen durch Verwendung dieses Substrates nicht störten, konnte eine vorhandene PPlase-Aktivität auf eine erfolgreiche Überexpression von *dIpar12.8a* zurückgeführt werden.

Die Reinigung des rekombinanten Proteins ist unter Punkt B 2.9.6. näher beschrieben.

3.13. Northern Blot-Analyse

Gesamt-RNA aus den verschiedenen Pflanzenteilen von *D. lanata* wurde freundlicherweise von A. Pangert (Institut für Pharmazeutische Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) zu Verfügung gestellt. Die Northern Blot-Analyse wurde durchgeführt wie es bei Scholze (Dissertation, 1999) beschrieben wurde.

Als Kontrolle für den gleichmäßigen Transfer der mRNA auf die Blotmembran wurde 18S ribosomale RNA als Kontrollsonde verwendet (Dobrowolski et al., 1989). Die Hybridisierung erfolgte nach Ablösung der gebundenen *dIpar12.8a*-Sonde.

C Ergebnisse

1. Ergebnisse der chromatographischen Reinigung

1.1. Allgemeine Bemerkungen zur Reinigungsstrategie

Die chromatographische Reinigung erfolgte wie unter Punkt B 2.9. beschrieben. Über den gesamten Reinigungsprozeß wurde PPIase-Aktivität immer mit einem phosphorylierten (Ac-Ala-Ala-Ser(OPO₃H₂)-Pro-Arg-NH-Np) und einem unphosphoryliertem Substrat (Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-NH-Np) bestimmt, um aus dem Verhältnis zueinander die Aufreinigung der phosphospezifischen PPIase gegenüber anderen PPIasen bestimmen zu können. Das Verhältnis der Aktivitäten von Ac-Ala-Ala-Ser(OPO₃H₂)-Pro-Arg-NH-Np gegenüber Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-NH-Np im Homogenat betrug etwa 1:3. Dagegen konnte nach der Fractogel TSK AF-Blue-Säule ein Verbesserung des Verhältnisses auf 7:1 beobachtet werden (siehe Tab. 2). Eine vollständige Abtrennung von cytosolischem Cyp 18 mittels Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie war jedoch nicht möglich, was aufgrund der fast identischen theoretischen isoelektrischen Punkte von 8.89 für *DLP*Par12.8 und 8.29 für *DLC*yp18.0 auch nicht zu erwarten war. Natürlich wäre es möglich gewesen, störende Cyclophiline spezifisch über eine Trägermatrix, an die CsA gekoppelt wurde, aus den Proben zu isolieren. Jedoch erwies sich dieser Reinigungsschritt als nicht notwendig, da mittels der RP-HPLC beide Enzyme gut voneinander zu trennen waren.

Ein anfangs verwendeter zusätzlicher Reinigungsschritt in Form einer Gelfiltration nach der Anionenaustausch-Säule und AF-Blue-Säule wurde wieder verworfen. Für diesen Schritt war zum einen eine Konzentrierung der Probe notwendig und andererseits kein weiterer Reinigungseffekt zu beobachten als der, der auch durch RP-HPLC erreicht werden konnte. In Bezug auf Cyclophiline war der Unterschied in der Elutionszeit zwischen 18 kDa-Proteinen und 13 kDa-Proteinen viel zu gering, um eine vollständige Trennung beider Proteine voneinander zu erreichen.

1.2. Chromatographische Reinigung von *DLP*Par12.8

1.2.1. Reinigungsschritt 1: Fractogel EMD-DEAE-Anionentauscher

Im ersten Reinigungsschritt wurde ein Fractogel EMD-DEAE Anionentauscher verwendet. Vorteil dieses Reinigungsschrittes war die Möglichkeit, große Proteinmengen in großen Volumina auftragen zu können. Gleichzeitig war die Abtrennung großer Mengen Fremdprotein

gewährleistet. Ein weiterer Vorteil war, daß die gesammelten Fraktionen für eine sofortige Weiterbearbeitung zu Verfügung standen, ohne z.B. dialysiert oder aufkonzentriert werden zu müssen. Damit war eine zügige Aufreinigung gewährleistet und Verluste durch zusätzliche Arbeitsschritte wurden vermieden. Für die weiteren Reinigungsschritte wurden die Fraktionen verwendet, die die höchste spezifische Aktivität (Verhältnis aus PPlase-Aktivität und Proteinkonzentration) für das Substrat Ac-Ala-Ala-Ser(OPO₃H₂)-Pro-Arg-NH-Np aufwiesen. Im in Abb. C-1 dargestellten Chromatogramm wurden die Fraktionen 19-26 für die weitere Bearbeitung verwendet.

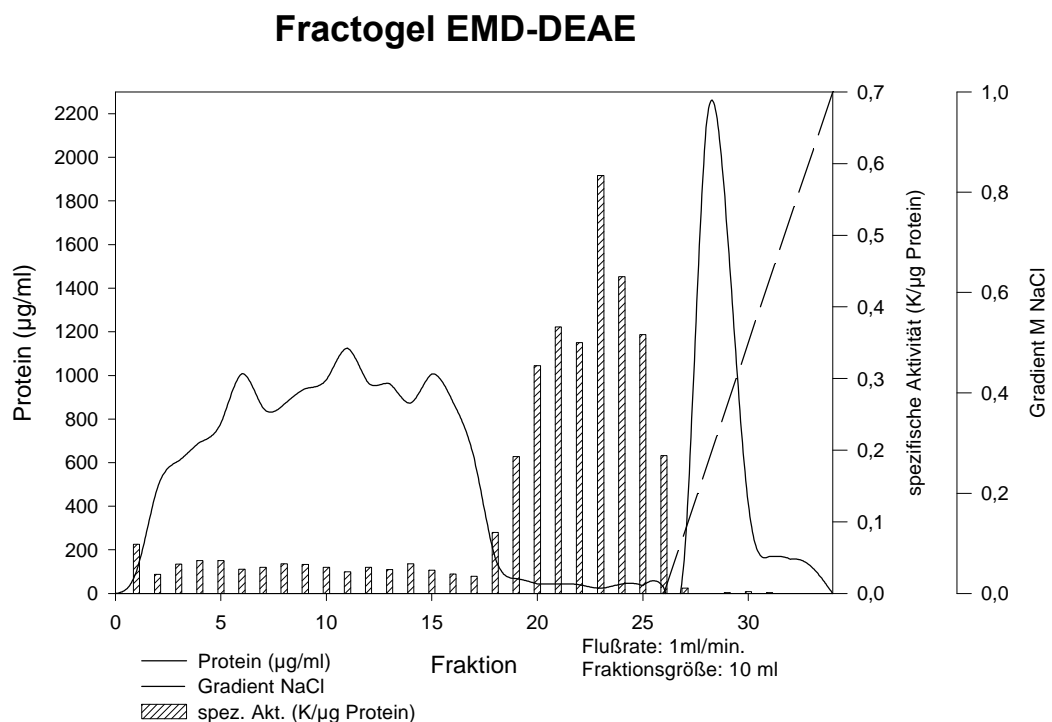


Abb. C-1: Chromatogramm des Anionentauschers Fractogel EMD-DEAE. Für die weiteren Reinigungsschritte wurden, wie in diesem Beispiel, die Fraktionen 19 - 26 verwendet. Diese Fraktionen besaßen die höchste spezifische Aktivität für das Substrat Ac-Ala-Ala-Ser(OPO₃H₂)-Pro-Arg-NH-Np.

1.2.2. Reinigungsschritt 2: Fractogel TSK AF-Blue

Der zweite Reinigungsschritt bestand aus einer Fractogel TSK AF-Blue Säule. Ausgewählte Fraktionen des ersten Reinigungsschrittes konnten sofort auf diese Säule aufgetragen werden. Die Abtrennung großer Mengen Fremdprotein, eine leichte Aufkonzentrierung von DLPar12.8 und die Möglichkeit relativ große Volumina auftragen zu können, zeichneten die Fractogel TSK AF-Blue Säule aus. Nach diesen zwei Reinigungsschritten ließen sich Proben,

die *DLP*12.8 enthielten, ohne größeren Aktivitätsverlust auch für längere Zeit bei -20°C aufbewahren.

Fractogel TSK-AF-Blue

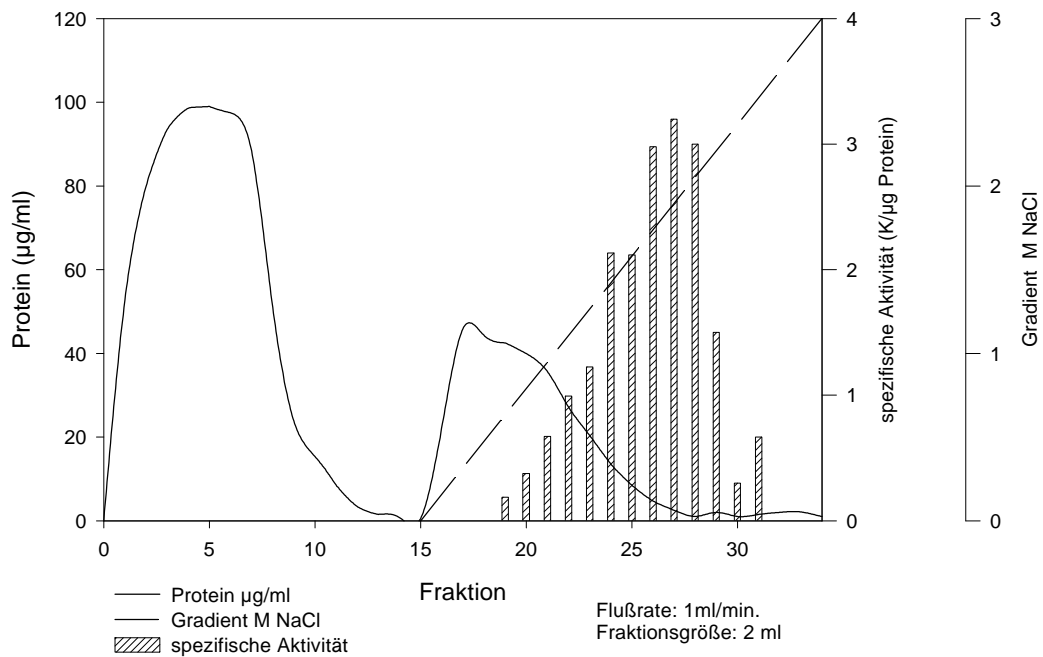


Abb. C-2: Chromatogramm des zweiten Reinigungsschrittes, in dem eine Fractogel TSK AF-Blue Säule verwendet wurde. PPIase-Aktivität wurde mit dem Substrat Ac-Ala-Ala-Ser(OPO₃H₂)-Pro-Arg-NH-Np bestimmt. Für die Endreinigung mittels RP-HPLC wurden die Fraktionen 21 - 29 verwendet.

Im silbergefärbten SDS-PAGE-Gel (17.5 %) war es möglich, dem Aktivitätsprofil (Abb.: C-2) eine korrelierende Bande zuzuordnen, die sich nach RP-HPLC-Trennung und Sequenzierung als Bande von zwei Acyl-CoA-bindenden Proteinen (ACBP) identifizieren ließ. Beide Sequenzen wurde in die Swiss-Prot Protein-Datenbank unter den Nummern P81624 und P81625 eingetragen (Metzner et al., 2000a). Heterolog in *E. coli* überexprimiertes ACBP aus *A. thaliana* zeigte (Engeseth et al., 1996) im PPIase-Aktivitätstest mit dem Substrat Ac-Ala-Ala-Ser(OPO₃H₂)-Pro-Arg-NH-Np keine Aktivität.

1.2.3. Reinigungsschritt 3: Nuc C18 RP-HPLC

Im letzten Reinigungsschritt wurde eine Nuc C18 RP-HPLC-Säule verwendet, die einen enormen Reinigungseffekt bedeutete. Es ließen sich alle noch vorhandenen Proteine abtrennen, unter anderem noch vorhandene Cyclophiline. Auch die Trennung von zwei Acyl-CoA

bindenden Proteinen, die über mehrere Säulen koeluierten, gelang mit Hilfe dieser C18-Säule (Metzner et al., 2000a). Im PPlase-Assay ließ sich unter Verwendung von Ac-Ala-Ala-Ser(OPO₃H₂)-Pro-Arg-NH-Np für den mit *DLP*ar12.8 gekennzeichneten Proteinpeak unmittelbar nach der Trennung PPlase-Aktivität nachweisen. Für alle anderen gesammelten Proteinpeaks war dieses nicht möglich.

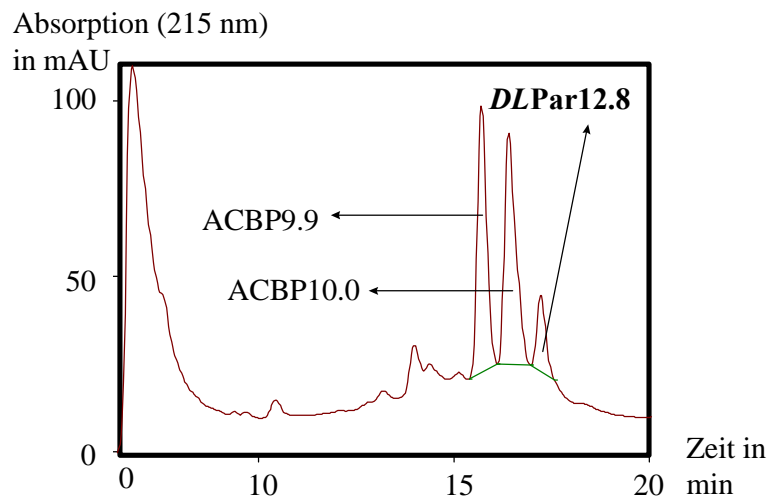


Abb. C-3: Ausschnitt des Chromatogramms des dritten Reinigungsschrittes, bei dem eine Nucleosil C18-Säule für RP-HPLC zur Anwendung kam. Es ließen sich alle noch vorhandenen Proteine soweit abtrennen, daß nach Lys-C-Verdau eine partielle Sequenzierung des Proteins möglich war. Auch zwei, über alle verwendeten Säulen koeluiierenden Acyl-CoA-bindenden Proteine konnten letztlich in diesem Reinigungsschritt abgetrennt werden. Ersichtlich ist auch die geringe Menge gereinigtes Protein, die für weitere Untersuchungen vorlag. (Flußrate: 0.5 ml/min, Temperatur 40°C, Auftrag: 1 ml von aktiven Fraktionen des vorigen Reinigungsschrittes).

Die Abtrennung der ACBPs und aller anderen Fremdproteine ermöglichte eine eindeutige Identifizierung von *DLP*ar12.8 im silbergefärbten SDS-PAGE-Gel, wobei fast die gesamte Menge des erhaltenen Proteinpeaks verwendet werden mußte. Dabei wurde ersichtlich, daß das apparente Molekulargewicht mit dem durch MALDI-TOF-MS ermittelten übereinstimmt. Die Bande von *DLP*ar12.8 liegt im Bereich von 12 kDa, wie in Abb. C-4 zu sehen ist.

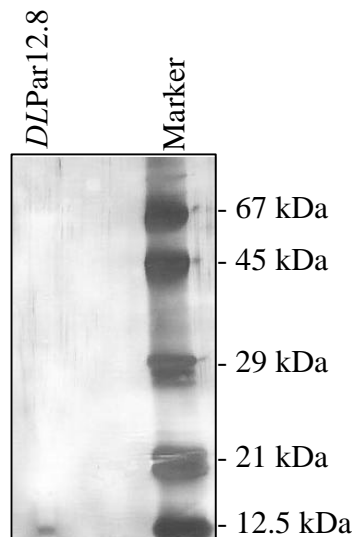


Abb. C-4: SDS-PAGE-Gel (silbergefärbt, 17.5 %) von *DLPAr12.8* (links, M_G 12846 Da). Das apparente Molekulargewicht liegt mit 12.5 kDa im Bereich des mittels MALDI-TOF-MS ermittelten. Die aufgetragene Menge entsprach etwa der Hälfte des in Abb. C-3 dargestellten RP-HPLC-Peaks (*DLPAr12.8*).

1.2.4. Reinigungsschema für *DLPAr12.8*

Im folgenden Reinigungsschema sind die Ergebnisse aller drei verwendeten Säulen noch einmal zusammengefasst. Am Aufreinigungsfaktor von 21500 wird deutlich, wie gering die Ausbeute an *DLPAr12.8* gewesen ist.

| Säule | Volumen in ml | Protein konzentration in | | | PPlase Aktivität ¹ in | | | PPlase Aktivität ² in K/ml | Reini- gungs- faktor | spezifische Aktivität in K/mg |
|--------------------------|------------------|-----------------------------|-------------------|---------------------|-------------------------------------|------|-------|---|----------------------------|-------------------------------------|
| | | µg/ml | mg | % | K/ml | K | % | | | |
| Homogenat | 200 | 1632 | 320 | 100 | 36 | 7200 | 100 | 96 | 1 | 0.022 |
| Fractogel EMD-DEAE | 80 | 160 | 12.8 | 4 | 18 | 1440 | 20 | 20 | 5 | 0.11 |
| Fractogel TSK AF-Blue | 16 | 20 | 0.32 | 0.1 | 10 | 160 | 2.2 | 1.5 | 22.7 | 0.5 |
| RP-HPLC C18 | 1 | 0.5 | $5 \cdot 10^{-4}$ | $1.6 \cdot 10^{-4}$ | 17 | 17 | 0.236 | < 1 | 21500 | 472 |

Tab. C-1: Reinigungsschema von *DLPAr12.8* unter Berücksichtigung der verwendeten Säulenmaterialien sowie beider für die chromatographische Reinigung verwendeter Substrate: ¹Ac-Ala-Ala-Ser(OPO₃H₂)-Pro-Arg-NH-Np, ²Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-NH-Np.

1.2.5. Bestimmung des nativen Molekulargewichtes mittels Größenausschlußchromatographie

Die Bestimmung des nativen Molekulargewichtes erfolgte wie unter Punkt B 2.9.5. beschrieben.

Hierbei ließ sich feststellen, daß die Elutionszeit von *DLP*12.8 einem Molekulargewicht entspricht, welches im ungefähren Bereich des theoretischen Molekulargewichtes von 13 kDa liegt. Aktivität mit Ac-Ala-Ala-Ser(OPO₃H₂)-Pro-Arg-NH-Np ließ sich im höhermolekularen Bereich nicht nachweisen. Die Bildung von Dimeren oder Oligomeren ließ sich damit ausschließen.

1.3. Bestimmung des Molekulargewichtes von *DLP*12.8 mittels MALDI-TOF-MS

Von einem Aliquot des mit *DLP*12.8 gekennzeichneten Proteinpeaks wurde mittels MALDI-TOF-MS das Molekulargewicht des Proteins bestimmt. Es wurde mit 12846 ± 5 Da bestimmt.

1.4. Partielle Sequenzierung von *DLP*12.8

Durch eine N-terminale Blockierung von *DLP*12.8 war eine direkte Sequenzierung durch Edman-Abbau nicht möglich. Aus diesem Grund erfolgte ein Verdau mit der Endoprotease Lys-C, die Proteine spezifisch C-terminal von der Aminosäure Lys spaltet. Der Verdau wurde mittels RP-HPLC (C3-Säule, 125 x 2 mm) aufgetrennt und von den erhaltenen Peaks das Molekulargewicht bestimmt. Eines der erhaltenen Fragmente konnte anschließend mittels eines Sequenzer 476A entsprechend den Vorschriften des Herstellers sequenziert werden. Die Sequenz des aus 15 Aminosäuren bestehenden Peptidfragments lautet:

Arg-Gly-Gly-Asp-Leu-Gly-Ser-Phe-Gly-Arg-Gly-Gln-Met-Gln-Lys (Teilsequenz 1)

Ein weiteres, aus 10 Aminosäuren bestehendes Fragment des Lys-C-Verdaus wurde mittels MALDI-TOF-MS nach Pfeifer et al. (1999) sequenziert:

Pro-Phe-Glu-Asp-Ala-Thr-Phe-Gly-Leu-Lys (Teilsequenz 2)

Der Vergleich beider Teilsequenzen mit Einträgen der SWISS-Prot- und EMBL-Datenbank resultierte in einer Liste von phospho-spezifischen-Parvulinen (Abb.: C-5). Das sequenzierte Fragment 1 stellt einen hochkonservierten Bereich der Parvulinfamilie dar. Die bis zum letzten Reinigungsschritt detektierbare PPlase-Aktivität konnte damit einem Parvulin zugeordnet werden. Die anfänglich vermutete Existenz eines phospho-spezifischen Parvulins in Pflanzen war damit zwar noch nicht endgültig bestätigt, doch legte die hohe Sequenzhomologie zur Teilsequenz aus *A. thaliana* und das Erkennen eines phosphorylierten Substrates nahe, daß es sich um ein phospho-spezifisches Parvulin handelt. Legt man diese Vermutung zugrunde, so war bereits aus dem durch MALDI-TOF-MS bestimmten Molekulargewichtes von *DLP*Par12.8 abzuleiten, daß sich dieses vermutlich phospho-spezifische-Parvulin von den bereits gefundenen unterscheidet. Die Molekulargewicht aller anderen bisher bekannten phospho-spezifischen-Parvuline liegen im Bereich von etwa 18.2 kDa (*hPin1*) bis 22.0 kDa (*Ess/Ptf1*), während der jetzt gefundene pflanzliche Vertreter mit 13 kDa deutlich unterhalb dieser Größe liegt.

Teilsequenz 2 konnte durch Sequenzvergleiche direkt als C-terminal benachbart zu Teilsequenz 1 identifiziert werden. Sie stellt jedoch einen weniger konservierten Bereich dar, als es bei Teilsequenz 1 der Fall ist (siehe Abb. C-5).

2. Molekularbiologische Bearbeitung von *DLP*Par12.8

2.1 Ableitung von Oligonukleotidprimern für die PCR

Mit den beiden erhaltenen partiellen Peptidsequenzen und den bereits bekannten phospho-spezifischen-Parvulinen vom Menschen (*Pin1*, AC Q13526), *S. cerevisiae* (*Ess/Ptf1*, AC P22696), *N. crassa* (*Ssp1*, AC AJ0006023), *D. melanogaster* (*Dodo*, AC P54353) und der Teilsequenz von *A. thaliana* (AC AC006201) wurde ein Sequenzvergleich durchgeführt. Aus diesem Homologievergleich wurden unter Berücksichtigung der *D. lanata* Teilsequenzen und verschiedener hochkonservierter Sequenzbereiche Primer für die RT-PCR abgeleitet.

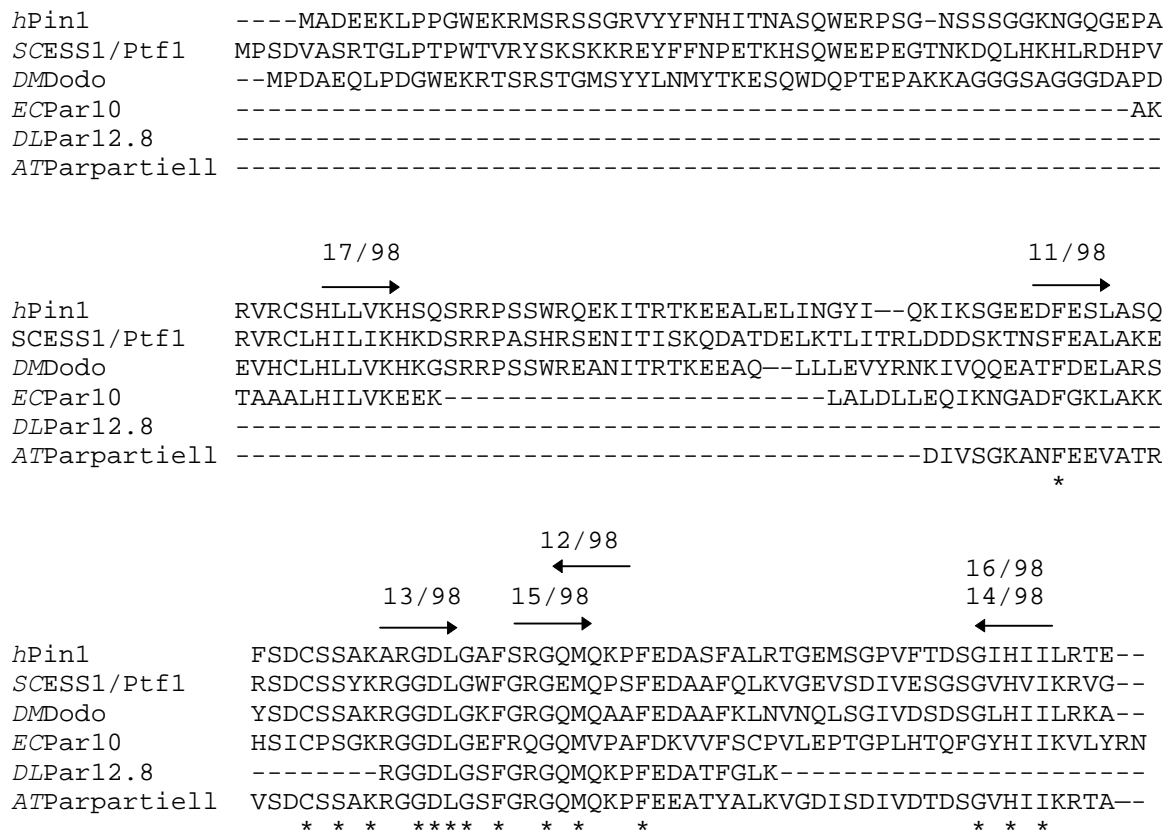


Abb. C-5: Darstellung der für die Primerableitung zugrunde gelegten Parvulinsequenzen und die daraus abgeleiteten Oligonukleotide für die RT-PCR. Folgende Sequenzen mit den entsprechenden Datenbank-Nummern wurden verwendet: *H. sapiens* Pin1: 5453898; *S. cerevisiae* Ess1/Ptf1: S52764; *D. melangoster* Dodo: AAC46958; *E.coli* Par10: P39159; *A. thaliana* partielle Sequenz: F13919. Das Symbol * steht für identische Aminosäure.

2.2. Amplifizierung von PCR-Fragmenten mittels RT-PCR

Die RT-PCR wurde durchgeführt, wie unter Punkt B 3.1.2. beschrieben. Verwendet wurden alle möglichen sinnvollen Primerkombination. Die Primer-Anlagerungstemperatur während der RT-PCR lag bei 55°C.

Mit zwei Primerkombination war es möglich, unter den beschriebenen PCR-Bedingungen spezifische PCR-Produkte zu amplifizieren. Mit der Kombination von MM13/98 und MM14/98 gelang es, ein 128 bp PCR-Fragment (*dl128bp*) zu amplifizieren und dieses in den TOPO-T/A-Vektor zu klonieren.

Die Primerkombination MM15/98 und MM14/98 führten zu einem 104 bp Fragment (*dl104bp*), welches ebenfalls in den TOPO-T/A-Vektor kloniert wurde.

Die Sequenz von *dl104bp* ist in *dl128bp* enthalten. Beide DNA-Sequenzen zeigen eine hohe Homologie zu den bekannten phospho-spezifischen Parvulinen und umfassen dabei auch die sequenzierte partielle Peptidsequenz von *D. lanata*, wobei jedoch Abweichungen zwischen den PCR-Produkten und der Partialsequenz von *DLP*12.8 festgestellt wurden.

2.3. Isolierung von *dlpar12.8a* aus einer cDNA-Bank von PEMs

Durch die Feststellung von geringen Abweichungen in den abgeleiteten Aminosäuresequenzen beider PCR-Fragmente zu *DLP*12.8 deutete sich das Vorhandensein einer möglichen Isoform an. Um den cDNA-Klon von einem *DLP*12.8 zuzuordnenden cDNA-Klon zu unterscheiden, wurde die Bezeichnung *dlpar12.8a* für den cDNA-Klon und *DLP*12.8a für die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz verwendet.

Das 128 bp PCR-Produkt (*dl128bp*) wurde als Sonde verwendet, um eine cDNA-Bank aus PEMs von *D. lanata* zu durchsuchen und einen vollständigen cDNA-Klon zu isolieren (siehe B 3.11.). Mit den beiden Primern MM13/98 und MM14/98 und einem durch Hitzebehandlung denaturierten Aliquot der cDNA-Bank konnte mittels PCR *dlpar12.8a* detektiert werden. Ein falsch positives Signal durch *E. coli* DNA konnte ausgeschlossen werden.

Insgesamt wurden 5×10^5 pfu der Phagen-cDNA-Bank mit dem radioaktiv markierten 128 bp Sonde hybridisiert. Es wurden nur sehr wenige positive Doppelsignale erhalten. Insgesamt 6 Primärklone wurden weiterbearbeitet, die zuvor auf gleiche Art und Weise wie die cDNA Bank mittels PCR auf Vorhandensein von *dlpar12.8a* getestet wurden.

Sekundär- und Tertiärscreening erfolgten analog dem Primärscreening (B 3.11.), wobei wiederum mittels PCR die abgesammelten Phagen nach *dlpar12.8a* durchsucht wurden. Nach dem Tertiärscreening waren die Phagen soweit vereinzelt, daß Einzelphagen abgenommen werden konnten. Von den 6 Phagenpools blieben noch 3 positive Klone übrig. Diese wurden mittels PCR zusätzlich zu den Primern MM 14/98 und MM 15/98 noch mit den Vektorprimern 1 und 2 getestet. Die zusätzliche PCR mit den beiden Vektorprimern erlaubte Aussagen über die Länge der isolierten cDNA. Aus der Länge ließ sich die eventuelle Unvollständigkeit des cDNA-Klons ableiten. Im Falle der 3 positiven Phagenpools schienen vollständige cDNA-Klone vorzuliegen.

Aus allen drei Phagenpools wurden korrespondierende pBluescript-Phagemide mit integrierter cDNA durch in vivo-Excision ausgeschnitten. Anschließend erfolgte die Isolierung und Sequenzierung der Plasmide. Die Sequenzauswertung mittels des Programms *ClustalW* ergab, daß alle drei isolierten cDNA-Klone identisch waren.

2.4. Der vollständige cDNA-Klon *dIpar12.8a*

Der größte offene Leserahmen (ORF) von *dIpar12.8a* beträgt 354 bp und kodiert für ein Protein von 118 Aminosäuren (*DLP*12.8a). Das theoretische Molekulargewicht wurde mit 12834 Da und der isoelektrische Punkt zu pH 8.9 berechnet (*Bjellqvist et al.*, 1993).

Der Vergleich der beiden 128 bp und 104 bp großen PCR-Fragmente mit den entsprechenden Bereichen aus *dIpar12.8a* zeigte eine vollständige Übereinstimmung der drei Nukleinsäuresequenzen.

| | | | | | |
|--|--------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| GGCACGAGTC | CGATCGGAAG | AGGAAGAAGG | CCTCGATCTC | GTCCGGAGAT | -64 |
| CGGGCTAGCG | AGCACCATCA | CCACCACCAC | AAGAAGCAAG | CGAGCAGCAC | -14 |
| | M S S E K V R A S H I L | | | | 12 |
| <u>CAAGAAGACG</u> | AAAATGTCAT | CGGAGAAGGT | TAGGGCGTCC | CACATACTCA | 37 |
| I K H Q G S R R K S S W K D P D G | | | | | 29 |
| TAAAGCACCA | GGGATCCCGC | CGCAAGTCCT | CCTGGAAGGA | CCCTGATGGT | 87 |
| S L I S A T T R D D A V S Q L Q S | | | | | 46 |
| AGCCTCATCT | CCGCCACTAC | CCGAGACGAC | GCTGTTTCTC | AGCTCCAATC | 137 |
| L R Q E L L S D P A S F S D L A | | | | | 62 |
| CCTCCGACAA | GAACTCCTTT | CCGACCCCGC | CTCCTTCTCC | GACCTCGCCT | 187 |
| S R H S H C S S A K R G G D L G P | | | | | 79 |
| CCCGTCACTC | CCACTGCAGC | TCTGCAAAGC | GTGGTGGCGA | TCTTGTCCT | 237 |
| F G R G Q M Q K P F E E A T F A L | | | | | 96 |
| TTTGGAAGGG | GCCAGATGCA | GAAACCTTTC | GAAGAAGCCA | CATTTGCACT | 287 |
| K V G E I S D I V D T D S G V H | | | | | 112 |
| AAAGGTTGGT | GAGATAAGTG | ATATCGTGGA | TACTGACAGT | GGAGTTCACA | 337 |
| I I K R T G | | | | | 118 |
| TCATCAAGAG | AACAGGATAG | CAAGTGATGC | AAAATTTGCA | ACTTCAGGGT | 387 |
| GCTTTGGTTG | CCAGATTGTG | TGCCTATATG | TGAGCTTTGC | TTTTTTGTTT | 437 |
| GAGCAACAAC | AGACTCATGT | CATTGTAATG | CCTATAGCCG | TTCTTGAGG | 487 |
| CTACAGTTTT | TAATGATTGT | AATTTATTAC | CCTATTGCAT | TTACACACAA | 537 |
| ACCAAATTAT | CTCTCTGGCT | GCTGTGCAGT | AATTGGTATA | TTATTGATCC | 587 |
| AAAAAAA | | | | | 594 |

Abb. C-6: Darstellung der Nukleinsäuresequenz der cDNA-Sequenz *dIpar12.8a* und der davon abgeleitete Proteinsequenz *DLP*12.8a (AC AJ133755) aus *D. lanata*. Der

translatierte Bereich der Nukleinsäuresequenz umfaßt 354 bp, die Proteinsequenz 118 Aminosäuren. Am 5'Ende besteht der untranslatierte Bereich aus 113 bp, am 3'Ende dagegen aus 240 bp. Der Poly-A-Schwanz der mRNA beginnt bei 700 bp. Unterstrichen dargestellt ist die Ribosomenbindungsstelle (Shine-Dalgarno-Sequenz) an der Position -7.

Der 5'untranslatierte Bereich besitzt auffällig wenig T-Nukleotide. Ihr Anteil ist mit 9% erstaunlich gering. Der 3'untranslatierte Bereich dagegen ist A+T reich. Der Anteil der beiden Basen beträgt hier zusammen 63%. An der Position -7 ist die Ribosomenbindungsstelle 5'-AGG AGG-3'(Shine-Dalgarno-Sequenz, 3'-UCC UCC-5) erkennbar, die für die Translation der mRNA von Bedeutung ist (Shine und Dalgarno, 1975). Weitere Nukleinsäure-Sequenzmotive konnten bisher nicht gefunden werden.

Die cDNA-Sequenz *dIpar12.8a* wurde unter der Nummer AJ133755 in die EMBL-Datenbank eingetragen. Ein Vergleich des offenen Leserahmens von *dIpar12.8a* und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz mit Einträgen der SWISS-Prot- und EMBL-Sequenz-Datenbank resultiert in einer Liste mit Einträgen der verschiedenen Parvuline, wobei die phospho-spezifischen Parvuline die höchste Homologie aufweisen.

| Homologie von <i>DLPar12.8a</i> (<i>D. lanata</i>) in % zur PPlase-Domäne von | |
|--|----|
| <i>ATPar (A. thaliana)</i> | 73 |
| <i>hPin1 (H. sapiens)</i> | 53 |
| <i>Ess/Ptf1 (S. cerevisiae)</i> | 51 |
| <i>SSP1 (N. crassa)</i> | 51 |
| <i>Dodo (D. melangoster)</i> | 48 |
| <i>Par10 (E.coli)</i> | 32 |
| <i>hParv14 (H. sapiens)</i> | 30 |

Tab. C-2: Vergleich der Homologie von *DLPar12.8a* zu PPlase-Domänen verschiedener Parvuline (PPlase-Domäne: siehe Abb.: C-7). Die geringsten Homologien wurde zu den nicht phospho-spezifischen Parvulinen, wie *Par10* oder *hPar14* gefunden. Der Unterschied in der Homologie zwischen den pflanzlichen und den anderen phospho-spezifischen-Parvulinen ist auf die WW-Domäne zurückzuführen, die bei den pflanzlichen Vertretern fehlt. Somit zeigen die beiden pflanzlichen phospho-spezifischen-Parvuline die höchste Homologie zueinander. Verwendete Datenbank-Einträge: *A. thaliana* *ATPar13*: AC AAD20122; *H. sapiens* *Pin1*: AC 5453898; *S. cerevisiae* *Ess1/Ptf1*: AC S52764; *N. crassa* *Ssp1*: AC CAA06818;

D. melangoster Dodo: AC AAC46958; *E.coli* Par10: AC P39159; *H. sapiens*
Par14: AC 5453902

Ein Vergleich der Sequenz des chromatographisch gereinigten *DLP*12.8 mit der von *dlpar12.8a* abgeleiteten Aminosäuresequenz *DLP*12.8a zeigte, daß beide Sequenzen geringfügige Abweichungen voneinander zeigen. Genau wie bei der für die Isolierung verwendeten Sonde *dl128bp* beträgt der Unterschied zwischen der abgeleiteten Aminosäuresequenz und *DLP*12.8 3 Aminosäuren von 25 sequenzierten, d.h. 12 %. Die Diskussion dieser Abweichung erfolgt unter Punkt D 2.2.4..

Durch den Sequenzvergleich wird noch einmal deutlich, was sich schon bei der Bestimmung des Molekulargewichtes von *DLP*12.8 andeutete: die pflanzlichen Vertreter der phosphospezifischen Parvuline unterscheiden sich von allen anderen phosphospezifischen Parvulinen deutlich in ihrem Molekulargewicht. Den pflanzlichen Vertretern fehlt, die, wegen ihrer zwei konservierten Tryptophane WW-Domäne genannte, 35- 40 Aminosäuren lange N-terminale Peptidsequenz.

| | | | |
|------------------------------|---|--|-----|
| <i>DLP</i> Par12.8 | ----- | | |
| <i>dl</i> 104bp | ----- | | |
| <i>dl</i> 128bp | ----- | | |
| <i>DLP</i> Par12.8a | ----- | | |
| <i>ATP</i> Par13 | ----- | | |
| <i>NCS</i> sp1 | ----- | MSNTIET--GLPEDW EVRHSQSKNLPYYFNSATKTSRWEP | 38 |
| <i>hPin</i> 1 | ----- | MAD--EE--KLPPG WEKRMSRSSGRVYYFNHITNASQWER | 36 |
| <i>DMD</i> dodo | ----- | MPD--AE--QLPDG WEKR TSRSTGMSY LN MYTKESQWDQ | 36 |
| <i>SC</i> ESS1/ <i>P</i> tf1 | MIIVVLIPTHNRLRHNDAP | MPSDVASRTGLPTP W TVRYSKSKKREYFFNPETKHSQWEE | 60 |
| <i>EC</i> Par10 | ----- | *-----*-----*-----*-----*-----*-----* | |
| | | | |
| <i>DLP</i> Par12.8 | ----- | | |
| <i>dl</i> 104bp | ----- | | |
| <i>dl</i> 128bp | ----- | | |
| <i>DLP</i> Par12.8a | ----- | MSSEKVRASH ILIKHQGSRR KSSWKDPDGS | 30 |
| <i>ATP</i> Par13 | ----- | MASRDQVKASH ILIKHQGSRR KASWKDPEGK | 31 |
| <i>NCS</i> sp1 | PSGTDV DKLKIYMAKYHSPTS QQQQQQQQQQQPQ GKIRCAHLLV KHNQ SRR PS S WRESE-- | | 96 |
| <i>hPin</i> 1 | PSG----- | NSSSGGKNGQGE P -ARVRC S HLLV KHSQSRR PS S WRQEK-- | 77 |
| <i>DMD</i> dodo | PTEP----- | AKKAGGSAGGG D APDEVHCL HLLV KHK SRR PS S WREAN-- | 80 |
| <i>SC</i> ESS1/ <i>P</i> tf1 | PEG----- | TNKDQLHKHLR DHPVRVRC L HILIKHKDSRR PASH R SEN-- | 102 |
| <i>EC</i> Par10 | * | MKATAAAL HILVKEEK ----- | 16 |
| | | * * * * * * * * * * * | |
| | | | |
| <i>DLP</i> Par12.8 | ----- | -----RGGDLGSFGRGQM QKP | 16 |
| <i>dl</i> 104bp | ----- | -----GRGQM QKP | 8 |
| <i>dl</i> 128bp | ----- | -----RGGDLGPFGRGQM QKP | 16 |
| <i>DLP</i> Par12.8a | LISATTRDDAVS QLQSLRQELL --SDPASFSDLASRHS H CSSAKRGGDLGPFGRGQM QKP | | 88 |
| <i>ATP</i> Par13 | IILTTTREA AVEQLKSIRE DIV--SGKANFEEVATRVSD C SSAKRGGDLGSFGRGQM QKP | | 89 |
| <i>NCS</i> sp1 | --ITRTKQEAL TTLQGF EQR IK --SGSISLGELAL TESD CSSAKR GDLGYFGRGDMQ KE | | 152 |
| <i>hPin</i> 1 | --ITRTKEEA LELINGYIQ IK IK --SGEEDFESLASQF SD CSSAKARGDLGAF SRGQM QKP | | 133 |
| <i>DMD</i> dodo | --ITRTKEEA QLLE VYRN KIV --QGEATFDELARS YSD CSSAKRGGDLGK FGRGQM QAA | | 136 |
| <i>SC</i> ESS1/ <i>P</i> tf1 | --ITISKQDAT DELKTLITR LDDSD KTN SFEALAKERS D CSSYK RGGDLGW FGRGEM QPS | | 160 |
| <i>EC</i> Par10 | ----- | LALDLLE QI --KNGADFGK LAKHSI CP SGRGGDLGE FR QGM VPA | 61 |
| | | * * * * * * * * * * * | |
| | | | |
| <i>DLP</i> Par12.8 | FEDATFGLK----- | | 25 |
| <i>dl</i> 104bp | FEEATFALKVGEISDIVD TDS SGV HII ----- | | 34 |
| <i>dl</i> 128bp | FEEATFALKVGEISDIVD TDS SGV HII ----- | | 42 |
| <i>DLP</i> Par12.8a | FEEATFALKVGEISDIVD TDS SGV HII KRTG-- | | 118 |
| <i>ATP</i> Par13 | FEEATYALKVGD ISDIVD T DS SGV HII KRTA-- | | 119 |
| <i>NCS</i> sp1 | FEDA AFALK -GEISDIVDT ASGLH LIERLE-- | | 181 |
| <i>hPin</i> 1 | FEDAS FALRTGEMSGPVFT D SGIHII LRTE-- | | 163 |
| <i>DMD</i> dodo | FEDA AFKLN VNQLSGIV SDSGLHII LRKA-- | | 166 |
| <i>SC</i> ESS1/ <i>P</i> tf1 | FEDA AFQLK VGEVSD IVESGS GV HV IKRVG-- | | 190 |
| <i>EC</i> Par10 | FDK VVF SCPVLEPTG PLHTQ FGY HII KVL YRN | | 93 |
| | * | * * * * * | |

Abb. C-7: Darstellung eines Sequenzvergleiches zwischen *DLP*Par12.8, *DLP*Par12.8a, beiden PCR-Fragmenten, *ATP*Par13, *E. coli* Par10 und verschiedenen phosphospezifischen Parvulinen. Die WW-Domäne wurde im Kasten ohne Hintergrund dargestellt und die beiden konservierten Tryptophane wurden violett hervorgehoben. Die PPIase-Domäne wurde in einem grau unterlegten Kasten dargestellt. Rot bzw. blau dargestellt wurden, die für die Substratbindung bzw. für die katalytische Aktivität wichtigen Aminosäuren. Evident wird die hohe Homologie zwischen allen Sequenzen sowie das Fehlen der N-terminalen WW-Domäne (im Kasten dargestellt) bei *D. lanata* und *A. thaliana*. Verwendete

Datenbank-Einträge: *D. lanata* DLPar12.8a: AJ133755 *A. thaliana* ATPar13: AAD20122; *H. sapiens*: 5453898; *S. cerevisiae* Ess1/Ptf1: S52764; *N. crassa* Ssp1: CAA06818; *D. melanogaster* Dodo: AAC46958; *E. coli* Par10: P39159. Das Symbol * symbolisiert identische Aminosäuren.

2.5. Überexpression von *dlpar12.8a* in *E. coli*

2.5.1. Subklonierung von *dlpar12.8a* in den Expressionsvektor pQE 30

Da die durch chromatographische Reinigung erhaltene Menge an DLPar12.8 sehr gering war und für weitergehenden Untersuchungen wie Substratspezifität und Antikörpergewinnung größere Mengen des entsprechenden Proteins benötigt wurden, war eine Überexpression in *E. coli* zur Erzeugung größerer Mengen Protein notwendig. Um die für DLPar12.8a kodierende Sequenz in einen Expressionsvektor zu klonieren, machte es sich zuvor erforderlich, vor dem Start- und nach dem Stopcodon Schnittstellen für Restriktionsenzyme einzuführen. Aus der Schnittstellenanalyse des ORF von *dlpar12.8a* und der Analyse des verwendeten Expressionsvektors pQE 30 ergaben sich die zu verwendenden Restriktionsenzyme. An das 5'Ende wurde die Sequenz für Kpn I, und an das 3'Ende die Sequenz für Hind III angefügt. Die Sequenzen, der sich daraus ergebenden Primer MM11/99 als sense und MM02/99 als antisense Primer sind unter Punkt B 1.4.3. dargestellt, die PCR wurde wie unter B 3.1.4. beschrieben, durchgeführt. Das PCR-Produkt von 369 bp wurde im TOPO-T/A-Vektor zwischenkloniert und sequenziert. Anschließend wurde die, für DLPar12.8a kodierende Sequenz mittels der Restriktionsendonukleasen Kpn I und Hind III ausgeschnitten und wie unter B 3.7.3. beschrieben in den pQE 30 Vektor subkloniert.

Der pQE 30-Expressionsvektor ist dadurch charakterisiert, daß an das gewünschte Protein ein N-terminaler His-Anhang angefügt wird. Durch das Anfügen dieses aus 6 Histidinen bestehenden Anhangs an das gewünschte Protein, wird eine schnelle Aufreinigung ermöglicht, da das Protein spezifisch an eine Ni²⁺-NTA-Agarose-Matrix binden kann. Durch die Verwendung von Kpn I als 5'-Restriktionsschnittstelle erhöht sich die Molekulargewichtszunahme des überexprimierten Proteins um 11 Aminosäuren auf insgesamt 129 Aminosäuren bzw. um 1973 Da auf 14807 Da. Die 3'-Restriktionsschnittstelle blieb ohne Einfluß auf das Molekulargewicht des überexprimierten Proteins, da vor der Hind III-Sequenz das interne Stop-Codon von *dlpar12.8a* integriert war.

2.5.2. Expression von *dlpar12.8a* in *E. coli*

Die erfolgreiche Klonierung in den Expressionsvektor pQE 30 wurde durch anschließende Restriktionsanalyse, PCR und DNA-Sequenzierung überprüft. Parallel dazu wurde die heterologe Überexpression durch SDS-PAGE und den PPlase-Assay überprüft. In 5 Mini-Kulturen von transformierten Klonen, die mit IPTG inkubiert wurden, erfolgte durch Anschalten des Phagen T5 Promotors des pQE 30 Expressionsvektors eine Induktion der Proteintranslation von *dlpar12.8a*. In Abbildung 8 ist die positive Induktion der Translation in Form einer induzierten Bande bei etwa 15 kDa zu sehen. Ohne IPTG-Zugabe ist keine induzierte Proteinbande zu beobachten.

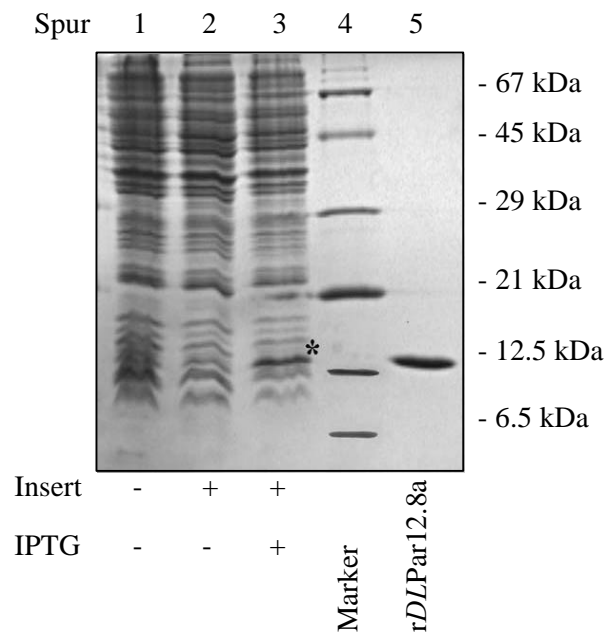


Abb. C-8: SDS-PAGE-Gel (Coomassie gefärbt, 17.5%) von verschiedenen transformierten *E. coli*-Klonen nach der heterologen Überexpression von *dlpar12.8a*. Neben dem Klon, der den reinen pQE 30-Vektor ohne jegliches Insert (Spur 1) enthält, sind zwei Klone, die den pQE 30-Vektor mit integrierter kodierender Sequenz von *dlpar12.8a* enthalten. Dabei erfolgte beim Klon in Spur 2 keine IPTG-Zugabe, dagegen beim Klon in Spur 3 eine Inkubation mit 1 mM IPTG. In Spur 4 wurde Proteinstandard aufgetragen (siehe C 4.6.1.) und in Spur 5 aufgereinigtes rDLPar12.8a. Mit dem Symbol * wurde die induzierte Bande von rDLPar12.8a bei etwa 15 kDa gekennzeichnet.

2.5.3. Reinigung des überexprimierten Proteins *rDLPar12.8a*

Aus einer 1 Liter-Kultur eines positiven Klones wurden nach Reinigung (B 2.9.6.) mittels einer Ni^{2+} -NTA-Agarose-Säule etwa 10 mg aktives *rDLPar12.8a* erhalten.

Mittels MALDI-TOF-MS wurde das Molekulargewicht mit 14807 ± 3 Da bestimmt, welches damit exakt mit dem theoretischen Molekulargewicht übereinstimmt. Eine N-terminale Ansequenzierung der ersten 10 Aminosäuren zeigte, daß der N-terminale 6xHis-Anhang auch tatsächlich vorhanden war.

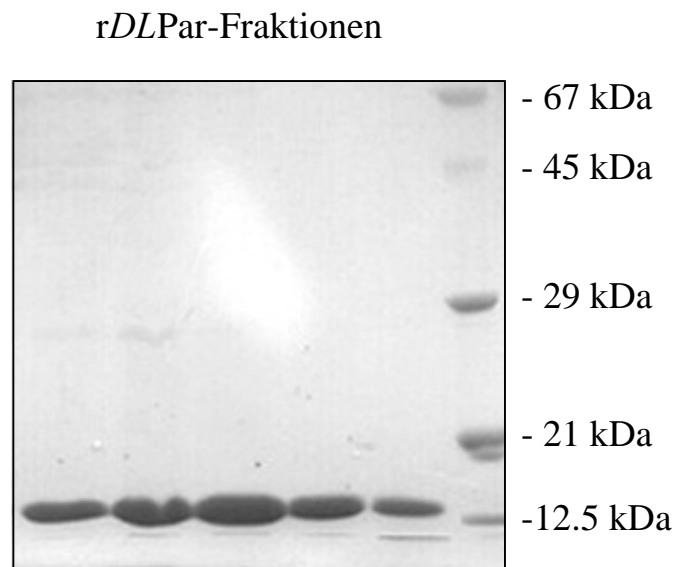


Abb. C-9: SDS-PAGE -Gel (Coomassie gefärbt, 17.5 %) von Fraktionen, die über eine Ni^{2+} -NTA-Agarose-Säule zur Homogenität gereinigtes *rDLPar12.8a* enthalten. Die Ausbeute einer 1 Liter Kultur betrug etwa 10 mg.

2.6. Gewinnung des anti-*rDLPar12.8a*-Antikörpers

2.6.1. Aufreinigung von *rDLPar12.8a* zur Antikörpergewinnung

An die Reinheit von *rDLPar12.8a* zur Gewinnung polyklonaler Antikörper waren besondere Anforderungen zu stellen, um Antikörper zu erhalten, die möglichst spezifisch *DLPar12.8* erkennen. Aus diesem Grund wurde ein Aliquot von *rDLPar12.8a* einem weiteren Reinigungsschritt mittels RP-HPLC (siehe B 2.9.) unterzogen. Die Homogenität der Probe wurde nach der C3-Säule nochmals auf Reinheit und Identität mittels MALDI-TOF-MS überprüft. Etwa 450 μg *rDLPar12.8a* wurden für 3 Injektionen verwendet.

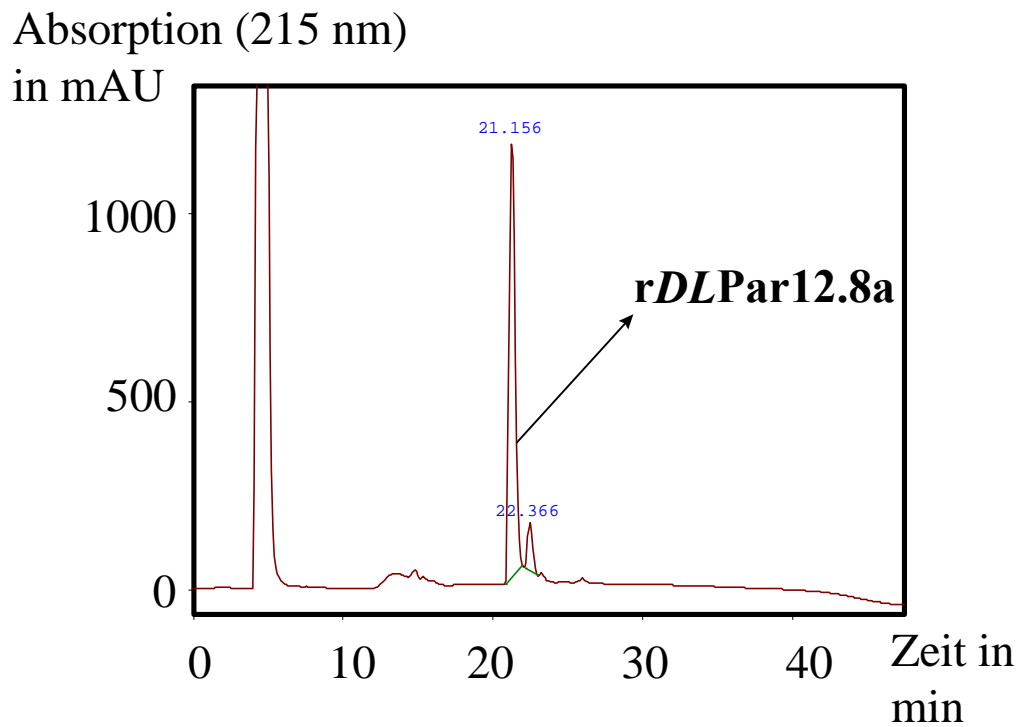


Abb. C-11: Chromatogramm der Aufreinigung von *rDLPar12.8a* für die Antikörpergewinnung aus Kaninchen mittels RP-HPLC. Es gelang noch vorhandenes Fremdprotein abzutrennen, so daß hochgereinigtes *rDLPar12.8a* für die Injektion zur Verfügung stand.

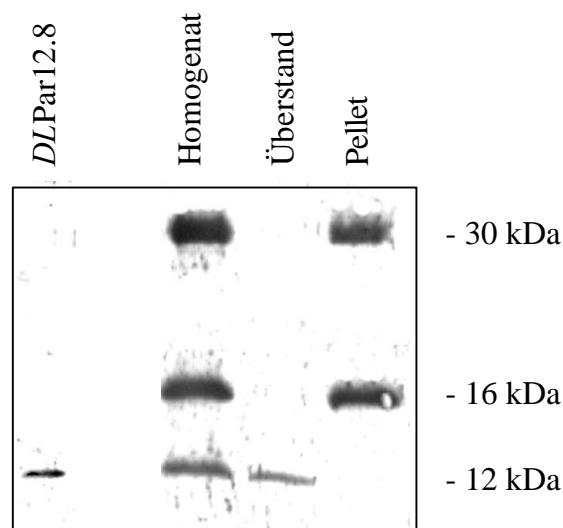


Abb. C-12: SDS-PAGE-Gel (Coomassie gefärbt, 20%) von *rDLPar12.8a* nach RP-HPLC-Reinigung. Dazu wurden von links nach rechts jeweils die doppelte Proteinmenge aufgetragen.

2.6.2. Überprüfung der Qualität des Antikörpers

Die Testung, der zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommenen Antiseren, erfolgte mittels Western Blot gegen rekombinantes Protein und gegen Homogenat aus PEM's.

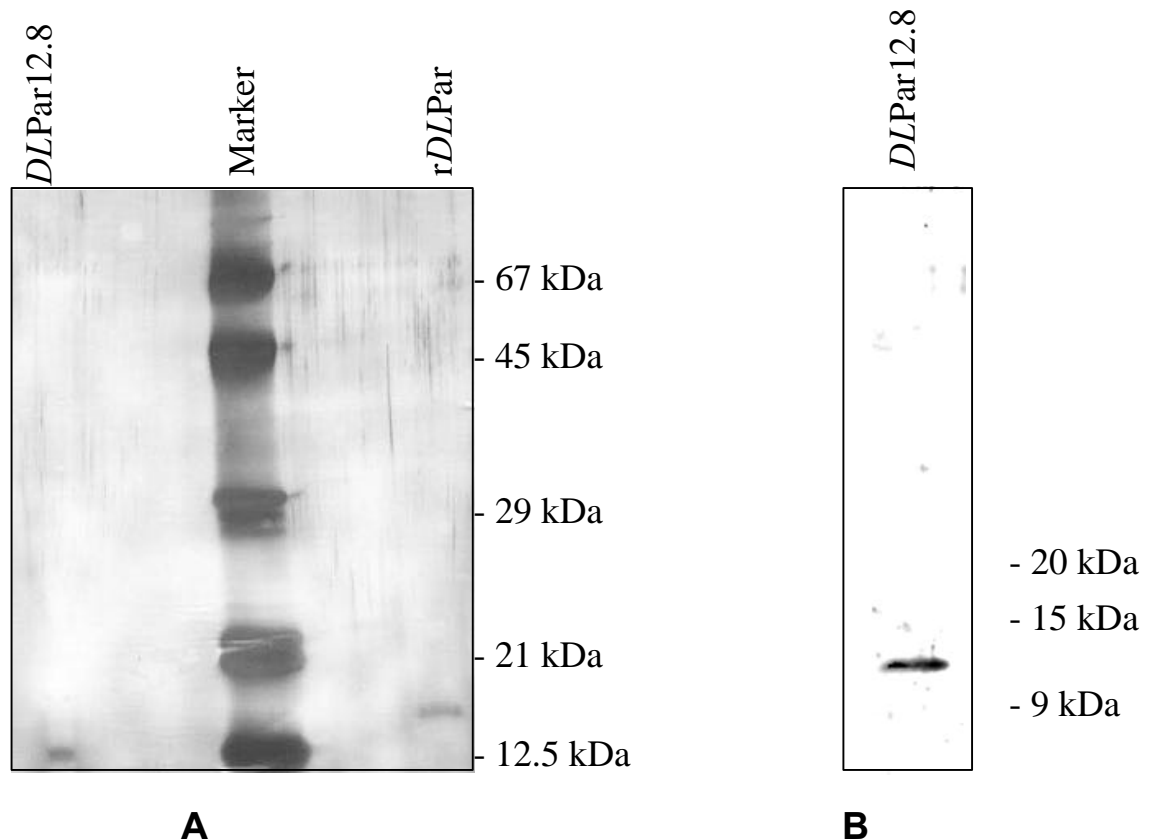


Abb. C-13: A: SDS-PAGE-Gel (silbergefärbt, 17.5 %) von homogenem *DLPAr12.8* (links, M_G 12846 Da) und homogenem *rDLPAr12.8a* (rechts, M_G 14807 Da). Deutlich zu sehen ist der Größenunterschied beider Proteine, der bei *rDLPAr12.8a* durch einen zusätzlichen N-terminalen 6xHis-Anhang verursacht ist.

B: Western Blot-Analyse von homogenem *DLPAr12.8*.

3. Charakterisierung von *rDLPar12.8a*

3.1. Bestimmung der $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ - Werte für Oligopeptide

Mit gereinigtem *rDLPar12.8a* wurde, wie unter B 2.2. beschrieben, die Spezifität für verschiedene kurzkettige Peptidsubstrate bestimmt.

| Substrate | Hilfsprotease | <i>rDLPar12.8a</i> | | <i>hPin1</i> | ESS1/PTF1 |
|-----------------|---------------------------------------|-----------------------------------|------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | | ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) | [%] | ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) | ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) |
| Ac-ApSPY-NH-Np | Chymotrypsin (120 mg/ml, 100 μ l) | 15,900 | 100. | 3,370 | 17,200 |
| Ac-ASPY-NH-Np | Chymotrypsin (120 mg/ml, 100 μ l) | 1.6 | < 1 | 269 | 15.5 |
| AApSPF-NH-Np | Chymotrypsin (120 mg/ml, 100 μ l) | 7,300 | 46 | 3,760 | 8,740 |
| AASPF-NH-Np | Chymotrypsin (120 mg/ml, 100 μ l) | 1 | <1 | 9 | ----- |
| Suc-AEPP-NH-Np | Chymotrypsin (20 mg/ml, 3 μ l) | 3,200 | 20 | 3,410 | 4,170 |
| Suc-AFPF-NH-Np | Chymotrypsin (20 mg/ml, 3 μ l) | 0.5 | < 1 | ----- | <1 |
| Ac-AApSPR-NH-Np | Trypsin (10 mg/ml, 3 μ l) | 252 | 2 | 9,300 | 12,000 |
| AApSPR-NH-Np | Trypsin (10 mg/ml, 3 μ l) | 121 | 1 | ----- | ----- |
| WYpSPR-NH-Np | Trypsin (10 mg/ml, 3 μ l) | 128 | 1 | ----- | ----- |

Tab. C-3: Übersicht über die Substratspezifität von *rDLPar12.8a* im Vergleich mit *hPin1* und ESS1/PTF1 anhand einiger ausgewählter Substrate. Der $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von *rDLPar12.8a* von Ac-ApSPY-NH-Np wurde zu 100 % gesetzt. Die Daten für *hPin1* wurden aus *Yaffe et al. (1997)* und die Werte für Ess1/Ptf1 aus *Hani et al. (1999)* entnommen. Alle Werte sind in [$\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$] angegeben.

Aus Tabelle C-3 wird die Präferenz von *rDLPar12.8a* für Substrate ersichtlich, die in der Seitenkette der Aminosäure N-terminal zu Prolin eine Phosphorylierung tragen. Dabei folgt C-terminal meist eine hydrophobe Aminosäure wie Arg oder Tyr, so daß das bevorzugte Motiv folgendermaßen zusammenfassen läßt: pSer-Pro-Xaa, wobei Xaa hier für hydrophobe Aminosäuren steht.

Für das Substratpaar Ac-ApSPY-NH-NP/Ac-ASPY-NH-NP beträgt der Quotient der beiden bestimmten $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werten ungefähr 10000. Bei den anderen gemessenen Substratpaaren ist die Bevorzugung des phosphorylierten Substrates gegenüber dem nichtphosphorylierten ebenfalls deutlich sichtbar.

Vergleicht man die Substratspezifität von *rDLPar12.8a*, *hPin1* und Ess/Ptf1, so läßt sich feststellen, daß sich alle drei Parvuline ähnlich verhalten, bei *rDLPar12.8a* jedoch die Präferenz für phosphorylierte Substrate noch stärker ausgeprägt ist.

3.2. Inhibierung durch den Parvulininhibitor Juglon

Durch Hennig et al. (1999) wurde mit Juglon erstmals ein spezifischer Inhibitor für Parvuline beschrieben, der durch Interaktion mit Cys⁴¹ (Par10; hPin1: Cys¹¹³) letztendlich zur Inaktivierung des Parvulins führt. Die Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung (10 molarer Überschuß Juglon, 10°C, gemessen im protease-gekoppelten Assay) wurde für rDLPar12.8a mit $3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ berechnet. Ein Vergleich mit der Inaktivierungskinetik anderer phospho-spezifischer Parvuline und *E. coli* Par10 zeigt für diese einen ähnlichen Verlauf.

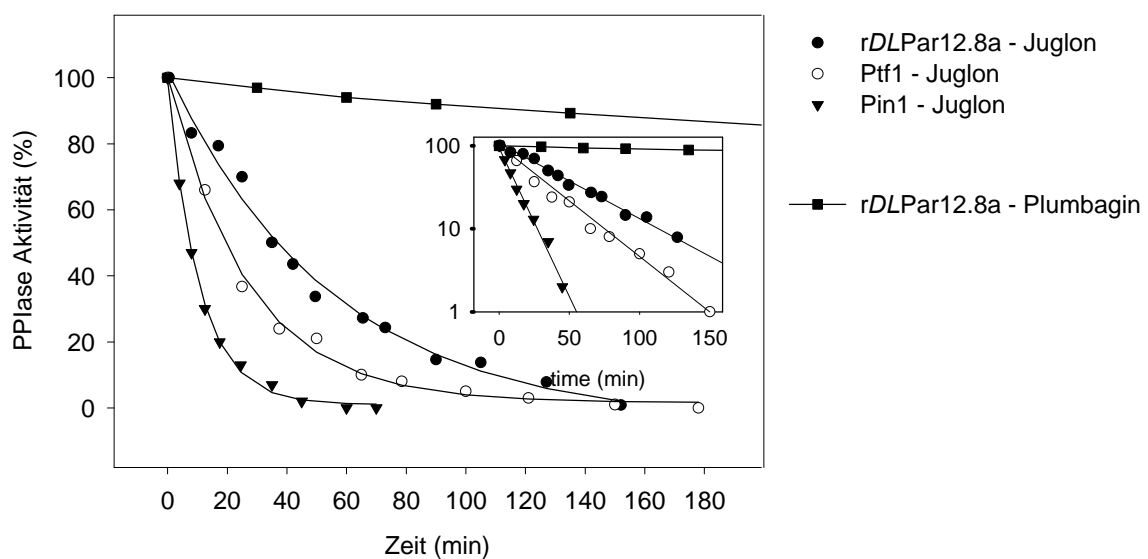


Abb. C-10: Inhibierung von rDLPar12.8a durch einen 10 molaren Überschuß von Juglon bei 10°C (gemessen im Protease-gekoppelten PPlase-Assay, B 2.3.). Die gemessenen Werte wurden nach einer Reaktionskinetik pseudo-erster Ordnung angepaßt, welche von Hennig et al. für die Inaktivierung von Par10 durch Juglon bestimmt wurde. Die Geschwindigkeitskonstante der vollständigen Inaktivierung von rDLPar12.8a durch Juglon wurde mit $3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ berechnet. Plumbagin zeigt nur einen geringen Einfluß auf die PPlase-Aktivität von rDLPar12.8a.

4. Die Gewebespezifität von DLPar12.8

DLPar12.8 wurde chromatographisch aus PEM's von *D. lanata* isoliert. Diese undifferenzierten somatischen Zellen, die in Suspensionskulturen kultiviert werden, sind nur wenig aussagekräftig in Bezug auf die Gesamtpflanze von *D. lanata*. Aus diesem Grund sollte

die Verteilung von *DLP*ar12.8 in der Gesamtpflanze von *D. lanata* auf Proteinebene und auf mRNA-Ebene untersucht werden.

4.1. Untersuchung zur Verteilung von *DLP*ar12.8 in *D. lanata* durch Western Blot-Analyse

Die Aufarbeitung des Pflanzenmaterials sowie die Durchführung des Western Blots erfolgten wie unter Punkt B 2.7. beschrieben.

Verwendet wurden zweijährige blühende Exemplare von *D. lanata* EHRH., die in die entsprechenden einzelnen Pflanzenteile zerlegt und mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren wurden. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

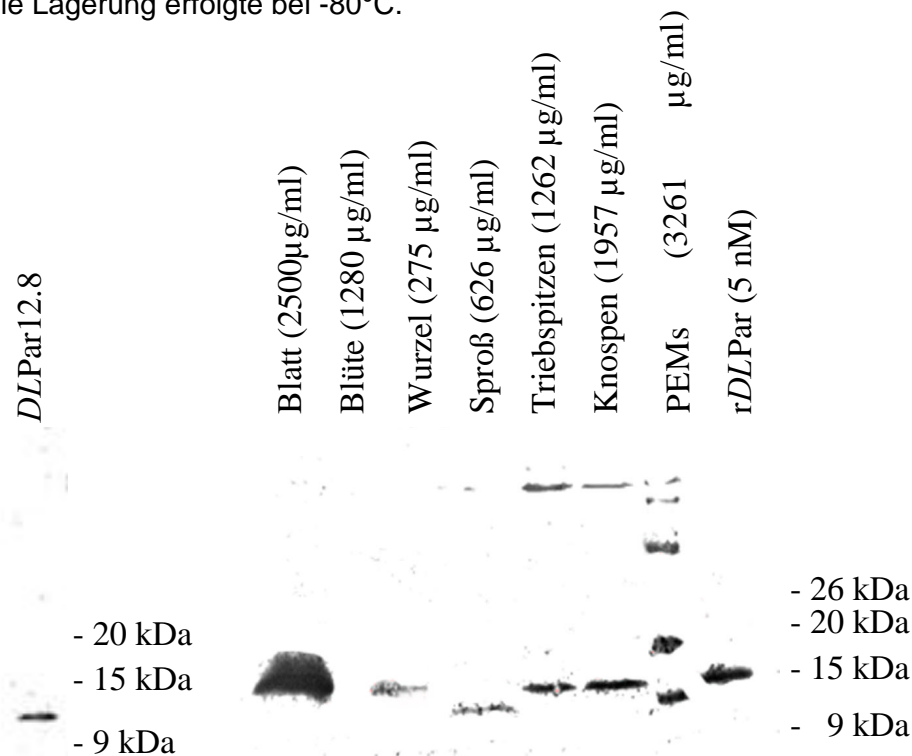


Abb. C-14: Western Blot-Analyse mit r*DLP*ar12.8a-Antikörper. Aufgetragen wurden Proteinextrakte aus verschiedenen Pflanzengewebe von *D. lanata* EHRH. Eindeutig erkennbar ist, daß die Signale aus Sproß und PEMs ein kleineres Molekulargewicht als die der übrigen Gewebe haben. Diese liegen im Bereich des Molekulargewichtes von r*DLP*ar12.8a (M_G 14807 Da).

Die Verwendung des anti-r*DLP*ar12.8a-AK zur Detektion von *DLP*ar12.8 ergab den in Abb. C-14 dargestellten Western Blot. In allen verwendeten Pflanzenteilen, außer den Blüten war ein Signal erkennbar. Auffallend war das Vorhandensein von Signalen in zwei verschiedenen Größen. Die Mehrheit der Signale liegt auf gleicher Höhe mit r*DLP*ar12.8a (M_G 14807 Da).

Jedoch gibt es zwei Ausnahmen: Das Signal aus der Sproßachse und aus PEMs besitzt ein kleineres Molekulargewicht. (In PEMs wurde es nach der chromatographischen Reinigung mittels MALDI-TOF-MS mit 12846 Da bestimmt.) Der Grund dieses Unterschiedes ist nicht bekannt. Auch die Ursache für das Fehlen eines Signals in Blüten ist unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Northern Blot-Analyse nicht zu erklären.

4.2. Northern Blot-Analyse von *dlpar12.8a*

Die Northern Blot-Analyse wurde durchgeführt wie von Scholze beschrieben (Dissertation, 1999). Verwendet wurde mRNA aus verschiedenen Pflanzenteilen von einjährigen und zweijährigen *D. lanata* Pflanzen, die freundlicherweise von A. Pangert (Institut für Pharmazeutische Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellt wurde. Als Ergebnis dieser Untersuchung läßt sich feststellen, daß Transkripte von *DLPAr12.8a* in allen verwendeten Geweben gefunden wurden. Die Transkriptmengen variieren in den verschiedenen Geweben nur schwach (Abb. C-15 A). Es wurden gleiche mRNA-Mengen geblottet, was aus der Kontrollhybridisierung zu erkennen ist (Abb. C-15 B). PEMs wurden durch Northern-Blot-Analyse bisher nicht untersucht.

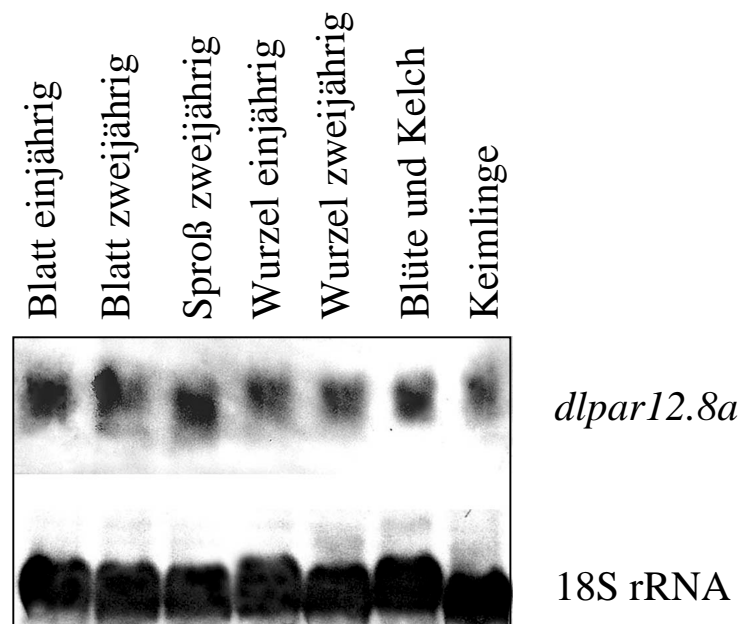


Abb. C-15: Northern Blot-Analyse, mit mRNA aus verschiedenen Pflanzenteilen von *D. lanata*. Als Sonde wurde die kodierende Sequenz von *dlpar12.8a* eingesetzt. Als Kontrolle für den gleichmäßigen Transfer der mRNA auf die Blotmembran wurde 18S ribosomale RNA verwendet (Dobrowolski et al., 1989).

4.3. Untersuchung zur zellulären Lokalisation von *DLP*ar12.8/*DLP*ar12.8a

Die Frage der zellulären Lokalisation von *DLP*ar12.8 bzw. *DLP*ar12.8a in PEMs wurde durch die Methode der differentiellen Zentrifugation untersucht. Dazu wurden PEMs wie unter B 2.4. beschrieben, aufgearbeitet. Durch eine Zentrifugation (100 000 x g) erfolgte eine Auftrennung in lösliche und unlösliche bzw. an Zellfragmente aggregierte Proteine. Das erhaltene Pellet wurde im gleichen Volumen wie der Überstand resuspendiert. Vom Überstand, suspendiertem Pellet und vom Homogenat wurden gleiche Proteinmengen durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot-Analyse auf die Anwesenheit eines phospho-spezifischen Parvulins hin untersucht (Abb. C-16).

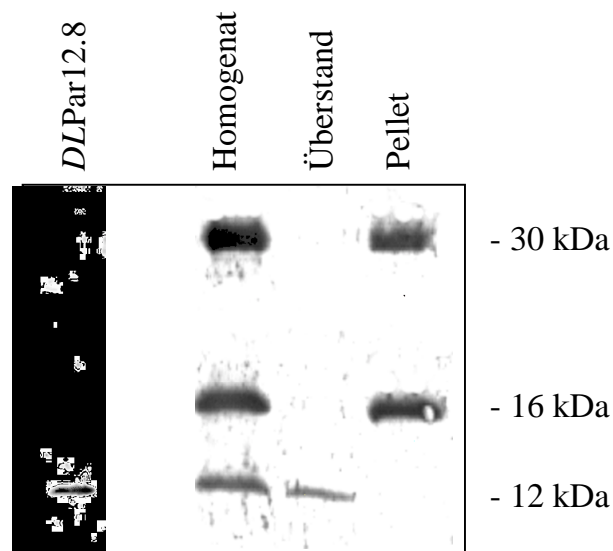


Abb. C-16: Western Blot zur Untersuchung der zellulären Lokalisation von *DLP*ar12.8 in PEMs durch differentielle Zentrifugation. Dabei ist zu erkennen, daß *DLP*ar12.8 stets nur im Rohextrakt und im Überstand der 100 000 x g Fraktion zu finden ist und sehr wahrscheinlich ein im Zytosol lokalisiertes Protein ist.

Dabei konnte festgestellt werden, daß im Homogenat und im Überstand der 100 000 x g Fraktion ein Signal im entsprechenden Molekulargewichtsbereich sichtbar ist. Dagegen ist in der Pelletfraktion nur ein sehr schwaches Signal nachzuweisen. Das deutet darauf hin, daß *DLP*ar12.8 bzw. *DLP*ar12.8a wahrscheinlich im Zytosol lokalisiert ist. Wäre es ein kernlokalisiertes, mitochondriales oder plastidäres Protein oder membranständig, so hätte das Signal aus der Pelletfraktion mindestens stärker bzw. sogar das stärkste Signal ergeben müssen.

4.4. Konzentrationsbestimmung von *DLP*ar12.8/*DLP*ar12.8a in PEMs

Mittels Western Blot wurde versucht, Rückschlüsse auf die Konzentration von *DLP*ar12.8/*DLP*ar12.8a in PEMs zu ziehen. Dazu wurde ein Eichreihe aus r*DLP*ar12.8a angefertigt. Die für die Eichreihe erhaltenen Signale wurden mit dem Signal aus PEMs verglichen. Aus der bekannten Konzentration von r*DLP*ar12.8a wurde die Konzentration von *DLP*ar12.8/*DLP*ar12.8a auf ungefähr 5 nM berechnet.

5. in-vivo-Untersuchungen an PEMs

5.1. Inkubation von PEMs mit Juglon und Plumbagin

Um den Einfluß des Parvulin-Inhibitors Juglon bzw. von Plumbagin auf PEMs zu untersuchen wurden verschiedene Konzentration der beiden Naphthochinone in Methanol gelöst und der Zellkultur zugefügt. Die Zellen wurden nach einem Tag geerntet, gewogen und mittels des TTC-Testes (Triphenyltetrazoliumchlorid; *Diettrich* et al., 1986) auf ihre Vitalität untersucht. Dabei zeigten beide Naphthochinone in vivo keinen Unterschied im Einfluß auf PEMs. Beide Substanzen führten im Bereich von 25 und 50 µM zu irreversiblen Schädigungen der Zellen. Ein spezifischer Einfluß von Juglon auf *DLP*ar12.8/*DLP*ar12.8a konnte nicht beobachtet werden.

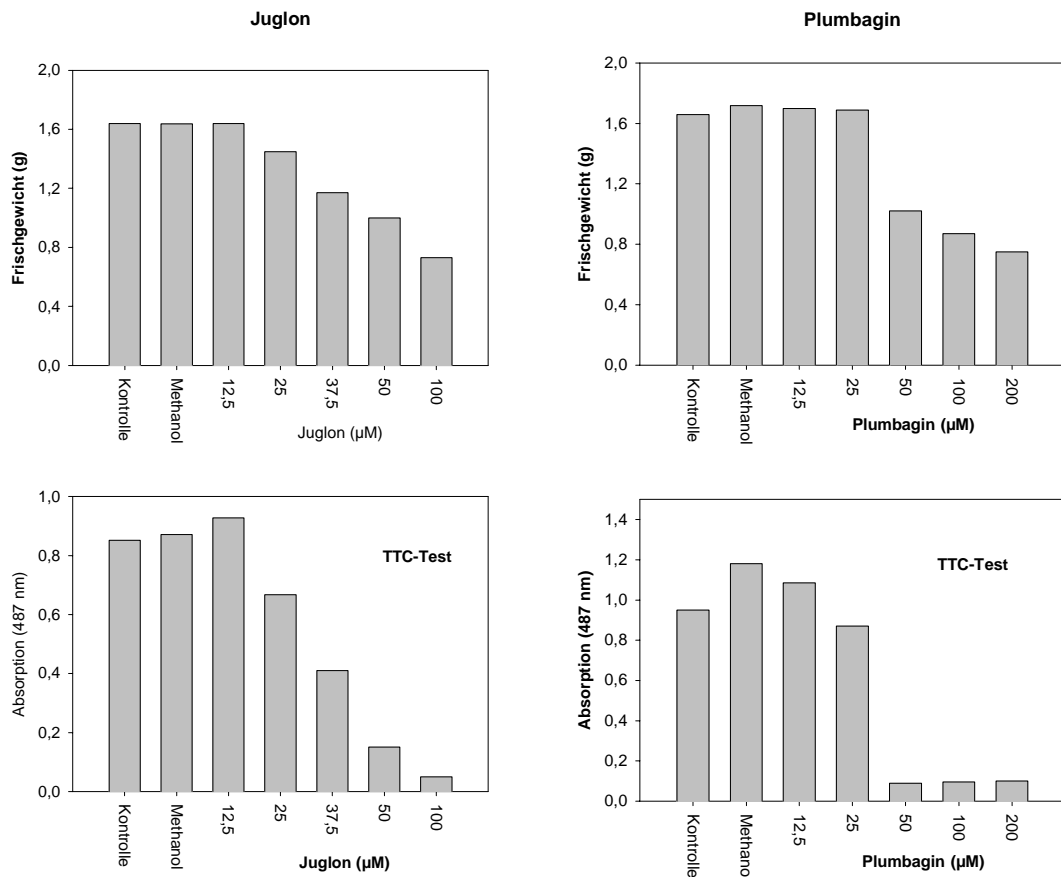


Abb. C-17: Untersuchungen zum Einfluß von Juglon und Plumbagin auf PEMs von *D. lanata*.

Beide Substanzen zeichnen ein ähnliches Bild in ihrer Wirkung auf PEMs. Im Konzentrationsbereich von 25 bis 50 µM erfolgt eine irreversible Schädigung der Zellen, was sich mittels Vitalitätstest (TTC-Test) zeigen ließ.

Mittels FACS-Analyse (Durchflußzytometrie, Fluorescence-Activated Cell Sorter) wurde der Einfluß beider Naphthochinone auf den DNA-Gehalt von PEMs untersucht, die mit verschiedenen Konzentration von Juglon oder Plumbagin für einen Tag inkubiert wurden. Es ließ sich eine Abnahme der Zellzahl beobachten, die sich in der G2/M-Phase des Zellzyklus befindenden. Dagegen hat die Anzahl der Zellen, die in der Phase G0-G1 sind, zugenommen. Auch hier ließ sich kein Unterschied zwischen Juglon und Plumbagin beobachten, so daß alle beobachteten Veränderungen wahrscheinlich auf die Naphthochinonstruktur zurückzuführen sind (Daten nicht gezeigt).

6. Untersuchungen zur Funktion von *DLP*ar12.8a

In Zusammenarbeit mit *K. P. Lu* und *Dr. G. Stoller* (Harvard Medical School, USA) wurden Untersuchungen zur Funktion von *DLP*ar12.8a durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurde eine Hefemutante (*S. cerevisiae*, Stamm YPM2, *Hani et al.*, 1999) verwendet, bei der das essentielle *Ess1/Ptf1*-Gen im Bereich der PPlase-Domäne eine Mutation trägt (G^{127D}). Dadurch ist der Hefestamm temperatursensitiv und kann lediglich bei 23°C, nicht jedoch bei 30-37°C wachsen. In diesem Hefe-Stamm wurden verschiedene PPlasen unter Kontrolle eines durch Galaktose induzierbaren Promoters exprimiert. Bei Verwendung von Glukose im Nährmedium erfolgt eine Repression und damit keine Expression der einklonierten PPlasen. Durch Expression von *hPin1* oder auch *Ess1/Ptf1* in diesem Stamm kann die Funktion des ausgeschalteten, natürlichen *Ess1/Ptf1* ersetzt und die Temperatursensitivität der Hefe aufgehoben werden und die Hefemutanten damit auch bei 37°C wachsen. Während die Hefemutante mit dem ausgeschalteten, natürlichen *Ess1/Ptf1* in einer letztlich letalen mitotischen Arretierung verharren, wird diese Arretierung durch die Expression von *hPin1* oder *Ess1/Ptf1* aufgehoben (*Lu et al.* 1996). Die Expression der PPlasen wurde durch Western Blot-Analyse kontrolliert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses Experiment ebenfalls mit der kodierenden Sequenz von *dlpar12.8a* durchgeführt, wobei als Kontrolle *hPin1* und pBC100 Vektor eingesetzt wurden. Die Fähigkeit, den temperatursensitiven Phenotyp zu retten, war nach 3-6 Tage zu beobachten.

Dabei zeigte sich, daß *DLPar12.8a* ebenso wie *hPin1* in der Lage ist, die Funktion des ausgeschalteten *Ess1/Ptf1* zu übernehmen und die Überlebensfähigkeit des Hefe-Stammes bei höheren Temperaturen (37°C) zu ermöglichen.

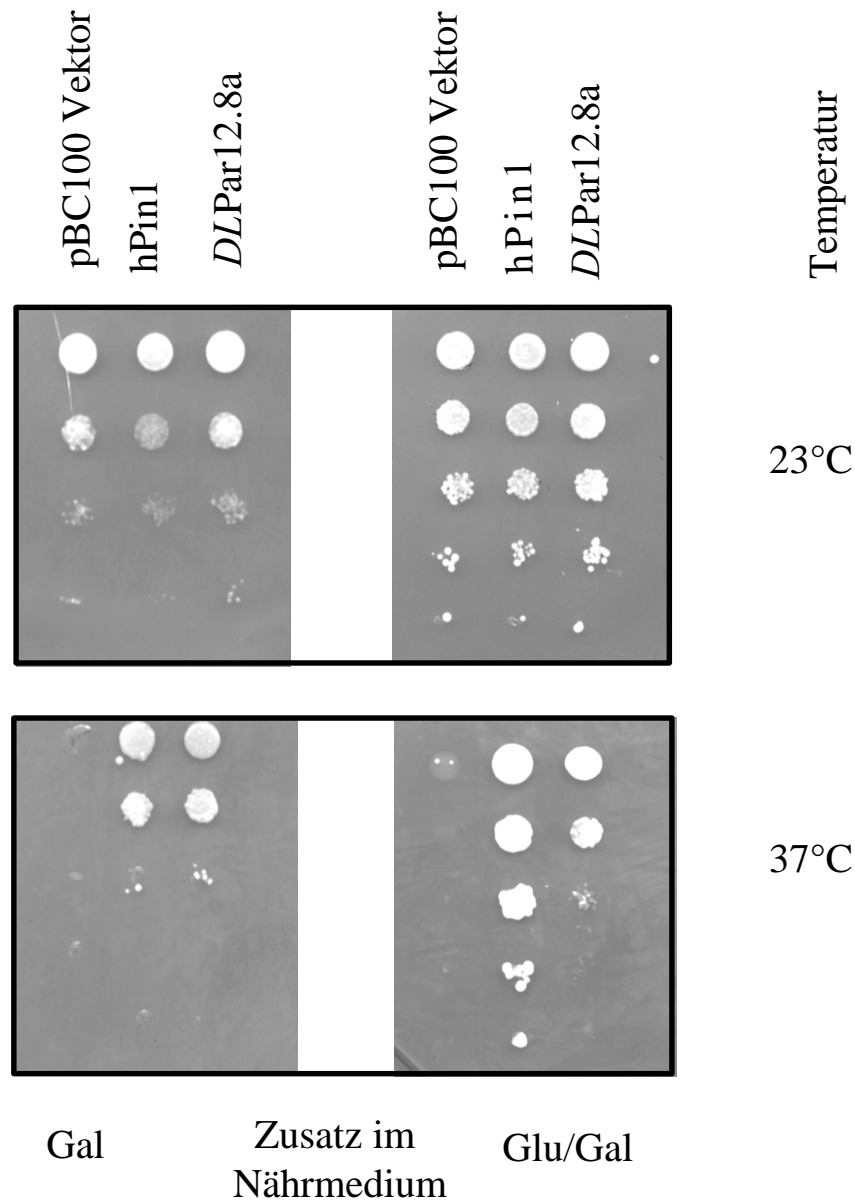


Abb. C-18: Darstellung des Wachstums verschieden transformierter Hefezellen des temperatursensitiven Stammes YPM2 bei 23°C und 37°C mit Galaktose (Gal) bzw. Galaktose/Glukose (Glu/Gal) im Nährmedium. Die Funktion von *DLPar12.8a* wurde untersucht mit Hilfe des YPM2-Stammes von *S. cerevisiae*, der eine temperatursensitive Mutation im essentiellen *Ess1/Ptf*-Gen enthält. Dadurch kann dieser Stamm nur bei niedrigeren Temperaturen wachsen (23°C), während bei höheren Temperaturen (30-37°C) ein terminaler (oder letaler) mitotischer Phänotyp ausgeprägt wird. Mit Hilfe des Galaktose-induzierbaren Expressionsvektors pBC100 wurden *dipar12.8a* und *hPin1* in diesem Stamm unter verschiedenen Temperaturen und Galaktosekonzentrationen exprimiert. Als negative Kontrolle wurde nur der Vektor transformiert. Jeweils 5 µl der

Zellsuspension wurden pro Kolonie aufgetragen. Ausgehend von einer $OD_{600}=1.0$ (obere Reihe) wurden Verdünnungen um jeweils eine Zehnerpotenz verwendet.

Bei Verwendung von Galaktose im Nährmedium erfolgt eine starke Expression von hPin1 und *DLP*ar12.8a. Bei 23°C ist kein Unterschied im Wachstum der verschiedenen transformierten Hefezellen zu beobachten. Die Hefe wächst ohne Einschränkung. Anders sieht es bei einer Temperatur von 37°C aus. Die Hefezellen des Stammes YPM2, in denen hPin1 bzw. *dipar12.8a* exprimiert werden, sind in der Lage, auch bei 37°C zu wachsen, während bei Verwendung des reinen pBC100 Vektors, die Hefezellen nicht imstande sind zu wachsen.

Die Konsequenz hieraus ist, daß *DLP*ar12.8a bei hoher Konzentration in der Lage ist, die essentielle Funktion von Ess1/Ptf1 zu ersetzen. Es ist kein quantitativer Unterschied zu hPin1 feststellbar.

Bei gleichzeitiger Verwendung von Glukose und Galaktose im Nährmedium erfolgte eine mäßige Expression von hPin1 und *DLP*ar12.8a. Bei 23°C ist kein Unterschied im Wachstum von pBC 100 Vektor, hPin1 und *DLP*ar12.8a zu beobachten. Bei 37°C sind wiederum nur die Hefezellen, in denen hPin1 und *dipar12.8a* exprimiert wird, in der Lage zu wachsen. Die Hefezellen, die nur den reinen pBC 100 Vektor exprimieren, zeigen kein Wachstum. Zwischen hPin1 und *DLP*ar12.8a ist bei mäßiger Expression jedoch ein quantitativer Unterschied feststellbar. *DLP*ar12.8a scheint weniger gut in der Lage zu sein, Ess1/Ptf1 zu ersetzen, als hPin1.

D Diskussion

1. Allgemeine Bemerkungen zu Strategie und Problemen während der chromatographischen Reinigung von *DLPar12.8*

Die Existenz von phospho-spezifischen Parvulinen in Mensch, Hefe, *D. melangoster* und deren Bedeutung in diesen Organismen sowie eine erste Teilsequenz aus *A. thaliana* legten die Vermutung nahe, ein homologes Parvulin auch in Pflanzen zu finden. Mit dem in der Seitenkette phosphorylierten Substrat Ac-Ala-Ala-pSer-Pro-Arg-NH-Np wurde deshalb in Homogenaten von PEMs aus *D. lanata* zunächst nach einer detektierbaren PPlase-Aktivität gesucht. Diese ließ sich nachweisen. Vor einer chromatographischen Reinigung des die PPlase-Aktivität hervorrufenden Proteins mußte jedoch abgesichert werden, daß es sich bei der nachgewiesenen PPlase-Aktivität nicht um eine, durch andere PPlasen hervorgerufene Aktivität handelt. Denkbar wäre zum Beispiel, daß Cyclophilin das verwendete phosphorylierte Substrat zwar sehr viel schlechter erkennt, aber durch eine wesentliche höhere Konzentration in der Zelle die schlechte Substraterkennung kompensiert. Somit würde Cyclophilin das Vorhandensein einer phospho-spezifischen PPlase vortäuschen.

Diese Absicherung wurde durch zwei Strategien realisiert. Zum einen erfolgte eine Hemmung von Cyclophilinen und FKBP's durch deren spezifische Inhibitoren CsA und Fk 506 sowie in einem weiteren Versuch eine Hemmung des vermutlichen Parvulins durch dessen spezifischen Inhibitor Juglon. Die nach Cyclosporin A/FK 506-Inhibierungsversuch detektierbare Aktivität in PEMs mit dem Substrat Ac-Ala-Ala-pSer-Pro-Arg-NH-Np sollte von einem phospho-spezifischen Parvulin stammen. Eine gleichzeitig durchgeführte Aktivitätsbestimmung mit Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-NH-Np zeigte dagegen die vollständige Inhibierung vorhandener Cyclophiline bzw. FKBP's.

Eine separat durchgeführte Inkubation von PEMs mit Juglon sollte mit dem Substrat Ac-Ala-Ala-pSer-Pro-Arg-NH-Np keine Aktivität, dagegen bei gleichzeitiger Bestimmung mit dem Substrat Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-NH-Np PPlase-Aktivität anzeigen.

Diese beiden Hypothesen konnten experimentell bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Dadurch konnte relativ sicher angenommen werden, daß die mit dem phosphorylierten Substrat Ac-Ala-Ala-pSer-Pro-Arg-NH-Np in PEMs bestimmte PPlase-Aktivität nicht durch Cyclophiline oder FKBP's verursacht wird, sondern einem Parvulin zuzuordnen ist. Um jedoch vollständige Sicherheit zu erhalten, erfolgte noch ein weiteres Experiment.

Diese zweite Strategie ergab sich aus der Tatsache, daß von *Liebau* (Dissertation, 1995; *Kültertz et al.*, 1999) Cyclophiline als am häufigsten vertretene PPlasen von *D. lanata* beschrie-

ben worden sind und Cyp18.0 wiederum der häufigste Vertreter der Cyps ist. Cyp18.0 war durch die Arbeiten von *Scholze* (Dissertation, 1998) als rekombinantes Fusionsprotein vorhanden und konnte somit auf seine Substratspezifität hinsichtlich der beiden oben erwähnten Substrate untersucht werden. Aus dem Ergebnis eines 90 fachen besseren Erkennens von Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-NH-Np durch rekombinantes Cyp18.0, konnte abgeleitet werden, daß die mit Ac-Ala-Ala-pSer-Pro-Arg-NH-Np gemessene PPlase-Aktivität nicht durch Cyps vorge-täuscht sein konnte.

Durch diese Vorversuche schien es relativ sicher, daß es sich wirklich um ein bisher nicht be-kanntes, phospho-spezifisches Parvulin handelt.

Die chromatographische Reinigung von *DLPar12.8* war durch mehrere Probleme gekenn-zeichnet. Die Konzentration dieser PPlase in den PEMs wurde nachträglich mittels Western Blot-Analyse auf etwa 5 nM berechnet. Verglichen mit hPin1, für das ein Wert von 500 nM gefunden wurde (*Shen et al.* 1998), ist das sehr gering und verdeutlicht noch einmal die Schwierigkeit der chromatographischen Reinigung.

Hinzu kam eine hohe Empfindlichkeit gegenüber äußeren Einflüssen wie Temperatur oder Zeitdauer der Lagerung, die zum Verlust der PPlase-Aktivität führte. Dadurch war es zwin-gend notwendig, die zeitliche Dauer der Reinigung so kurz wie möglich zu halten. Das wurde durch die Verwendung des unter C 1.2.5. beschriebenen Reinigungsschema gewährleistet.

Eine weitere nicht zu unterschätzende Schwierigkeit war, daß die Menge an *DLPar12.8* wäh-rend der Reinigung nicht groß genug war, um das Enzym durch SDS-PAGE sichtbar zu ma-chen. Erst nach dem letzten Reinigungsschritt war es möglich, *DLPar12.8* durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung überhaupt sichtbar zu machen.

Da ein spezifischer Antikörper für die Detektierung von *DLPar12.8* während der chroma-tographischen Reinigung nicht zur Verfügung stand, war der sehr empfindliche PPlase-Assay mit Ac-Ala-Ala-pSer-Pro-Arg-NH-Np als Substrat die einzige Möglichkeit, das Enzym nachzu-weisen.

Problematisch war die Koelution von zwei Acyl-CoA bindenden Proteinen (ACBPs, M_G ca. 10000 Da), die über drei Säulen (DEAE, AF-Blue, Superdex 75) sich genauso, wie die ge-suchte PPlase verhielten und dadurch lange Zeit vortäuschten, diese PPlase zu sein. Das Molekulargewicht der 3 Proteine ist ähnlich groß, jedoch differieren die isoelektrischen Punkte deutlich voneinander (*DLPar12.8a*: IP 8.7; ACBPs: IP 5.8).

Letztlich gelang es aber, *DLPar12.8* von beiden ACBPs durch RP-HPLC an einer C18-Säule zu trennen und damit gleichzeitig die Existenz von Isoformen des ACBPs nachzuweisen (*Metzner et al.*, 2000a; siehe C 1.2.4). Ob diese Koelution ein zufälliges Produkt ist oder beide

Proteine Interaktionspartner sind, bleibt unbeantwortet. ACBP wurde als zytosolisches Protein (*Knudsen et al.* 1989) beschrieben, ebenso wie *DLP*12.8 zytosolischer Herkunft zu sein scheint (siehe C 2.8.3.). Die genannten Eigenschaften, wie IP und Lokalisation des Proteins reichen jedoch nicht aus, um auf eine physiologische oder zufällige Interaktion beider Proteine zu schließen. Eine genauere Untersuchung wäre nötig, so daß es hier lediglich um die Erwähnung dieser Beobachtung geht. Da beide ACBPs kein -Ser/thr-Pro- Motiv besitzen, sollten ACBPs zumindest nicht als natürliche Substrate von *DLP*12.8 in Frage kommen.

Die durch Sequenzierung gewonnene Partialsequenz 1 von *DLP*12.8 stammt aus dem hochkonservierten Bereich der Parvuline und erlaubt dadurch die Zuordnung von *DLP*12.8 zur Familie der Parvuline aufgrund der Sequenzhomologie. Gleiches gilt für die Partialsequenz 2, die zwar eine geringere Konservierung zeigt, jedoch auch eine eindeutige Zuordnung zur Parvulinfamilie erlaubt. Da durch die RP-HPLC-Trennung *DLP*12.8 als homogenes Protein vorlag und PPlase-Restaktivität nachweisbar war, ergeben Sequenzierung und Aktivitätsmessung zusammen einen eindeutigen Beweis für die Zugehörigkeit von *DLP*12.8 zur Parvulin-Subfamilie der phospho-spezifischen Parvuline.

2. Die cDNA-Sequenz *dipar12.8a*

2.1. Die aus *dipar12.8a* abgeleitete Aminosäuresequenz *DLP*12.8a

Die kodierende Sequenz von *dipar12.8a* besteht aus 354 bp. Die korrespondierende Aminosäuresequenz *DLP*12.8a besteht aus 118 Aminosäuren. Das theoretische Molekulargewicht wurde mit 12834 Da errechnet. Die Bestimmung des Molekulargewichtes vom chromatographisch aufgereinigten *DLP*12.8 mittels MALDI-TOF-MS ergab ein Molekulargewicht von 12846 Da und damit eine Abweichung von 12 Da. Da sich beide Proteine in ihrer Aminosäuresequenz geringfügig unterscheiden, zeigt das ähnliche Molekulargewicht lediglich, daß *DLP*12.8 und *DLP*12.8a sehr ähnliche Proteine sein müssen.

Der theoretische isoelektrische Punkt von *DLP*12.8a wurde zu pH 8.9 berechnet. Eine experimentelle Bestimmung des IP erfolgte aufgrund der geringen vorhandenen Menge von *DLP*12.8 nicht.

2.2. Vergleich von *DLP*ar12.8a mit anderen Parvulinen

2.2.1. Diskussion des Aminosäuresequenzvergleiches

*DLP*ar12.8a zeigt die von *Rudd* et al. (1995) und *Maleszka* et al. (1997) beschriebenen, für Parvuline typischen, Sequenzmotive. Das sind drei in allen Parvulinen hochkonservierte Motive, die im folgenden Sequenzvergleich der PPlase-Domänen bekannter Parvuline in Abb. D-1 im grau unterlegten Rahmen mit den Ziffern 1-3 bezeichnet, dargestellt sind.

```

ECPAr10 --MAKTAALHILVK-----EKLALDLELQIKNGADFGKLAKKHSTC
HSPAr14 KGGNAVKVRHILCE-----KHGKIMEAMEKLLKSGMRFNEVAAQYSED
EANifM FVRPEQRYTRHLLLT-----VEGNSPAVREQIDAIARRLRDGHALFARQALRYSHC
KPNifM FMRPEQRLTRHLLLT-----VDNDREAVHQIRILGLYRQINASRDFAFAPLAQRHSHC
ACNifM FKVPARHKARHILVT-----INEDFPENTREAAARTRIEAILKRLRGKPERFAEQAAKHSEC
AVNifM QFKVPAQHKAHILVT-----INEDFPENTREAAARTRIEAILKRLRGKPERFAEQAMKHSEC
PANifM LLGPWRLQLRHVLLA-----CAPDDLEGRETARKQAAELLDLGRGHPERFVDLARRFSAC
CSPAr - MADKIKCSHILVK-----KQGEALAVQERLKAGEKFGKLAKELSID
RPPrsA LKGKEQIKVAHILVK-----SQKEANTVKTKLSKGNFTKLAEFSLD
CEPar KGGGTAVKVRHILCE-----KQKALEAIEKLLKSGMKFNEVAAQYSED
HPPAr LFKVQEAHARHILVK-----TEDEAKRIISEIDKQPKAKKEAKFIELANRDTIDPNSKN
CjCbf2 YVKPARVQAKHILVA-----TEKEAKDIINELKGLKGEKELDAKFSELAKESID
BSPrsA EGLKGKIRASHILVA-----DKKTAEEVEKLLKKGKEFEDLAKEYSTD
BSPAr -----SRILLAAVILSSVF
DDPar -----
BBPar FVNPDISRVSHIFFS-----TKDKKRSSVLDQAKNILSQIRSKITFEEAVRKYSND
ATPar25 VVRCRTQFGLHLLQV-----LSREPVKDIQVEEL---HSKM
    
```

| | | | |
|------------|--|---|-------------------------------|
| hPin1 | QGE PAR VRCS HLLV K HSQS RR PSSWRQEK | --ITRTKEEALELINGYIQIKSGEE-- | DFESLASQFSD C |
| MSPin1 | QGE PAK VRCS HLLV K HSQS RR PSSWRQEK | --ITRSKEEALELINGYIQIKSGEE-- | DFESLASQFSD C |
| DMdodo | GDAPDEVHCL HLLV K HKGS RR PSSWREAN | --ITRTKEEALELINGYIQIKSGEE-- | DFESLASQFSD C |
| DLPar12.8 | | | |
| DLPar12.8a | MSSEKVRAS HILL K HQGS RR KSSWKDPD | GS LISAT TRDDAVS QLQ SLRQ ELLSD PA SFSD LA SRH SH C | |
| ATPar13 | MASRDQVKAS HILL K HQGS RR KASWKDPE | KG II LTTT TREAA VEQLKS IRE DIVSGKAN FEE VATRVSD C | |
| NCSspl | QQPQGIKCA HLLV K HNQS RR PSSWRESE | --ITRTKQEA LT T LQGF EQRIKSGSI-- | SLGELAL TESD C |
| ENPar | PSQEGKIRCS HLLV K HRDS RR PSSWREAE | --ITRTKEEA RE ILRG HQ ERIMRGEI-- | RLGDLAM SESD C |
| SPPAr | ASNSPKIRAS HLLV K HRES RR PSSWKEEH | --ITRSKEEA R KLAEHYEQ LLK SGSV-- | SMHDLAM KESD C |
| SCEss1a | VRV RCL HILL K HKDS RR PASHRSEN | --ITRTKEEA Q LLLE VYR NKIVQ QEA -- | TFDELARSYSD C |
| SCEss1Ptfl | VRV RCL HILL K HKDS RR PASHRSEN | --ITIS KQ DATDEL KTL TRLD DD SKT SF EALAKERS D | |
| DDPinA | SSEPKTV TCR HLLV K HQGS RR NPSSWRESK | --ITRTKERAI AKL NEYRATI IS GSA-- | TFEDLA HKN SD C |
| |1111ssssssssssssss..... | | 222222222222 |

```

ECPAr10 PSGKR-GGDLGEFRQQ-----MVPAFDKVVFSCPVLEPTG-----PLHTQFGYHIIKVLY 91
HSPAr14 KARQ---GGDLGWMTRGS-----MVGPFQEAAFALPSGMDKPVFTDPPVKTKFGYHIIMVEG 129
EANifM PSAMG-GGVLGWVGRGI-LYPQLEDTLFRLEAQLSS-----PVETELGWHLLLCEQ 225
KPNifM PSALE-EGRLGWISRGL-LYQLETALFLSLAENALSL-----PIASELGWHLLWCEA 221
ACNifM PTAMQ-GGLLGEVVPGT-LYPELDACLFQMAQQLSP-----VLESPIGFHVILFCES 244
AVNifM PTAMQ-GGLLGEVVPGT-LYPELDACLFQMARGELSP-----VLESPIGFHVILYCES 243
PANifM PSKES-GGDLGWIEPGQ-----TVPEFEKRLLRRAPGLLEH-----PLESRYGLHVVELLA 194
CSPAr GGSAKRDGSLGYFGRGK-----MVKPFEAAFRLQVGEVSE-----PVKSFGYHVIKRGL 92
RPPrsA KATASNGGIIGYILNQ---PGQLVPEFEQKAFALKVNVST-----PVKTSFGWHIIKVLE 231
CEPar KARS---GGDLGWMTRGS-----MVGPFQDAAFALSNSSCDKPIYTDPPVKTKFGYHVIMVEG 124
HPPAr AQN---GGDLGKFQKNQ-----MAPDFSKAAFALTPGDYTKT-----PVKTEFGYHIIYLIS 253
CjCbf2 PGSKNQGGELGWFDQST-----MVKPFTDAAFALKNGTITTT-----PVKTNFGYHVILKEN 228
BSPrsA SSASK-GGDLGWFAKEGQ-----MDETFSKAAFLKTGEVSD-----PVKTQYGYHIIKKTE 224
BSPAr SITYL-QSDLGWFAKEGQ-----MDETFTKAFLKTGEVSDPLESTAQA-----IW----- 61
DDPar GDPRQRGGDLGWAPATN-----YVQPFAEAVTKLKGQLVDK-----PVQTQFGWHVIQVDD 52
BBPar ESSKAKNGDLGFLSRGDQNAQNLLGADFVKEVFNKGDISS-----PIASKEGFHVIKVTE 273
ATPar25 QDPVFMDEAQLIDVREPNEIEIASLPGFKVFLRAPDITSKLNPEKDTFVLCKVG-----182
    
```

| | |
|-------------|--|
| hPin1 | SSAKA-RGDLG AF SR Q -----M QK P F E DA S FAL RT GEM SG-----P V F T D S G HI I L R TE 163 |
| MSPin1 | SSAKA-RGDLG GF SR Q -----M QK P F E DA S FAL RT GEM SG-----P V F T D S G HI I L R TE 165 |
| DMdodo | SSAKA-GGDLG KF GR Q -----M QA A F E DA A F L N V NQ LS G -----I V D S D SGL HI I L R KA 166 |
| DLPar12.8 | ----R-GGDLG SF GR Q -----M QK P F E D A T F GL K-----I V D S D SGL HI I L R KA 25 |
| DLPar12.8a | SSAKR-GGDLG GF GR Q -----M QK P F E E A T F AL K VGE I SD -----I V D T D SGV HI I K R TG 118 |
| ATPar13 | SSAKR-GGDLG SF GR Q -----M QK P F E E A T Y AL K VGD I SD -----I V D T D SGV HI I K R TA 119 |
| NCSspl | SSARK-RGDLG YF GR GD -----M QK E F E DA A F L K P GE I SD -----I V D T A SGL HLL I ER L E 182 |
| ENPar | SSARK-KGDLG FF GR GE -----M QK E F E E A A F AL Q P G V SD-----I V E S G SGL HLL I ER L Q 177 |
| SPPAr | SSARR-GGELG EF GR DE -----M QK P F E DA A F L K P GE I SG -----V V E T S S G F HI I Q R VA 176 |
| SCEss1 | SSAKR-GGDLG WF GR GE -----M Q P S F E DA A F L K VGE VSD-----I V E S G SGV HV I K R V 190 |
| SCEss1/Ptfl | SSYKR-GGDLG WF GR GE -----M Q P S F E DA A F L K VGE VSD-----I V E S G SGV HV I K R V 170 |
| DDPinA | SSAKR-GG YLD P F K R G Q -----M Q R P F E D CA F SL K VGE V S G-----I V D T D SGV HI I ER L A 243 |
| | 222222222222.....333333333333..... |

Abb. D-1: Vergleich der Aminosäuresequenzen einiger bekannter Parvuline und phosphospezifischer Parvuline aus verschiedenen Spezies. Verglichen wurde lediglich die PPlase-Domäne der Parvuline (Rudd et al., 1995; Maleszka et al., 1997). Fett eingerahmt und ohne farbliche Unterlegung dargestellt wurde die Parvulin-Subfamilie der phospho-spezifischen Parvuline. Der mit s hervorgehobene und ebenfalls umrahmte Abschnitt ist nach Ranganathan et al. (1997) für die Bindung von, in der Seitenkette phosphorylierten Substraten, verantwortlich. Die für die Bindung entscheidenden Aminosäuren sind rot hervorgehoben. Die mit den Ziffern 1, 2, 3 bezeichneten und grau unterlegten Rahmen kennzeichnen drei konservierte Motive der PPlase-Domäne (Rudd et al., 1995; Maleszka et al., 1997). Verwendete Datenbank-Einträge: *E. coli* ECPar10: P39159; *H. sapiens* HSPar14: 5453902; *Enterobacter agglomerans* EANifM: CAA68024; *Klebsiella pneumoniae* KPNifM: P08534; *A. chroococcum* ACNifM: P23119; *Azotobacter vinelandii* AVNifM P14890; *Pseudomonas aeruginosa* PANifM: CAA75544; *Cenarchaeum symbiosum* CSPar: AAC62692; *Rickettsia prowazekii* RPPrsA: CAA15023; *Caenorhabditis elegans* CEPar CAB55116; *Helicobacter pylori* HPPar AAD05744; *Campylobacter jejuni* CJCbf2: Q46105; *B. subtilis* BSPrsA: P24327; *B. subtilis* BSPar: I40003; *D. discoideum* DDPPar P40415; *Borrelia burgdorferi* BBPar AAC66497; *A. thaliana* ATPar25: CAB06699; *H. sapiens* hPin1: 5453898; *Mus sp.* Pin1: BAA87037; *D. melangoster* DMDodo: AAC46958; *A. thaliana* ATPar13: AAD20122; *D. lanata* DLPar12.8a: AJ133755; *N. crassa* NCSsp1: CAA06818; *Emmericella nidulans* ENPar AAC49984; *Schizosaccharomyces pombe* SPPar CAA20742; *S. cerevisiae* Ess1: 6322478; *S. cerevisiae* Ess1/Ptf1: S52764; *D. discoideum* DDPinA: AAB36960.

Durch Auswertung der Kristallstruktur von hPin1 beschrieben Ranganathan et al. (1997) die Histidine der Motive 1 und 3 sowie Serin des Motivs 3 zusammen mit dem zu Motiv 2 gehörenden Cystein (in Abb. D-1 blau hervorgehoben bzw. unterstrichen; in hPin1: His⁵⁹, Cys¹¹³, Ser¹⁵⁴, His¹⁵⁷) als einen Cluster, in dem das Cystein das katalytische Nukleophil darstellt. In der gleichen Arbeit wurden 3 positiv geladene Aminosäuren am C-terminalen Ende des in Abb.: D-1 mit s bezeichneten Motivs (in hPin1: Lys⁶³, Arg⁶⁸, Arg⁶⁹; rot dargestellt) als Substratbindungstasche beschrieben, die aufgrund ihrer Ladung in der Lage sind, mit in der Seitenkette phosphorylierten Substraten wechselzuwirken. Die Phosphorylierung von Threonin oder Serin in der Position P₁ zu Prolin in Tetra- oder Pentapeptidsubstraten führt zu einer sauren Seitenkette, für die hPin1 und die anderen phospho-spezifischen Parvuline eine starke Präferenz zeigen.

*DLP*12.8a fügt sich in den in Abb. D-1 dargestellten Sequenzvergleich gut ein. Es besitzt die für Parvuline als typisch beschriebenen Sequenzmotive 1, 2 und 3. Mit der Unterfamilie der phospho-spezifischen Parvuline teilt *DLP*12.8a den zusätzlichen Sequenzeinschub, der für die Substratbindung verantwortlich ist (in Abb. D-1 Motiv durch s gekennzeichnet).

2.2.2. *DLP*12.8a und die WW-Domäne

Auffällig beim Vergleich der kompletten Aminosäuresequenzen von phospho-spezifischen Parvulinen in Abb. C-7 ist, daß *DLP*12.8/*DLP*12.8a und *ATP*13 viel kleinere Proteine sind, als die anderen bekannten Vertreter. *Ess*1/*Ptf*1, *hPin*1 und *Ssp*1 sind durch eine zusätzliche sogenannte WW-Domäne (*Bork* und *Sudol*, 1994; *Sudol* et al., 1995; *Einbond* und *Sudol*, 1996) charakterisiert, die N-terminal zur PPlase Domäne lokalisiert ist und als Protein-Protein-Interaktionsmodul beschrieben wurde (siehe Abb. C-7).

Bei einer ganzen Anzahl eukaryotischer, funktionell nicht verwandter Proteine (etwa 170), wie humanem Dystrophin, dem Yes associated protein (YAP), *Nedd*4 aus Maus oder dem FE65-Protein ist das Vorhandensein der WW-Domäne bekannt (*Yagi* et al., 1999; *Chen* et al. 1995, 1997; *Harvey* et al., 1999a, b; *Komuro* et al., 1999a, b; *Pirozzi* et al., 1997).

Verschiedene veränderte Varianten von *Ess*1/*Ptf*1, bei denen die konservierten Tryptophane der WW-Domäne gegen Phenylalanin bzw. Valin ausgetauscht wurden, wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit getestet, in einer *S. cerevisiae* Mutante (siehe C 6.), in der das essentielle *Ess*1/*Ptf*1 ausgeschaltet war, die Funktion des ausgeschalteten Proteins zu ersetzen. Dabei war kein Unterschied der *Ess*1/*Ptf*1-Varianten zum unveränderten *Ess*1/*Ptf*1 zu beobachten.

Ein gleichartig gelagertes Experiment mit Dodo aus *D. melanogaster* zeigte dabei folgendes: ein Austausch eines einzelnen der beiden Tryptophane der WW-Domäne gegen ein Alanin wird toleriert, nicht jedoch ein gleichzeitiger Austausch beider Tryptophane gegen Alanin. *Hanes* et al. (1997) leiten daraus eine große Bedeutung der WW-Domäne in vivo ab.

Sowohl *Lu* et al. (1999) als auch *Zhou* et al. (1999) charakterisieren die WW-Domäne als essentiell für die Funktion von *hPin*1 in vivo. Ihre Bedeutung wird mit der Fähigkeit beschrieben, phosphorylierte Proteine zu binden, die während der Mitose eine wichtige Rolle spielen. Zwar ist auch die PPlase-Domäne von *hPin*1 in der Lage phosphorylierte Peptide zu binden, jedoch scheint hauptsächlich die WW-Domäne die Funktion eines pSer-Bindungsmoduls zu haben. Versuche mit der bereits erwähnten, temperatursensitiven *Ess*1/*Ptf*1-Mutante (siehe C 6.) zeigten, daß weder die WW-Domäne noch die PPlase-Domäne von *hPin*1 allein in der Lage waren, die natürliche Funktion von *Ess*1/*Ptf*1 zu ersetzen und ein Wachstum der Mutante bei 37°C zu ermöglichen. Nur intaktes *hPin*1, bestehend aus WW- und PPlase-Domäne, ermöglichte das

Wachstum. Ähnliche Versuche mit hPin1-Varianten, die Mutationen in der WW-Domäne trugen, konnten nur dann die Ess1/Ptf1 Funktion ersetzen, wenn sie auch gleichzeitig in der Lage waren, Phospho-Proteine wie z.B. die Phosphatase Cdc25C, die Kinase Myt1 oder Plk1 zu binden. Aus diesen Experimenten wurde von Lu et al. (1999) die essentielle Funktion der WW-Domäne abgeleitet.

Nun sind *DLP*12.8/*DLP*12.8a und *ATP*13 die ersten beiden charakterisierten bzw. vollständig sequenzierten phospho-spezifischen Parvuline, denen diese Domäne fehlt. Welche Auswirkungen das auf unterschiedliche Funktionen der pflanzlichen Vertreter gegenüber den anderen phospho-spezifischen Parvulinen hat, muß jedoch noch genauer untersucht werden. Bei Untersuchungen zur Substratspezifität wurde bei Verwendung phosphorylierter Peptidsubstrate für *rDLP*12.8a ähnliche k_{kat}/K_M -Werte berechnet wie für hPin1 oder Ess1/Ptf1. Für die entsprechenden unphosphorylierten Varianten der Substrate lagen die k_{kat}/K_M -Werte jedoch niedriger als bei hPin1 und Ess1/Ptf1. Dadurch ist auch der Unterschied zwischen phosphoryliertem Substrat und unphosphoryliertem Substrat bei *rDLP*12.8a noch deutlicher ausgeprägt als bei hPin1 oder Ess1/Ptf1 (vgl. C 3.1.).

Die Inaktivierung von *DLP*12.8a durch Juglon ist in Abb. C-10 dargestellt. Verglichen mit hPin1 und Ess1/Ptf1 wurde für *DLP*12.8a eine kleine Geschwindigkeitskonstante berechnet. Es ließ sich jedoch kein Einfluß der WW-Domäne feststellen, da die Geschwindigkeitskonstanten von hPin1 und Ess1/Ptf1 (mit WW-Domäne) genauso stark von einander abwichen wie z.B. die von Ess1/Ptf1 und *DLP*12.8a (vgl. C 3.2.).

Untersuchungen mit *DLP*12.8a und der temperatursensitiven Ess1/Ptf1-Mutante zeigten, daß *DLP*12.8a in der Lage ist, die Funktion von Ess1/Ptf1 zu ersetzen (siehe Punkt C 6.; D 6.). Das heißt, daß die WW-Domäne zumindest in den pflanzlichen Vertretern nicht essentiell für deren Funktion zu sein scheint. Daraus Rückschlüsse auf die Bedeutung der WW-Domäne für hPin1 oder Ess1/Ptf1 abzuleiten, wäre verfrüht, da alle bisherigen Ergebnisse aufzeigen, daß die WW-Domäne essentiell für die in vivo Funktion dieser beiden phospho-spezifischen Parvuline ist. Trotzdem bleibt zu untersuchen, was die pflanzlichen Vertreter in die Lage versetzt, ohne WW-Domäne auszukommen. Dazu sind jedoch genauere Untersuchungen über die in vivo Funktion der pflanzlichen phospho-spezifischen Parvuline in einem pflanzlichen System nötig.

Zusammenfassen lassen sich die bisherigen Ergebnisse über die Rolle der WW-Domäne wie folgt: Sowohl bei der Substratspezifität, der Inaktivierung durch Juglon als auch bei den Untersuchungen zur Funktion von *DLP*12.8a in Hefezellen konnte überraschenderweise kein Einfluß der WW-Domäne beobachtet werden. Dieses Ergebnis relativiert scheinbar die von Hanes et al. (1997) und Lu et al. (1999) gefundenen Ergebnisse über die Bedeutung der WW-Domäne.

2.2.3. Vergleich von *DLP*ar12.8a mit dem homologen pflanzlichen Vertreter aus *A. thaliana*

Von Lin et al. (1999) wurde der homologe Vertreter von *DLP*ar12.8/*DLP*ar12.8a aus *A. thaliana* isoliert, sequenziert und in die EMBL-Datenbank als vermutliche PPlase eingetragen (AC AAD20122). Nach Generierung von Oligonukleotidprimern wurde *atpar13* im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus *A. thaliana* cDNA mittels PCR amplifiziert, kloniert und in *E. coli* überexprimiert. Für rATPPar13 konnte PPlase-Aktivität nachgewiesen werden und damit die Vermutung experimentell bestätigt werden, daß ATPPar13 tatsächlich eine PPlase ist. Nach Aufreinigung des Enzyms konnte weiterhin die Präferenz von rATPPar13 für in der Seitenkette phosphorylierte Peptidsubstrate nachgewiesen werden (Lohaus, Diplomarbeit, 2000). Sequenzvergleiche der DNA- und der Aminosäuresequenz der phospho-spezifischen Parvuline von *A. thaliana* und *D. lanata* zeigen eine sehr hohe Homologie.

Vergleich der Nukleinsäuresequenzen von *atpar13* und *dlpar12.8a*

```

atpar13      ATGGCGTCGAGAGACCAAGTTAAGGCATCGCACATTTTGATTAAGCATCAAGGTTCTCGG 60
dlpar12.8a  ATGTCATCG-GAGA--AGGTTAGGGCGTCCCACATACTCATAAAGCACCAGGGATCCCGC 57
*** * ** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

atpar13      AGGAAAGCGTCGTGGAAGGATCCAGAAGGGAAGATTATTCTGACTACCACTAGAGAAGCC 120
dlpar12.8a  CGCAAGTCCTCCTGGAAGGACCCTGATGGTAGCCTCATCTCCGCCACTACCCGAGACGAC 117
* ** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

atpar13      GCCGTTGAGCAGCTTAAATCGATCCGTGAAGATATTGTCTCCGGCAAGGCGAATTTCGAA 180
dlpar12.8a  GCTGTTTCTCAGCTCCAATCCCTCCGACAAGAATCCTTTCCGACCCCGCCTCCTTCTCC 177
** *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

atpar13      GAAGTGGCGACTCGTGTTTCTGACTGTAGCTCTGCTAAACGCGCGGTGATCTTGGTTCC 240
dlpar12.8a  GACCTCGCTCCCGTCACTCCACTGCAGCTCTGCAAAGCGTGGTGGCGATCTTGGTCCT 237
** * ** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

atpar13      TTTGGTAGAGGTCAAATGCAGAAACCATTTGAGGAAGCAACTTACGCGCTCAAGGTTGGA 300
dlpar12.8a  TTTGGAAGGGGCCAGATGCAGAAACCTTTGGAAGAAGCAACATTTGCACTAAAGGTTGGT 297
***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

atpar13      GATATAAGCGACATTGTCGATACAGACAGTGGAGTCCACATCATTAAGAGAACAGCTTGA 360
dlpar12.8a  GAGATAAGTGATATCGTGGATACTGACAGTGGAGTTCACATCATCAAGAGAACAGGATAG 357
** ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Abb. D-2: Vergleich der beiden cDNA-Sequenzen der pflanzlichen phospho-spezifischen Parvuline aus *A. thaliana* und *D. lanata*. Beide Sequenzen sind zueinander sehr homolog (69%). Das Symbol * charakterisiert identische Nukleotide. Es wurden die Datenbankeinträge AAD20122 (*A. thaliana* ATPPar13) und AJ133755 (*D. lanata* *DLP*ar12.8a) verwendet.

Vergleich der Proteinsequenzen *ATPar13* und *DLPAr12.8a*

```

ATPar13      MASRDQVKASHILIKHQGSRRKASWKDPEGKIILTTTREAAVEQLKSIREDIVSGKANFE 60
DLPAr12.8a  MSS-EKVRASHILIKHQGSRRKSSWKDPDGLISATTRDDAVSQLQSLRQELLSDPASFS 59
             * * * * *
ATPar13      EVATRVSDCSSAKRGGDLGSGFRGQMQKPFEEATYALKVGDISDIVDTDSGVHIIKRTA 119
DLPAr12.8a  DLASRHSCHCSSAKRGGDLGPFGRGQMQKPFEEATFALKVGEISDIVDTDSGVHIIKRTG 118
             * * * * *

```

Abb. D-3: Vergleich der beiden Proteinsequenzen der pflanzlichen phospho-spezifischen Parvuline aus *A. thaliana* und *D. lanata*. Die Homologie zwischen beiden Sequenzen ist ähnlich hoch wie auf Nukleinsäureebene (73%). * steht für identische Aminosäuren.

Mit *DLPAr12.8/DLPAr12.8a* und *ATPar13* konnte damit erstmals für zwei pflanzliche Parvuline eine Phosphospezifität nachgewiesen werden und beide der Subfamilie der phospho-spezifischen Parvuline zugeordnet werden.

2.2.4. Diskussion der Differenzen von *DLPAr12.8* und *DLPAr12.8a*

Die Sequenzierung von proteolytischen Fragmenten des gereinigten *DLPAr12.8* resultierte in den im Punkt C 1.4. dargestellten Aminosäuresequenzen. Durch entsprechende OligonukleotidAuswahl gelang es, mittels RT-PCR, zwei PCR-Produkte zu erhalten, deren abgeleitete Aminosäuresequenz der von *DLPAr12.8* homolog war, jedoch keine völlige Übereinstimmung zeigte. Durch Verwendung des längeren PCR-Produktes als Sonde für das Durchsuchen einer cDNA-Bank von PEMs gelang es, den vollständigen cDNA-Klon *dipar12.8a* zu isolieren und zu sequenzieren. Sowohl das als Sonde verwendete, als auch das kleinere PCR-Produkt waren vollständig identisch mit *dipar12.8a*. Der cDNA-Klon wies aus diesem Grund zu *DLPAr12.8* die gleichen Abweichungen auf, wie bereits die beiden PCR-Produkte. Exakt betrug die Abweichung 3 Aminosäuren von insgesamt 25 sequenzierten, d.h. 12% Abweichung. Ein Sequenzierfehler auf Proteinebene ist hier jedoch auszuschließen (K.-P. Rücknagel, persönliche Mitteilung). Bei der DNA-Sequenzierung ist ein Fehler ebenfalls als unwahrscheinlich anzunehmen, da unabhängig von einander zwei identische Sequenzen bei der RT-PCR und beim Durchsuchen der cDNA-Bank gefunden wurden, die die gleiche Abweichung zu *DLPAr12.8* besitzen. Die Sequenz aus der cDNA-Bank wurde weiterhin durch drei voneinander unabhängige Klone abgesichert, die in beide Richtungen sequenziert wurden und immer zur gleichen Nuklein- bzw. Aminosäuresequenz führten. Außerdem sind die ausgetauschten Aminosäuren in *DLPAr12.8* einmal durch 6, 4 bzw. durch 2 verschiedene Kodons verschlüs-

selt, d.h. ein einfacher Basenaustausch durch einen Sequenzierfehler würde nur in sehr wenigen Fällen direkt zur Änderung einer Aminosäure in *DLP*12.8a führen.

Als ein naheliegender Grund für die gefundenen Unterschiede wäre die Existenz von Isoformen für phospho-spezifische Parvuline in *D. lanata* zu diskutieren, ähnlich den Cyclophilinen, für die in *D. lanata* mindestens 4 Isoformen gefunden wurden (Liebau, 1995; Küllertz et al., 1999; Scholz et al., 1999; EMBL-Sequenzeintrag Y08273; Metzner, unveröffentlicht). Die Anzahl der Cyclophiline in anderen Spezies ist ähnlich groß. Jedoch wurden bei Parvulinen bisher nichts über die Existenz von Isoformen berichtet. Bekannt ist bisher in *A. thaliana* das gleichzeitige Auftreten eines phospho-spezifischen Parvulins und eines Parvulins, welches nicht diese Substratspezifität besitzt (*ATP*13 und *ATP*25). Gleiches ist mit *hPin*1 und *hPar*14 beim Menschen gefunden wurden (Lu et al., 1996; Uchida et al., 1999).

Jedoch konnte während der chromatographischen Reinigung und auch bei der Sequenzierung bzw. Massenbestimmung keinerlei Anhaltspunkt für die Existenz eines weiteren phospho-spezifischen Parvulins gefunden werden. Auch Western Blot-Untersuchungen ergaben hier kein anderes Ergebnis.

Durch das Herstellen der cDNA-Bank eingebrachte Fehler sind in diesem Fall ebenfalls auszuschließen. Für die RT-PCR wurde frische mRNA isoliert, die anschließend in cDNA umgeschrieben wurde. Beide daraus erhaltenen PCR-Produkte sind mit *dlpar*12.8a identisch.

Möglicherweise ist bei der Existenz von Isoformen der *DLP*12.8 entsprechende cDNA-Klon in der cDNA-Bank unterrepräsentiert ist und somit schwer zu finden ist. Hierzu müßte eine repräsentativere Menge an Phagen nochmals durchsucht werden. Eine schnellere Antwort auf die Frage nach Isoformen würde vielleicht das vollständig sequenzierte Genom von *A. thaliana* geben.

Die oben beschriebenen Abweichungen für *D. lanata* sind nicht neu. Von *Kandzia* (Dissertation, 1999) wurden bei der Reinigung und Klonierung der Lanatosid-15'-O-Acetylerase ebenfalls derartige Differenzen zwischen Aminosäuresequenz des gereinigten Enzyms und der des cDNA-Klon festgestellt. Hier waren 3 Aminosäurepositionen unterschiedlich, jedoch bestand das gesamte Protein aus 386 Aminosäuren. Der Grund für diese Unterschiede war nicht bekannt und wurde nicht weiter diskutiert.

Auch für die beiden ACBP-Isoformen konnten bisher nicht die entsprechenden cDNA-Klone gefunden werden. Wohl wurden zwei verschiedene cDNA-Klone gefunden (Gruner, Sequenzeinträge, 1999), jedoch korrelieren diese nicht hundertprozentig mit den beiden chromatographisch gereinigten ACBPs. ACBP9.9 weicht z. B. in 1 von 30 bekannten Aminosäure vom cDNA-Klon *acbp*4 (Sequenzeintrag: CAB56694) ab, ACBP10.0 dagegen sogar in 4 von

40 Aminosäuren von cDNA-Klon *acbp3* (Sequenzeintrag CAB56693) ab. Es ist durchaus möglich, daß es noch weitere Isoformen von ACBPs in PEMs gibt und das die bisher isolierten Proteine und cDNA-Klone nicht zusammengehören. Jedoch stellt sich die Frage, nach der Funktion und Nutzen in bzw. für die Pflanze bei Vorhandensein so vieler Isoformen mit zum Teil so geringen Abweichung voneinander.

Ähnlich stellt sich die Lage bei einer aus Blättern isolierten Cardenolid-16'-O-Glukohydrolase (73 kDa) und einem anschließend isolierten cDNA-Klon dar. Auch hier betrug die Abweichung in der Aminosäuresequenz zwischen sequenziertem Peptidfragment und cDNA-Klon etwa 14% (*Framm*, persönliche Mitteilung).

Eine mögliche Erklärung dieser Abweichungen in den Zellkulturen könnte neben der Annahme von Isoformen in der Tatsache bestehen, daß Zellkulturen eine hohe Zellteilungsrate und damit auch eine hohe Mutationsrate haben. Die zur Isolation des vollständigen cDNA-Klons verwendete cDNA-Bank wurde 1993 angefertigt, die chromatographische Reinigung von *DLPar12.8* fand 1998 statt. In der Zwischenzeit wurde der verwendete Zellstamm VIII mindestens 250 mal umgesetzt. Da Zellkulturen eine begrenzte Lebenserwartung eingeräumt wird, könnte das Alter des Stammes VIII Grund für aufgetretene Mutationen sein. Dem widerspricht jedoch das Ergebnis der RT-PCR, die mit cDNA aus frisch isolierter mRNA durchgeführt wurde und wie schon erwähnt, zum gleichen Resultat führte, wie die zum damaligen Zeitpunkt 5 Jahre alte cDNA-Bank.

Da das entsprechende Transkript zum Zeitpunkt der chromatographischen Reinigung definitiv in PEMs existiert, sollte es ein dazu gehöriges Protein geben. Warum dann ein ähnliches Protein mit Abweichungen in der Aminosäuresequenz gefunden wurde und damit die Frage nach existierenden Isoformen, muß jedoch unbeantwortet bleiben.

Ergebnisse der Western und Northern Blot-Analyse lassen nicht auf die Existenz eines weiteren Parvulins schließen. Jedoch muß konstatiert werden, daß Isoformen mit einem sehr ähnlichen Molekulargewicht durch diese Methoden auch nicht detektierbar sind. Lediglich eine Southern Blot-Analyse könnte hier Aufschluß über das Vorhandensein von Isoformen geben. Dieser ist jedoch für *D. lanata* DNA als äußerst schwierig durchführbar anzusehen, da ein hoher Gehalt an sekundären Stoffwechselprodukten diese Methode stark stört.

2.3. Der nicht kodierende Bereich von *dlpar12.8a*

Der 5'untranslatierte Bereich von *dlpar12.8a* besteht aus 113 bp und der 3'untranslatierte Bereich aus 240 bp. Das Auffinden einer Ribosomenbindungsstelle (Shine-Dalgarno-

Sequenz) für die Translation der mRNA in das entsprechende Protein weist darauf hin, daß *dlpar12.8a* allem Anschein nach in PEMs exprimiert wird.

Durch heterologe Überexpression konnte gezeigt werden, daß *rDLPar12.8a* PPIase-Aktivität besitzt. Ein Hinweis auf seine Existenz als Protein in vivo steht jedoch aus. Hier gibt es nur den Nachweis für *DLPar12.8* mittels chromatographischer Reinigung.

Wie bereits erwähnt, konnten weitere besondere Sequenzmotive innerhalb der untranslatierten Bereiche nicht gefunden werden.

2.4. Diskussion der Überexpression von *dlpar12.8a* in *E. coli*

Für die Überexpression von *dlpar12.8a* in *E. coli* standen unterschiedliche Systeme zur Verfügung. Zum einen existierte das von *Scholze* genutzte Verfahren, das Protein als Thioredoxin-fusionsprotein zu exprimieren (*Scholze*, Dissertation, 1998). Entscheidender Nachteil dieses Systems ist jedoch die teure und unvollständige Spaltung von rekombinantem Protein und Thioredoxin durch Enterokinase. Das System ist deshalb wohl vor allem für schwer lösliche Protein, wie z. B. Membranproteine geeignet, die als Fusionsprotein löslicher werden können.

Somit wurde ein System ohne Fusionsprotein ausgewählt, wobei hier zwei Varianten existieren. Die erste, eine Expression ohne einen zusätzlichen Anhang, wie z. B. mehrere Histidine, war weder für *dlpar12.8a* noch für *atpar13* durchführbar. Die Gründe dafür sind unbekannt. Möglicherweise war der verwendete pQE60 Expressionsvektor dafür ungeeignet. Die zweite Variante bestand in einem N- oder C-terminalen His-Anhang, der für eine einfache und schnelle chromatographische Reinigung von rekombinanten Proteinen verwendet wird. Verwendet wurde für *dlpar12.8a* und für *atpar13* der Expressionsvektor pQE 30.

Die Expression ergab für *dlpar12.8a* eine Ausbeute von etwa 10 mg *rDLPar12.8a* je Liter Medium. Das Protein war aktiv, zeigte jedoch nach einigen Monaten trotz der Lagerung bei -20°C Abbauerscheinungen. Diese machte sich auch in einer geringen Abnahme der Aktivität bemerkbar.

3. Eigenschaften von *rDLPar12.8a*

3.1. Diskussion der Substratspezifität von *DLPar12.8a*

Wie aus Tabelle C-3 ersichtlich ist, wurde die Substratspezifität von *rDLPar12.8a* mit verschiedenen synthetischen Tetra- und Pentapeptidsubstraten untersucht. Dabei wurde versucht, Substratpaare zu verwenden, von denen das eine phosphoryliert und das andere

unphosphoryliert war. Dadurch konnte die Präferenz von *rDLPar12.8a* für in der Seitenkette phosphorylierte Peptidsubstrate untersucht werden.

rDLPar12.8a zeigt eine ausgesprochene Affinität für Peptidsubstrate, die in der P_1 -Position zu Prolin eine positive Ladung besitzen. Das ist zum einen der Fall, wenn die Seitenkette eines Serins oder Threonins im phosphorylierten Zustand vorliegt, oder aber die Aminosäure Glutaminsäure an der P_1 -Position steht. Die k_{kat}/K_M -Werte von *rDLPar12.8a* für phosphorylierte Substrate liegen in der gleichen Dimension wie die von *hPin1* oder *Ess1/Ptf1*, d.h. es ist ein ebenso aktives Enzym.

Bei Peptidsubstraten, die diese Eigenschaft nicht besitzen, läuft die *cis/trans*-Isomerisierung durch *rDLPar12.8a* jedoch bis zu 10000 fach langsamer ab. Bei *hPin1* wurden hier Werte bis zu einer 1300 fachen Verlangsamung bestimmt (Yaffe et al., 1997). Das bedeutet, daß *rDLPar12.8a* unphosphorylierte Substrate noch schlechter erkennt als *hPin1* oder *Ess1/Ptf1*.

Zusammenfassen läßt sich das bevorzugte Substratmotiv wie folgt: pSer-Pro-Xaa, wobei Xaa hier für hydrophobe Aminosäuren steht.

Vergleicht man *rDLPar12.8a* mit *hPin1* oder *Ess1/Ptf1*, so zeigt sich zwischen *rDLPar12.8a* und *Ess1/Ptf1* eine größere Ähnlichkeit in der Substratspezifität, als zwischen *DLPar12.8a* und *hPin1* (siehe Tab. C-3).

Die Phosphorylierung der N-terminal zu Prolin benachbarten Aminosäure und die anschließende *cis/trans*-Isomerisierung stellt möglicherweise einen neuen Regulationsmechanismus dar, der von Zhou et al. (1999) beschrieben wurde. Das heißt, daß die phospho-spezifischen Parvuline, speziell *hPin1*, nur dann die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung beschleunigen, wenn das Peptid oder Protein zuvor an der Position P_1 zu Prolin (Ser/Thr-Pro) phosphoryliert wurde. Die Phosphorylierung der Aminosäuren Serin oder Threonin soll dabei durch Prolin spezifische Protein-Kinasen erfolgen. Nicht phosphorylierte Peptide oder Proteine werden von *hPin1* nur schlecht erkannt. Die *cis/trans*-Isomerisierung verändert dabei die räumliche Struktur des Protein, wodurch es wieder von einem in der Signalkaskade nachgeschalteten Enzym, z.B. einer Phosphatase als Substrat erkannt wird und dephosphoryliert wird. Nun kann es wiederum von einem anderen Protein erkannt werden, wodurch ein Signal weitergeleitet werden kann.

3.2. Inhibierung von *DLPar12.8a* durch Juglon und Plumbagin

Die Reaktion von Juglon mit der Aminosäure Cystein (Cys^{41} bei *Par10*) führt zur Entfaltung der Parvuline und letztlich zur Inaktivierung der PPLase-Aktivität. Die Inaktivierung läuft nach einer Reaktion pseudo-erster Ordnung ab.

Wie in Punkt C 3.2. dargestellt, ist auch rDLPar12.8a (Cys⁶⁸) durch Juglon inhibierbar. Ein Vergleich der Geschwindigkeiten der Inaktivierung von rDLPar12.8a mit anderen phosphospezifischen Parvulinen und *E. coli* Par10 zeigt einen ähnlichen Verlauf.

Wie schon bei der Substratspezifität, zeigen auch bei der spezifische Inhibierung durch Juglon Ess1/Ptf1 und rDLPar12.8a die größte Ähnlichkeit zueinander.

Plumbagin führte nur zu einer geringen Verminderung der PPlase-Aktivität von rDLPar12.8a und nicht zu einer vollständigen Inaktivierung.

Untersuchungen von *Hennig* (Diplomarbeit, 1996) zur Inaktivierung von Parvulinen durch Juglon zeigen, daß die Inaktivierung in zwei unterschiedlich schnell ablaufenden Schritte erfolgt. In einem ersten, schnellen Schritt (4 min.) geht Juglon durch elektrophile 1,4-Addition an freie Thiolgruppen des Cystein (in hPin1: Cys¹¹³) eine kovalente Bindung mit Parvulin ein. Anschließend erfolgt in einem zweiten, wesentlich langsamer verlaufenden Schritt die Entfaltung des Parvulins und damit verbunden die Abnahme der PPlase-Aktivität (unter den unter B 2.3. beschriebenen Bedingungen bis zu 160 min.).

Durch den ersten schnell ablaufende Schritt steht das von *Ranganathan* als katalytisches Nukleophil beschriebene Cystein nicht mehr als zur Verfügung. Die Inaktivierung der PPlase-Aktivität korreliert aber nicht mit der Addition von Juglon an Parvulin bzw. hPin1, sondern verläuft wesentlich langsamer nach einer Reaktion pseudo-erster Ordnung. Das heißt nach der Addition von Juglon an Cystein (in hPin1: Cys¹¹³) ist immer noch PPlase-Aktivität bestimmbar, obwohl das Cystein nicht mehr als katalytisches Nukleophil zur Verfügung stehen kann. Demzufolge kann das beschriebene Modell so nicht zu treffen.

4. Diskussion der Lokalisation von DLPar12.8/DLPar12.8a in PEMs und *D. lanata*-Pflanzen

Durch Northern Blot-Analyse (C 5.2.) war *dlpar12.8a* mRNA in allen Pflanzenorganen von *D. lanata* nachweisbar, wobei die Transkriptmengen etwa gleich groß waren. *Shen et al.* (1998) haben die hPin1-Menge während des Zellzyklus untersucht. Dabei stellten sie fest, daß das hPin1-Niveau keinerlei Schwankungen unterworfen ist. Das bedeutet, daß die Mitosespezifische Funktion nicht durch eine Zu- oder Abnahme der hPin1-Menge reguliert wird. Die Ergebnisse der Western Blot-Untersuchung stimmen mit den Resultaten des Northern Blot-Analyse soweit überein, als das in allen getesteten Pflanzenteilen ein Signal detektierbar war. Lediglich bei Blüten wurde auf Proteinebene kein Signal gefunden. Warum DLPar12.8/DLPar12.8a nicht in Blüten detektierbar ist, muß noch aufgeklärt werden. Sollte

sich die in ersten Experimenten nachgewiesene Funktion von *DLP*12.8a bestätigen, müßte es auch in Blüten zu finden sein, da auch dort Zellteilung stattfindet.

Die Ursache für das besonders starke Western Blot-Signal von *DLP*12.8/*DLP*12.8a in Blättern als auch die unterschiedliche Größe der Signale in *D. lanata* sind unbekannt und bedürfen näherer Untersuchung.

5. Diskussion des Einflusses von Juglon und Plumbagin auf PEMs in vivo

Plumbagin und Juglon gehören beide zur Gruppe der Naphthochinone. Plumbagin unterscheidet sich von Juglon durch eine zusätzliche Methylgruppe in Position 2. Juglon wurde durch *Hennig* et al. als irreversibler Inhibitor der Parvuline beschrieben. Bei Untersuchungen zur Inhibierbarkeit von *rDLP*12.8a durch beide Substanzen war es trotz der großen strukturellen Ähnlichkeit nur mit Juglon möglich, unter den angegebenen Bedingungen eine vollständige Inaktivierung von *rDLP*12.8a zu erreichen.

An diese Beobachtung anknüpfend, sollte durch Inkubation von PEMs mit beiden Naphthochinonen untersucht werden, ob in vivo ebenfalls eine Hemmung eines Parvulin erreicht werden kann. Wie in Abbildung C-17 dargestellt, ist jedoch zwischen Plumbagin und Juglon kein Unterschied in ihrer Wirkung auf PEMs festgestellt worden. Sämtliche Beobachtungen scheinen auf Wechselwirkungen des Naphthochinongrundkörpers mit den Zellen zu beruhen, wobei jedoch genauere Aussagen nicht möglich sind.

Sicher ist, daß eine spezifische Wechselwirkung von Juglon mit *DLP*12.8/*DLP*12.8a sich bei in vivo Untersuchungen an PEMs nicht feststellen ließ.

6. Untersuchungen zur Funktion von *DLP*12.8a

Der Versuch, die Funktion von *DLP*12.8a aufzuklären, legte nahe, dafür ein System zu nutzen, welches von *Lu* et al. (1996) schon für die Aufklärung der Funktion von hPin1 und Ess1/Ptf1 verwendet wurde. In einer *S. cerevisiae* Mutante wurde, das für die Zellen essentielle Ess1/Ptf1 durch einen Aminosäureaustausch mutiert, wodurch die Hefe-Mutante temperatursensitiv wurde (*Hani* et al., 1999). Bei einer Temperatur von 23°C wächst sie ohne Einschränkungen ihrer Lebensfähigkeit. Eine Erhöhung der Temperatur auf 30 oder 37°C resultiert jedoch in einer letalen mitotischen Arretierung der Hefezellen. In diese Mutante wurde die kodierende Sequenz von *dipar12.8a* inkloniert und exprimiert. Die Expression in der Mutante wird durch einen Promoter reguliert, der durch Galaktose induziert und durch Glukose unterdrückt werden kann.

Bei starker Induzierung der *dlpar12.8a*-Expression durch ein galaktosehaltiges Medium ist *DLPar12.8a* in der Lage, die Temperatursensitivität der Mutante aufzuheben, d.h. es konnte die Funktion von Ess1/Ptf1 übernehmen und die Mutante damit bei 37°C wachsen. Auch die hPin1 Kontrolle zeigte das gleiche Ergebnis wie *DLPar12.8a*.

Auch bei mäßiger Expression durch ein Galaktose/Glukose-haltiges Medium zeigten die Ergebnisse, daß *DLPar12.8a* die Funktion von Ess1/Ptf1 übernehmen kann. Die hPin1-Kontrolle zeigt unter gleichen Wachstumsbedingungen noch in größeren Verdünnungen ein Wachstum. Bei *DLPar12.8a* ist das nicht der Fall, woraus sich ableiten läßt, daß von hPin1 geringere Mengen als von *DLPar12.8a* nötig sind, um die Funktion von Ess1/Ptf1 zu ersetzen. Auch von Ess1/Ptf1 sind geringe Mengen nötig als bei *DLPar12.8a*.

Ob in diesem Zusammenhang die fehlende WW-Domäne von *DLPar12.8a* eine Rolle spielt, wurde bisher nicht untersucht. Auszuschließend ist der Einfluß der WW-Domäne nicht, jedoch waren bei den bisher untersuchten Eigenschaften von *DLPar12.8a* (Jugloninhibierung, Substratspezifität) keine grundsätzlichen Unterschiede zwischen *DLPar12.8a* und hPin1 bzw. Ess1/Ptf1 feststellbar. Denkbar wäre und das steht im Einklang mit den eben beschriebenen Ergebnissen, daß die WW-Domäne keinen Einfluß darauf hat, ob in den Hefezellen die Funktion von Ess1/Ptf1 ersetzt werden kann, jedoch in welcher Quantität das geschieht. Das könnte bedeuten, daß bei Vorhandensein einer WW-Domäne, das gesamte phosphospezifische Parvulin wirksamer wird, wodurch schon geringere Mengen ausreichend, die Lebensfähigkeit der Hefemutante zu sichern. *DLPar12.8a* ist bei mäßiger Expression (Glu/Gal) nur bei hoher Zelldichte der Hefemutante in der Lage, Wachstum bei 37°C zu ermöglichen. Unter diesem Gesichtspunkt sollte auch noch einmal der Versuch betrachtet werden, die WW- und die PPIase-Domäne separat mit Hilfe der Hefemutante zu untersuchen. Vielleicht reichte ja die Menge der exprimierten PPIase-Domäne nicht aus, um die Ess1/Ptf1-Funktion zu ersetzen. Bei einer stärkeren Induktion der Expression ist dieses vielleicht möglich.

Möglicherweise sind aber auch die Sequenzunterschiede innerhalb der PPIase-Domäne von *DLPar12.8a* und hPin1 bzw. Ess1/Ptf1 der Grund für die oben beschriebenen Abweichungen, da diese immerhin 50% betragen.

Von diesem gerade diskutierten, quantitativen Unterschied abgesehen, konnte durch diese Experimente gezeigt werden, daß *DLPar12.8a* eine ähnlich Funktion innerhalb der Zelle haben muß, wie Ess1/Ptf1 oder hPin1. Humanes Par14, welches nicht die Präferenz für phosphorylierte Substrate zeigt, ist im übrigen nicht in der Lage, die Funktion von Ess1/Ptf1 in der temperatursensitiven Hefemutante zu ersetzen (Metzner et al., 2000b). Eine Rolle in der Regulation der Mitose ist deshalb für *DLPar12.8a* als wahrscheinlich anzusehen, wenn dieses

auch bisher nicht experimentell bestätigt werden konnte. Hierzu sind umfangreiche Untersuchungen nötig.

Untersuchungen zur zellulären Lokalisation von *DLPar12.8a* in PEMs (siehe C 4.3.) zeigten, daß *DLPar12.8a* zytosolischer Natur ist. Auszuschließend ist bei diesem Ergebnis nicht, daß vielleicht doch ein geringer Teil des zellulären *DLPar12.8a* kernlokalisiert ist und diese Menge für die Regulation der Mitose ausreichend ist. Vielleicht ist aber auch die fehlende WW-Domäne Grund für die cytosolische Lokalisation von *DLPar12.8a*. *hPin1* dagegen wurde als kernlokalisiert beschrieben, besitzt aber auch die WW-Domäne. Auch hier sind weitere Untersuchungen nötig

Lu et al. (1999) berichteten, daß die WW-Domäne in der Lage ist, pSer- oder pThr-Peptide und eine ganze Anzahl von Phosphoproteinen zu binden, die während der Mitose eine Rolle spielen. Weiter wurde darauf hingewiesen, daß ein hydrophober Cluster der WW-Domäne, bestehend aus Ser¹⁶, Tyr²³ und Trp³⁴, die pSer- oder pThr-Bindungstasche sein könnte, die die Interaktion von *hPin1* mit phosphorylierten Substraten vermittelt könnte. Versuche, die für die WW-Domäne und die PPlase-Domäne kodierende cDNA in einer *Ess1/Ptf1*-Mutante zu exprimieren und die essentielle Funktion von *Ess1/Ptf1* zu ersetzen, zeigten, daß nur *hPin1* (bestehend aus WW- und PPlase-Domäne) dazu in der Lage ist. Weder die WW-Domäne noch die PPlase-Domäne allein, vermögen diese Funktion zu übernehmen.

Die durchgeführten Experimente mit *DLPar12.8a* und der Hefemutante stehen jedoch im Widerspruch zu diesen Ergebnissen, da *DLPar12.8a* keine WW-Domäne besitzt, aber dennoch wie *hPin1* in der Hefemutante die Funktion von *Ess1/Ptf1* ersetzen kann.

An dieser Stelle sollte noch einmal ausdrücklich darauf hingewiesen werden, daß *DLPar12.8a* keine WW-Domäne besitzt. Trotzdem ist es, wie *hPin1* oder *Ess1/Ptf1* in der Lage, die essentielle Funktion des ausgeschalteten *Ess1/Ptf1* zu übernehmen. Daraus kann abgeleitet werden, daß die Bedeutung der WW-Domäne, zumindest in Pflanzen nicht so groß ist, wie es von *Lu et al.*, *Hanes et al.* oder *Zhou et al.* postuliert wurde. Die PPlase-Domäne ist selbst in der Lage, ihre Substrate zu binden und die *cis/trans*-Isomerisierung der pSer/pThr-Pro-Bindung zu beschleunigen. Möglicherweise unterstützt die WW-Domäne die Bindung von phosphorylierten Substraten bzw. phosphorylierten Interaktionspartnern. Eine essentielle Funktion scheint sie aber in Pflanzen nicht zu besitzen. Ob es möglicherweise in Pflanzen noch ein weiteres phospho-spezifisches Parvulin gibt, welches eine WW-Domäne besitzt, bleibt abzuwarten.

Kürzlich berichteten *Winkler et al.* (2000) über eine weitere Funktion von *Pin1*. Sie stellten fest, daß *xPin1* aus *Xenopus leavis* an der Regulation des Kontrollpunktes der DNA-

Replikation im Rahmen des Zellzyklus beteiligt ist. Die Rolle von endogenem Pin1 in der Regulation des eukaryotischen Zellzyklus wurde als essentiell bezeichnet, wobei sich zeigte, daß die katalytische PPlase-Aktivität von xPin1 unentbehrlich für die beschriebene Regulation ist.

7. Diskussion von weiteren Aufgaben

Durch die Klonierung und die Überexpression von *dlpar12.8a* bzw. *atpar13* in *E. coli* sind wichtige Voraussetzungen für die Untersuchung dieser phospho-spezifischen Parvuline geschaffen worden. Weiterführende Arbeiten sollten sich der genaueren Untersuchung der Funktion von *DLPar12.8a* bzw. *ATPar13* annehmen, da die bisherigen Experimente lediglich erste Hinweise geben.

Die Suche nach Interaktionspartnern der pflanzlichen, phospho-spezifischen Parvuline ist eine weitere Aufgabe, die eine Antwort auf die Frage der Funktion dieser Proteine in vivo zu geben vermag. Interessant dürfte sich das Fehlen der für Proteininteraktionen wichtigen WW-Domäne in den pflanzlichen Vertretern der phospho-spezifischen Parvuline auswirken. *DLPar12.8a* oder *ATPar13* als Fusionsprotein an Glutathion-S-Transferase (GST) gebunden, ließe sich hierzu gut einsetzen. Möglicherweise gelingt es, natürliche Bindungspartner von *DLPar12.8a* oder *ATPar13* zu finden, und damit einen genaueren Zugang zur in vivo Funktion dieser PPlase zu bekommen.

Weiterhin sind proteinmechanistische Untersuchungen an Vertretern der pflanzlichen phospho-spezifischen Parvuline denkbar. Durch das Fehlen der WW-Domäne ist ein zusätzlicher, das Gesamtprotein beeinflussender, Faktor nicht vorhanden ist und erleichtert somit allgemeine Aussagen zur Enzymkatalyse oder der Substratbindung bei phospho-spezifischen Parvulinen.

Der in Abb. C-14 dargestellte Western Blot zeigt für *D. lanata* Pflanzen je nach verwendetem Gewebe Signale in zwei verschiedenen Größen. Hier sollte abgeklärt werden, ob es sich dabei um posttranslationale Veränderungen von *DLPar12.8/DLPar12.8a* handelt, oder ob in *D. lanata* Pflanzen ein weiteres phospho-spezifisches Parvulin vorhanden ist. Diese Untersuchungen sollten auf Protein- und DNA-Ebene erfolgen.

In diesem Zusammenhang sollte auch die ungeklärte Frage nach der Existenz von Isoformen wieder ins Blickfeld rücken.

E Zusammenfassung

Peptidyl-prolyl *cis/trans* Isomerasen sind Enzyme, die die *cis/trans* Isomerisierung der -Xaa-Pro-Bindung katalysieren. Sie sind in allen Zellkompartimenten beschrieben worden und an den verschiedensten Prozessen der Zelle beteiligt. So wurde gezeigt, daß sie an Synthese, Faltung, Reifung, Transport und Abbau von Proteinen beteiligt sind. Für erst kürzlich beschriebene Vertreter der PPlasen wurde eine Rolle in der Regulation der Mitose gezeigt. Auch ein Einfluß auf durch Streß induzierte Prozesse durch PPlasen wurde nachgewiesen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die chromatographische Reinigung des pflanzlichen phospho-spezifischen Parvulins *DLP*12.8 aus *D. lanata* mittels eines Aktivitätstestes beschrieben. Weiterhin wurde durch die Methode der PCR eine *DLP*12.8 homologe cDNA-Sonde gefunden, mit der eine cDNA-Bank Proembryogener Massen von *D. lanata* durchsucht wurde. Es gelang, den vollständigen cDNA-Klon *dlpar12.a* zu isolieren und anschließend in *E. coli* überzuexprimieren. Die aus *dlpar12.8a* abgeleitete Aminosäuresequenz *DLP*12.8a unterscheidet sich in 3 der 25 sequenzierten Aminosäuren von *DLP*12.8, wobei keine hochkonservierten Bereiche von Austauschungen betroffen sind. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Durch einen protease-gekoppelten PPlase-Aktivitäts-Assay und verschiedene säulenchromatographische Methoden gelang es, eine bis dahin unbekannte pflanzliche Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerase soweit aufzureinigen, daß durch Sequenzierung eine Teilsequenz zugänglich wurde. Es zeigte sich, daß *DLP*12.8 eine hohe Homologie zu Parvulinen und eine sehr hohe Homologie zu phospho-spezifischen Parvulinen hat. Diese phospho-spezifischen Parvuline sind gekennzeichnet durch eine Präferenz für Peptidsubstrate, die eine Phosphorylierung der Seitenkette von Serin oder Threonin in der Position P₁ zu Prolin aufweisen. Sie wurden bisher unter anderem in Hefe (*Ess1/Ptf1*), Fruchtfliege (*Dodo*) und Mensch (*hPin 1*) beschrieben. *DLP*12.8 ist der erste Vertreter dieser Unterfamilie der Parvuline, der als natives Protein mittels des PPlase-Aktivitätstestes isoliert wurde und für den eine PPlase-Aktivität belegt ist. Zudem ist *DLP*12.8a der erste pflanzliche Vertreter, der untersucht und beschrieben wurde. Ein Charakteristikum dieses und der anderen, mittlerweile in Sequenzbibliotheken zugänglichen, pflanzlichen Vertreter dieser phospho-spezifischen Parvuline ist das Fehlen einer WW-Domäne. Diese Domäne ist ein aus etwa 40 Aminosäuren bestehendes Motiv, welches eine Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen spielt.

2. Aus der erhaltenen Partialsequenz von *DLP*Par12.8 und den aus Sequenzbibliotheken zugänglichen phospho-spezifischen Parvulinen wurden degenerierte Oligonukleotidprimer abgeleitet, die für RT-PCR-Versuche verwendet wurden. Es gelang, zwei 128 bp und 104 bp lange PCR-Produkte zu amplifizieren, von denen das längere als Sonde für das Screening einer cDNA-Bank aus PEMs von *D. lanata* verwendet wurde. Es wurde die cDNA-Sequenz *dipar12.8a*, mit einem offenen Leserahmen von 354 bp gefunden, die für ein Protein mit 118 Aminosäuren kodiert. Der untranslatierte Bereich von *dipar12.8a* umfaßt dabei am 5'Ende 113 bp und am 3'Ende 240 bp. Die Nukleinsäuresequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz zeigen eine hohe Homologie zu phospho-spezifischen Parvulinen aus den verschiedensten Spezies. Aus der Sequenzhomologie und der am rekombinanten Protein nachgewiesenen Inhibierbarkeit durch Juglon ist die PPLase eindeutig den Parvulinen, durch die sehr hohe Sequenzhomologie und die Substratspezifität sogar der Subfamilie der phospho-spezifischen Parvuline zuzuordnen. Die Sequenz von *dipar12.8a* wurde unter der Nummer AJ133755 in die EMBL-Datenbank eingetragen.
3. Die von Lin et al. (1999) in der Zwischenzeit gefundene vollständige cDNA-Sequenz *atpar13* (Eintragsnummer AAD20122), die *dipar12.8a* homolog ist, konnte aus *A. thaliana* cDNA isoliert werden. Durch Überexpression von *atpar13* in *E. coli* konnte gezeigt werden, daß *atpar13* für ein Protein kodiert, welches PPLase-Aktivität besitzt und bevorzugt die *cis/trans*-Isomerisierung von phosphorylierten Substraten katalysiert. Aufgrund der besonders hohen Homologie von *atpar13* und *dipar12.8a* auf DNA- und Proteinebene, kann man davon ausgehend, daß *atpar13* für das *DLP*Par12.8/*DLP*Par12.8a homologe Protein aus *A. thaliana* kodiert.
4. In Northern Blot Experimenten konnte gezeigt werden, daß in allen Pflanzenorganen von *D. lanata* etwa gleich große Transkriptmengen von *dipar12.8a* vorhanden sind. Das läßt auf ein ubiquitäres Protein schließen, welches eine essentielle Rolle in der Zelle spielen könnte.
5. Der offene Leserahmen von *dipar12.8a* wurde in den Expressionsvektor pQE 30 subkloniert. Die Expression in *E. coli* führte zur Synthese eines 14807 Da großen Proteins, welches N-terminal einen aus 6 Histidinen bestehenden His-Anhang besitzt. Es konnte bis zur Homogenität gereinigt und seine PPLase-Aktivität nachgewiesen werden. Für das homogene *rDLP*Par12.8a wurde die Substratspezifität für verschiedene phosphorylierte und unphosphorylierte Substrate bestimmt und seine Hemmbarkeit durch den spezifischen, irreversiblen Parvulininhibitor Juglon (5-Hydroxy-1,4-naphthochinon) nachgewiesen.

6. Ein Aliquot des gereinigten *rDLPar12.8a* wurde nach weiterer RP-HPLC-Reinigung zur Gewinnung polyklonaler Antikörper herangezogen. Die erhaltenen Antikörper wurde zum Nachweis eines phospho-spezifischen Parvulins in Pflanzenteilen und PEMs von *D. lanata* sowie für weitere Untersuchungen verwendet.
7. Mittels Western Blot-Analyse wurde die Verteilung von *DLPar12.8/DLPar12.8a* in der Gesamtpflanze von *D. lanata* untersucht. Das Protein konnte in allen Geweben, außer in den Blüten nachgewiesen werden. Interessant war, daß lediglich in PEMs und in der Sprossachse ein Signal in der gleichen Größe, wie der des gereinigten Proteins (12.8 kDa) zu finden war. In allen anderen Pflanzenteilen wurde nur ein Signal im Bereich von etwa 15 kDa gefunden. Ob es sich hier um eine weitere PPlase handelt oder ob posttranslationale Modifizierungen der Grund dieses Größenunterschiedes sind, sollen nachfolgende Untersuchungen klären. Eine weiteres phospho-spezifisches Parvulin scheint aus verschiedenen Gründen unwahrscheinlich, ist aber nicht auszuschließen.
Weiterhin wurde durch die Verwendung einer Eichreihe aus *rDLPar12.8a* die zelluläre Konzentration von *DLPar12.8/DLPar12.8a* auf etwa 5 nM berechnet.
8. Die Lokalisation von *DLPar12.8/DLPar12.8a* in der Zelle wurde durch die Methode der differentiellen Zentrifugation untersucht. Dabei zeigte sich, daß *DLPar12.8/DLPar12.8a* hauptsächlich im Zytosol lokalisiert ist. Da Pin1 als ein kernlokalisiertes Parvulin beschrieben wurde (Lu et al. 1996), wäre zu untersuchen, welchen Einfluß die WW-Domäne auf die zelluläre Lokalisation und Funktion der phospho-spezifischen Parvuline ausübt.
9. In vivo-Experimente, die den Einfluß von Naphthochinonen (Juglon und Plumbagin) auf PEMs zum Gegenstand hatten, zeigten, daß der irreversible Parvulininhibitor Juglon auf PEMs ähnliche Wirkungen zeigt wie Plumbagin. Daraus folgt, daß eine spezifische Interaktion zwischen Juglon und dem *D. lanata* Parvulin in vivo nicht gefunden werden konnte.
10. Durch Verwendung einer temperatursensitiven *S. cerevisiae* Mutante (Hani et al., 1999), deren essentielles phospho-spezifisches Parvulin Ess1/Ptf1 ausgeschaltet wurde, konnte nach Überexpression von *DLPar12.8a* gezeigt werden, daß *DLPar12.8a* in der Lage ist, die Funktion von Ess1/Ptf1 zu ersetzen. Bei einer Temperaturerhöhung auf 37°C war zu beobachten, daß die Hefemutante, die *dipar12.8a* exprimiert, überlebensfähig war, während die Hefemutante, in die nur der Vektor inkloniert wurde, in ihrer Lebensfähigkeit eingeschränkt war (Metzner et al., 2000b). Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, daß *DLPar12.8/DLPar12.8a* wahrscheinlich die gleiche Funktion wie hPin1 erfüllt.

Durch die Klonierung und die Überexpression von *dlpar12.8a* und *atpar13* in *E. coli* sind wichtige Voraussetzungen geschaffen worden, um die Suche nach möglichen Interaktionspartnern aufzunehmen. Interessant dürfte sich hier das Fehlen der für Proteininteraktionen wichtigen WW-Domäne in den pflanzlichen Vertretern der phospho-spezifischen Parvuline auswirken. Weiterhin sind proteinmechanistische Untersuchungen an Vertretern der pflanzlichen phospho-spezifischen Parvuline denkbar. Durch das Fehlen der WW-Domäne ist ein zusätzlicher, das Gesamtprotein beeinflussender Faktor, nicht vorhanden ist und erleichtert somit allgemeine Aussagen zur Enzymkatalyse oder der Substratbindung bei phospho-spezifischen Parvulinen.

E Literatur

1. **Alm, R. A., Ling, L.-S. L., Moir, D. T., King, B. L., Brown, E. D., Doig, P. C., Smith, D. R., Noonan, B., Guild, B. C., deJonge, B. L., Carmel, G., Tummino, P. J., Caruso, A., Uria-Nickelsen, M., Mills, D. M., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S. D., Jiang, Q., Taylor, D. E., Vovis, G. F. und Trust, T. J.** (1999): Genomic sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. EMBL-Sequenzeintrag AAD05744. *Nature* **397**, 176-180
2. **Altschul, S. F., Gish, Webb Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J.** (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-10
3. **Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J.** (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25** (17), 3389-3402
4. **Andersson, S. G., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U. C., Podowski, R. M., Naslund, A. K., Eriksson, A. S., Winkler, H. H. und Kurland, C. G.** (1998): The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. EMBL-Sequenzeintrag CAA15023. *Nature* **396** (6707), 133-140
5. **Arnold, W., Rump, A., Klipp, W., Priefer, U. B. und Puhler, A.** (1988): Nucleotide sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. SWISS-Prot-Sequenzeintrag P08534. *Journal of Molecular Biology* **203** (3), 715-738
6. **Babiychuk, E., Fuangthong, M., Inze, D., Van Montagu, M. und Kushnir, S.** (1997): Efficient gene tagging in *Arabidopsis thaliana* using a gene trap approach. EMBL-Sequenzeintrag CAB06699. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94** (23), 12722-12727
7. **Barthelmess, I. B. und Tropschug, M.** (1993): FK506-binding protein of *Neurospora crassa* (NcFKBP) mediates sensitivity to the immunosuppressant FK506; resistant mutants identify two loci. *Current Genetics* **23** (1), 54-58
8. **Blecher, O., Erel, N., Callebaut, I., Aviezer, K. und Breiman, A.** (1996): A novel plant peptidyl-prolyl-cis-trans-isomerase (PPIase): cDNA cloning, structural analysis, enzymatic activity and expression. *Plant Molecular Biology* **32** (3), 493-504
9. **Bjellqvist, B., Hughes, G. J., Pasquali, Ch., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J.-Ch., Frutiger, S. und Hochstrasser, D. F.** (1993): The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* **14**, 1023-1031
10. **Bork, P. und Sudol, M.** (1994): The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends in Biochemical Sciences* **19** (12), 531-533

11. **Bradford, M. M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254
12. **Braaten, D., Ansari, H. und Luban, J.** (1997): The hydrophobic pocket of cyclophilin is the binding site for the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein. *Journal of Virology* **71** (3), 2107-2113
13. **Breiman, A., Fawcett, T. W., Ghirardi, M. L. und Mattoo, A. K.** (1992): Plant organelles contain distinct peptidyl-prolyl-cis/trans-isomerases. *Journal of Biological Chemistry* **267** (30), 21293-21296
14. **Borel, J. F., Feurer, C., Gubler, H. U. und Stahelin, H.** (1976): Biological effects of cyclosporin A: A new antilymphocyte agent. *Agents Action* **6**, 468-475
15. **Burucoa, C., Fremaux, C., Pei, Z., Tummuru, M., Blaser, M. J., Cenatiempo, Y. und Fauchere, J. L.** (1995): Nucleotide sequence and characterization of peb4A encoding an antigenic protein in *Campylobacter jejuni*. SWISS-Prot-Sequenzeintrag Q46105. *Res. Microbiology* **146** (6), 467-476
16. **Chen, H. I. und Sudol, M.** (1995): The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92** (17), 7819-7823
17. **Chen, H. I., Einbond, A., Kwak, S. J., Linn, H., Koepf, E., Peterson, S., Kelly, J. W. und Sudol, M.** (1997): Characterization of the WW domain of human yes-associated protein and its polyproline-containing ligands. *Journal of Biological Chemistry* **272** (27), 17070-17077
18. **Chen, S. R., Zhang, L., und MacLennan, D. H.** (1994): Asymmetrical blockade of the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) by 12-kDa FK506 binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 11953-11957
19. **Chou, I. T. und Gasser, C. S.** (1997): Characterization of the cyclophilin gene family of *Arabidopsis thaliana* and phylogenetic analysis of known cyclophilin proteins. *Plant Molecular Biology* **35** (6), 873-892
20. **Crenshaw, D. G., Yang, J., Means, A. R. und Kornbluth, S.** (1998): The mitotic peptidyl-prolyl isomerase, Pin1, interacts with Cdc25 and Plx1. *EMBO Journal* **17** (5), 1315-1327
21. **Christner, C.** (1999): Mikrobielle Effektoren prolin-spezifischer Enzyme. *Dissertation*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
22. **Colley, N. J., Baker, E. K., Stamnes, M. A. und Zuker, C. S.** (1991): The cyclophilin homolog ninaA is required in the secretory pathway. *Cell* **67** (2), 255-263
23. **Diettrich, B., Haack, U. und Luckner, M.** (1986): Cryopreservation of *D. lanata* cells grown in-vitro precultivation and recultivation. *Journal of Plant Physiology* **126**. (1). 74

24. **Dobrowolski, B., Glund, K. und Metzloff, M.** (1989): Cloning of tomato nuclear ribosomal DNA. Ribosomal DNA organization in leaves and suspension-cultured cells. *Plant Science* **60**, 206
25. **Dolinski, K., Scholz, C., Muir, R. S., Rospert, S., Schmid, F. X., Cardenas, M. E. und Heitman, J.** (1997): Functions of FKBP12 and mitochondrial cyclophilin active site residues in vitro and in vivo in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **8** (11), 2267-2280
26. **Einbond, A. und Sudol, M.** (1996): Towards prediction of cognate complexes between the WW domain and proline-rich ligands. *FEBS Letters* **384** (1), 1-8
27. **Engeseth J. N., Pacovsky S. R., Newman T., Ohlrogge B. J.** (1996): Characterisation of an acyl-CoA-binding protein from *Arabidopsis thaliana*. *Arch Bioch Biophys* **331**, 55-62
28. **Evans, D. J., Jones, R., Woodley, P. R., Wilborn, J. R. und Robson, R. L.** (1991): Nucleotide sequence and genetic analysis of the *Azotobacter chroococcum* nifUSVWZM gene cluster, including a new gene (nifP) which encodes a serine acetyltransferase. SWISS-Prot-Sequenzeintrag P23119. *Journal of Bacteriology* **173** (17), 5457-5469
29. **Fischer, G.** (1994): Über Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen und ihre Effektoren. *Angewandte Chemie* **106**, 1479-1501.
30. **Fischer, G., Bang, H. und Mech, C.** (1984): Nachweis einer Enzymkatalyse für die cis-trans-Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden. *Biomedica Biochimica Acta* **43** (10), 1101-1111
31. **Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T. und Schmid, F. X.** (1989): Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* **337** (6206), 476-478
32. **Fraser, C. M., Casjens, S., Huang, W. M., Sutton, G. G., Clayton, R. A., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K. A., Dodson, R., Hickey, E. K., Gwinn, M., Dougherty, B., Tomb, J.-F., Fleischmann, R. D., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A. R., Quackenbush, J., Salzberg, S., Hanson, M., van-Vugt, R., Palmer, N., Adams, M. D., Gocayne, J. D., Weidman, J., Utterback, T., Watthey, L., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Garland, S., Fujii, C., Cotton, M. D., Horst, K., Roberts, K., Hatch, B., Smith, H. O. und Venter, J. C.** (1997): Genomic sequence of a Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. EMBL-Sequenzeintrag AAC66497. *Nature* **390**, 580-586
33. **Fujimori, F., Takahashi, K., Uchida, C. und Uchida, T.** (1999): Mice lacking Pin1 develop normally, but are defective in entering cell cycle from G₀ arrest. EMBL-Sequenzeintrag BAA87037. *Biochem. Biophys. Res. Communication* **265**, 658-663
34. **Galat, A.** (1993): Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins. *European Journal of Biochemistry* **216** (3), 689-707

35. **Galat, A. und Metcalfe, S. M.** (1995) Peptidylproline *cis/trans* isomerases. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **63**, 67-118.
36. **Galibert, F., Alexandraki, D., Baur, A., Boles, E., Chalwatzis, N., Chuat, J. C., Coster, F., Cziepluch, C., De Haan, M., Domdey, H., Durand, P., Entian, K. D., Gatus, M., Goffeau, A., Grivell, L. A., Hennemann, A., Herbert, C. J., Heumann, K., Hilger, F., Hollenberg, C. P., Huang, M. E., Jacq, C., Jauniaux, J. C., Katsoulou, C. und Karpfinger-Hartl, L.** (1996): Complete nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosom. Sequenzeintrag 6322478. *EMBO Journal* **15** (9), 2031-2049
37. **Gasser, C. S., Gunning, D. A., Budelier, K. A. und Brown, S. M.** (1990): Structure and expression of cytosolic cyclophilin/peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase of higher plants and production of active tomato cyclophilin in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87** (24), 9519 -9523
38. **Gill, S. C. und von Hippel, P. H.** (1989): Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry* **182** (2), 319-326
39. **Gruner B., Metzner M. und Mueller-Uri F.** (1999): unveröffentlicht. EMBL-Sequenzeintrag AJ249833.
40. **Gruner B., Metzner M. und Mueller-Uri F.** (1999): unveröffentlicht. EMBL-Sequenzeintrag AJ249834.
41. **Hacker, J. und Fischer, G.** (1993): Immunophilins: structure-function relationship and possible role in microbial pathogenicity. *Molecular Microbiology* **10** (3), 445-456
42. **Handschumacher, R. E., Harding, M. W., Rice, J., Drugge, R. J. und Speicher, D. W.** (1984): Cyclophilin a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* **226**, 547
43. **Hanes, S. D., Shank, P. R. und Bostian, K. A.** (1989): Sequence and mutational analysis of ESS1, a gene essential for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBL-Sequenzeintrag S52764. *Yeast* **5** (1), 55-72
44. **Hanes S., D.** (1997). Ess1. In: Gething, M.J. (Ed.): Guidebook to Molecular Chaperones and Protein Folding Factors. Sambrook and Tooze at Oxford University Press, Oxford
45. **Hani, J., Stumpf, G. und Domdey, H.** (1995): PTF1 encodes an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae*, which shows strong homology with a new putative family of PPlases. EMBL-Sequenzeintrag S52764. *FEBS Letters* **365** (2-3), 198-202
46. **Hani, J., Schelbert, B., Bernhardt, A., Domdey, H., Fischer, G., Wiebauer, K. und Rahfeld, J. U.** (1999): Mutations in a peptidylprolyl-*cis/trans*-isomerase gene lead to a defect in 3'-end formation of a pre-mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **274** (1), 108-116

47. **Harding, M. W., Galat, A., Uehling, D. E. und Schreiber, S. L.** (1989): A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* **341** (6244), 758-760
48. **Harvey, K. F. und Kumar, S.** (1999a): Nedd4-like proteins: an emerging family of ubiquitin-protein ligases implicated in diverse cellular functions. *Trends in Cell Biology* **9** (5), 166-169
49. **Harvey, K. F., Dinudom, A., Komwatana, P., Jolliffe, C. N., Day, M. L., Parasivam, G., Cook, D. I. und Kumar, S.** (1999b): All three WW domains of murine Nedd4 are involved in the regulation of epithelial sodium channels by intracellular Na⁺. *Journal of Biological Chemistry* **274** (18), 12525-12530
50. **Heitman, J., Movva, N. R. und Hall, M. N.** (1992): Proline isomerases at the crossroads of protein folding, signal transduction, and immunosuppression. *New Biologist* **4** (5), 448-460
51. **Heitman, J., Koller, A., Kunz, J., Henriquez, R., Schmidt, A., Movva, N. R. und Hall, M. N.** (1993): The immunosuppressant FK506 inhibits amino acid import in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & Cellular Biology* **13** (8), 5010-5019
52. **Heitman, J., Cardenas, M. E., Breuder, T., Hemenway, C., Muir, R. S., Lim, E., Goetz, L., Zhu, D., Lorenz, M. und Dolinski, K.** (1994): Antifungal effects of cyclosporine and FK 506 are mediated via immunophilin-dependent calcineurin inhibition. *Transplantation Proceedings* **26** (5), 2833-2834
53. **Hemenway, C. und Heitman, J.** (1993): Proline isomerases in microorganisms and small eukaryotes. *Annals of the New York Academy of Sciences* **696**, 38-46
54. **Hennig, L** (1996) Inhibierung der Peptidyl-prolyl cis/trans Isomerase Parvulin durch den Naturstoff Juglon. *Diplomarbeit*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
55. **Hennig, L., Christner, C., Kipping, M., Schelbert, B., Rucknagel, K. P., Grabley, S., Kullertz, G. und Fischer, G.** (1998): Selective inactivation of parvulin-like peptidyl-prolyl cis/trans isomerases by juglone. *Biochemistry* **37** (17), 5953 -5960
56. **Herrler, M., Bang, H., Brune, K., Fischer, G. und Marahiel, M. A.** (1992): Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase from *Bacillus subtilis*. A prokaryotic enzyme that is highly sensitive to cyclosporin A. *FEBS Letters* **309** (3), 231-234
57. **Heukeshoven, J. und Dernick, R.** (1985): Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* **6**. (3) 103-112
58. **Hoffmann, K. und Handschumacher, R. E.** (1995): Cyclophilin-40: evidence for a dimeric complex with hsp90. *Biochemical. Journal* **307** (Pt 1), 5-8

59. **Hottenrott, S., Schumann, T., Pluckthun, A., Fischer, G. und Rahfeld, J. U.** (1997): The *Escherichia coli* SlyD is a metal ion-regulated peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase. *Journal of Biological Chemistry* **272** (25), 15697-15701
60. **Jacobs, M., Andersen, J. B., Kontinen, V. und Sarvas, M.** (1993): *Bacillus subtilis* PrsA is required in vivo as an extracytoplasmic chaperone for secretion of active enzymes synthesized either with or without pro-sequences. *Molecular Microbiology* **8** (5), 957-966
61. **Jacobson, M. R., Brigle, K. E., Bennett, L. T., Setterquist, R. A., Wilson, M. S., Cash, V. L., Beynon, J., Newton, W. E. und Dean, D. R.** (1989): Physical and genetic map of the major nif gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. SWISS-Prot-Sequenzeintrag P14890. *Journal of Bacteriology* **171** (2), 1017-1027
62. **Kaenel von, B., Chung, S. und Parish, R. W.** (1993): unveröffentlicht. SWISS-Prot-Sequenzeintrag P40415
63. **Kandror, O., Sherman, M., Moerschell, R. und Goldberg, A. L.** (1997): Trigger factor associates with GroEL in vivo and promotes its binding to certain polypeptides. *Journal of Biological Chemistry*. **272**. (3). 1734
64. **Kandzia, R.** (1999): Reinigung und Klonierung der Lanatosid-15'-O-Acetylerase aus *Digitalis lanata* EHRH.. *Dissertation*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
65. **Kay, J. E.** (1996): Structure-function relationships in the FK506-binding protein (FKBP) family of peptidylprolyl cis-trans isomerases. *Biochemical. Journal* **314** (Pt 2), 361-385
66. **Kern, D., Schutkowski, M. und Drakenberg, T.** (1997): Rotational barriers of cis/trans isomerization of proline analogues and their catalysis by cyclophilin. *Journal of the American Chemical Society*. **119** (36), 8403-8408
67. **Knudsen, J., Hojrup, P., Hansen, H. O., Hansen, H. F. und Roepstorff, P.** (1989): Acyl-CoA-binding protein in the rat. Purification, binding characteristics, tissue concentrations and amino acid sequence. *Biochemical Journal* **262**, 513-519
68. **Koletsky, A. J., Harding, M. W. und Handschumacher, R. E.** (1986): Cyclophilin: distribution and variant properties in normal and neoplastic tissues. *Journal of Immunology* **137** (3), 1054-1059
69. **Komuro, A., Saeki, N. und Kato, S.** (1999a): Npw38, a novel nuclear protein possessing a WW domain capable of activating basal transcription. *Nucleic Acids Research* **27** (9), 1957-1965
70. **Komuro, A., Saeki, M. und Kato, S.** (1999b): Association of two nuclear proteins, Npw38 and NpwBP, via the interaction between the WW domain and a novel proline-rich motif containing glycine and arginine. *Journal of Biological Chemistry* **274** (51), 36513-36519

71. **Kontinen, V. P., Saris, P. und Sarvas, M.** (1991): A gene (prsA) of *Bacillus subtilis* involved in a novel, late stage of protein export. SWISS-Prot-Sequenzeintrag P24327. *Molecular Microbiology* **5** (5), 1273-1283
72. **Kops, O., Eckerskorn, C., Hottenrott, S., Fischer, G., Mi, H. und Tropschug, M.** (1998): Ssp1, a site-specific parvulin homolog from *Neurospora crassa* active in protein folding. EMBL-Sequenzeintrag CAA06818. *Journal of Biological Chemistry* **273** (48), 31971-31976
73. **Kullertz, G., Luthe, S. und Fischer, G.** (1998): Semiautomated microtiter plate assay for monitoring peptidylprolyl cis/trans isomerase activity in normal and pathological human sera. *Clinical Chemistry* **44** (3), 502-508
74. **Kullertz, G., Liebau, A., Rucknagel, P., Schierhorn, W., Diettrich, B., Fischer, G. und Luckner, M.** (1999): Stress-induced expression of cyclophilins in proembryonic masses of *Digitalis lanata* does not protect against freezing thawing stress. *Planta* **208** (4), 599-605
75. **Kreutzer, R., Steibl, H. D., Dayananda, S., Dippe, R., Halda, L., Buck, M. und Klingmueller, W.** (1991): Genetic characterization of nitrogen fixation in *Enterobacter* strains from the rhizosphere of cereals. EMBL-Sequenzeintrag CAA68024. (in) Polsinelli, M., Materassi, R. und Vincenzini, M. (Eds.); *Nitrogen Fixation*: 24-26; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London
76. **Kyse-Andersen, J.** (1984): Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **10** 203-209
77. **Laemmli, U. K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (259), 680-685
78. **Lam, E., Martin, M. M., Timerman, A. P., Sabers, C., Fleischer, S., Lukas, T., Abraham, R. T., O'Keefe, S. J., O'Neill, E. A. und Wiederrecht, G. J.** (1995): A novel FK506 binding protein can mediate the immunosuppressive effects of FK506 and is associated with the cardiac ryanodine receptor. *Journal of Biological Chemistry* **270** (44), 26511-26522
79. **Lazar, S. W. und Kolter, R.** (1996): SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins. *Journal of Bacteriology* **178** (6), 1770-1773
80. **Liebau, A.** (1995): Untersuchungen zur Cyclophilin-Expression unter Streßbedingungen bei *Digitalis lanata* Ehrh.. *Dissertation*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
81. **Lill, R., Crooke, E., Guthrie, B. und Wickner, W.** (1988): The 'trigger factor cycle' includes ribosomes, presecretory proteins, and the plasma membrane. *Cell* **54** , 1013-1018

82. **Lin, X., Kaul, S., Rounsley, S. D., Shea, T. P., Benito, M.-I., Town, C. D., Fujii, C. Y., Mason, T. M., Bowman, C. L., Barnstead, M. E., Feldblyum, T. V., Buell, C. R., Ketchum, K. A., Lee, J. J., Ronning, C. M., Koo, H., Moffat, K. S., Cronin, L. A., Shen, M., VanAken, S. E., Umayam, L., Tallon, L. J., Gill, J. E., Adams, M. D., Carrera, A. J., Creasy, T. H., Goodman, H. M., Somerville, C. R., Copenhaver, G. P., Preuss, D., Nierman, W. C., White, O., Eisen, J. A., Salzberg, S. L., Fraser, C. M. und Venter, J. C.** (1999): Sequence and analysis of chromosome II of *Arabidopsis thaliana*. EMBL-Sequenzeintrag AAD20122. *Nature* **402**, 761-768
83. **Lippuner, V., Chou, I. T., Scott, S. V., Ettinger, W. F., Theg, S. M. und Gasser, C. S.** (1994): Cloning and characterization of chloroplast and cytosolic forms of cyclophilin from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **269** (11), 7863-7868
84. **Liu, J., Farmer, J. D., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I. und Schreiber, S. L.** (1991): Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66** (4), 807-815
85. **Lohaus, A.** (2000): Klonierung und Überexpression einer phospho-spezifischen Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerasen aus *A. thaliana*. *Diplomarbeit*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
86. **Loomis, W. F. und Iranfar, N.** (1996): unveröffentlicht. EMBL-Sequenzeintrag AAB36960
87. **Lu, K. P. und Hunter, T.** (1995): The NIMA kinase: a mitotic regulator in *Aspergillus nidulans* and vertebrate cells. *Progress. in Cell Cycle Research*. **1** 187-205
88. **Lu, K. P., Hanes, S. D. und Hunter, T.** (1996): A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* **380** (6574), 544-547
89. **Lu, P. J., Zhou, X. Z., Shen, M. und Lu, K. P.** (1999): Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science* **283** (5406), 1325-1328
90. **Luan, S., Li, W., Rusnak, F., Assmann, S. M. und Schreiber, S. L.** (1993): Immunosuppressants implicate protein phosphatase regulation of K⁺ channels in guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90** (6), 2202-2206
91. **Luan, S., Albers, M. W. und Schreiber, S. L.** (1994): Light-regulated, tissue-specific immunophilins in a higher plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91** (3), 984-988
92. **Luan, S., Lane, W. S. und Schreiber, S. L.** (1994): pCyP B: a chloroplast-localized, heat shock-responsive cyclophilin from fava bean. *Plant Cell* **6** (6), 885-892
93. **Luan, S., Kudla, J., Gruissem, W. und Schreiber, S. L.** (1996): Molecular characterization of a FKBP-type immunophilin from higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93** (14), 6964-6969

94. **Luban, J., Bossolt, K. L., Franke, E. K., Kalpana, G. V. und Goff, S. P.** (1993): Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* **73** (6), 1067-1078
95. **Luban, J.** (1996): Absconding with the chaperone: essential cyclophilin-Gag interaction in HIV-1 virions. *Cell* **87** (7), 1157-1159
96. **Luo, G., An, G. und Wu, R.** (1994): A PCR differential screening method for rapid isolation of clones from a cDNA library. *Biotechniques* **16** (4), 670-675
97. **Maleszka, R., Hanes, S. D., Hackett, R. L., Decouet, H. G. und Miklos, G. L. G.** (1996): The *Drosophila melanogaster* dodo (dod) gene, conserved in humans, is functionally interchangeable with the Ess1 cell division gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93** (1), 447-451
98. **Maleszka, R., Lupas, A., Hanes, S. D. und Miklos, G. L.** (1997): The dodo gene family encodes a novel protein involved in signal transduction and protein folding. *Gene* **203** (2), 89-93
99. **Marivet, J., Frendo, P. und Burkard, G.** (1992): Effects of abiotic stresses on cyclophilin gene expression in maize and bean and sequence analysis of bean cyclophilin cDNA. *Plant Science (Limerick)* **84**. (2). 178
100. **Marivet, J., Margis-Pinheiro, M., Frendo, P. und Burkard, G.** (1994): Bean cyclophilin gene expression during plant development and stress conditions. *Plant Molecular Biology*. **26** (4), 1181-1189
101. **Marivet, J., Frendo, P. und Burkard, G.** (1995): DNA sequence analysis of a cyclophilin gene from maize: developmental expression and regulation by salicylic acid. *Molecular. & General. Genetics* **247** (2), 222-228
102. **McCaffrey, P. G., Perrino, B. A., Soderling, T. R. und Rao, A.** (1993): NF-ATp, a T lymphocyte DNA-binding protein that is a target for calcineurin and immunosuppressive drugs. *Journal of Biological Chemistry* **268** (5), 3747-3752
103. **Metzner, M., Ruecknagel, K. P., Knudsen, J., Kuellertz, G., Mueller-Uri, F., Diettrich, B.** (2000): Isolation and characterization of two acyl-CoA-binding proteins from proembryogenic masses of *Digitalis lanata* Ehrh.. SWISS-Prot-Sequenzeinträge P81624 und P81625. *Planta* **210**, 683-685
104. **Metzner, M., Ruecknagel, K. P., Kuellertz, G., Fischer, G., Luckner, M.** (2000): Isolation and characterization of a new phospho-specific peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase from proembryogenic masses of *Digitalis lanata* EHRH.. EMBL-Sequenzeintrag AJ133755. Submitted to *Journal of Biological Chemistry*
105. **Murashige T., Skoog F.** (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497

106. **Owens-Grillo, J. K., Hoffmann, K., Hutchinson, K. A., Yem, A. W., Deibel Jr., M. R., Handschumacher, R. E., und Pratt, W. B.** (1995) The cyclosporin A-binding immunophilin CyP40 and the FK506-binding immunophilin hsp56 bind to a common site on hsp90 and exist in independent cytosolic heterocomplexes with the untransformed glucocorticoid receptor. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 20479-20484.
107. **Owens-Grillo, J. K., Stancato, L. F., Hoffmann, K., Pratt, W. B. und Krishna, P.** (1996): Binding of immunophilins to the 90 kDa heat shock protein (hsp90) via a tetratricopeptide repeat domain is a conserved protein interaction in plants. *Biochemistry* **35** (48), 15249-15255
108. **Paul, W. und Merrick, M.** (1987): The nucleotide sequence of the nifM gene of *Klebsiella pneumoniae* and identification of a new nif gene: nifZ. *European Journal of Biochemistry* **170** (1-2), 259-265
109. **Paul, W. und Merrick, M.** (1989): The roles of the nifW, nifZ and nifM genes of *Klebsiella pneumoniae* in nitrogenase biosynthesis. *European Journal of Biochemistry* **178** (3), 675-682
110. **Pearson, W.R. und Lipman, D.J.** (1988): FASTA . *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85**, 2444-2448
111. **Peterson, A.** (1996): Unveröffentlicht. Sequenzeintrag EMBL-Datenbank Y08273
112. **Pfeifer, T., Rucknagel, P., Kuellertz, G. und Schierhorn, A.** (1999): A strategy for rapid and efficient sequencing of Lys-C peptides by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry post-source decay. Rapid Communications. In: *Mass Spectrometry* **13** (5), 362-369
113. **Pirozzi, G., McConnell, S. J., Uveges, A. J., Carter, J. M., Sparks, A. B., Kay, B. K. und Fowlkes, D. M.** (1997): Identification of novel human WW domain-containing proteins by cloning of ligand targets . *Journal of Biological Chemistry* **272** (23), 14611-14616
114. **Provost, J. J., Fudge, J., Israelit, S., Siddiqi, A. R. und EXTON, J. H.** (1996): Tissue-specific distribution and subcellular distribution of phospholipase D in rat: evidence for distinct RhoA- and ADP-ribosylation factor (ARF)-regulated isoenzymes. *Biochemical Journal* **319**, 285-291
115. **Purnelle, B., Goffeau, A., Wood, V., Rajandream, M. A. und Barrell, B. G.** (1998): unveröffentlicht. EMBL-Sequenzeintrag CAA20742
116. **Qi, Y., Ogunbunmi, E. M., Freund, E. A., Timerman, A. P. und Fleischer, S.** (1998): FK-binding protein is associated with the ryanodine receptor of skeletal muscle in vertebrate animals. *Journal of Biological Chemistry* **273** (52), 34813-34819

117. **Rahfeld, J. U., Schierhorn, A., Mann, K. und Fischer, G.** (1994a): A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Escherichia coli*. SWISS-Prot-Sequenzeintrag S45525. *FEBS Letters* **343** (1), 65-69
118. **Rahfeld, J. U., Rucknagel, K. P., Schelbert, B., Ludwig, B., Hacker, J., Mann, K. und Fischer, G.** (1994b): Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl cis/trans isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin. *FEBS Letters* **352** (2), 180-184
119. **Ranganathan, R., Lu, K. P., Hunter, T. und Noel, J. P.** (1997): Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent. *Cell* **89** (6), 875-886
120. **Ratajczak, T., Carrello, A., Mark, P. J., Warner, B. J., Simpson, R. J., Moritz, R. L. und House, A. K.** (1993): The cyclophilin component of the unactivated estrogen receptor contains a tetratricopeptide repeat domain and shares identity with p59 (FKBP59). *Journal of Biological Chemistry* **268** (18), 13187-13192
121. **Ratajczak, T. und Carrello, A.** (1996): Cyclophilin 40 (CyP-40), mapping of its hsp90 binding domain and evidence that FKBP52 competes with CyP-40 for hsp90 binding. *Journal of Biological Chemistry* **271** (6), 2961- 2965
122. **Reimer, U., Scherer, G., Drewello, M., Kruber, S., Schutkowski, M. und Fischer, G.** (1998): Side-chain effects on peptidyl-prolyl cis/trans isomerisation. *Journal of Molecular Biology* **279** (2), 449-460
123. **Reinbothe, C., Diettrich, B. und Luckner, M.** (1990): Regeneration of plants from somatic embryos of *Digitalis lanata*. *J. Plant Physiol.* **137**, 224-228
124. **Rompf, A., Hyland, S., Hoffmann, T. und Jahn, D.** (1997): unveröffentlicht. EMBL-Sequenzeintrag CAA75544
125. **Roof, W. D., Horne, S. M., Young, K. D. und Young, R.** (1994): SlyD, a host gene required for phi X174 lysis, is related to the FK506-binding protein family of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerases. *Journal of Biological Chemistry* **269** (4), 2902- 2910
126. **Rouviere, P. E. und Gross, C. A.** (1996): SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes & Development.* **10** (24), 3182
127. **Rudd, K. E., Sofia, H. J., Koonin, E. V., Plunkett, G., III, Lazar, S. und Rouviere, P. E.** (1995): A new family of peptidyl-prolyl isomerases. *Trends in Biochemical Sciences* **20** (1), 12-14
128. **Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis** (1989): *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2nd Ed. Cold Spring Harbor, New York
129. **Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74** (12), 5463-5467

130. **Schechter, I. und Berger, A.** (1968): On the active site of proteases. Mapping the active site of papain; specific peptide inhibitors of papain. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **32** (5), 898-902
131. **Schelbert, B.** (1998): Untersuchungen zur Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase Parvulin aus *Escherichia coli* und dem homologen Protein Ptf1 aus *Saccharomyces cerevisiae*. *Dissertation*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
132. **Scherer, G., Kramer, M. L., Schutkowski, M., Reimer, U. und Fischer, G.** (1998): Barriers to rotation of secondary amide peptide bonds. *Journal of the American Chemical Society* **120** (22), 5568-5574
133. **Schleper, C., DeLong, E. F., Preston, C. M., Feldman, R. A., Wu, K. Y. und Swanson, R. V.** (1998): Genomic analysis reveals chromosomal variation in natural populations of the uncultured psychrophilic archaeon *Cenarchaeum symbiosum*. Sequenzeintrag AAC62692. *J. Bacteriology* **180** (19), 5003-5009
134. **Schmid, F. X., Mayr, L., Mücke, M. und Schönbrunner, R. E.** (1993) Prolyl isomerases: role in protein folding. *Adv. Prot. Chem.* **44**, 25-66.
135. **Schneuwly, S., Shortridge, R. D., Larrivee, D. C., Ono, T., Ozaki, M. und Pak, W. L.** (1989): *Drosophila ninaA* gene encodes an eye-specific cyclophilin (cyclosporine A binding protein). *Proceedings of the National Academy of Science* **86** (14), 5390 -5394
136. **Scholz, C., Stoller, G., Zarnt, T., Fischer, G. und Schmid, F. X.** (1997): Cooperation of enzymatic and chaperone functions of trigger factor in the catalysis of protein folding. *EMBO Journal* **16** (1), 54-58
137. **Scholze, C.** (1999): Isolierung und Charakterisierung einer Cyclophilin-cDNA aus *Digitalis lanata* und Expression in *E. coli*. *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
138. **Scholze, C., Peterson, A., Diettrich, B. und Luckner, M.** (1999): Cyclophilin isoforms from *Digitalis lanata*. Sequences and Expression during embryogenesis and stress. *Journal of Plant Physiology* **155** (2), 212-219
139. **Schreiber, S. L. und Crabtree, G. R.** (1992): The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunology Today* **13**, 136-142.
140. **Schutkowski, M., Bernhardt, A., Zhou, X. Z., Shen, M., Reimer, U., Rahfeld, J. U., Lu, K. P. und Fischer, G.** (1998): Role of phosphorylation in determining the backbone dynamics of the serine/threonine-proline motif and Pin1 substrate recognition. *Biochemistry* **37** (16), 5566-5575
141. **Shine, J. und Dalgarno, L.** (1975): Growth-dependent changes in terminal heterogeneity involving 3'-adenylate of bacterial 16S ribosomal RNA. *Nature* **256** (5514), 232-233

142. **Siekierka, J. J., Staruch, M. J., Hung, S. H. und Sigal, N. H.** (1989a): FK-506, a potent novel immunosuppressive agent, binds to a cytosolic protein which is distinct from the cyclosporin A-binding protein, cyclophilin. *Journal of Immunology* **143** (5), 1580-1583
143. **Siekierka, J. J., Hung, S. H., Poe, M., Lin, C. S. und Sigal, N. H.** (1989b): A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature* **341** (6244), 755-757
144. **Shen, M., Haggblom, C., Vogt, M., Hunter, T. und Lu, K. P.** (1997): Characterization and cell cycle regulation of the related human telomeric proteins Pin2 and TRF1 suggest a role in mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94** (25), 13618-13623
145. **Shen, M., Stukenberg, P. T., Kirschner, M. W. und Lu, K. P.** (1998): The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins. *Genes & Development* **12** (5), 706-720
146. **Shieh, B. H., Stamnes, M. A., Seavello, S., Harris, G. L. und Zuker, C. S.** (1989): The *ninaA* gene required for visual transduction in *Drosophila* encodes a homologue of cyclosporin A-binding protein. *Nature* **338** (6210), 67-70
147. **Smith, H., de Jong, A., Bron, S. und Venema, G.** (1988): Characterization of signal-sequence-coding regions selected from the *Bacillus subtilis* chromosome. EMBL-Sequenzeintrag I40003. *Gene* **70** (2), 351-361
148. **Smith, D. F., Baggenstoss, B. A., Marion, T. N. und Rimerman, R. A.** (1993): Two FKBP-related proteins are associated with progesterone receptor complexes. *Journal of Biological Chemistry* **268** (24) 18371
149. **Stamnes, M. A., Shieh, B. H., Chuman, L., Harris, G. L. und Zuker, C. S.** (1991): The cyclophilin homolog *ninaA* is a tissue-specific integral membrane protein required for the proper synthesis of a subset of *Drosophila* rhodopsins. *Cell* **65** (2), 219-227
150. **Stoller, G., Rucknagel, K. P., Nierhaus, K. H., Schmid, F. X., Fischer, G. und Rahfeld, J. U.** (1995): A ribosome-associated peptidyl-prolyl cis/trans isomerase identified as the trigger factor. *EMBO Journal* **14** (20), 4939-4948
151. **Stoller, G., Tradler, T., Rucknagel, K. P., Rahfeld, J.-U. und Fischer, G.** (1996): An 11.8 kDa proteolytic fragment of the *E. coli* trigger factor represents the domain carrying the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity. *FEBS Letters*. **384** (2), 117-122
152. **Stoller, G.** (1998): Charakterisierung des Triggerfaktors - einer ribosomenassoziierten Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase aus *Escherichia coli*. *Dissertation* Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
153. **Sudol, M., Bork, P., Einbond, A., Kastury, K., Druck, T., Negrini, M., Huebner, K. und Lehman, D.** (1995): Characterization of the mammalian YAP (Yes-associated

- protein) gene and its role in defining a novel protein module, the WW domain. *Journal of Biological Chemistry* **270** (24), 14733-14741
154. **Sudol, M., Chen, H. I., Bougeret, C., Einbond, A. und Bork, P.** (1995): Characterization of a novel protein-binding module--the WW domain. *FEBS Letters* **369** (1), 67-71
155. **Sudol, M.** (1996): Structure and function of the WW domain. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **65** (1-2), 113-132
156. **Takahashi, N., Hayano, T. und Suzuki, M.** (1989): Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* **337** (6206), 473-475
157. **Tewes, A., Wappler, A., Peschke, E. M., Garve, R., Nover, L.** (1982): Morphogenesis and embryogenesis in long-term cultures of *Digitalis*. *Z. Pflanzenphysiol.* **106**, 311-324
158. **The Qiaexpressionist™** (1998): Instruction Manual. 3rd Edition, Qiagen, Hilden, Deutschland
159. **Thomar, S., Dumke-Lehmann, U., Diettrich, B. und Luckner, M.** (1998): Gene control in somatic embryos of *Digitalis lanata*: Expression of the β -glucuronidase gene fused to a plastocyanin promoter. *Botanica Acta* **111**, 22-27
160. **Thompson, J. D., Higgins, D. G. und 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 Research* **22** (22), 4673-4680
161. **Timerman, A. P., Wiederrecht, G., Marcy, A. und Fleischer, S.** (1995): Characterization of an exchange reaction between soluble FKBP-12 and the FKBP ryanodine receptor complex. Modulation by FKBP mutants deficient in peptidyl-prolyl isomerase activity. *Journal of Biological Chemistry* **270** (6), 2451-2459
162. **Timerman, A. P., Onoue, H., Xin, H. B., Barg, S., Copello, J., Wiederrecht, G. und Fleischer, S.** (1996): Selective binding of FKBP12.6 by the cardiac ryanodine receptor. *Journal of Biological Chemistry* **271** (34), 20385-20391
163. **Tradler, T., Stoller, G., Rucknagel, K. P., Schierhorn, A., Rahfeld, J. U. und Fischer, G.** (1997): Comparative mutational analysis of peptidyl prolyl cis/trans isomerases: active sites of *Escherichia coli* trigger factor and human FKBP12. *FEBS Letters* **407** (2), 184-190
164. **Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J.** (1992): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979 [classical article]. *Biotechnology* **24**, 145-149

165. **Uchida, T., Fujimori, F., Tradler, T., Fischer, G. und Rahfeld, J. U.** (1999): Identification and characterization of a 14 kDa human protein as a novel parvulin-like peptidyl prolyl cis/trans isomerase. *FEBS Letters* **446** (2-3), 278-282
166. **Vos, R. M., Van Ommen, B., Hoekstein, M. S., De Goede, J. H. und Van Bladeren, P. J.** (1989): Irreversible inhibition of rat hepatic glutathione S-transferase isoenzymes by a series of structurally related quinones. *Chemico-Biological Interactions* **71** (4), 381-392
167. **Vucich, V. A. und Gasser, C. S.** (1996): Novel structure of a high molecular weight FK506 binding protein from *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & General Genetics* **252** (5), 510-517
168. **Wagenknecht, T., Radermacher, M., Grassucci, R., Berkowitz, J., Xin, H. B., und Fleischer, S.** (1997) Locations of calmodulin and FK506-binding protein on the three-dimensional architecture of the skeletal muscle ryanodine receptor. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 32463-32471
169. **Wallis, J. M.** (1999): unveröffentlicht. EMBL-Sequenzeintrag CAB55116.
170. **Webb, J. L.** (1966): *Enzyme and Metabolic Inhibitors*. Vol. III, Academic Press, New York.
171. **Wieggers, K., Rutter, G., Schubert, U., Grattinger, M. und Krausslich, H. G.** (1999): Cyclophilin A incorporation is not required for human immunodeficiency virus type 1 particle maturation and does not destabilize the mature capsid. *Virology* **257** (1), 261-274
172. **Winkler, K. E., Swenson, K. I., Kornbluth, S., Means, A. R.** (2000): Requirement of the prolyl isomerase Pin1 for the replication checkpoint. *Science* **287** 1644-1647
173. **Wüthrich, K., Grathwohl, C. und Schwyzer, R.** (1974): In *Peptides, Polypeptides and Proteins*, Wiley, New York
174. **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., Cantley, L. C. und Lu, K. P.** (1997): Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science* **278** (5345), 1957-1960
175. **Yagi, R., Chen, L. F., Shigesada, K., Murakami, Y. und Ito, Y.** (1999): A WW domain-containing Yes-associated protein (YAP) is a novel transcriptional co-activator. *EMBO Journal* **18** (9), 2551-2562
176. **Yokoi, H., Kondo, H., Furuya, A., Hanai, N., Ikeda, J. E. und Anazawa, H.** (1996): Characterization of cyclophilin 40: highly conserved protein that directly associates with Hsp90. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **19** (4), 506-511

177. **Zhou, X. Z., Lu, P. J., Wulf, G. und Lu, K. P.** (1999): Phosphorylation-dependent prolyl isomerization: a novel signaling regulatory mechanism [Review]. *Cellular & Molecular Life Sciences* **56** (9-10), 788-806

Danksagung

Die hier vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Biologie des Fachbereiches Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in enger Kooperation mit der Max-Planck-Arbeitsgruppe „Enzymologie der Proteinfaltung“ in Halle/Saale angefertigt.

Ich möchte mich ganz herzlich bei den Mitarbeitern beider Institute, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben, für die Zusammenarbeit und die freundliche Atmosphäre bedanken. Es hat mir viel Freude gemacht.

Prof. Dr. Beate Diettrich, Prof. Dr. Martin Luckner und Prof. Dr. Gunther Fischer danke ich für die Überlassung des Themas und die Schaffung der guten Arbeitsmöglichkeiten.

PD Dr. habil. Gerd Küllertz gilt mein Dank für die gute Betreuung und Zusammenarbeit, die wertvollen Tips und Ratschläge beim experimentellen Teil der Arbeit, die vielen fachlichen Gespräche und Diskussionen und die Geduld, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ohne seine Unterstützung wäre die Arbeit wohl nicht zu bewältigen gewesen.

Dr. Frieder Müller-Uri danke ich ebenfalls für die gute Zusammenarbeit und die vielen fachlichen Diskussionen und Gespräche.

Hannes Framm möchte ich erwähnen wegen der vielen Gespräche, Diskussionen und Erlebnisse, die unsere gemeinsame Doktorandenzeit am Institut für Pharmazeutische Biologie begleitet haben und die wir, so hoffe ich, in guter Erinnerung behalten werden. Weiterhin danke ich ihm für das kritische Lesen der vorliegenden Arbeit sowie einiger Manuskripte.

Andreas Werner, Matthias Weiwad und Frank Erdmann möchte ich als hilfsbereiten Mitstreitern im gemeinsamen Labor danken.

Mein Dank gilt ebenfalls *Dr. Jens Rahfeld* für die zahlreichen Diskussionen und Gespräche über Parvuline und das kritische Lesen der Arbeit.

Dr. A. Peterson danke ich für die freundliche und gute Zusammenarbeit in Bezug auf die vielen DNA-Sequenzierungen am A.L.F.-Sequencer und die Bereitstellung der PEMs-cDNA-Bank aus *D. lanata*.

Dr. Mike Schutkowski danke ich für die Bereitstellung der Peptidsubstrate.

Dr. Peter Rücknagel gilt mein Dank für den richtigen Treffer bei der Protein-Sequenzierung und die Geduld bei den vielen Chromatographie-Läufen an der HPLC-Anlage.

Für die Aufnahme der Massenspektren danke ich *Dr. Angelika Schierhorn* und *Marc Kipping*.

Anne Lohaus danke ich für die Unterstützung, die sie im Rahmen ihrer Diplomarbeit über das phospho-spezifischen Parvulin aus *A. thaliana* geleistet hat.

Für die technische Unterstützung gilt mein Dank *Frau Beate Schöne*, *Frau D. Watzka*, *Frau K. Ostrecha* und *Frau H. Ungar*. Besonders hervorheben möchte ich noch einmal *Frau Beate Schöne*, die sehr häufig die vielen kleinen Dinge im Labor erledigt hat, die nie erwähnt werden, aber doch für ein gutes Arbeiten unerlässlich sind.

Dankend erwähnen möchte ich ebenfalls meine Eltern. Auch wenn Sie nicht direkt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, so doch dadurch, daß Sie die Grundlagen für meine Ausbildung gelegt haben.

Das Beste zum Schluß. Meiner Frau Regina danke ich für die vergangenen vier gemeinsamen Jahre.

Lebenslauf

Name: Metzner
Vorname: Martin
Geburtsdatum: 12.01.1970
Geburtsort: Erfurt

Familienstand:

- verheiratet

schulische Ausbildung:

- Besuch der Polytechnischen Oberschule in Leinefelde und Jena von 1976 - 1986
- Besuch der Erweiterten Oberschule in Jena von 1986 - 1988

Wehrdienst:

- von 1988 - 1990 in Leipzig

berufliche Ausbildung:

- Studium der Pharmazie von 1990 - 1994 an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Oktober 1994 bis März 1995 Pharmaziepraktikum in der Theater-Apotheke Weimar
- April 1995 bis Oktober 1995 Diplomand am Fachbereich Pharmazie, Institut für Pharmazeutische Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- November 1995 Approbation als Apotheker

Promotion:

- von Januar 1996 bis Dezember 1996 Stipendiat des Cusanuswerkes
- seit Januar 1997 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter der Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt habe. Ich versichere weiterhin, daß anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche gekennzeichnet wurden.

(Martin Metzner)

Halle (Saale), im März 2000