

Das humane Parvulin 14: Struktur und Untersuchungen an Substrat- und DNA-Komplexen

Dissertation

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

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Dipl.-Pharm. Elena Sekerina
geb. am 1. Dezember 1976 in Ismajlowo (Russland)

Gutachter:

1. Prof. Dr. G. Fischer
2. Prof. Dr. G. Hübner
3. PD Dr. A. Scheidig

Verteidigungsdatum: 31. Januar 2002

urn:nbn:de:gbv:3-000003082

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003082>]

Abkürzungsverzeichnis

Zur Abkürzung der Aminosäurenbezeichnungen sind die Drei- bzw. Einbuchstabenkodierungen nach Vorschlägen der IUPAC-IUB-Kommission für Biochemische Nomenklatur verwendet worden (*Eur. J. Biochem.* **1984**, 138, 9-37).

1D, 2D, 3D	ein-, zwei-, dreidimensional
Å	Angström
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
CD	Circulardichroismus
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
CSI	<i>chemical shift index</i>
Da	Dalton
δ	chemische Verschiebung
DIPSI	<i>decoupling in the presence of scalar interactions</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FID	<i>free induction decay</i>
Gl.	Gleichung
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinoethansulfonsäure
HSQC	<i>heteronuclear single quantum correlation</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
Kap.	Kapitel
K _d	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
LB	Luria-Bertani
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOE	<i>nuclear Overhauser enhancement</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
ppm	<i>parts per million</i>
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
P.Ser-	Phosphoserin
rpm	<i>rotations/min</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
T1	Longitudinale Relaxationszeit
TPPI	<i>time proportional phase incrementation</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TOCSY	<i>total correlated spectroscopy</i>
UV	Ultravioletter Spektralbereich
VDW	van der Waals
X, Xaa	Beliebige proteinogene Aminosäure (Ein- bzw. Dreibuchstabencode)
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Definition und Einteilung der PPIasen	1
1.2	Definition und Einteilung der Parvuline	2
1.2.1	Prokaryotische Parvuline	2
1.2.2	Eukaryotische Parvuline	3
1.2.2.1	Phosphatspezifische Parvuline vom <i>hPin1</i> -Typ	4
1.2.2.2	Phosphatspezifische pflanzliche Parvuline	6
1.2.2.3	Nichtphosphatspezifische eukaryotische Parvuline	7
1.3	Aufgabestellung	7
2	Strukturaufklärung von Proteinen mittels NMR-Spektroskopie	9
3	Materialien und Methoden	13
3.1	Enzyme und Chemikalien	13
3.2	Kits und Standards	13
3.3	Bakterienstamm	13
3.4	Plasmide, Oligonukleotide und Peptide	13
3.4.1	Plasmide	13
3.4.2	Oligonukleotide	14
3.4.3	Peptide	15
3.5	Medien, Antibiotika und Puffer	15
3.6	Allgemeine gentechnische Methoden	16
3.6.1	Kultivierung und Konservierung von <i>E.coli</i> -Stämmen	16
3.6.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	16
3.6.3	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	17
3.6.4	Gelelektrophorese von DNA	17
3.6.5	Restriktion	18
3.6.6	Ligation	18
3.6.7	Transformation von <i>E.coli</i> mit Plasmid-DNA	18
3.7	Allgemeine proteinchemische Methoden	18

3.7.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	18
3.7.2	N-terminale Proteinsequenzierung	19
3.7.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	20
3.8	Isolierung von bakteriell expremiertem <i>hPar14</i> mit Hilfe des GST Genfusion System	20
3.9	<i>Miniprep</i>-Reinigung des C-terminal His-getagten <i>hPar14</i> (<i>hPar14-6His</i>) aus <i>E. coli</i>	21
3.9.1	Herstellung des Expressionsplasmids	21
3.9.2	Anzucht von Bakterien und Zellaufschluss	21
3.9.3	Mini-Präparation von <i>hPar14-6His</i>	22
3.10	Fluoreszenzspektroskopie	22
3.10.1	Probenvorbereitung	22
3.10.2	Fluoreszenztitration	22
3.11	NMR-Spektroskopie	23
3.11.1	Herkunft der Proteine	23
3.11.2	Probenvorbereitung	23
3.11.3	Allgemeine Messbedingungen	24
3.11.4	Aufnahmeparameter	24
3.11.5	Prozessierung und Auswertung der NMR-Spektren	25
3.11.5.1	Analyse der Signalverschiebung nach Bindung von <i>hPar14</i> an ein Modellsubstrat	26
3.11.5.2	¹⁵ N-HSQC-Titration von <i>hPar14</i> mit einem Oligonukleotid	26
3.11.5.3	Bestimmung der Austauschraten von Amidprotonen	26
3.11.5.4	Bestimmung der R ₁ - Relaxationsraten von Amidstickstoffatomen	27
3.12	Sekundärstruktur-Bestimmung	27
3.12.1	Distanz- und Winkeleinschränkungen	27
3.12.1.1	Distanzeinschränkungen aufgrund von NOEs	27
3.12.1.2	Distanzeinschränkungen aufgrund von Wasserstoffbrücken	27
3.12.1.3	Einschränkungen dihedraler Winkel	28
3.12.2	Sekundärstrukturbestimmung nach Wishart	28
3.13	Strukturberechnung mit X-PLOR	29
4	Ergebnisse	30
4.1	Klonierung und Expression von <i>hPar14</i> in <i>Escherichia coli</i>	30
4.1.1	Strategie	30
4.1.2	Herstellung eines GST-Fusionproteins	30
4.1.2.1	Ausgangspunkt: pGEX-4T-2- <i>hPar14</i>	30

4.1.2.2	Isolierung von GST- <i>hPar14</i> -Fusionsprotein	30
4.1.2.3	Abspaltung des GST-Teils vom Fusionsprotein	31
4.1.2.4	Trennung der Fragmente nach Thrombin-Spaltung	32
4.1.3	Etablierung des <i>E. coli</i> M15/pQE70- <i>hPar14</i> Expressionssystems	33
4.1.3.1	PCR-Klonierung von <i>hPar14</i> in pQE70	33
4.1.3.2	Expression von <i>hPar14</i> mit C-terminalem Hexa-Histidin-Anhang	33
4.1.3.3	<i>Miniprep</i> -Isolierung des <i>hPar14</i> -6His	34
4.1.3.4	Untersuchung zur Identität des <i>hPar14</i> -6His	34
4.1.4	¹⁵ N, ¹³ C-Markierung von <i>hPar14</i>	36
4.2	NMR-Struktur von <i>hPar14</i> in Lösung	36
4.2.1	Homonukleare zweidimensionale Experimente	36
4.2.1.1	Identifizierung der Spinsysteme mit Hilfe von 2D-Spektren	37
4.2.1.2	Sequentielle Zuordnung der Spinsysteme mit Hilfe von 2D-Spektren	38
4.2.2	Heteronukleare Spektren	40
4.2.2.1	Zuordnung der Heterokernresonanzen des Proteinrückgrats	40
4.2.2.2	Zuordnung der Seitenkettensignale	43
4.2.3	Bestimmung von Sekundärstrukturparametern	44
4.2.3.1	Bestimmung der Sekundärstruktur mit Hilfe der chemischen Verschiebungsanalyse	45
4.2.3.2	Quantitative Bestimmung der ³ J(H _N -H _α)-Kopplungskonstante	46
4.2.3.3	Analyse von NOE-Kreuzresonanzen	47
4.2.3.4	Austausch von H _N -Protonen in D ₂ O	49
4.2.3.5	Zusammenfassende Charakterisierung der Sekundärstrukturelemente	50
4.2.4	Berechnung und Charakterisierung der dreidimensionalen Struktur	51
4.2.4.1	Strukturberechnung	51
4.2.4.2	Qualität der Strukturen	53
4.2.4.3	Die Tertiärstruktur von <i>hPar14</i>	54
4.3	Untersuchungen zur Interaktion von <i>hPar14</i> mit einem Modelsubstrat	55
4.3.1	Einfluß der Substratbindung auf die chemische Verschiebung	56
4.3.2	Einfluß der Substratbindung auf die Austauschraten von H _N -Protonen in D ₂ O	57
4.3.3	Einfluß der Substratbindung auf die T ₁ – Zeiten	59
4.4	Untersuchungen des <i>hPar14</i>-DNA Komplexes	61
4.4.1	Untersuchungen an <i>hPar14</i> -ds-Oligonukleotid-Komplexen	61
4.4.1.1	Fluoreszenztitrations zur Bestimmung des Einflusses einzelner Basenpaarvariationen der <i>consensus</i> -Sequenz auf die Bindung	61
4.4.1.2	Gelretardationsassay mit <i>hPar14</i> und ds-Oligonukleotid	64
4.4.1.3	NMR-Spektroskopie	65
4.4.1.3.1	Beobachtung der Komplexbildung mit ¹ H-NMR	65
4.4.1.3.2	Bestimmung des Bindungsinterfaces von <i>hPar14</i> ₁₋₁₃₁	66
4.4.1.3.3	Untersuchungen zum Bindungsverhalten von <i>hPar14</i> ₂₅₋₁₃₁	67
4.4.2	Wechselwirkung von <i>hPar14</i> mit ss-Oligonukleotiden	69
4.4.3	Wechselwirkung von <i>hPar14</i> mit einem RNA-Oligonukleotid	70

5	Diskussion	72
5.1	<i>hPar14</i> besitzt eine FKBP-ähnliche Topologie	72
5.2	Die aktiven Zentren der Parvuline sind konserviert	74
5.3	Neuordnung des <i>alignment</i> von Parvulinsequenzen bezüglich ihrer PPIase-Domänen	76
5.4	Unterschiede in <i>loop</i>-Regionen und Oberflächenladungen liefern eine Basis für die Funktionalität der Parvuline	78
5.5	Die Bindung von Succinyl-Ala-Arg-Pro-Phe-para-nitroanilin an <i>hPar14</i> verändert dessen Konformation	82
5.6	<i>hPar14</i> ist ein DNA-bindendes Protein	83
6	Zusammenfassung	87
7	Literatur	89
8	Anhang	96

1. Einleitung

1.1 Definition und Einteilung der PPIasen

In Proteinstrukturen nehmen zwei aufeinanderfolgende Aminosäuren meist eine *trans*-Konformation gegenüber ihre Peptidbindung ein. Nur in seltenen Fällen konnten bisher in ungefalteten Proteinen *cis*-Isomere nachgewiesen werden [1]. Eine Ausnahme machen jedoch Peptidbindungen, in denen die Iminosäure Prolin C-terminal beteiligt ist. Die *cis*-Isomere sind hier oft stärker populiert wegen des geringen Energieunterschieds im Grundzustand zwischen der *cis*- und *trans*-Konformation [2]. Die *cis/trans*-Isomerisierung der Peptidbindung zwischen dem Imidstickstoff des Prolins und dem Carbonylkohlenstoff der N-terminalen Aminosäure mit darauffolgender Konformationsumwandlung der naszierenden Polypeptidkette ist ein wichtiger Prozess bei der Proteinfaltung [3]. Die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung ist eine langsame Reaktion, welche die Entfaltungsraten von Proteinen *in vitro* und *in vivo* limitieren kann [4,5,6]. Diese Reaktion kann durch besondere Enzyme beschleunigt werden [7]. Entsprechend ihrer enzymatischen Aktivität werden sie als Peptidyl-Prolyl *cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) bezeichnet.

Bisher sind drei Familien von PPIasen bekannt: die Cyclophiline, die FK506 bindenden Proteine (FKBP) [8] und seit 1994 die Familie der Parvuline [9,10,11]. Zwischen diesen drei PPIase-Familien besteht keine Sequenzhomologie. Sie unterscheiden sich auch hinsichtlich der Substratspezifität und der Hemmung durch spezifische Inhibitoren. Dabei inhibiert das Cyclosporin A die PPIase-Aktivität der Cyclophiline [12,13] und das FK506 – die der FKBP [8]. Die PPIase-Aktivität der Parvuline wird weder durch FK506 noch durch Cyclosporin A inhibiert [10]. Für einige Vertreter der Parvulin-Familie (*E. coli* Parvulin, Ess1/Ptf1, hPin1, DIPar13) konnte jedoch eine irreversible Hemmung der PPIase-Aktivität durch Juglon (5-Hydroxy-1,4-Naphthochinon) nachgewiesen werden [14,15].

Die Substratspezifität ist bei jeder Familie der PPIasen unterschiedlich. Bei den FKBP und Cyclophilinen besteht eine eingeschränkte Spezifität für Substrate mit hydrophoben Aminosäureresten N-terminal zu Prolin [16]. Im Allgemeinen bevorzugen Cyclophiline an dieser Stelle aliphatische Reste im Gegensatz zu langkettigen oder aromatischen hydrophoben Seitenketten. FKBP weisen die umgekehrte Präferenz auf. Die Unterschiede in k_{cat}/K_M – Werten sind aber nicht deut-

lich ausgeprägt [17]. Prokaryotische Parvuline weisen kein allgemeines Muster für eine Substratspezifität bezüglich der Aminosäure N-terminal zu Prolin. Eine höhere Substratspezifität als die bisher erwähnten PPIasen besitzen phosphatspezifische Parvuline. Die k_{cat}/K_M -Werten für Substrate, bei denen eine Phosphoserin oder -threonin N-terminal zum Prolin vorhanden ist, sind je nach PPIase und Substrat zwei bis vier Größenordnungen größer als die für Substrate mit nicht phosphoryliertem Serin oder Threonin [15].

1.2 Definition und Einteilung der Parvuline

PPIasen werden der Parvulin-Familie zugeordnet, wenn sie eine ausgeprägte Sequenzhomologie zu Par10 aus *E. coli* [11] aufweisen und sich weder durch FK506 noch durch Cyclosporin A hemmen lassen. Zu der Familie der Parvuline zählen sowohl eukaryotische als auch prokaryotische Vertreter. Bis jetzt sind jedoch noch keine Parvuline in *Archea* gefunden [18].

1.2.1 Prokaryotische Parvuline

Der erste biochemisch charakterisierte Vertreter der Parvuline war Par10 aus *E. coli* [11], das gleichzeitig der erste entdeckte Vertreter der Parvuline überhaupt ist. Dieses Protein wurde wegen seines geringen Molekulargewichts von 10.1 kDa „Parvulin“ genannt (lat.: *parvulus*, sehr klein) [11]. Einer der größte bekannte Vertreter der Parvuline, SurA (EcPvn47), ist auch ein prokaryotisches periplasmatisches Protein, das an der Trimerisierung von LamB, einem Membranprotein, beteiligt ist [19]. Prokaryotische Parvuline können sowohl nur eine PPIase-Domäne (Par10 aus *E. coli* und Homologe) als auch zwei (SurA aus *E. coli* und Homologe) enthalten. Parvuline des PpiD-Typs haben einen zusätzlichen N-terminalen Transmembrananker und können strukturell dem TypII der Transmembran-Proteine zugeordnet werden [20].

Parvuline erfüllen in der prokaryotischen Zelle vielfältige Funktionen. PpiD aus *E. coli* [20], deren PPIase-Domäne sich im Periplasma befindet, hat eine essentielle Funktion bei der Reifung der Membranproteine OmpA und OmpF. Das Lipoprotein PrsA spielt bei späteren Stadien des Proteinexportes in *Bacillus subtilis* [21] eine Rolle. Lipoprotein PrtM aus *Lactococcus lactis* [22] ist an der Reifung der Serinprotease SK11 beteiligt und NifM aus *Azotobacter vinelandii* [23] nimmt an der Stabilisierung und Aktivierung der eisenhaltigen Komponente (nifH) der Nitrogenase teil [31]. Zusätzlich zu den bekannten Parvulinen wurde während der Genom-

sequenzierung eine Reihe von hypothetischen Proteinen in verschiedenen Bakterien gefunden [24-29] und aufgrund ihrer Sequenzhomologie den Parvulinen zugeordnet (Abb. 1-1). Die prokaryotischen Parvuline weisen neben ihrer PPIase-Aktivität auch eine Chaperon-Aktivität (PpiD, SurA) auf [30].

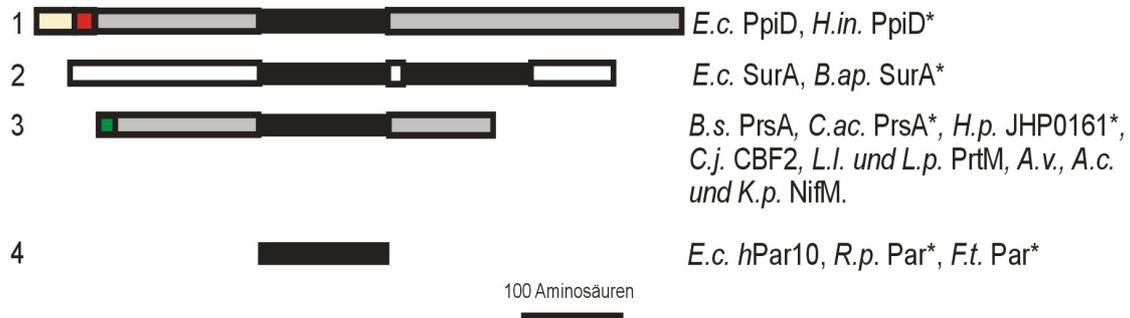


Abb. 1-1: Die Domänenstrukturen der nichtphosphatspezifischen Parvuline (modifiziert nach Rahfeld, 1999 [15]). Links ist der Aufbau schematisch dargestellt, rechts sind die entsprechenden Proteinnamen aufgeführt (*-hypothetische Proteine). Die Par10-ähnliche Domäne ist schwarz gefärbt. Die Farben bezeichnen: rosa – cytoplasmatische Domäne, rot – transmembran-Domäne, grau – periplasmatische Domäne, grün - Signalsequenz, blau – eigentliches/r Protein/Faktor. *E.c. PpiD* (P77241), *E.c. SurA* (P2102) und *E.c. Par10* (S45525) sind aus *E.coli*, *B.ap. SurA** (P57240) aus *B.aphidicola* und *B.s. PrsA* (P24327) aus *B.subtilis*, *C.ac. PrsA** (AAK81151) aus *C.acetobutilicum*, *H.p. JH0161** (Q9ZMQ7) aus *H.pylori*, *C.j. CBF2* (CAB75232) aus *C. jejuni*, *L.l. PrtM* (P14308) aus *L.lactis*, *L.p. PrtM* (Q02473) aus *L. paracasei*, *A.v. NifM* (PI4890) aus *A.vinelandii*, *A.c. NifM* (P23119) aus *A.chroococcum*, *K.p. NifM* (P08534) aus *K.pneumonie*, *R.p. Par** (CAC10161) aus *R.prowazekii* und *F.t. Par** (AAG33120-5) aus *Fransciella sp.*

Zu Beginn dieser Arbeit war die dreidimensionale Struktur prokaryotische Parvuline unbekannt. Parallel zur vorliegenden Arbeit wurden stukturelle Untersuchungen an Par10 aus *E. coli* durchgeführt [52], die Struktur wurde aber bis Ende 2001 in der Literatur nicht erwähnt.

1.2.2 Eukaryotische Parvuline

Aufgrund der biochemischen Eigenschaften lassen sich zwei Subfamilien der eukaryotische Parvuline unterscheiden, wobei die erste ausschließlich Vertreter mit Substratspezifität für phosphorylierten Peptide enthält, die sich durch Juglon hemmen lassen [15]. Die zweite Gruppe von Parvulinen (*hPar14* und Homologa) ist nicht phosphatspezifisch.

Im Falle der phosphatspezifischen Parvuline kann eine WW-Domäne [18] N-terminal zur PPIase-Domäne vorhanden sein (*hPin1*-Typ) oder fehlen (pflanzliche Parvuline). Eukaryotische nichtphosphatspezifische Parvuline, wovon nur der humane Vertreter bis jetzt isoliert und biochemisch charakterisiert ist [32], besitzen zusätzlich zur

PPIase-Domäne eine N-terminale Erweiterung aus 30-35 Aminosäuren [33]. Die Struktur und Funktion dieser neuen Domäne ist bisher nicht beschrieben worden.

1.2.2.1 Phosphatspezifische Parvuline vom *hPin1*-Typ

Zum *hPin1*-Typ gehört die Mehrzahl der bis jetzt identifizierten phosphatspezifischen Parvuline, die eine WW-Domäne N-terminal zur PPIase-Domäne enthalten, wie *Pin1* aus *Homo sapiens* (*hPin1*) [34], *ESS1/Ptf1* aus *Saccharomyces cerevisiae* [35], *Pin1* aus *Mus* sp. (*mPin1*) [36], *Dodo* aus *Drosophila melanogaster* [37], *Pin1* aus *Xenopus laevis* (*xPin1*) [38], *PINA* aus *Aspergillus nidulans* [39] und *SspI* aus *Neurospora crassa* [40]. Die Parvuline dieser Gruppe sind essentielle (*hPin1*, *Ptf1*) PPIasen [34,35,41], die an wesentlichen zellulären Prozessen beteiligt sind. Genetische Studien der Hefe-PPIasen zeigten, daß die Deletion nur eines einzigen Parvulins (*Ptf1*) letal ist. Vertreter der phosphatspezifischen Parvuline aus anderen Organismen, z.B. *Dodo* oder *hPin1*, können alle essentiellen Funktionen des *Ptf1* übernehmen und den letalen Effekt vermeiden [34].

hPin1 ist die am besten untersuchte PPIase der Parvulin-Familie und der charakteristische Vertreter der phosphatspezifischen Parvuline. Im Jahre 1996 entdeckt [34] und als NIMA-Kinase-wechselwirkendes Protein bezeichnet, wurde *hPin1* 1999 wegen seiner essentiellen Beteiligung bei der Regulation des Zellzyklus als mitotischer Regulator erkannt [42]. *hPin1*-Depletion in Hela-Zellen verursacht eine zum Zelltod führende Blockierung der Mitose, während eine Überexpression zu einem „Arrest“ in der G2-Phase führt. Neben der Katalyse von phosphorylierten Substraten wurde die direkte Bindung an eine große Anzahl mitotischer Phosphoproteine, wie z.B. *Cdc25*, *Myt1*, *Wee1*, *Plk1*, *Cdc4* festgestellt [39, 42-44]. Diese Wechselwirkungen werden durch die WW-Domäne vermittelt [45]. Etwas später wurde die Beteiligung von *hPin1* an anderen zellulären Prozessen unabhängig vom Zellzyklus festgestellt. *hPin1* bewirkt bei seinen Substratproteinen eine Konformationsänderung, so daß letztere durch Proteinphosphatase 2A dephosphoryliert werden können. Auf dieser Weise fördert *hPin1* die Dephosphorylierung des hyperphosphorylierten Tau-Proteins, wie es im Gehirn von Alzheimer-Patienten vorliegt [46].

Strukturelle Untersuchungen an Parvulinen wurden ausschließlich an *hPin1* gemacht. Die erste Struktur von *hPin1*, dessen PPIase-Domäne mit einem Sulfat-Ion und einem Ala-Pro-Dipeptid (Abb. 1-2) komplexiert ist, wurde im Jahr 1997 mittels

Röntgenstrukturanalyse (1.35 Å Auflösung) aufgeklärt [47]. Bei einer weiteren strukturellen Untersuchung wurde die Kristallisierung von *hPin1* im Komplex mit phosphoryliertem Substrat vorgenommen. Die resultierende Struktur, wurde im Jahr 2000 mit einer Auflösung von 1.98 Å veröffentlicht [48]. Das Substrat, in diesem Falle das Heptapeptid Tyr-P.Ser-Pro-Thr-P.Ser-Pro-Ser aus dem C-terminalen Teil der größeren Einheit der RNA-Polymerase II, bindet an die WW-Domäne von *hPin1*, nicht jedoch an die katalytische PPIase-Domäne. Die erste der beiden veröffentlichten Strukturen soll im Folgenden kurz vorgestellt werden (Abb. 1-2) .

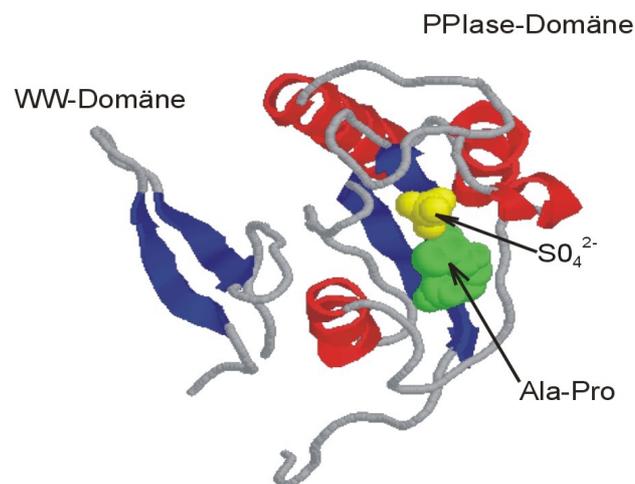


Abb. 1-2: Struktur von *hPin1*. Die Darstellung erfolgte mit dem Programm Rasmol unter Verwendung der Struktur mit kokristallisiertem Ala-Pro-Peptid und einem Sulfat-Ion (Ranganathan et al., 1997; PDB: 1PIN). Die Sekundärstrukturelemente sind rot (α -Helices) und blau (β -Stränge) markiert.

hPin1 besteht aus einer N-terminalen WW-Domäne und einer C-terminalen PPIase-Domäne, die durch einen *Gly-linker* verbunden sind. Die „Berührungsfläche“ der beiden Domänen ist gut definiert, dabei sind Aminosäurereste der $\beta 2'/\beta 3'$ *loop*-Region und des β -Strang-3' aus der WW-Domäne zusammen mit Aminosäureresten der α -Helices-1 und 4 und dem mittleren Teil des β -Strang-3 der PPIase-Domäne an der Interaktion beteiligt. Die N-terminale WW-Domäne von *hPin1* besteht aus einem viersträngigen antiparallelen β -Faltblatt und stellt ein häufig vorkommendes Strukturmotiv dar [45], das bei anderen Proteinen die Wechselwirkung mit poly-Prolin-haltigen Substraten vermittelt. Die wesentlichen Strukturelemente der C-terminale PPIase-Domäne sind ein viersträngiges β -Faltblatt (Anordnung $\beta 2, \beta 1, \beta 4, \beta 3$), eine komplexe Schleife zwischen β -Strang-1 und -2, bestehend aus

drei α -Helices und anschließenden Loops, und zudem eine α -Helix, die das Faltblattgerüst umgibt und β -Stränge-2 und 3 sequenziell miteinander verbindet.

Die PPIase Domäne wurde zusammen mit einem Sulfation kokristallisiert. Es wird spekuliert, daß das Ion die Phosphatgruppe eines möglichen phosphorylierten Substratmoleküles ersetzen könnte. Die in räumlicher Nachbarschaft angesiedelten positiv geladenen Seitenketten der Aminosäuren Lys63, Arg68 und Arg69, wären dann an der Bindungstasche für die Phosphatgruppe beteiligt. Eine Struktur mit einem phosphoryliertem Substrat in der PPIase-Domäne wurde bisher allerdings nicht veröffentlicht.

Die Peptidbindung des kokristallisierten Ala-Pro Dipeptids wird von den Aminosäuren His59, Cys113, Ser154 und His157 umgeben, die symmetrisch um die Bindungsachse angeordnet sind. Alle vier Reste sind innerhalb der phosphatspezifischen Parvuline konserviert. Die Prolinseitenkette liegt in einer hydrophoben Bindungstasche, an deren Aufbau die Aminosäuren Leu122, Met130 und Phe134 beteiligt sind.

1.2.2.2 Phosphatspezifische pflanzliche Parvuline

Jede Pflanzenzelle scheint mindestens ein Parvulin-Gen zu enthalten, in manchen Fällen, wie in *Glycine max* und *Lycopersicum esculentum* wurden sogar mehrere Gene davon identifiziert [49]. Alle bis jetzt gewonnenen pflanzlichen Parvuline (Pin1 aus *Arabidopsis thaliana* (AtPin1) [50], Pin1 aus *Malus domestica* (MdPin1) [49], Par13 aus *Digitalis lanata* (DIPar13) [15]) zeigen eine starke Präferenz für phosphorylierte Substrate ohne jedoch eine N-terminale WW-Domäne zu besitzen. Der Teil, der wahrscheinlich die Funktion einer WW-Domäne bei der Protein-Protein-Wechselwirkung ersetzt ist die hydrophobe α -Helix-1 der PPIase-Domäne [50]. Die Expression von pflanzlichen Parvulinen in *Saccharomyces cerevisiae* kann den letalen Effekt von mutiertem Ptf1 genauso effektiv wieder aufheben wie die Expression von hPin1 [34]. Dies weist darauf hin, dass alle phosphatspezifischen Parvuline eine ähnliche zelluläre Funktion erfüllen, die am besten für das humane Pin1 aufgeklärt ist [49].

Es gibt keine Struktur eines pflanzlichen Parvulins in der PDB-Datenbank. Bis jetzt wurde nur die NMR-Zuordnung von Pin1 aus *Arabidopsis thaliana* veröffentlicht

[51]. Die Sekundärstrukturelemente haben die Anordnung $\beta\alpha\alpha\beta\alpha\beta\beta$ und sind damit der Sekundärstruktur von *hPin1* [47] ähnlich.

1.2.2.3 Nichtphosphatspezifische eukaryotische Parvuline

Der erste Vertreter der nichtphosphatspezifischen Parvuline aus höheren Organismen, das humane Par14, wurde im Jahre 1999 aus einer Lungen cDNA-Bibliothek gewonnen und biochemisch charakterisiert [32]. Bei der Suche nach Homologen wurden mehrere Gene von nichtphosphatspezifischen Parvulinen aus verschiedenen *Eukaryoten* identifiziert. Alle diese hypothetischen Proteine sollten eine *hPar14*-ähnliche Domänenstruktur besitzen [33]. Eine Sequenzanalyse zwischen der PPIase-Domäne von *hPar14* und *E.coli* Par10 liefert eine 34,5%ige Identität und 73,6%ige Homologie. Die ersten 41 Aminosäuren von *hPar14* zeigen zudem eine 40-50%ige Sequenzhomologie zu glycinreichen Sequenzen der chromosomalen HMG17-Proteine [32]. Die PPIase-Aktivität von *hPar14* bezüglich verschiedener Oligopeptide ist im Gegensatz zu *hPin1* um drei Größenordnungen geringer, dabei ist die Aktivität für Oligopeptide mit einer Arg-Pro Einheit am höchsten [$k_{cat}/K_M = 4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$] [32]. Es wurde nachgewiesen, dass *hPar14* sich sowohl im Kern als auch im Cytoplasma und in den Mitochondrien von HEK293-Zellen befindet [33].

Die zelluläre Funktion von *hPar14* wurde bisher nicht untersucht. Es gibt aber einige Hinweise, dass die beiden humanen Parvuline, *hPar14* und *hPin1*, funktionell nicht verwandt sind. Für eine unterschiedliche Funktion der beiden Proteine spricht die verschiedene zelluläre Lokalisierung und der experimentelle Befund, dass *hPar14* den Phänotyp einer *Ptf1*-Hefemutante nicht kompensieren kann, *hPin1* jedoch sehr wohl [15]. Zu Beginn dieser Arbeit war die Struktur von *hPar14* nicht bekannt.

1.3 Aufgabestellung

hPar14 ist der zweite, vor kurzem charakterisierte Vertreter der humanen Parvuline. Die physiologische Funktion dieses Proteins ist unbekannt. Das Interesse an seiner Wirkungsweise ist besonders hoch, weil für den ersten Vertreter der humanen Parvuline (*hPin1*) eine essentielle Rolle bei der Mitose nachgewiesen worden ist. Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von *hPar14* könnte einen Beitrag zum Verständnis seiner Funktion leisten. Mit einem Molekulargewicht von 14 kDa und einer guten Löslichkeit eignete sich *hPar14* zur Strukturaufklärung mittels NMR.

Die NMR ist zudem eine effektive und schnelle Methode zur Untersuchung von intermolekularen Wechselwirkungen auf atomare Ebene. Zu Beginn der Arbeit war kein zelluläres Substrat für *hPar14* bekannt, es wurde aber ein Modellsubstrat für einen PPIase-Aktivitätstest beschrieben [32]. Dieses Substrat sollte dazu verwendet werden, das Bindungsinterface auf *hPar14* zu kartieren.

Im Verlauf der Arbeit wurden Hinweise für eine DNA-Bindung von *hPar14* gefunden (Dr. Rascher, persönliche Mitteilung). Es galt daher ein optimales DNA-Konstrukt zu entwickeln und den spektrometrische Nachweis der Bindng zu liefern. Später sollte die Bindung von *hPar14* an die DNA quantitative untersucht werden.

2. Strukturaufklärung von Proteinen mittels NMR-Spektroskopie

Nach der ersten erfolgreichen Anwendung der Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR) zur Strukturaufklärung von Proteinen durch Kurt Wüthrich [53] hat sich diese Methode neben der Röntgenkristallographie als Technik zur Aufklärung atomarer Details von Makromolekülen etabliert. Eine natürliche Grenze für die NMR-Strukturaufklärung von Biomolekülen mittels der NMR stellt deren Molekulargewicht dar. Mit steigendem Molekulargewicht nimmt die Breite der beobachtbaren Resonanzlinien und deren Anzahl zu, was zu einer Überlappung der Peaks und einer einhergehenden schlechteren Auflösung führt. Diese Probleme versucht man heutzutage mit neueren NMR Techniken zu vermindern (TROSY, [54]).

Bei der Kernspinresonanz detektiert man die Resonanzsignale von Atomkernen, die einen Spin größer Null haben (^1H , ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}N , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P und so weiter). Im Rahmen der Strukturaufklärung von Proteinen interessiert man sich vorwiegend für die Kerne ^1H , ^{13}C und ^{15}N , die einen halbzahligen Spin besitzen. Für kleine Moleküle bis 10 kDa ist es oftmals ausreichend nur homonukleare ^1H Spektren auszuwerten und ausgehend von Proton-Proton-Abständen die Struktur zu ermitteln. Oberhalb dieser Molekulargewichtsgrenze reicht der Informationsgehalt von homonuklearen Spektren zur Ermittlung der Strukturdaten nicht mehr aus. Die Anwendung von Triple-Resonanz (3D) Techniken, die Korrelationen zwischen Isotopen mit stärkerer Kopplungen (^1H , ^{13}C und ^{15}N) nutzen und das Problem der Überlagerungen durch die Dispersion von Signalen in ^{13}C und ^{15}N -Richtung lösen, ermöglichen es, die Grenze für die Strukturbestimmung höher zu setzen (30-40 kDa) [55,56]. Dazu müssen die Proteine jedoch mit den Isotopen ^{13}C und ^{15}N angereicht werden. Bei zusätzlicher Markierung mit dem Isotop ^2H (80% - 90%) lassen sich Makromoleküle bis zu 60 kDa untersuchen [57]. Die Anwendung einer neuen Generation von ^1H - ^{15}N -korrelierten NMR-Experimenten (TROSY, [54]) ermöglicht es auch, die Struktur von Proteinen von 100-110 kDa Größe [58] und kombiniert mit CRINEPT [117] in Zukunft bis in den MDa-Bereich aufzuklären [59].

Das Erscheinen eines Signals in einem 2D oder 3D NMR-Spektrum ist auf die Wechselwirkung zwischen Kernen zurückzuführen. In Spektren vom COSY/TOCSY-Typ und in Tripleresonanz-Spektren geben die Kerne, die über chemische Bindungen miteinander verknüpft sind (skalar oder J-gekoppelt), Anlaß zu Resonanzen. In NOESY-Typ Spektren ergeben sich Resonanzen (NOEs), falls der Abstand zwischen

zwei Kernen voneinander im Raum nicht mehr als 5 Å beträgt. Die beiden Informationen aus TOCSY und NOESY-Spektren gehen sowohl in die „Zuordnung“, als auch in die Strukturberechnung ein.

Als „Zuordnung“ bezeichnet man den Vorgang, bei dem die NMR-Signale den entsprechenden Atomen der Polypeptidkette zugeordnet werden.

Bei dem historisch ersten Verfahren, dem *chaintracing* oder der TOCSY/NOESY-basierten Zuordnung [53], werden im ersten Schritt die Monomer-Bausteine (Aminosäuren) identifiziert. Jede Aminosäure besitzt eine besondere Anzahl von vicinal oder geminal miteinander verbundenen Protonen, die im homonuklearen 2D TOCSY-Spektrum durch ein charakteristisches Muster von Diagonal- und Kreuzresonanzen, dem sogenannten Spinsystem, sichtbar werden. Die Spinsysteme werden später mit Hilfe von NOESY-Spektren miteinander verbunden. Im NOESY findet man NOEs für die räumliche Nähe eines H_{α} des Restes i zum H_N des Restes $i+1$ (Abb. 2-1). Das *chaintracing* ist in Kapitel 4.2.1.2 am Beispiel von *hPar14* als Teil des Ergebnisses der Arbeit beschrieben.

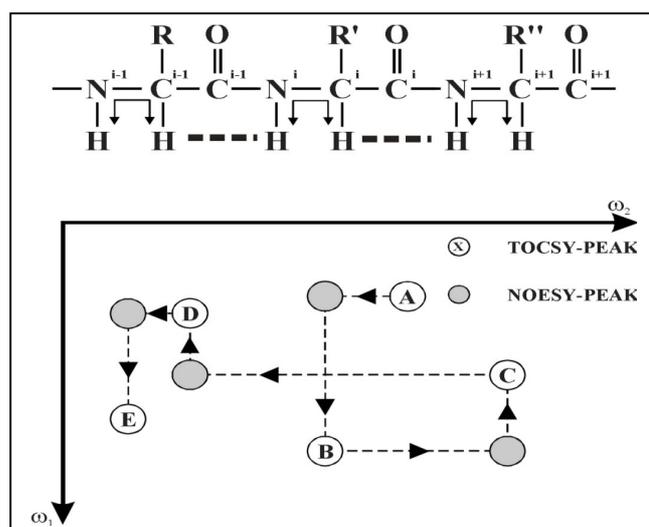


Abb. 2-1: Das *chaintracing*-Verfahren. Ausschnitt aus einer Peptidkette. Pfeile kennzeichnen die Kopplung von Protonen, die zu TOCSY-Resonanzen führen, gestrichelte Linien – zu NOESY-Peaks. Darunter ist schematisch der Ablauf des *chaintracing* mit überlagerten TOCSY- und NOESY-Spektren abgebildet. Abbildung wurde entnommen aus [60].

Das zweite, historisch jüngere Verfahren bezieht sich auf die sequentielle Zuordnung von Resonanzen in dreidimensionalen Tripleresonanz-Spektren des HNCA-Typs [56,61]. Im Unterschied zum *chaintracing* werden keine Raumkorrelationen (NOEs) benutzt. Die Zuordnung erfolgt nur durch Identifizierung von Atomen, die skalar miteinander gekoppelt sind. Im HNCA-Spektrum wird die Frequenz eines Amidprotons $H_N(i)$ über den Amidstickstoff $^{15}N(i)$ mit der Frequenz des $^{13}C_{\alpha}$ -Kohlenstoffatoms der eigenen (i) und auch der vorherigen ($i-1$) Aminosäure verknüpft. Dies passiert, weil die beiden Korrelationen $N(i)-C_{\alpha}(i-1)$ und $N(i)-C_{\alpha}(i)$ Kopplungs-

konstanten (Stärke der Kopplung in Hz) von annähernd gleicher Grösse aufweisen (Abb. 2-2). Die Tatsache, dass auch das C_{α} Signal der (i-1) Aminosäure auftaucht, kann man nutzen um eine Verbindung aller Spinsysteme herzustellen.

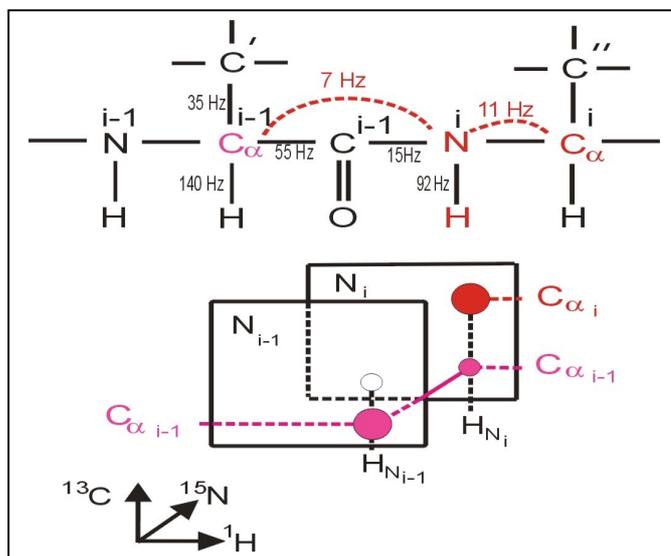


Abb. 2-2: Ausschnitt aus einer Peptidkette. Rote Linien kennzeichnen die Kopplung von Atomen, die zu HNCA-Resonanzen führen. Die entsprechenden Kopplungskonstanten sind eingetragen. Darunter ist schematisch der Ablauf der Zuordnung zwischen einzelnen HNCA-Ebenen abgebildet.

Im Laufe der Zuordnung werden weiter Spektren benutzt, die die notwendige Verbindungen zwischen allen verbleibenden Atomen (H_N , N , $H_{\alpha}(i)$, $H_{\alpha}(i-1)$, $C_{\alpha}(i)$, $CO(i)$, $C_{\beta}(i)$, $C_{\alpha}(i-1)$, $CO(i-1)$, $C_{\beta}(i-1)$) herstellen. Dies ist für *hPar14* in Kapitel 4.2.2.1 beschrieben.

Ein weiterer Schritt der Analyse von NMR-Spektren besteht in der Extraktion von Atomabständen und Winkeln für die Strukturrechnung. Als wichtigste Quelle zur Entnahme von Atomabständen dient das NOESY-Spektrum. Der NOE-Effekt nimmt mit der 6. Potenz des Abstands der beiden wechselwirkenden Kerne im Raum ab und lässt sich daher zur Abstandsmessung verwenden. Kurze Distanzen, wie die von H_{α} - und H_N -Kernen benachbarter β -Stränge oder Abstände in α -Helices zwischen $H_{\alpha}(i)$ und $H_{\beta}(i+3)$, $H_{\alpha}(i)$ und $H_N(i+3)$ sowie $H_{\alpha}(i)$ und $H_N(i+4)$ lassen sich über die Stärke einer NOE-Resonanz bestimmen. Trägt man diese NOEs in einem Diagramm gegen die Aminosäuresequenz des Proteins auf, ergibt sich ein charakteristisches Muster, das Auskunft über die Lokalisation von Sekundärstrukturelementen innerhalb der Peptidkette erlaubt. Ein solches Diagramm ist für *hPar14* im Kapitel 4.2.3.3, Abbildung 4-15 zu sehen. Neben den für die Sekundärstruktur typischen NOEs lassen sich weitere NOEs von Rückgrat- und der Seitenkettenprotonen für Abstandsangaben gewinnen (*long-range* NOEs). Diese haben besondere Bedeutung für die korrekte „Faltung“ der Polypeptidkette (Tertiärstruktur) während der Strukturrechnung.

Die Größe eines dihedralen Winkels einer Peptidbindung läßt sich aus der Stärke der skalaren Kopplung zwischen dem H_{α} - und dem H_N -Protonen einer Aminosäure ziehen (Karplus, 1970). Dies ist am Beispiel von *hPar14* in den Kapiteln 3.12.1.3 und 4.2.3.2 dieser Arbeit dargestellt.

Die Informationen über Abstände und Winkel werden eingesetzt, um den möglichen Konformationsraum eines Proteins einzuschränken. Dies erfolgt im Computer durch einen Moleküldynamikschritt und eine anschließende Minimierung einer Targetfunktion, die durch die potentielle Energie E_{TOT} eines Systems dargestellt wird.

$$E_{TOT} = E_{GEO} + E_{NOE} \qquad E_{NOE} = \sum_{\substack{\text{Paare} \\ (i,j)}} K_{NOE} (r_{ij} - r_{ij}^0)^2$$

Abb. 2-3: (Links) Die Targetfunktion für die Minimierung, dabei bedeuten E_{TOT} = Gesamtenergie des Systems, E_{GEO} = Energie, die durch Abweichung von der idealen Geometrie erzeugt wird. (Rechts) Der Term für die NOE-Einbindung. Dabei bedeutet r_{ij} der aktuelle Abstand zwischen den Protonen i und j ; r_{ij}^0 ist der Abstand, der aus den experimentellen NOE-Daten resultiert und K_{NOE} ist eine Konstante, die Gewichtung des E_{NOE} Terms gegenüber den anderen Termen der Gleichung vornimmt.

Das in dieser Arbeit verwendete Programm X-PLOR bietet für die Strukturrechnung einen sogenannten *simulated annealing* oder SA-Algorithmus an. Beim SA werden den Atomen des Peptids im Computer hohe Startgeschwindigkeiten gemäß einer Maxwell-Verteilung zugeschrieben, was einer fiktiven hohen Temperatur gleichgesetzt werden kann. Während einer langsamen „Abkühlungsphase“ nehmen die Atome zueinander Positionen ein, die mit der Erfüllung der Daten und der chemischen Referenzwerte („ideale“ Atomabstände und Winkel) einhergehen (Kapitel 4.2.4.1). Die Abweichung von den experimentellen Daten wird während des Rechengvorgangs mit einem positiven Energiebeitrag „bestraft“, der sich zu E_{TOT} addiert (Abb. 2-3). Die Strukturrechnung führt schließlich zu einer Schar von Strukturen, deren Konvergenz von der Zahl und Güte der experimentellen Daten abhängt.

3. Materialien und Methoden

3.1 Enzyme und Chemikalien

Die Enzyme wurden, wenn nichts anders angegeben, von den Firmen New England Biolabs (Beverly, USA), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) und Stratagene (La Jolla, USA) bezogen. Medien-Bestandteile, Agar und Agarose stammten von Fluka (Neu-Ulm) und Merck (Darmstadt). Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) stammt von Roth (Karlsruhe).

Alle restlichen verwendeten Chemikalien wurden in den Reinheitsgraden „reinst“ oder „pro analysi“ von der Firmen ICN (Eschwege), Sigma (St. Louise, USA) und Merck (Darmstadt) bezogen.

3.2 Kits und Standards

Alle in dieser Arbeit verwendeten Kits wurden von der Firma Qiagen (Hilden) bezogen: QIAGEN Plasmid Mini Kit, QIAEX II Gel Extraction Kit, QIAexpressionist. Der 1 kbp DNA Längenstandard stammte von der Firma New England Biolabs (Beverly, U.S.A.) und der 10 kDa Protein Längenstandard von Gibco (Eggenstein).

3.3 Bakterienstamm

Es wurden ausschließlich Bakterien der Art *Escherichia coli* verwendet.

Tabelle 3-1: Verwendeter Bakterienstamm. Angegeben ist der Name, der Genotyp und die Referenz.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E.coli</i> M15	<i>naI^f, str^s, rif^r, thi⁻, lac⁻, ara, gal, mtl⁻, F⁻, recA, uvr, lon</i>	[62]

3.4 Plasmide, Oligonukleotide und Peptide

3.4.1. Plasmide

pGEX-4T-2-hPar14

Der Vektor pGEX-4T-2 (4950 bp) mit dem inserierten Gensegment *hPar14* (409 bp) wurde freundlicherweise innerhalb der Arbeitsgruppe der Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft in Halle von Dr. Jens

Rahfeld zur Verfügung gestellt. Der Vektor enthält *hPar14* als Fusionsprotein mit N-terminaler 26 kDa Glutathione-S-Transferase.

pQE70

Der Vektor pQE70 (3431 bp) gehört zur Familie der pDS-Plasmide [63] und basiert auf dem Plasmid pDS56/RBSII. Er besitzt den T5-Promotor P_{N25} [64], zwei *lac*-Operationserkennungssequenzen und eine synthetische ribosomale Bindungsstelle, die auf hohe Expressionsraten in *E. coli* optimiert ist. Eine *in frame* Ligation in die *multiple-cloning-site*, bestehend aus *Sph* I, *Bam*H I und *Bgl* II, führt zu einer C-terminalen Fusion der rekombinanten Proteine mit sechs Histidinen (*His6-Tag*). Die Sequenz ATG der *Sph* I Restriktionssequenz dient für die Expression als Startkodon. Das Plasmid verleiht Resistenz gegenüber Ampicillin durch die Expression des β -Laktamasegens *bla* und repliziert in *E. coli* mittels des ColE1 Replikationsursprunges aus pBR322 [65]. Die Genexpression im pQE70 Vektor ist durch den Lac-Repressor reprimierbar. Zu diesem Zwecke wurde die Expression unter Verwendung des Helferplasmids pREP4 durchgeführt.

pREP4

Das Plasmid pREP4 (3740 bp) ist mit seinem Replikationsursprung P15A [66] kompatibel zu ColE-Plasmiden und kann so in Kombination mit pQE-Vektoren in *E.coli* repliziert werden. Es exprimiert den durch *lacI*-Gen [67] kodierten Lac-Repressor. Durch das *neo*-Gen vermittelt es Resistenz gegen Kanamycin. Aufgrund einer Mutation in der RBS von *neo* sollten jedoch nur Konzentrationen von 25 μ g/mL zur Selektion eingesetzt werden. pREP4 wurde als Helferplasmid in Kombination mit pQE70 verwendet, um durch die lac-Repressorproduktion, eine Regulation der Expression von in pQE70-Vektor enthaltenen Gene zu ermöglichen.

3.4.2 Oligonukletide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden entweder von der Firma MWG (Ebersberg) oder von TIB MOLBIOL (Berlin) bezogen und sind in der Tabelle 3-2 zusammengefasst. Die Oligodesoxyribonukleotide 1 und 2 dienten als DNA-Primer (1-Forward (*Sph* I); 2- Reverse (*Bgl* II)) bei der PCR-Klonierung des *hPar14-6His*. Die Oligodesoxyribonukleotide 3 bis 13 und das Oligoribonukleotid 14 wurden für Fluoreszenztitrationen verwendet.

Tabelle 3-2: Verwendete Oligonukleotide. Angegeben ist die laufende Nummer, die Nukleotidsequenz in 5'-> 3'-Richtung sowie die Länge des Oligonukleotids.

Nummer	Sequenz	Länge
1	AACATGCATGCCGCCCAAAGGAAAAAGT	28mer
2	GAAGATCTTTTTCTTCCTTCGACCATAATA	28mer
3	GATGCAAATGTTTTCATTTGCATC	24mer
4	GATGAAAATGTTTTCATTTTCATC	24mer
5	GATGCCAATGTTTTCATTGGCATC	24mer
6	GATGCACATGTTTTCATGTGCATC	24mer
7	GATGCAACTGTTTTCAGTTGCATC	24mer
8	GATGCAAAGGTTTTCTTTGCATC	24mer
9	GATGAAAACGTTTTCGTTTTCATC	24mer
10	GATAAAAATGTTTTCATTTTTATC	24mer
11	GTAAAAAATGTTTTCATTTTTTAC	24mer
12	GAAAAAAAAGTTTTCTTTTTTTTC	24mer
13	CGACTCACTATTTTTAGTGAGTCG	24mer
14	GAUGAAAAUCUUCGGAUUUUCAUC	24mer

3.4.3. Peptide

Das verwendete Peptid Succinyl-Ala-Arg-Pro-Phe-para-nitroanilin wurde innerhalb der Arbeitsgruppe der Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft in Halle von Herrn Dipl.-Chem. Mario Drewello chemisch synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Es wurde als Modellsubstrat bei der Kartierung der Substratbindungsstelle auf *hPar14* verwendet (Kapitel 3.11.5.1).

3.5 Medien, Antibiotika und Puffer

LB-Medium:

10g/l Trypton

5g/l Hefe Extrakt

5g/l NaCl

15g/l Agar (nur für Kulturplatten)

Die Lösung wurde mit NaOH auf pH 7.5 gebracht und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen wurden nach Bedarf Antibiotika zugesetzt.

Psi Medium:

10g/l Trypton

5g/l Hefe Extrakt

5g/l NaCl

4 mM MgSO₄

10 mM KCl

Die Lösung wurde mit NaOH auf pH 7.5 gebracht und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen wurden Antibiotika zugesetzt.

Ampicillin-Stammlösung:

100 mg/ml in H₂O. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei – 20 °C gelagert. Zugabe zum Medium erfolgte im Verhältnis (v/v) 1:1000.

Kanamycin-Stammlösung:

25 mg/ml in H₂O. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei – 20 °C gelagert. Zugabe zum Medium erfolgte im Verhältnis (v/v) 1:1000.

TAE-Puffer

40 mM Tris/Acetat pH 8.0; 1mM EDTA

3.6 Allgemeine gentechnische Methoden

3.6.1 Kultivierung und Konservierung von *E.coli*-Stämmen

Die Anzucht von *E.coli*-Stämmen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C in LB-Medium, dem bei plasmidtragenden Stämmen das entsprechende Antibiotikum zugesetzt wurde. Vorkulturen wurden mit Einzelkolonien von LB-Agar-Platten angeimpft. Das bakterielle Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt. Zur dauerhaften Konservierung von Bakterienstämmen wurden 400 µl einer stationären Übernachtskultur mit 600µl 20% Glycerin versetzt und bei – 80 °C aufbewahrt.

3.6.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um DNA-Fragmente mit den geeigneten Schnittstellen zu versehen, wurden Primer konstruiert, die 5' von ihrem komplementären Teil die erwünschten Schnittstellen sowie

einen Übergang enthielten (Tabelle 3-2, Oligonukleotiden 1 und 2). Für die Wahl der Anlagerungstemperatur wurde nur der komplementäre Teil berücksichtigt. Wegen ihrer höheren Genauigkeit wurde für PCR-Fragmente, die subkloniert werden sollten, Pfu-DNA-Polymerase mit 3'-5' Exonukleaseaktivität verwendet. Der Reaktionsansatz (50 µl) enthielt je 0.2 mM dATP, dCTP, dGTP und sTTP, je 120 ng beider Primer, 5 ng Plasmid-DNA, 10 µl des 10fach konzentrierten Reaktionspuffers und 2.5 Einheiten Pfu-Polymerase. Die PCR wurde in 25 Zyklen nach folgendem Zeitschema durchgeführt:

Denaturierung der Vorlage:	30 Sekunden	94 °C
Hybridisierung der Primer:	30 Sekunden	58 °C
Verlängerung der Primer :	1 min (2 min/kB)	72 °C

Vor dem Durchlauf der einzelnen Zyklen wurde bei 94 °C für 5 min inkubiert, und nach jedem Zyklus für 10 min die Temperatur bei 72 °C belassen, um die Ausbildung von Doppelsträngen zu gewährleisten.

3.6.3 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das PCR-Produkt wurde durch eine präparative 1%ige Agarosegelelektrophorese gereinigt. Dazu wurde die mit Ethidiumbromid gefärbte PCR-Produkt-Bande aus dem Gel unter UV-Beleuchtung ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAEX II Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.6.4 Gelelektrophorese von DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA mittels horizontaler Gelelektrophorese wurde zur Kontrolle von Plasmid-Präparationen und Restriktionsreaktionen durchgeführt. Dazu wurden 1%ige Agarosegele in TAE-Puffer verwendet. Zur Probenvorbereitung wurde die DNA mit 1/5 ihres Volumens Auftragspuffer (50% Glycerin; 0.25% Bromphenolblau) versetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100 Volt durchgeführt. Der DNA-Nachweis erfolgte nach der Elektrophorese durch 10-minütige Inkubation des Agarosegels in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml). Das interkalierende Ethidiumbromid wurde daraufhin bei Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht.

3.6.5 Restriktion

Für die Verdauung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden die DNA-Lösungen mit den vom Hersteller angegebenen Puffer versetzt. Die Plasmid-Konzentration betrug ca. 0.1 µg/µl. Pro µg DNA wurden 4 bis 5 Einheiten Enzym eingesetzt. Jeder Ansatz enthielt 10 µg/ml BSA. Die Ansätze wurden 1 Stunde bei 37°C inkubiert, anschliessend mit 5-fach konzentriertem DNA-Auftragspuffer (50% Glycerin; 0.25% Bromphenolblau) versetzt und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen (*BamH I*, *Sph I*) wurden von Stratagene (La Jolla, U.S.A.) bezogen.

3.6.6 Ligation

0.5 µg bis 2 µg DNA (*insert* im Verhältnis 3:1 zu *BamH I* und *Sph I* verdaute pQE70 Plasmid-DNA) wurden in einem Volumen von 50 µl mit 2 Units T4-DNA-Ligase und 50 nmol ATP in einem vom Hersteller mitgelieferten T4-Ligase-Puffer über Nacht bei 16 °C inkubiert, anschliessend wurden 2 µl für die Transformation von *E. coli* eingesetzt.

3.6.7 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Für die Transformation von Plasmid-DNA in M15[pREP4] *E.coli*-Zellen wurde die Hitzeschock-Methode nach der Vorschrift des Herstellers (The QIAexpressionist, QIAGEN, Hilden) angewandt. Zur Herstellung von transformationskompetenten Bakterien wurde die Calciumchlorid-Methode nach der Vorschrift des Herstellers (The QIAexpressionist, QIAGEN, Hilden) verwendet.

3.7 Allgemeine proteinchemische Methoden

3.7.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde zur analytischen Trennung von Proteingemischen verwendet. Sie wurde nach Laemmli (1970) als vertikale Plattenelektrophorese (Mighty small II SE 250, Hoefer, San Francisco, USA) im diskontinuierlichen System durchgeführt. Die Trenngele hatten die Dimension 102 mm × 60 mm × 0.75 mm, die Sammelgele etwa 20 mm × 60 mm × 0,75 mm. Zur Trennung der *hPar14-6His* von Fremdproteinen wurden 15%ige Trenngele und zum

Gelretardationsassay von *hPar14* mit einem Oligonukleotid 7.5%ige Trenngele verwendet (Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele

	Sammelgel (1 Gel)	Trenngel (1 Gel)	
30% Acrylamid/ 0,8% N,N'-Methylenbisacrylamid	0.4 ml	1.875 ml (7.5%iges)	3.75 ml (15%iges)
10% SDS	25 µl	75 µl	75 µl
10% APS	8.5 µl	25 µl	25 µl
1.8 M Tris, pH 8.8	-	1,5 ml	1.5 ml
1.25 M Tris, pH 6.8	0.25 ml	-	-
H ₂ O	1.8 ml	3.875 ml	2.00 ml
TEMED	2.5 µl	3.75 µl	3.75 µl

Als Molekulargewichtsstandard wurde eine 10 kD-Leiter (GIBCO) verwendet. Zum Auftragen der Proben wurden maximal 10 µl der Proteinlösung zusammen mit 10 µl Probenpuffer (120 mM Tris; 20% Glycerin (w/v); 6% SDS (w/v); 6% β-Mercaptoethanol, 0.6% Bromphenolblau (w/v)) 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Gele ließ man bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA im Laufpuffer (50mM Tris, pH 8.5; 0.384 mM Glycin; 0.1% SDS (w/v)) elektrophoresieren. Zur Anfärbung der Proteine nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel in Färbelösung (0.05% Coomassie Brillant Blue R-250 (w/v); 45% Methanol (v/v); 9.2% Eisessig (v/v)) gelegt und zweimal für 30 min in Entfärbelösung (26% Methanol (v/v); 1% Eisessig (v/v)) geschüttelt.

3.7.2 N-terminale Proteinsequenzierung

Die Überprüfung der Identität von Proteinen sowie der Nachweis des N-Terminus wurden durch N-terminale Sequenzierung über automatischen Edman-Abbau mit einem Applied Biosystems 476A Gasphasen-Sequencer (Applied Biosystems, Foster Cita, USA) durchgeführt. Die Sequenzierung von Proteinen aus Proteingemischen erfolgte nach Auftrennung der Proteine durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Elektrotransfer in 50 mM Borat/NaOH; 20% Methanol; pH 9.0 auf eine PVDF-Membran (Bio Rad, Hercules, USA). Nach Anfärbung der Membran mit Coomassie wurde die zu untersuchende Proteinbande ausgeschnitten, mit Methanol entfärbt und

zur Sequenzierung eingesetzt. Die Sequenzanalyse des *hPar14-6His* und des *hPar14* Abbauproduktes wurde freundlicherweise von Herrn. Dr. Rücknagel (Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt.

3.7.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Konzentrationsbestimmungen gereinigter Proteine wurden spektrophotometrisch durchgeführt. Die Konzentration von Lösungen von *hPar14* wurde aus dem Lambert-Beerschen Gesetz erhalten.

$$A = \varepsilon \times c \times d \quad \text{(Gleichung 3-1)}$$

Dabei entsprechen ε dem molaren Extinktionkoeffizienten in $M^{-1} \times cm^{-1}$, c der Konzentration in M und d der Schichtdicke der verwendeten Küvette in cm. Der Extinktionskoeffizient für *hPar14* ist $8370 (M^{-1} \times cm^{-1})$. Alle Spektren wurden in 1 cm Quarzglasküvetten (Hellma, Müllheim) über einen Wellenlängenbereich von 240 nm bis 340 nm mit Puffer als Referenz aufgenommen.

3.8 Isolierung von bakteriell exprimiertem *hPar14* mit Hilfe GST Genfusion System

Die Expression und anschließende Isolierung des N-terminal des GST-getagten *hPar14* mit Hilfe des GST Genfusion System wurde nach Vorschrift „GST Gene Fusion Systeme“, Third Edition, Revision 2, 1997, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden durchgeführt. Die Affinitäts-Chromatographie erfolgte an einer „Glutathion Sepharose 4B“ (24 ml Bettvolumen; Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Die Flussrate betrug 3 ml/min (Peristaltic Pump P-1, Amersham Pharmacia). Das Eluat enthielt am Ende GST-*hPar14* im *Elutionspuffer* (10 mM reduziertes Glutathion in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0). Das so gewonnene Eluat wurde in einem Polypropylenröhrchen (Falcon) mit der entsprechenden (durch Titration bestimmten) Menge an Thrombin gemischt und wurde über Nacht bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Der Stand der Spaltungsreaktion wurde durch 15%-ige SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese überprüft (Kap. 3.7.1). Für die Trennung der Reaktionsprodukte aus der Thrombin-Spaltung wurde eine Ionen-Austausch-Chromatographie an „Mono S HR 10/10“ (Bettvolumen 8 ml, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Zur Steuerung, Detektion und Fraktionierung

wurde das FPLC-System (bestehend aus Programmer GP-250, High Precision Pump P-500, Uvicord S II, Fractionssamler RediFrac) von Pharmacia Biotech genutzt. Die Darstellung der Elutionsprofile erfolgte mit Hilfe des angeschlossenen Flachbrettschreibers REC 101 (Pharmacia Biotech). Die Temperatur betrug 4 °C, die Flussrate 0.5 ml/min. Die gepackte Säule wurde vor dem Auftragen des Proteingemisches mit dem Puffer A (20 mM HEPES, pH 7.2, 1 mM NaCl) bis zu einer konstanten Extinktion des Eluates äquilibriert. Nach dem Auftragen erfolgte ein Waschschriff mit Puffer B (20 mM HEPES, pH 7.2), gefolgt von der Elution über einen ansteigenden Salzgradienten, der durch Gradientenmischer, bestehend aus zwei verbundenen Flaschen mit Puffern A und B, als Pufferkammern bereitgestellt wurde. Die verwendeten Puffer wurden durch eine 0.2 µm-Membran (Sartorius, Göttingen) filtriert. Das Eluat wurde gesammelt und mit Hilfe eines Microsep Mikrokonzentrators (Filtron GmbH, Karlstein) mit 3 kDa Ausschluss gemäss der Anleitung des Herstellers bei 4°C konzentriert, wobei ein weiterer Pufferaustausch gegen 10 mM Phosphatpuffer (pH 6.5) vorgenommen wurde.

3.9 Miniprep-Reinigung des C-terminal His-getagten *hPar14* aus *E.coli*

3.9.1 Herstellung des Expressionsplasmids

Die Erstellung eines Expressionsplasmids für das C-terminal His-getagte *hPar14* (*hPar14-6His*) wurde mit Hilfe von Standardklonierungstechniken (siehe Kapitel 3.6) durchgeführt. Dazu wurde die kodierende Region aus einem anderen Expressionsvektor pGEX-4T-2-*hPar14* mittels PCR durch Einsatz der Primer „Forward“ und „Reverse“ amplifiziert. Das erhaltene Gensegment wurde über die Restriktionsschnittstellen Sph I und Bgl II in den pQE70-Vektor (Quiagen, Hilden) inseriert. Die Richtigkeit der Gensequenz wurde durch DNA-Sequenzanalyse überprüft.

3.9.2 Anzucht von Bakterien und Zellaufschluss

Es wurden 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin mit 2 ml einer stationären Übernachtskultur des plasmidtragenden Stammes angeimpft. Das Inokkulat wurde bei 37 °C bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0.5 bis 0.6 (600 nm) geschüttelt. Die Induktion erfolgte daraufhin durch Zugabe von 1mM IPTG. Nach weiteren 4-5 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4 °C

(20 min; 15000×g) geerntet. Der Zellaufschluss wurde in 5ml *Lysierpuffer* (50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0; 300mM NaCl; 10 mM Imidazol) durch Zugabe von Lysozym bis zur Konzentration 1 mg/ml bei 4 °C durchgeführt. Nach weiteren 30 Minuten wurden die aufgeschlossenen Zellen durch Zentrifugation (10 min; 15000×g) abgetrennt und der proteinhaltige Überstand weiter bearbeitet.

3.9.3 Mini-Präparation von *hPar14-6His*

Die Überstand wurde mit 1ml 50%-igen Ni-NTA Resin Suspension gemischt und bei 4 °C 30 Minuten vorsichtig geschüttelt. Resin wurde durch Zentrifugation (10 sek; 15000×g) abgetrennt, zweimal mit 5 ml *Waschpuffer* (50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0; 600mM NaCl; 30mM Imidazole) gewaschen und mit verschiedenen Konzentrationen von Imidazol im *Elutionspuffer* (50 mM NaH₂PO₄, pH 8.0; 300 mM NaCl; 250mM/500mM Imidazol) eluiert und wie im Kapitel 3.8 beschrieben konzentriert und umgepuffert.

3.10 Fluoreszenzspektroskopie

3.10.1 Probenvorbereitung

Das Protein (1,4 mM *hPar14* Lösung in 10 mM Phosphatpuffer pH 6.5 mit 150 mM KCl, 1.5mM MgCl₂ und 0.5 mM DTT) wurde freundlicherweise von Dr. Jens Rahfeld zur Verfügung gestellt. Die Lösung wurde aliquotiert und für den Gebrauch aufgetaut. Es wurde je 1 ml einer 200 nM Lösung für die Fluoreszenztitration vorgelegt. Als *Titrant* wurde eine 80-90 µM Lösung verschiedener Oligonukleotide (in 20 mM Phosphatpuffer, pH 6.5, 20 mM NaCl) verwendet (Tabelle 3-2, Oligonukleotide 3-14). Die Oligonukleotidlösungen wurden für eine Minute auf 90 °C erwärmt und anschließend auf Eis aufbewahrt, um die Ausbildung von Doppelsträngen zu ermöglichen.

3.10.2 Fluoreszenztitration

Um die Affinitäten verschiedener Oligonukleotide zu *hPar14* bestimmen zu können, wurden Fluoreszenztitrationen durchgeführt. Um eine unspezifische Bindung der Oligonukleotide auszuschließen und „Randeffekte“ der Kuvette zu detektieren wurden Kontrollexperimente mit BSA durchgeführt.

Die Fluoreszenztitrationsen wurden bei 285 K mit einem SLM Smart 8000 Spektrofluorimeter (Colora, Lorch), das mit einem PH-PC9635 Photomultiplier ausgerüstet ist, in Fluoreszenz-Rührküvetten (Schichtdicke 0.5 cm) in einem Volumen von 1 ml gemessen. Die Spaltbreiten betragen 1 nm (Anregung) und 16 nm (Emission). Die selektive Anregung der Tryptophanfluoreszenz erfolgte bei 295 nm. Die Fluoreszenzintensität wurde bei 348 nm gemessen. Alle erhaltenen Daten wurden um die Pufferfluoreszenz, den Verdünnungsfaktor sowie um den *inner filter*-Effekt korrigiert. Dazu wurden Kontrollexperimente an N-Acetyltryptophanamid durchgeführt. Als Messpuffer diente 20 mM Phosphatpuffer, pH 6.5, 20 mM NaCl. Zum Fitten der Daten wurde eine quadratische Gleichung verwendet, die das Bindungsgleichgewicht beschreibt [68].

$$F = F_0 \pm \Delta F_{\max} \cdot \frac{\frac{[P]+[L]+K_d}{2} - \sqrt{\left(\frac{[P]+[L]+K_d}{2}\right)^2 - [P] \cdot [L]}}{[P]} \quad (\text{Gleichung 3-2}),$$

dabei bezeichnet: F- die gemessene Fluoreszenzintensität, F_0 – die Fluoreszenzintensität bei $[L]=0$, ΔF_{\max} - die Maximale Änderung der Fluoreszenzintensität bei Sättigung, $[L]$ – die Oligonukleotidkonzentration, $[P]$ – die Proteinkonzentration, K_d – die Dissoziationskonstante. Während des Fittens wurden die Proteinkonzentration, die maximale Fluoreszenzänderung und die Dissoziationskonstante (K_d) variiert.

3.11 NMR-Spektroskopie

3.11.1 Herkunft der Proteine

Die in Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proteine wurden innerhalb der Arbeitsgruppe von Dr. Jens Rahfeld (*hPar14*₁₋₁₃₁, *hPar14*₂₅₋₁₃₁, ¹⁵N, ¹³C-*hPar14*) und Dr. Holger Bang (¹⁵N, ¹³C-*hPar14*-6His) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.11.2 Probenvorbereitung

Die Proteine wurden in 450 µl Puffer und 50 µl 99.9 Atom-% D₂O (Sigma, Deisenhofen) aufgenommen. Für alle Proben wurde ein 10 mM Phosphatpuffer pH6.5 mit 150 mM KCl, 1.5mM MgCl₂ und 0.5 mM DTT verwendet. Nicht lösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde in NMR-Röhrchen (Norell, Landsville, New Jersey, USA) oder Shigemi-Röhrchen (Shigemi Corp., Japan) überführt. Zum Austausch von Amidprotonen gegen Deuteronen wurde

die zu untersuchende Probe lyophilisiert und anschliessend in 500 ml 99.994 Atom-% D₂O (Sigma, Deisenhofen) aufgenommen.

3.11.3 Allgemeine Messbedingungen

NMR Messungen wurden mit einem Bruker DRX-500 Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) bei einer Protonen-Resonanzfrequenz von 500.130 MHz oder einem Inova 600 Spektrometer (Varian, Darmstadt) Protonen-Resonanzfrequenz von 599.8 Hz aufgenommen. Alle dreidimensionalen Spektren wurden unter Betreuung von Dr. Peter Bayer (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund) aufgenommen. Zur Eichung der ¹H chemischen Verschiebungen diente DSS (2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat) als interner Standard. Eichung der ¹⁵N- und ¹³C-Spektren erfolgte gemäß IUPAC Konvention [69]. Soweit nicht anderes beschrieben, wurden alle Spektren bei 300 K aufgenommen.

3.11.4 Aufnahmeparameter

Die für die vorliegende Arbeit aufgenommenen Spektren sind in Tabelle 3-4 aufgelistet. Für die Pulsprogramme wurde auf die Standardbibliothek der installierten Bruker bzw. Varian Datenbank zurückgegriffen. Die Aufnahme erfolgte im phasensensitiven Modus mit Quadraturdetektion unter Verwendung der TPPI [70] States- oder States-TPPI-Technik. Eine Unterdrückung des Wassersignals wurde durch die Anwendung der WATERGATE Pulsfolge [71] oder durch eine Vorsättigung erzielt. Die Mischzeit betrug 60-90 ms für die TOCSY-Spektren und 150 - 200 ms für die NOESY-Spektren. Für die ¹³C-Mischzeit im HCCH-TOCSY Experiment wurde eine 22 ms DIPSI-Pulsfolge verwendet. Für die R₁ Messungen wurden die Spektren mit 8 „*inversion recovery delays*“ aufgenommen: 10 ms, 30 ms, 90 ms, 150 ms, 250 ms, 350 ms, 530 ms, 800 ms. {¹H}-¹⁵N NOE Spektren wurden mit und ohne Sättigung von Protonen mittels einer Reihe von 120° ¹H Pulsen während der Wartezeit (Delay) aufgenommen. Weitere Aufnahmebedingungen und die Art der verwendeten Spektren sind in Tabelle 3-4 zusammengefasst.

Tabelle 3-4: Auflistung der aufgenommenen NMR-Spektren. B_0 /MHz - Feldstärke; F1(A), F2(A), F3(A) – Aufnahmeparameter (Datenpunkte); F1(P), F2(P), F3(P) – Prozessierungsparameter (Datenpunkte).

Experiment	Referenz	F3(A)	F2(A)	F1(A)	F3(P)	F2(P)	F1(P)
1D – ^1H		-	-	4096	-	-	
DQF-COSY	[70]	-	4096	1024	-	8124	1024
Clean – TOCSY	[72]	-	2048	512	-	4096	1024
NOESY	[73]	-	2048	512	-	4096	1024
^{15}N -HSQC	[74]	-	2048	512	-	2048	1024
HNCA	[56,75]	1024	34	128	1024	64	256
HNCO	[56,76]	1024	34	128	1024	64	256
HN(CO)CA	[77]	1024	40	100	1024	64	256
HN(CA)CO	[75,77]	1024	40	128	1024	64	128
CBCA(CO)NH	[75]	1024	46	98	1024	128	256
HNHA	[78]	1024	36	100	1024	64	128
HBHA(CO)NH	[79]	1024	46	100	1024	64	128
CC(CO)NH	[80]	1024	46	80	1024	64	128
HCCH-TOCSY	[81]	1024	128	128	1024	128	128
^{13}C -TOCSY-HSQC	[82]	1024	38	200	1024	64	256
^{15}N -TOCSY-HSQC	[83]	512	30	60	1024	64	128
^{13}C -NOESY-HSQC	[82]	512	20	100	512	64	128
^{15}N -NOESY-HSQC	[74]	1024	60	300	1024	64	256
R ₁ HSQC	[84]	-	2048	512	-	2048	1024
{ ^1H }- ^{15}N NOE	[85]	-	2048	512	-	2048	1024

3.11.5 Prozessierung und Auswertung der NMR-Spektren

Die Prozessierung und Auswertung aller Spektren erfolgte auf O₂ und INDIGO Workstations (Silicon Inc., USA) mit dem Programmpaket XwinNMR (Bruker, Karlsruhe) und NDEE (Spinup Inc., Dortmund). In den meisten Fällen wurde *Zerofilling* in F2/F3 für die mehrdimensionalen Spektren durchgeführt. Die erhaltenen FIDs wurden in allen Dimensionen mit einer um $\pi/2$ oder $\pi/3$ phasenverschobenen Sinus-Quadratfunktion multipliziert [86] und anschließend fouriertransformiert. Alle Spektren wurden einer Phasenkorrektur unterzogen. Die Basislinienkorrektur erfolgte mit einer kombinierten Sinus- und Cosinusfunktion siebenter Ordnung [87]. Die dreidimensionalen Spektren wurden mit Hilfe von XwinNMR prozessiert und mit AURELIA 2.4 (Bruker, Karlsruhe) zugeordnet.

3.11.5.1 Analyse der Signalverschiebung nach Bindung von *hPar14* an ein Modellsubstrat

Für NMR Experimente zum Studium des Bindungsverhaltens von *hPar14* an ein Modellsubstrat wurde das Peptid Succinyl-Ala-Arg-Pro-Phe-para-nitroanilin verwendet. Dabei wurde zu 500 μl einer 0.5 mM *hPar14*-Lösung (10 mM Phosphatpuffer pH 6.5 mit 150 mM KCl, 1.5mM MgCl_2 und 0.5 mM DTT) das Modellsubstrat im molaren Verhältnis von 1:1 zugegeben. Die ^{15}N -HSQC-Spektren des freien und komplexierten *hPar14* wurden dann im Multiplot-Modus von NDEE übereinandergelegt und die Verschiebungen der Signale quantifiziert (Kapitel 4.3.1).

3.11.5.2 ^{15}N -HSQC-Titration von *hPar14* mit einem Oligonukleotid

Zu 500 μl einer 0.2 mM *hPar14*-Lösung (10 mM Phosphatpuffer pH 6.5 mit 150 mM KCl, 1.5mM MgCl_2 und 0.5 mM DTT) wurde in sieben Schritten Oligonukleotid im gleichen Puffer bis zu einem molaren Verhältniss von 1:1.5 (*hPar14*:Oligo) dazutitriert. Nach jeder Zugabe von Oligonukleotid-Lösung wurde ein ^{15}N -HSQC-Spektrum aufgenommen. Die aufgenommenen Spekre wurden im Multiplot-Modus von NDEE übereinandergelegt. Die Verschiebungen der Signale wurden ausgemessen und gegen die DNA-Oligonukleotid Konzentration aufgetragen. Zum Anpassung der experimentellen Daten wurde Gleichung 4-2 benutzt, wobei anstelle von F , F_0 und ΔF_{max} δ (chemische Verschiebung der H_N -N Resonanzen), δ_0 (chemische Verschiebung bei $[\text{L}]=0$), $\Delta\delta_{\text{max}}$ (maximale Änderung der chemischen Verschiebung bei Sättigung) verwendet wurden.

3.11.5.3 Bestimmung der Austauschraten von Amidprotonen

Eine lyophilisierte Probe von *hPar14* wurde in 0.5 ml D_2O (pD 6.5) aufgenommen, um den Austausch von Protonen mit Deuteronen zu ermöglichen. Die Austauschraten der H_N -Protonen ließen sich aus zeitabhängigen Abnahme der Intensität des H_N -Resonanzsignals in ^{15}N -HSQC-Spektrum bestimmen. Die ^{15}N -HSQC-Spektren wurden bei 300 K jeweils nach 70 min, 130 min, 190 min, 250 min und 310 min aufgenommen und die Intensität der Resonanzsignale wurde mit Hilfe von XwinNMR (Brucker, Karlsruhe) durch Integration bestimmt. Die zeitliche Abnahme der Intensität des Resonanzsignals wurde mit Hilfe der Gleichung 3-3 angepasst.

$$I = I_0 \cdot e^{-kt} \quad (\text{Gleichung 3-3})$$

dabei bedeuten: I – Intensität des H_N -Resonanzsignals, I_0 – Anfangsintensität des H_N -Resonanzsignals, k – Amidprotonaustauschrate und t – Zeitpunkt der Aufnahme des Spektrums.

3.11.5.4 Bestimmung der R_1 - Relaxationsraten von Amidstickstoffatomen

Die Spektren für die Bestimmung von R_1 von Amidstickstoffatomen (Kapitel 3.11.4) wurden mit Hilfe von XwinNMR (Brucker, Karlsruhe) bearbeitet. Die Spektren wurden kalibriert und die einzelnen H_N -Resonanzsignale im Spektrum wurden integriert. Die wartezeitabhängige Abnahme der Signalintensität wurde mit Hilfe der Gleichung 3-3 (vorige Kapitel) angepasst, wobei t eine Relaxationswartezeit in ms und k eine Relaxationsrate in ms^{-1} bezeichnet.

3.12 Sekundärstruktur -Bestimmung

3.12.1 Distanz- und Winkeleinschränkungen

Aus den NMR-Spektren wurden zur Strukturaufklärung Distanzeinschränkungen (NOEs), Einschränkungen dihedraler Winkel und Wasserstoffbrücken entnommen.

3.12.1.1 Distanzeinschränkungen aufgrund von NOEs

Die Identifizierung und die Quantifizierung der NOEs aus zweidimensionalen und dreidimensionalen NOESY-Spektren wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Peter Bayer durchgeführt. Die Einteilung der NOE Intensitäten wurde in drei Klassen vorgenommen: stark ($1.8 \square - 2.5 \square$), mittel ($1.8 \square - 4.3 \square$) und schwach ($1.8 \square - 5.8 \square$). Für nicht stereospezifisch zugeordnete Protonen von Methyl- oder Methylengruppen und aromatischen Ringen wurde eine Modifikation der obengenannten Werte vorgenommen. Alle Abstände, die solche Pseudoatome enthielten, wurden um $0.5 \square$ erhöht [86].

3.12.1.2 Distanzeinschränkungen aufgrund von Wasserstoffbrücken

Durch Aufnahme eines NOESY-Spektrums und einer Reihe von HSQC Spektren in D_2O konnten stabile Amidprotonen ermittelt werden, die einen langsamen chemischen Austausch zeigen (Minuten bis Stundenbereich). Sie wurden in Form von Wasserstoffbrücken als Abstandseinschränkungen in die Strukturberechnung

miteingebracht. Dazu wurden jeweils zwei NOEs gesetzt: $d_{\text{HN-O}} = 1.7 - 2.3$ □ zwischen Wasserstoff und Akzeptorsauerstoff und $d_{\text{N-O}} = 2.4 - 3.3$ □ zwischen Donatorstickstoff und Akzeptorsauerstoff [88].

3.12.1.3 Einschränkungen dihedraler Winkel

Die Analyse von ${}^3\text{J}(\text{H}_\text{N}-\text{H}_\alpha)$ -Kopplungskonstanten liefert Informationen über die Torsionswinkel Φ der Peptidkette. Mit Hilfe von Gleichung 3-4 [89] wurden die aus den HNHA Spektren ermittelten Kopplungskonstanten in dihedrale Winkel umgerechnet. Für diesen Teil der Auswertung wurden die Intensitätsverhältnisse zwischen Kreuzresonanzen und Diagonalpeaks im HNHA Spektrum mittels Gleichung 3-5 in Kopplungskonstanten umgerechnet [78].

$${}^3\text{J}(\text{H}_\text{N}-\text{H}_\alpha) = 6.4 \cos^2 \Theta - 1.4 \cos \Theta + 1.9 \quad (\text{Gleichung 3-4})$$

mit $\Theta = [\Phi - 60^\circ]$

$$S_{\text{cross}}/S_{\text{diag}} = -\tan^2(2\pi \cdot \zeta \cdot {}^3\text{J}(\text{H}_\text{N}-\text{H}_\alpha)), \quad (\text{Gleichung 3-5})$$

dabei ist 2ζ die Mischzeit in HNHA-Experiment. Für die Messung an Parvaldin wurde $2\zeta = 0.026$ s gewählt. Die so ermittelten dihedralen Winkel wurden als experimentelle Parameter in X-PLOR-98 (Molecular Simulations Inc., USA) eingesetzt (Kapitel 3.13)

3.12.2 Sekundärstrukturbestimmung nach Wishart

Die chemischen Verschiebungen der H_α -Protonen wurden mit Hilfe des von Wishart et al.[90] entwickelten Algorithmus interpretiert. Für jede Aminosäure wurde aus der Differenz zwischen tatsächlich beobachteter H_α -Protonen-Verschiebung und dem entsprechenden Wert in ungeordneten Strukturen (*random coil*) ein chemischer Verschiebungsindex abgeleitet. Eine Differenz kleiner als -0.1 ppm entspricht dabei einem Index von -1 , Differenzen grösser als 0.1 ppm einem Index von $+1$. Ist der chemische Verschiebungsindex für einen Abschnitt von drei oder mehr Aminosäuren -1 ($+1$), so wird in diesem Bereich eine helikale Sekundärstruktur (β -Faltblatt) erwartet. Genauso hängen die chemischen Verschiebungen von Kohlestoffatomen (C_α , CO) von ihrer lokalen magnetischen Umgebung im Protein ab [91]. Die Kerne erfahren in einer α -Helix oder einem β -Faltblatt eine charakteristische Hoch- bzw. Tieffeldverschiebung gegenüber den Frequenzen, die bei ungeordneten Peptiden beobachtet werden [92]. Da jeder einzelner der Verschiebungswerte durch lokale

Einflüsse von diesem Schema abweichen kann, werden die drei unabhängigen Verschiebungsparameter in einem Verschiebungsindex gemäß ihrer Relevanz kombiniert.

3.13 Strukturberechnung mit X-PLOR

Für die Strukturberechnung wurde ein molekulardynamischer Ansatz nach der Strategie des *simulated annealing* mit nachfolgendem *refinement* gewählt. Die Strukturberechnungsprotokolle wurden freundlicherweise von Dr. Peter Bayer zur Verfügung gestellt. Die Strukturberechnung erfolgte mit Hilfe von X-PLOR-98 (Molecular Simulations Inc., USA) [93].

4. Ergebnisse

4.1 Klonierung und Expression von *hPar14* in *Escherichia coli*

Das in der Literatur beschriebene Verfahren zur Reinigung von *hPar14* [32] liefert zwar natives Protein ohne „Tag“, ist aber sehr arbeitsintensiv und aufwendig. Da man für Strukturaufklärung von *hPar14* mittels der NMR Spektroskopie größere Mengen an isotoopenmarkiertem Protein benötigt, sollte mit der Herstellung eines Expressionssystem begonnen werden, das eine hohe Expressionsrate und eine einfache Reinigung des Edukts ermöglicht. Es konnte dabei auf Verfahren zurückgegriffen werden, die sich in der Literatur bereits für diese Zwecke bewährt haben [94]. *hPar14* sollte als Fusionsprotein mit einem N- oder C-terminalen „Tag“ exprimiert und anschließend über eine Affinitätschromatographie gereinigt werden. Das an das Säulenmaterial gebundene Fusionsprotein läßt sich danach mit einer hochkonzentrierten Lösung von kompetitivem Ligand wieder von der Säule eluieren und durch eine spezifische Protease, deren Erkennungsstelle sich zwischen „Tag“ und dem eigentlichen Protein befindet, spalten. Ziel des ersten Teils der Arbeit war es, Glutathion-S-transferase und Hexahistidin als mögliche Fusionsanteile auf ihre Eignung zur Herstellung von *hPar14* zu testen. Da die entsprechenden Reinigungsprotokolle unabhängig vom exprimierten Protein sind, könnte auf die zeitraubende Entwicklung eines speziellen Reinigungsprotokolls verzichtet werden.

4.1.2 Herstellung eines GST-Fusionproteins

4.1.2.1 Ausgangspunkt: pGEX-4T-2-*hPar14*

In einem ersten Ansatz wurde *hPar14* aus dem Stamm *E. coli* M15, der mit dem Plasmid pGEX-4T-2-*hPar14* transformiert war, gereinigt. Das im Folgenden mit „pGEX-4T-2-*hPar14*“ bezeichnete Konstrukt wurde der Plasmidsammlung (im Labor vorhanden) entnommen. Das Konstrukt pGEX-4T-2-*hPar14* war so konzipiert, dass sich für das Glutathion-S-transferase-*hPar14*-Fusionsprotein eine Aminosäuresequenz ergab, die eine Thrombinspaltstelle genau vor der Position Methionin-1 des *hPar14* aufwies.

4.1.2.2 Isolierung von GST- *hPar14*-Fusionsprotein

Mit *E. coli* M15/pGEX-4T-2-*hPar14* wurden Fermentationen wie im Kapitel 3.8 beschrieben durchgeführt. In der Regel konnten 30 g Zellen (Feuchtwicht) aus 6 l

Medium geerntet werden. Abbildung 4-1 zeigt die *E. coli*-Zellextrakte vor und während der Expression. Die Expression des GST-*hPar14* nach Induktion ließ sich dabei durch die Zunahme einer Proteinbande im SDS-Polyacrylamidgel im Molekularmassenbereich zwischen 36 und 55 kDa verfolgen. Die Zellen wurden drei Stunden nach Induktion geerntet und das GST-*hPar14*-Fusionsprotein nach Aufschluss über eine Affinitätschromatographie gereinigt (Kapitel 3.8).

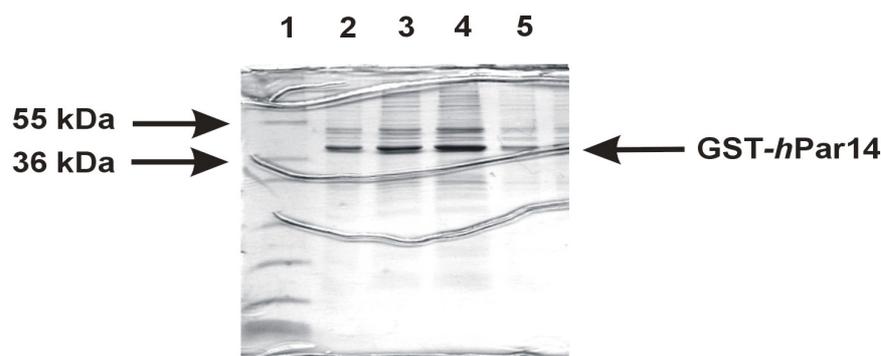


Abb. 4-1: Expression des GST- *hPar14*-Fusionsproteins in *E.coli* M15. Das Kulturmedium wurde mit einer stationären Übernachtskultur von *E. coli* M15 angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach der Induktion der rekombinanten Proteinexpression mit IPTG wurden zu den angegebenen Zeiten Proben genommen, mit SDS-Probenpuffer versetzt und nach Erhitzen mittels 15%iger SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Kap. 3.7.1) analysiert. Bahn 1: Molekulargewichtsstandard; Bahn 2 bis 4: Zellextrakt 60, 120, 180 Minuten nach der Induktion; Bahn 5: Zellextrakt vor der Induktion.

4.1.2.3 Abspaltung des GST-Teils vom Fusionsprotein

Um optimale Spaltungsbedingungen zu bestimmen, wurde das Fusionsprotein in einem Milliliter des Elutionsbettvolumens einer Thrombin-Spaltungsreaktion unterworfen. Die Thrombinkonzentration (Spaltungseinheiten) und die Bedingungen (mit oder ohne Schütteln) wurden variiert. Während der 24stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden mehrere Proben für eine denaturierende Polyacrylamid-gelelektrophorese (Abb. 4-2) entnommen. Die Spaltung des GST-*hPar14* ließ sich durch die Zunahme zweier Proteinbanden im SDS-Polyacrylamidgel bei 14 kDa (*hPar14*) und zwischen 21 und 31 kDa (GST) und die Abnahme der GST-*hPar14* Bande zwischen 36 und 55 kDa verfolgen. Die Bande bei 14 kDa wurde durch N-terminale Sequenzierung als *hPar14* identifiziert. Im Vergleich mit der publizierten Aminosäuresequenz [32] enthielt das so gewonnene *hPar14* zwei zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus, die von der Thrombinspaltstelle nach der Spaltung übrig geblieben waren. Die größten Proteinausbeuten (siehe Abb. 4-2) ergaben sich

nach 24stündiger Inkubation (Raumtemperatur und Schütteln) mit 80 Spaltungseinheiten Thrombin. Später durchgeführte Spaltungsansätze wurden unter diesen Bedingungen gefahren.

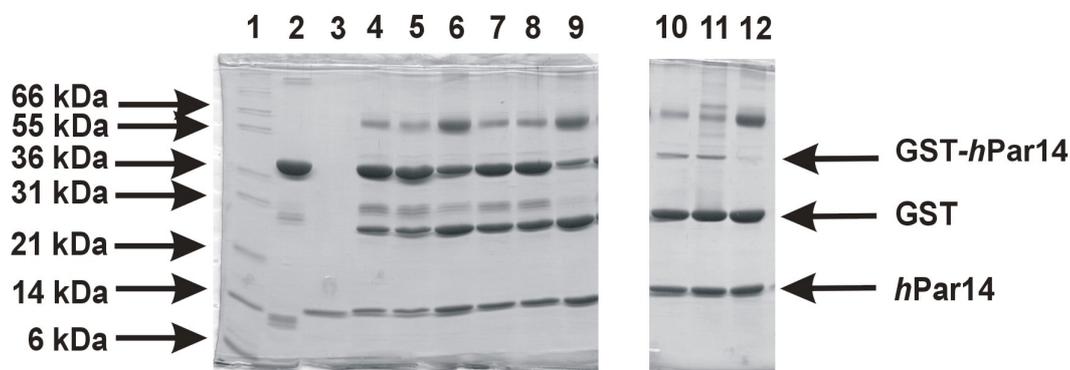


Abb. 4-2: Kinetik der Thrombinspaltung (Ausschnitt): Trennung der Reaktionsprodukte durch 15% ige SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Kap. 3.7.1) 2 h (4, 5, 6), 4 h (7, 8, 9) und 24 h (10, 11, 12) nach dem Start der Spaltungsreaktion. Bahn 1: Molekulargewichtsstandard; Bahn 2: Fusionsprotein vor der Zugabe des Thrombins in 1ml des Elutionsbettvolumens; Bahn 3: 5 µg von *hPar14* als Standard; Bahn 4 bis 12: Produkte einer Spaltungsreaktion mit X Einheiten des Thrombins pro 1 ml des Elutionsbettvolumens nach der Elution des Fusionproteins von Glutathionsepharose; Bahn 4, 7, 10: ohne Schütteln, X = 20; Bahn 5, 8, 11: Schütteln; X = 20; Bahn 6, 9, 12: Schütteln, X = 80.

4.1.2.4 Trennung der Fragmente nach Thrombin-Spaltung

Die Trennung des *hPar14* von ungespaltenem Fusionsprotein, abgespaltenem GST und von Thrombin wurde mit Hilfe der Kationenaustauschchromatographie (Kap. 3.8) durchgeführt (Abb. 4-3). Insgesamt konnten durchschnittlich 10 mg *hPar14* aus einer Fermentation mit 6 l Medium gewonnen werden.

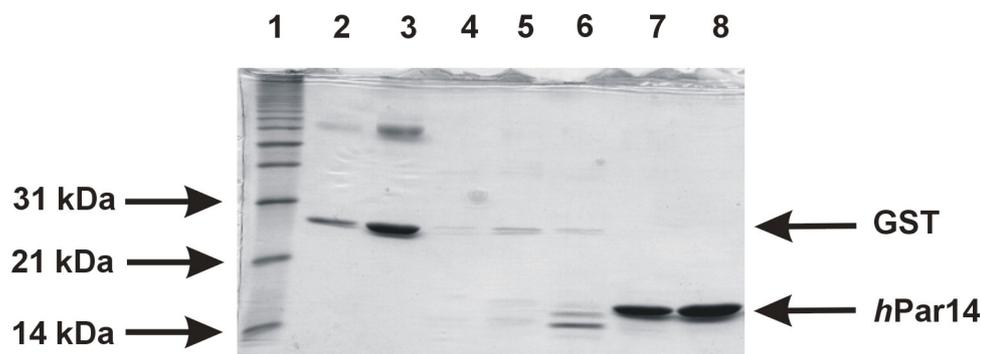


Abb. 4-3: Trennung der Fragmente nach Thrombin-Spaltung mittels Kationenaustauschchromatographie (Kap. 3.8). Gleiche Volumenanteile der Reinigungsfraktionen wurden mittels 15%iger SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Kap. 3.7.1.) analysiert. Bahn 1: Molekulargewichtsstandard; Bahn 2-3: GST und Thrombin enthaltende Fraktionen; Bahn 4-6: Zwischenfraktionen. Bahn 6 enthielt proteolytische Abbauprodukte des *hPar14*; Bahn 7 und 8: *hPar14* enthaltende Fraktionen.

4.1.3 Etablierung des *E. coli* M15/pQE70- *hPar14* Expressionssystems

Das oben beschriebene (Kap. 4.1.2) *E. coli*-Expressionssystem M15/pGEX-4T-2-*hPar14* ist zum Produzieren von ^{15}N , ^{13}C -markierten *hPar14* für NMR-Untersuchungen nicht optimal. Da bei einer ^{13}C -Isotopenmarkierung für die Herstellung 10 mg von *hPar14* mindestens 12 g ^{13}C -Glukose (2 g pro 1 Liter Medium) benötigt werden, ist das Verfahren zur Reinigung von *hPar14* mittels GST-Fusionssystem sehr kostspielig und wurde daher nicht weiter verfolgt. Deshalb sollte in einem zweiten Ansatz versucht werden *hPar14* fusioniert mit einem Hexa-Histidin-Anhang herzustellen.

4.1.3.1 PCR-Klonierung von *hPar14* in pQE70

Das *hPar14*-Gen wurde in die *Sph I*- und *Bgl II*- Schnittstellen des Vektors pQE70 kloniert, um eine Expression als Fusionsprotein mit einem Hexa-Histidin-Anhang C-terminal zu *hPar14* zu ermöglichen. Hierfür wurde die DNA-Sequenz von *hPar14* aus dem pGEX-4T-2-*hPar14*-Konstrukt mit den Primern 1 und 2 (Tabelle 3-2) in einer PCR amplifiziert (Kap. 3.6.2). Primer 1 und 2 waren so konzipiert, dass sie im 5'-Bereich die *Sph I*- und *Bgl II*- Schnittstelle enthielten und im 3'-Bereich komplementär zu dem gewünschten Sequenzabschnitt des *hPar14*-Gens waren und mit pGEX-4T-2-*hPar14* hybridisieren konnten. Als Ergebnis der PCR-Reaktion wurde ein DNA-Fragment mit der Größe des *hPar14*₁₋₁₃₁-Gens erhalten, das um die *Sph I*-Schnittstelle am 5'-Ende und um die *Bgl II* – Schnittstelle am 3'-Ende verlängert war. Das so gewonnene Gen wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und mit dem analog geschnittenen Vektor pQE70 ligiert (Kap. 3.6.5, 3.6.6). Nach Transformation in *E. coli* M15 und Selektion auf Ampicillin und Kanamycin wurde die Plasmid-DNA isoliert (Kap. 3.6.3). Die Sequenzierung der DNA ergab, dass die ermittelte Sequenz mit der gewünschten Sequenz des *hPar14*₁₋₁₃₁-Gens identisch war.

4.1.3.2 Expression von *hPar14* mit C-terminalem Hexa-Histidin-Anhang

Die Expression von *hPar14*-6His erfolgte in *E. coli* M15. Abbildung 4-4 zeigt das *E. coli*-Zellextrakt vor und während der Test-Expression. Die Expression des *hPar14*-6His nach Induktion ließ sich dabei durch die Zunahme einer Proteinbande im SDS-Polyacrylamidgel im Molekularmassenbereich zwischen 14 und 21 kDa

verfolgen. Die Identität dieser Bande als *hPar14-6His* wurde durch N-terminale Proteinsequenzierung nach Edman bestätigt (Kap. 3.7.2).

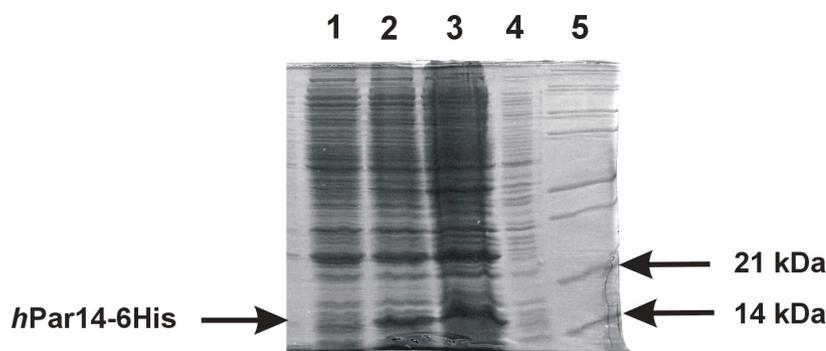


Abb. 4-4: Expression von *hPar14-6His* in *E. coli* M15. Das Kulturmedium wurde mit einer stationären Übernachtskultur von *E. coli* M15 angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach der Induktion mit IPTG wurden zu den angegebenen Zeiten Proben entnommen, mit SDS-Probenpuffer versetzt und nach Erhitzen mittels SDS-Polyacrylamidelektrophorese (Kap. 3.7.1) analysiert. Bahn 1 bis 3: Gesamtzellfraktion 60, 120, 180 Minuten nach Induktion; Bahn 4: Gesamtzellfraktion vor Induktion; Bahn 5: Molekulargewichtsstandard.

4.1.3.3 *Miniprep*-Isolierung des *hPar14-6His*

Die sechs Histidinreste, die C-terminal an *hPar14* gekoppelt worden sind, besitzen eine hohe Affinität zu zweiwertigen Metallionen, wie zum Beispiel Ni^{2+} , so dass das 6His-markierte Protein aus dem Rohextrakt von *E. coli* M15 durch Affinitätschromatographie an einer Nickelchelate-Matrix (Ni-NTA) gereinigt werden konnte (Kap. 3.9.3). Das *hPar14-6His* wurde durch Waschen mit Imidazol (30 mM) von unspezifisch gebundenen Proteinen getrennt. Anschliessend wurde das *hPar14-6His* mit 250 mM und 500 mM Imidazol eluiert und seine Molmasse durch SDS-Polyacrylamidelektrophorese bestimmt (Abb. 4-5). Sie betrug ~ 14 kDa. Wie Abbildung 4-5 zeigt, liegt *hPar14-6His* nach diesem Reinigungsschritt nahezu homogen vor (Bahnen 1 und 2). Während der Großteil aller zellulären Proteine schon bei einer Imidazolkonzentration von 30 mM eluierte (Bahnen 3 und 4), konnte das stark gebundene Fusionsprotein mit 250 mM/500 mM eluiert werden.

4.1.3.4 Untersuchung zur Identität von *hPar14-6His*

Um zu überprüfen, ob das *hPar14-6His* wie das "ungetagte" *hPar14* gefaltet ist oder sich die Faltung durch sechs N-terminale Histidinreste geändert hat, wurden die

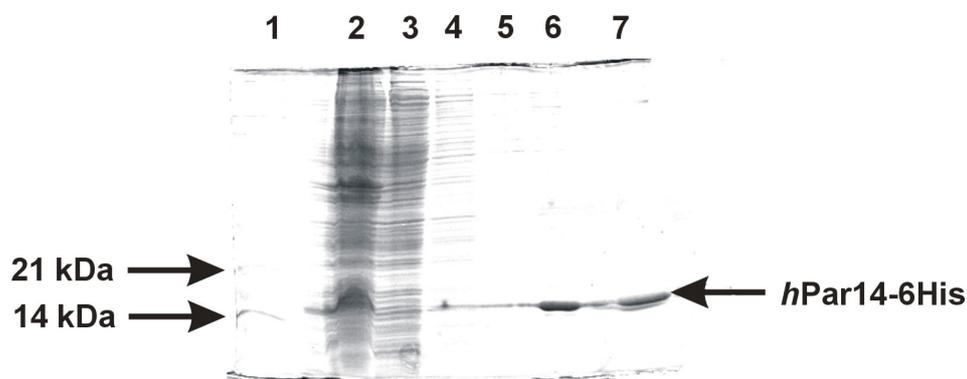


Abb. 4-5: Test-Reinigung des *hPar14-6His*. Gleiche Volumenanteile der Aufarbeitungs- und Reinigungsfractionen wurden mittels 15%iger SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Kap. 3.7.1) analysiert. Bahn 1: Molekulargewichtsstandard; Bahn 2: Überstand nach dem Zellaufschluss (Kap. 3.9.2); Bahn 3: Überstand nach der Abtrennung der Ni-NTA Resin (Kap. 3.9.3) mit spezifisch gebundenen *hPar14-6His*; Bahn 4: Erster Waschschrift mit 30 mM Imidazol; Bahn 5: Letzter Waschschrift mit 30 mM Imidazol; Bahn 6: Elution des Fusionsproteins mit 250 mM Imidazol; Bahn 7: Elution des Fusionsproteins mit 500 mM Imidazol.

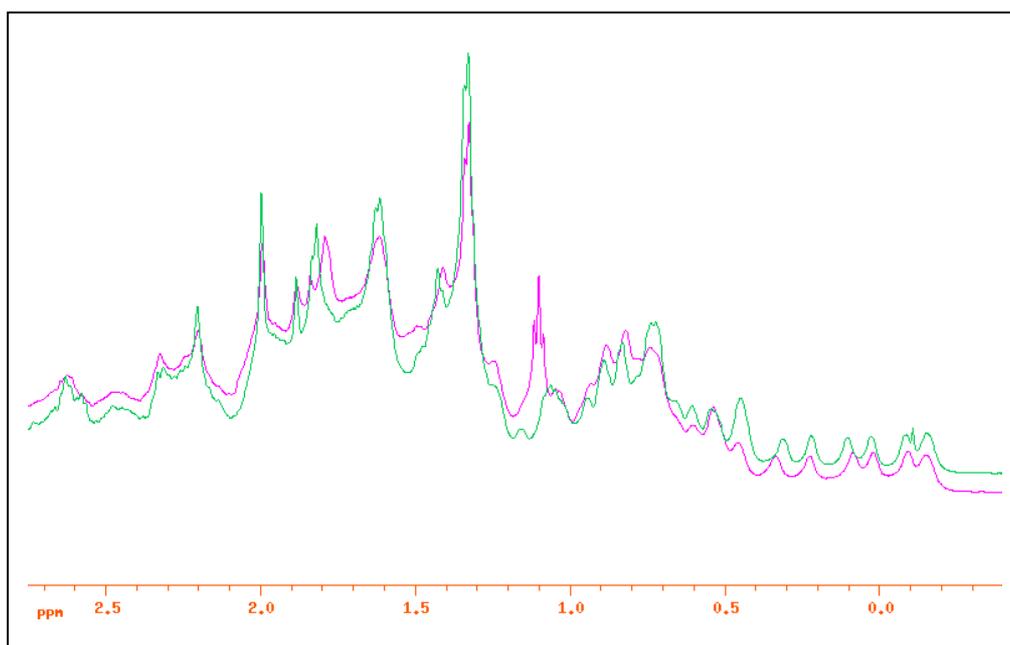


Abb. 4-6: Überlagerung der ¹H-NMR Spektren von *hPar14-6His* (grün gezeichnet) und *hPar14* (rosa gezeichnet) im Aliphatenbereich. Die Proteinkonzentrationen betragen 20 μ M und 500 μ M in 10% D₂O, pH 6.5. Die übrigen Parameter für die Aufnahme der Spektren waren wie in Kap. 3.11.3 beschrieben. Das ¹H-NMR Spektrum von *hPar14-6His* wurde mit erhöhter Anzahl (532) Scans aufgenommen.

^1H -NMR-Spektren (Kap. 3.11) beider Proteine im Überlagerungsmodus von XwinNMR (Bruker, Karlsruhe) verglichen.

Da sich die Spektren durch Anwesenheit der sechs N-terminalen Histidinreste in *hPar14-6His* (2H und 4H Protonen) im Amidprotonenbereich (7-10 ppm) erheblich unterschieden, wurde nur auf den Aliphatenbereich (-1 bis 5 ppm) des Spektrums zurückgegriffen (Abb. 4-6). Die hochfeldverschobenen Protonen im Bereich von -0.2 bis 1.0 ppm sind identisch, was auf die gleiche Tertiärstruktur beider Proteine schließen läßt. Das $\epsilon\text{H}_\text{N}$ -Proton (dieser Teil des Spektrums ist nicht abgebildet) des Imidazolrings von Trp84 findet man in beiden Spektren bei der gleichen chemischen Verschiebung (10.3 ppm).

4.1.4 ^{15}N , ^{13}C -Markierung von *hPar14*

^{15}N , ^{13}C -markiertes *hPar14-6His* wurde mit Hilfe des *E. coli* M15/pQE70-*hPar14* Expressionssystem von Dr. Holger Bang innerhalb der Arbeitsgruppe in größeren Mengen isoliert. Insgesamt konnten durchschnittlich 30 mg *hPar14-6His* aus einer Fermentation mit 6 l Medium gewonnen werden. Das Histidin-markierte Protein ließ sich im Vergleich zum GST-Fusionskonstrukt nicht nur mit einer höheren Ausbeute gewinnen, sondern es konnte auch die „Tag“-Abspaltung vermieden werden, was die Reinigung beschleunigt und erleichtert. Das so gewonnene ^{15}N , ^{13}C -markierte *hPar14-6His* wurde für den NMR-Versuch zur Modells substratbindung eingesetzt. Der größte Teil des in dieser Arbeit verwendeten, ^{15}N , ^{13}C -markierten *hPar14* wurde jedoch zu Beginn der Arbeit von Dr. Jens Rahfeld gereinigt [32] und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Damit wurden die Strukturaufklärung von *hPar14*, und die ^{15}N -HSQC-Titrations mit den DNA-Oligonukleotiden durchgeführt.

4.2 NMR-Struktur von *hPar14* in Lösung

4.2.1 Homonukleare zweidimensionale Experimente

Für die Aufklärung der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins wurden die in Kapitel 3.11.4 beschriebenen Spektren verwendet. Begonnen wurde mit der Identifizierung der Spinsysteme aus zweidimensionalen Spektren einer unmarkierten Probe.

4.2.1.1 Identifizierung der Spinsysteme mit Hilfe von 2D-Spektren

Einige typische Spinsysteme konnten direkt über ihre charakteristischen Verschiebungen identifiziert werden [53]. Dabei wurden hauptsächlich die Fingerprintregionen der TOCSY- und COSY-Spektren ausgewertet. In Abb. 4-7 ist dies exemplarisch für Aminosäuren Ala37, Ala98, Val103, Asp107, Lys108 und Val127 dargestellt.

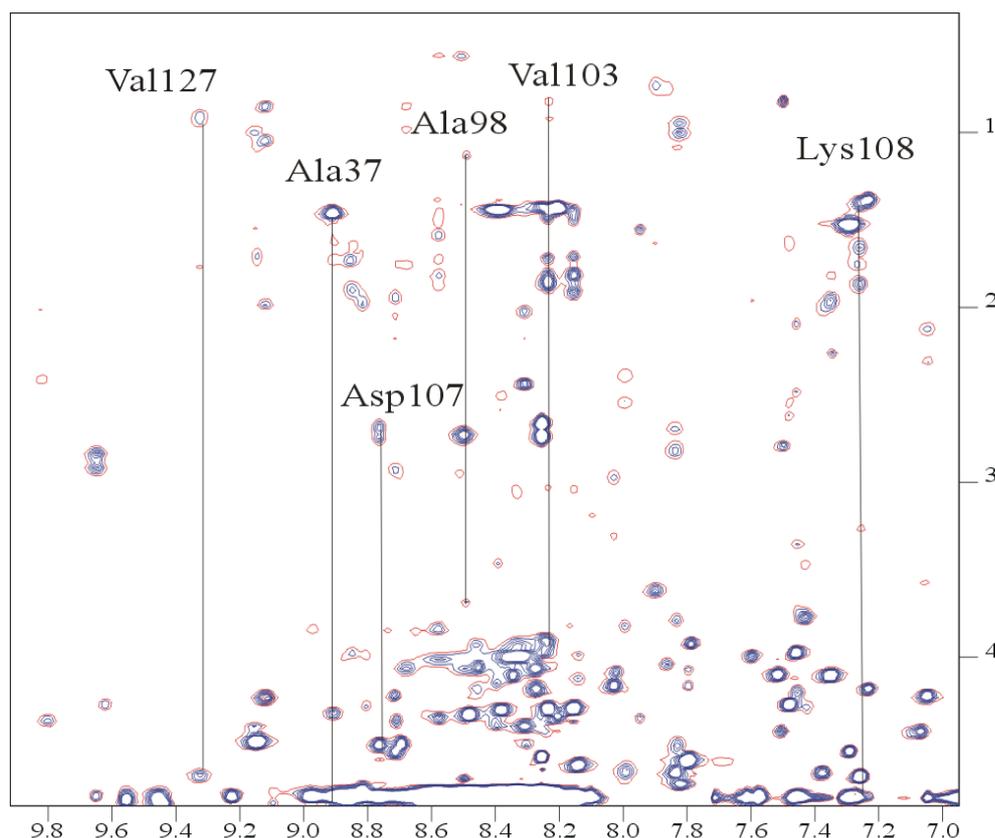


Abb. 4-7: Fingerprint-Region des TOCSY-Spektrums von *hPar14*. Die Spinsysteme für die Aminosäuren Ala37, Ala98, Val103, Asp107, Lys108 und Val127 wurden eingezeichnet. Verschiebungen sind auf den Achsen in ppm angegeben.

Mit dieser Methode konnten viele, aber nicht alle Spinsysteme vollständig zugeordnet werden. Vor allem bei langkettigen Aminosäuren (z.B. Ile124, Ile125) fehlten die Kreuzresonanzen der γ und δ Protonen, da hier der Magnetisierungstransfer entlang der Seitenkette durch die auftretende Relaxation abgeschwächt wurde. Bei Aminosäuren, die in Helices oder *loop*-Regionen liegen (z.B. Leu44 und Leu101), wurde der Magnetisierungstransfer zusätzlich durch die kleine $^3J(\text{H}_\text{N}-\text{H}_\alpha)$ -Kop-

plungskonstante vermindert, so dass Spinsysteme aus diesen Regionen nur schwach oder gar nicht zu beobachten waren.

In vielen Fällen musste daher auf das NOESY Spektrum zurückgegriffen werden. Intraresiduale NOEs, die die räumliche Nachbarschaft von Protonen innerhalb einer Aminosäure anzeigen und daher weitestgehend den TOCSY-Resonanzen entsprechen, können zur Identifizierung von Spinsystemen verwendet werden. In den überwiegenden Fällen unterscheiden sich diese NOEs von interresidualen, also solchen, die von Protonen verschiedener Aminosäuren erzeugt werden, durch ihre Intensität. Intraresiduale NOEs sind deutlich stärker als interresiduale und lassen sich in Verbindung mit einem COSY Spektrum zur Identifizierung und Vervollständigung von Spinsystemen nutzen. Mit Hilfe dieser Strategie konnten unter anderem die Systeme der Aminosäuren Ile43 und Leu58 zugeordnet werden.

Während sich in den Spektren von Parvulin die Spinsysteme der Faltblattstränge 1, 2 und 4 durch die große Dispersion der Resonanzen der darin befindlichen Amidprotonen leicht isolieren und zuordnen ließen, überlappten die entsprechenden Resonanzen einiger Helices und *loop*-Regionen stark. Die Spinsysteme Ile52, Ser60 bis Arg63, Tyr71 bis Gly80 (und damit die gesamten α -Helix3) und Ala97 bis Val110 (Teil der α -Helix-4 und der daran anschließenden *loop*-Region) konnten aus diesen Gründen nicht mit Hilfe der 2D-Spektren zugeordnet werden. Dies war der Hauptgrund für eine ^{13}C - und ^{15}N - Isotopenmarkierung von *hPar14* und die anschließende Durchführung mehrdimensionaler Experimente.

4.2.1.2 Sequentielle Zuordnung der Spinsysteme mit Hilfe von 2D-Spektren

Die sequentielle Zuordnung der gefundenen und identifizierten Spinsysteme erfolgte durch Auswertung der sequentiellen d_{NN} , $d_{\alpha\text{N}}$ und $d_{\beta\text{N}}$ NOEs. Ausgehend von einer H_{α} - H_{N} -Kreuzresonanz von Aminosäure A im COSY-Spektrum kann die entsprechende H_{α} - H_{N} -Resonanz der in der Kette folgenden Aminosäure B dadurch identifiziert werden, dass sie die chemische Verschiebung des H_{α} -Protons von A ($\text{H}_{\alpha}(i)$) und des H_{N} -Protons von B ($\text{H}_{\text{N}}(i+1)$) aufweisen muß. Die beiden Protonen sind weder geminal noch vicinal miteinander verbunden, sind aber weniger als 5 Å voneinander entfernt. In diesem Falle ist ein NOESY-Spektrum sehr hilfreich, in dem die räumliche Verknüpfungen zweier Protonen in Form von Kreuzresonanzsignalen (NOEs) sichtbar sind. An der Kreuzungsstelle der beiden H_{α} - H_{N} -Resonanzen zweier

benachbarter Aminosäuren im COSY Spektrum muß deshalb ein NOE im NOESY-Spektrum zu finden sein. Das resultierende *chaintracing* der Aminosäurenkette, ist in Abbildung 4-8 exemplarisch für die Aminosäuren Ile125 bis Lys131 (viertes β -Faltblatt mit C-Terminus) in der H_{α} - H_N -Region des NOESY-Spektrums dargestellt.

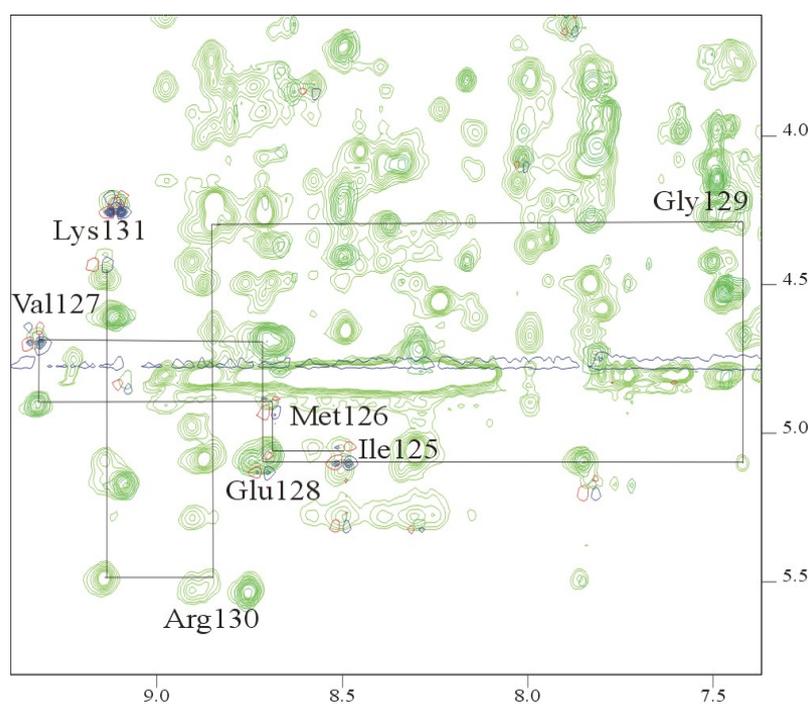


Abb. 4-8: *Chaintracing* der Aminosäuren Ile125 bis Lys131 im Fingerprint-Bereich. Dargestellt ist eine Überlagerung von COSY-Spektrum (rot-blau) und NOESY-Spektrum (grün). Die Verschiebung ist auf beiden Achsen in ppm aufgeführt.

Die Zuordnung der aromatischen Ringsysteme zu ihren aliphatischen Seitenketten erfolgte über intraresiduale NOEs von Ringprotonen zu den β -Protonen (z.B. H_{δ} Phe oder Tyr). Die Proline, die als Iminosäuren keine H_N -Resonanz aufweisen, konnten nach Zuordnung aller NOEs über die $H_{\alpha}(i)$ - $H_{\delta}(i+1)$ -NOEs identifiziert werden. Die $H_{\alpha}(i)$ - $H_{\delta}(i+1)$ -NOEs sind charakteristisch für *trans*-Xaa-Pro Bindungen. Sie konnten für alle Proline mit Ausnahme von Pro114 gefunden werden. Durch die starke Überlappung im *random coil* Bereich waren einige Resonanzen von Aminosäuren Lys4 bis Gly35 des Aminoterminus nicht eindeutig zu identifizieren.

4.2.2 Heteronukleare Spektren

Da eine komplette Zuordnung aller Resonanzen mit homonuklearen 2D-Spektren nicht durchführbar war, wurden heteronukleare Experimente mit $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -markiertem *hPar14* aufgenommen.

Mit Hilfe der dreidimensionalen Spektren war es wegen der Einführung zweier weiteren Dimensionen und der daraus folgenden größeren Dispersion der Signale in der Stickstoff- und Kohlenstoffdimension möglich, die bis dahin in den 2D-Spektren getroffenen Zuordnungswege zu bestätigen und die noch fehlenden Aminosäuren sequenzspezifisch zuzuordnen.

4.2.2.1 Zuordnung der Heterokernresonanzen des Proteinerückgrats

Um die in homonuklearen Spektren überlagerten Signale voneinander zu trennen, bedient man sich der NMR-Techniken, die das Spektrum durch eine zusätzliche Heterokern-Dimension entzerren. Einen einfachen Fall der Erweiterung auf zwei Dimensionen stellt das ^{15}N -HSQC-Spektrum dar, das oftmals als Baustein weiterer komplexerer Spektren verwendet wird. In Abbildung 4-9 ist ein $^1\text{H}\{-^{15}\text{N}\}$ heteronukleares NOESY Spektrum von *hPar14* abgebildet. Im normalen (direkt detektierten) ^{15}N -HSQC-Spektrum entspricht jede Resonanz (Peak) der NH Gruppe einer Aminosäure. Im Unterschied zum HSQC-Spektrum enthält das invers detektierte ^{15}N heteronukleare NMR-Spektrum zusätzlich Informationen über die Beweglichkeit der einzelnen NH Gruppen. NH Gruppen mit hoher Beweglichkeit (schneller als die Gesamtbewegung des Proteins = *Tumbling*) zeigen negative hetero-NOEs. NH-Gruppen, die relativ unbeweglich sind und sich nur mit dem gesamten Molekül reorientieren, weisen positive NOEs auf. Negative hetero-NOEs sind daher in ausgedehnten flexiblen *loop*-Regionen und den nicht strukturell eingebundenen C- und N-Termini von Proteinen zu erwarten.

Aus Abbildung 4-9 wird ersichtlich, dass die negativen hetero-NOEs zu dem aminoterminalen Teil von *hPar14* gehören, was darauf hinweist [84,85], dass der Aminoterminus sich in einer anderen Zeitskala als der Rest des Proteins bewegt. Dies zusammen mit der Position der entsprechenden Resonanzen im *random coil*-Bereich bestätigt, dass sich im Sequenzbereich von K4 bis G34 der Sequenz keine Sekundärstrukturelemente befinden und der Aminoterminus flexibel und ungefaltet vorliegt.

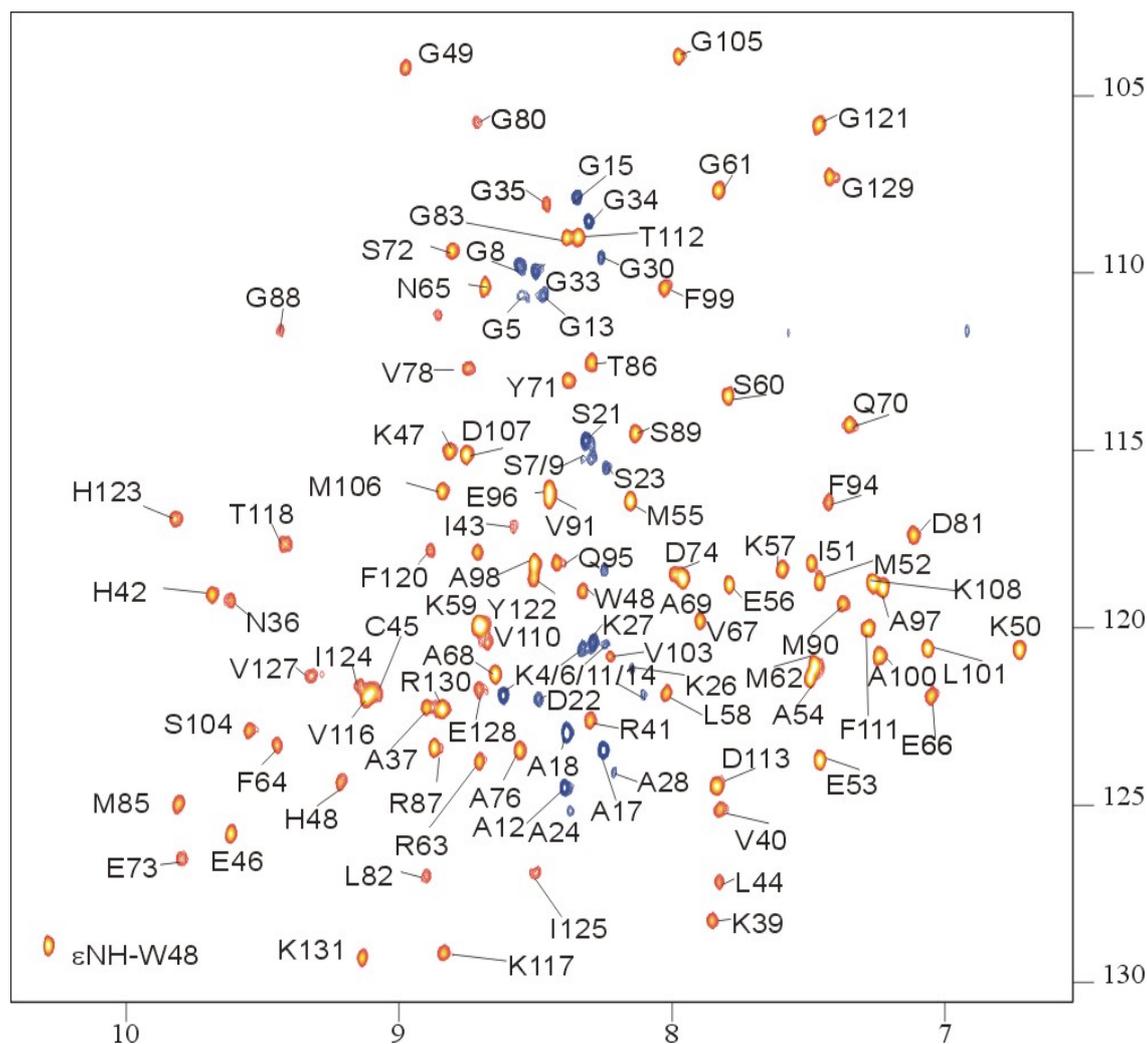


Abb. 4-9: $^1\text{H}\{-^{15}\text{N}\}$ NOE Spektrum von *hPar14*. Die hetero-NOEs für die Aminosäuren K4 bis R131, mit Ausnahme der Proline, wurden eingezeichnet. Blaue Resonanzen entsprechen den negativen hetero-NOEs von Aminosäuren K4-G34.

In HSQC und hetero-NOE Spektren von *hPar14* ist zu erkennen, dass die meisten NH-Resonanzen, die in den zweidimensionalen Spektren mit anderen überlagert waren, nun in der zweiten Dimension aufgespreizt werden konnten. Das gilt zum Beispiel für die Resonanzen der Aminosäuren Met52, Met62, Glu53, Gly121. Wie jedoch die Gruppe von Peaks bei der ^{15}N -Frequenz 122 ppm (Cys45, Val116 und Ile24) zeigt, sind hier noch Überlagerungen vorhanden. Um diese aufzulösen und die Resonanzen der Seitenketten zuordnen zu können, wurde die dritte Dimension und die Doppelmarkierung mit ^{13}C und ^{15}N verwendet.

Für doppelt markierte Proben lassen sich Informationen über Rückgrat-Resonanzen und die β -Kohlenstoffatomen aus der Kombination von HNCA und CBCACONH gewinnen. Durch die Auswertung der Signale im HNCA-Spektrum, wo jedes H_N -

Atom mit seinem N-Atom und dem C $_{\alpha}$ der eigenen und der vorherigen Aminosäure verknüpft werden kann, konnten mit Ausnahme von Ala76, Arg 77 und Gln78 alle Spinsysteme der *hPar14*-PPIase-Domäne (Asn36 bis Lys131) durch C $_{\alpha}$ -CO-N-C $_{\alpha}$ Verbindung sequenziell zugeordnet werden. Das resultierende sequentielle Zuordnung der Aminosäurenkette ist in Abbildung 4-10 exemplarisch für die C $_{\alpha}$, H $_N$, N-Resonanzen der Atome der Aminosäuren Met52 bis Leu58 aus α -Helix1 dargestellt. Obwohl sie sich theoretisch durch ihre relative Intensität unterscheiden, (i-1)-Korrelationen sind wegen der kleineren $^2J(N_i-C_{\alpha,i-1})$ -Kopplung schwächer als die Signale der $J(N_i-C_{\alpha,i})$ -Kopplung, waren die Signale in diesem Spektrum manchmal von recht ähnlicher Intensität oder auch überlagert, was die zuverlässige Identifizierung erschwerte.

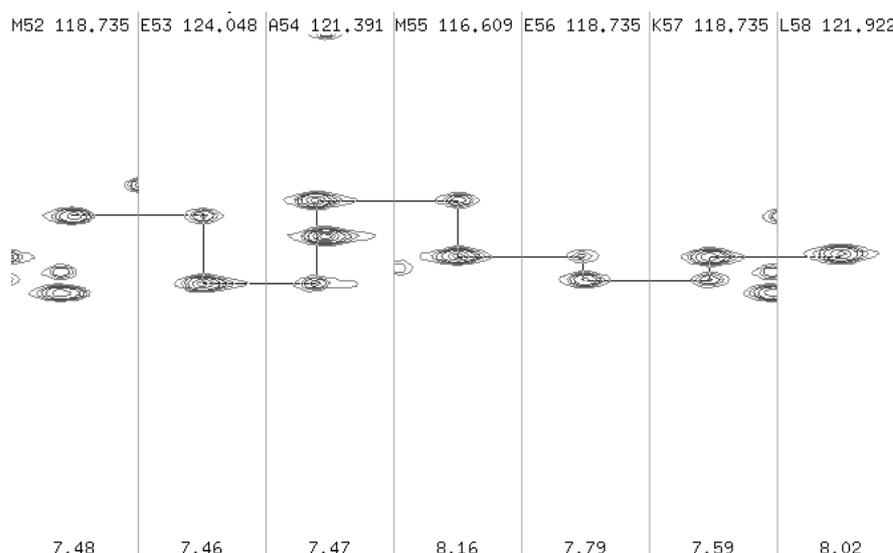


Abb. 4-10: Sequentielle Zuordnung von C $_{\alpha}$ -Resonanzen der Aminosäuren Met52 bis Leu58 im HNCA-Spektrum. Dargestellt sind die ^{13}C - 1H Ebenen mit verschiedenen ^{15}N -Koordinaten. Die Verschiebung ist oben (^{15}N) und unten (1H) in ppm aufgeführt.

Die restlichen C $_{\alpha}$, H $_N$, N-Resonanzen der 35 Aminosäuren des Aminoterminus konnten nur teilweise verknüpft werden. Die C $_{\alpha}$ -CO-N-C $_{\alpha}$ Verknüpfungen zwischen den Resten Met1 bis Ser21 fehlten, ab Asp22 konnte sequenzspezifisch zugeordnet werden. Die zugehörigen C $_{\beta}$ -Frequenzen der eigenen und der vorherigen Aminosäuren ließen sich bereits anhand ihrer chemischen Verschiebungen [92] aus dem CBCACONH-Spektrum gewinnen. Die zugehörige Carbonylkohlenstoffe wurden durch die HNC(O), bzw. HNCACO-Experimente ermittelt.

4.2.2.2 Zuordnung der Seitenkettensignale

Die Resonanzen der Seitenkettenprotonen können mit Hilfe eines ^{15}N -editierten TOCSY Spektrums (^{15}N -TOCSY-HSQC) zugeordnet werden. Dieses Spektrum enthält in einer Projektionsrichtung ein ^{15}N -HSQC in einer zweiten ein homonukleares TOCSY, in dem selektiv nur die Spinsysteme über den Amidprotonenresonanzen zu sehen sind. Basierend auf der Zuordnung aller NH-Resonanzen, können die zugehörigen Spinsysteme ausgelesen werden. Bei den ^{15}N -TOCSY-HSQC-Experiment wird für den Magnetisierungstransfer die $^n\text{J}(\text{H}_\text{N}-\text{H}_i)$ Kopplung genutzt, die jedoch bei $n > 3$ weniger effektiv wird und durch die Relaxation während der TOCSY-Mischzeit ($T_{1\rho}$ -Relaxation) zusätzlich abgeschwächt wird. Im Spektrum von *hPar14* konnten die Frequenzen fast aller α - und β -Protonen, sowie einiger γ -Protonen zugeordnet werden. Die Resonanzen von Protonen langkettiger Aminosäuren blieben wie schon im homonuklearen TOCSY-Spektrum meist unsichtbar.

Um die übriggebliebenen Protonen- und Kohlenstoffresonanzen der Seitenketten möglichst vollständig zuordnen zu können, wurden zusätzlich ein HBHACONH, ein ^{13}C editiertes TOCSY (^{13}C -TOCSY-HSQC) sowie ein HCCH-TOCSY aufgenommen. Während man im HBHACONH die Resonanzen der restlichen β -Protonen finden konnte, diente das ^{13}C -editierten TOCSY zur Identifizierung von Protonen- und Kohlenstoffresonanzen langkettiger Aminosäuren und von Iminosäuren (Proline). Da sich bei der Aufnahme eines ^{13}C editierten TOCSYs ähnliche Probleme stellen wie bei der ^{15}N editierten Variante, wurden zur Ergänzung ein HCCH-TOCSY aufgenommen. Dieses Experiment nutzt zum Magnetisierungstransfer die große $^1\text{J}(\text{C}-\text{C})$ Kopplung von 30 Hz. Die bis hierhin getroffene sequenzspezifische Zuordnung aller Resonanzen wurde mit Hilfe eines ^{15}N -NOESY-HSQC überprüft. Wie das homonukleare NOESY-Spektrum bietet diese dreidimensionale Ausführung die Möglichkeit entlang des Rückgrats der Aminosäurekette zu „wandern“ (siehe *chaintracing*, Kapitel 2). Der Vorteil gegenüber des 2D-Spektrums ist jedoch, die höhere Dispersion und damit eine erhöhte Eindeutigkeit bei der NOE-Suche. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Überlagerungen von NOEs, die zwischen Amid- und aliphatischen Protonen einerseits und Ring- und aliphatischen Protonen andererseits entstehen, aufgehoben werden.

Das *chaintracing* anhand eines ^{15}N -NOESY-HSQC Spektrums ist in Abbildung 4-11 exemplarisch anhand der Resonanzen von Aminosäure Glu96 bis Leu101 aus α -Helix-4 dargestellt.

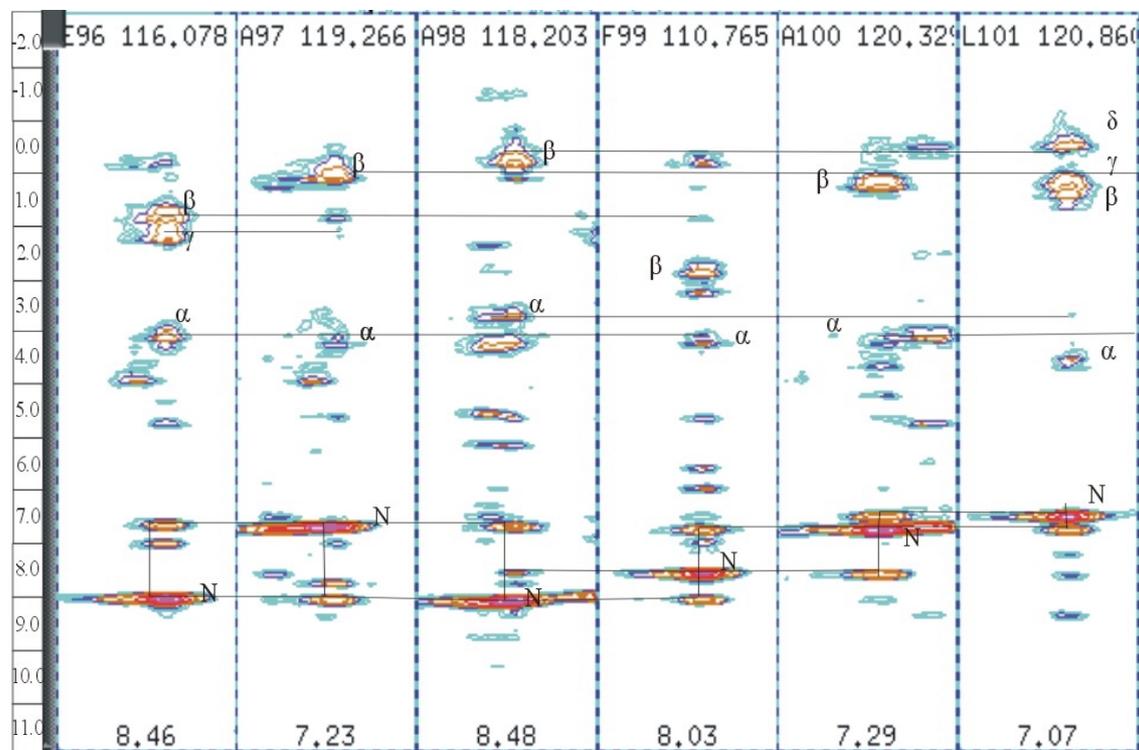


Abb. 4-11: Identifizierung der Spinsysteme nach der sequenzspezifischen Zuordnung der $\text{C}\alpha$, H_N , N -Resonanzen zu den jeweiligen Atomen der Aminosäuren am Beispiel von Glu96 bis Leu101. Dargestellt sind die ^1H - ^1H Ebenen des ^{15}N -NOESY-HSQC-Spektrums mit verschiedenen ^{15}N -Koordinaten. Die Verschiebung ist in ppm aufgeführt.

Mit Hilfe der hier beschriebenen Experimente konnten die Resonanzen aller Protonen, Stickstoff- und Kohlenstoffatome des N-Terminus ab Asp22 - Gly34 und der PPIase-Domäne von *hPar14* (Gly35 - Lys131) mit Ausnahme der Frequenzen von Aminosäure Gly79 und Gly92 zugeordnet werden. Die Zuordnung der schwachen Resonanzen von Ala76, Lys77 und Gln78 blieb unsicher. Die chemischen Verschiebungen finden sich in [95].

4.2.3 Bestimmung von Sekundärstrukturparametern

Die Sekundärstruktur von Parvulin wurde über drei unabhängige Parameter bestimmt: Abweichungen der chemischen Verschiebung vom Durchschnittswert für Peptide (der

so genannte *chemical shift index*), aus der Grösse der $^3J(\text{H}_\text{N}-\text{H}_\alpha)$ -Kopplungskonstanten und aus spezifischen NOEs.

4.2.3.1 Bestimmung der Sekundärstruktur mit Hilfe der chemischen Verschiebungsanalyse

Zwischen den chemischen Verschiebungen der verschiedenen Atome (C_α , C_β , CO und H_α) und der ausgebildeten Sekundärstruktur besteht ein direkter Zusammenhang (Kap. 3.12.2).

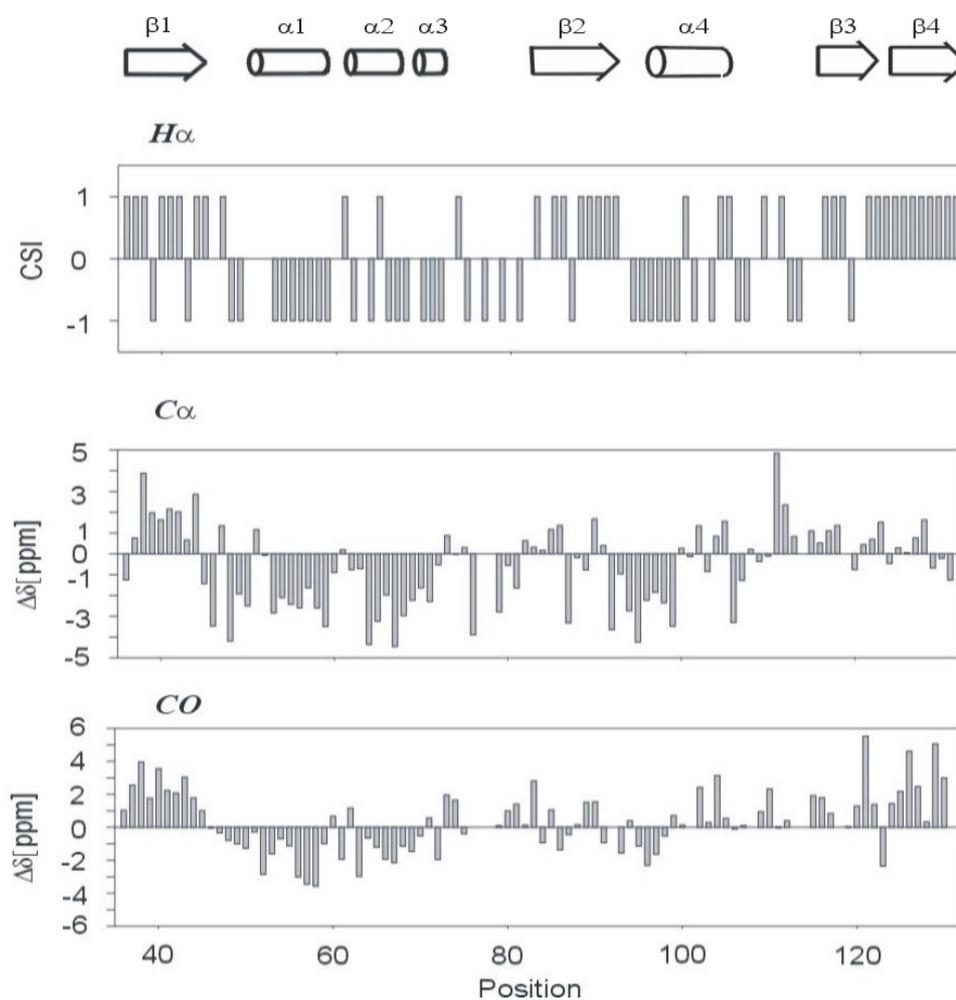


Abb. 4-12: Graphische Darstellung der Abweichungen der einzelnen chemischen Verschiebungen in *hPar14*₃₆₋₁₃₁ von den *random coil*-Werten. Oben sind die Sekundärstrukturelemente von *hPar14* schematisch dargestellt: „Pfeile“ bedeuten β -Faltblattstränge und „Röhren“ α -Helices. Zur Berechnung der H_α -Verschiebungsindizes (CSI) wurde die Methode von Wishart et al [90] verwendet. Die Balken kennzeichnen die Differenz zu den *random coil*-Werten, die größer (Balken nach oben) oder kleiner (Balken nach unten) als 0.1 ppm ist. Für die chemische Verschiebung von C_α und CO sind absolute Differenzen in ppm von den *random coil*-Werten als Balken dargestellt.

In Abbildung 4-12 sind die Abweichungen der verschiedenen Kerne von den *random coil*-Werten aufgezeigt. Aufgrund des in Kap. 3.12.2 definierten Algorithmus erhält man für die Bereiche Asn36 - Cys45, Gly80 - Met85, Val110 - Thr118, Phe122 - Gly129 eine Vorhersage auf β -Faltblattstruktur, in der Region Lys50 - Lys59, Arg63 - Tyr71, Pro93 - Leu101 eine auf α -helikale Struktur. Alle drei Gruppen ($C\alpha$, CO und $H\alpha$) (Abb.4-12) weisen in ihren Verschiebungsparametern gute Übereinstimmung auf. Für die Aminosäuren Lys4 - Gly35 (soweit zugeordnet) blieb die Abweichung der chemischen Verschiebung von den *random coil*-Werten $< \pm 0.1$ ppm (CSI = 0), was auf nicht vorhandene Sekundärstrukturelemente in diesem Bereich hinweist.

4.2.3.2 Quantitative Bestimmung der $^3J(H_N-H_\alpha)$ -Kopplungskonstante

Aussagen über die Sekundärstruktur können auch aufgrund der dihedralen Winkel gemacht werden, die durch die Karplus-Gleichung (Kap. 3.12.1.2) in Verbindung zur vicinalen $^3J(H_N-H_\alpha)$ Kopplungskonstante steht. Die Kopplungskonstante $^3J(H_N-H_\alpha)$

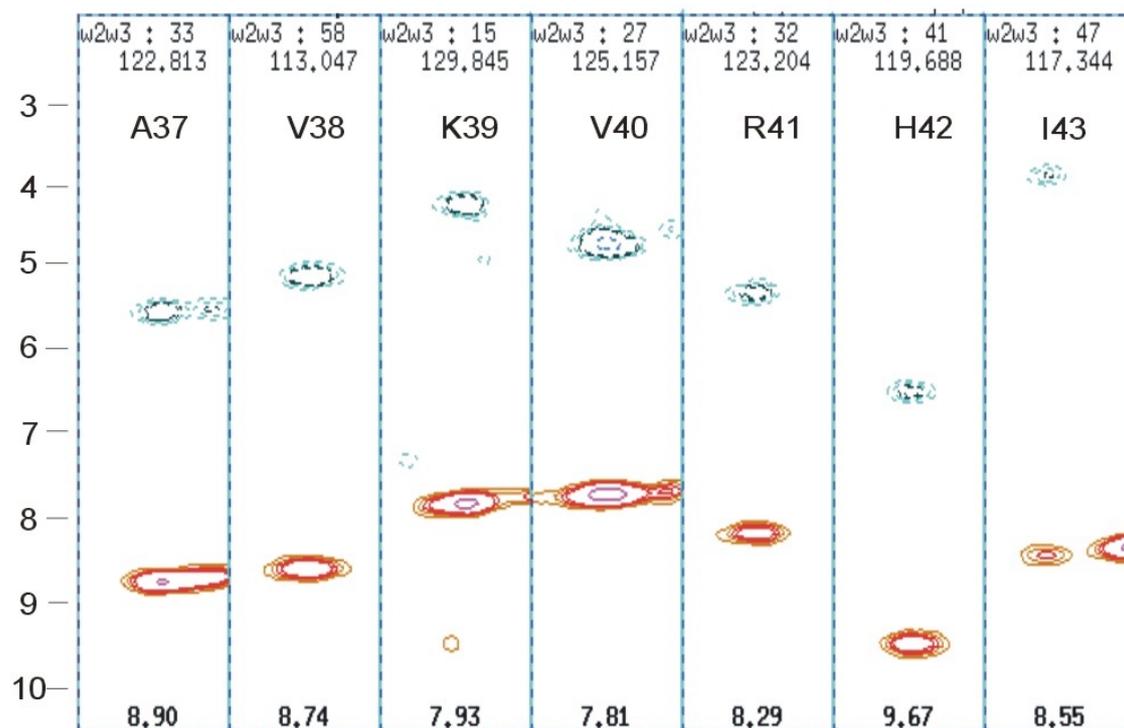


Abb. 4-13: 1H - 1H Ebenen des HNHA-Spektrums von *hPar14* mit verschiedenen ^{15}N -Koordinaten. Jeder Ausschnitt stellt ein Kreuzresonanz-Diagonalresonanzpaar für H_N-H_α einer Aminosäure dar. Die Kreuzresonanzen (positiv) sind rot gezeichnet, die Diagonalresonanzen (negativ) sind blau. Die chemische Verschiebung ist in ppm aufgeführt.

erschließt sich im Tripelresonanz-Experiment HNHA aus dem Intensitätsverhältnis von Kreuzsignal zu Diagonalsignal. Die Kreuzresonanz-Diagonalresonanzpaare sind exemplarisch für den mittleren Teil des β -Faltblatt-1 in Abb. 4-13 dargestellt.

In Abbildung 4-14 sind die im HNHA ausgewerteten Kopplungskonstanten gegen die Sequenzposition aufgetragen. Kopplungskonstanten von > 7 Hz für sequentiell aufeinanderfolgende Aminosäuren charakterisieren einen β -Faltblattstrang, Konstanten < 6 Hz einen α -helikalen Bereich. Die Konstanten in *loop*-regionen variieren stark bei sequentiell aufeinanderfolgenden Resten. Wie in Abb. 4-14 zu sehen ist, war die Bestimmung der Sekundärstruktur in diesem Falle nicht immer aussagekräftig: nur die β -Faltblattstränge-1 und 3 und α -Helices-1, 2 und 4 konnten eindeutig identifiziert werden. Für die β -Faltblattstränge-2 und 4 und α -Helix-3 konnte hingegen keine Aussage getroffen werden.

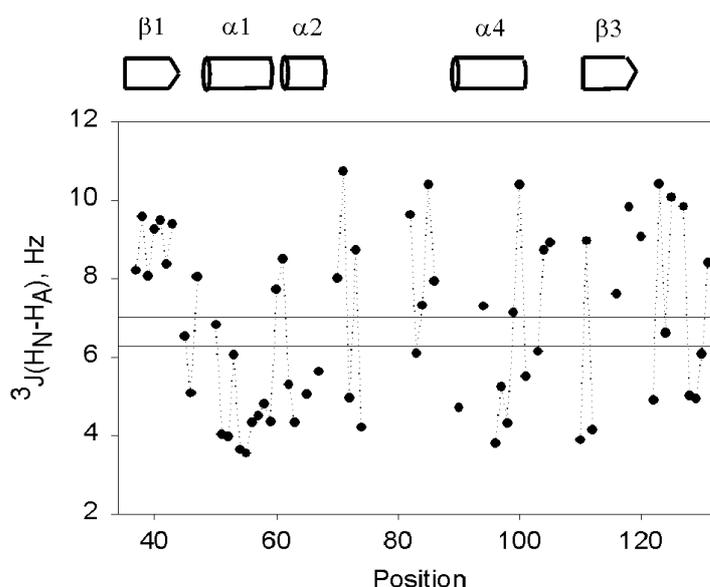


Abb. 4-14: Aus HNHA-Spektrum bezogene $^3J_{(H_N-H_\alpha)}$ -Kopplungskonstanten in *hPar14*. Der *random coil*-Bereich ist durch horizontale Linien markiert. Entsprechend ihrer Kopplungskonstanten wurden dihedrale Winkelschränkungen bei der Rechnung berücksichtigt. Hohe Kopplungskonstanten sind charakteristisch für β -Faltblattstrukturen, niedrige für helikale Bereiche. Oben sind die Sekundärstrukturelemente von *hPar14* schematisch dargestellt: „Pfeile“ bedeuten β -Faltblattstränge und „Röhren“ α -Helices.

4.2.3.3 Analyse von NOE-Kreuzresonanzen

Obwohl die in den Kapiteln 4.2.3.1 und 4.2.3.2 aufgeführten Punkte die Strukturbestimmung unterstützen, beruht die Strukturberechnung zum größten Teil auf der Bestimmung dihedraler Einschränkungen aufgrund von NOEs. Bestimmte

sequentielle und medium range-NOE sind typisch für Sekundärstrukturelemente [53]. Die in *hPar14* gefundenen NOEs sind in Abbildung 4-15 aufgeführt. Die in den vorausgehenden Kapiteln beschriebenen Sekundärstrukturelemente werden durch die entsprechenden NOEs deutlich charakterisiert.

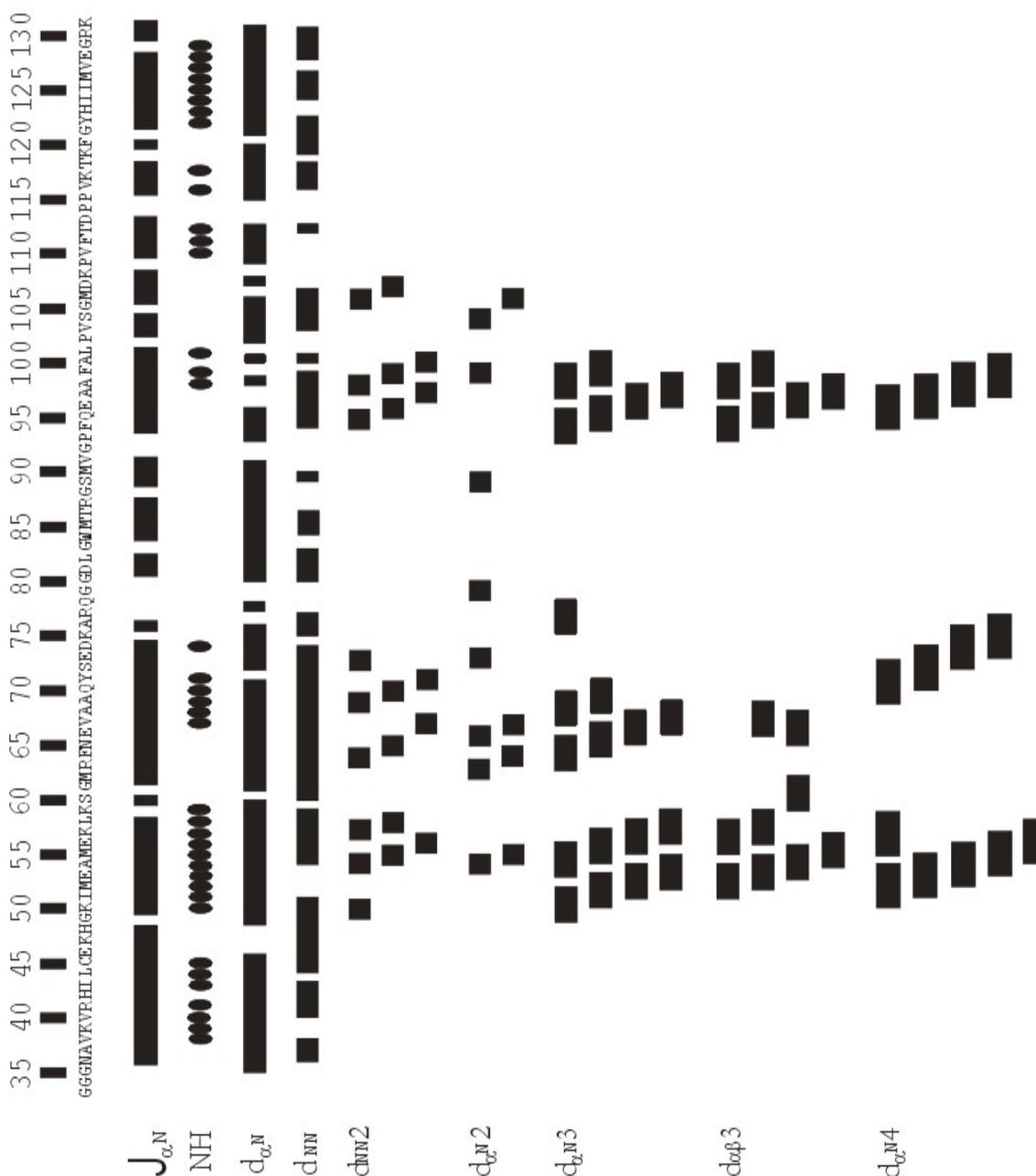


Abb. 4-15: Übersicht über sequentielle und mittelreichweitigen NOEs. Es sind außerdem diejenigen Aminosäuren markiert, für die dihedrale Winkelbeschränkungen gefunden wurden (bezeichnet mit J_{α}^N) oder deren Amidproton in D_2O langsam austauschen (bezeichnet mit \bullet). Bei den NOEs bezeichnen Zahlen hinter den Angaben die relativen Sequenzpositionen. Die Intensität der NOEs wird in dieser Abbildung nicht berücksichtigt.

Die für eine helikale Sekundärstruktur charakteristische Beobachtung von sukzessiven $d_{\text{NN}}\text{-NOEs}$ mit gleichzeitig auftretenden $d_{\text{NN}2}\text{-NOEs}$ konnte für die Sequenzabschnitte von Lys50 bis Lys59, Met62 bis Tyr71 und Pro93 bis Leu101 gemacht werden. Die Lage der α -Helices wurde durch das Vorhandensein von $d_{\alpha\text{N}3}$, $d_{\alpha\beta 3}$ und $d_{\alpha\text{N}4}\text{-NOEs}$ bestätigt.

4.2.3.4 Austausch von H_N -Protonen in D_2O

In ungefalteten Peptidketten tauschen die Amidprotonen des Proteinerückgrats in einer D_2O -Lösung mit den Deuteronen des Lösungsmittels aus. Amidprotonen sind deshalb im NMR-Spektrum eines Peptids in D_2O nicht sichtbar. Kommt es jedoch zur Behinderung des Austauschs durch Einbau von Amidprotonen in Wasserstoffbrücken, können diese Protonen im NMR-Spektrum oft selbst nach mehrer Stunden oder Tagen noch beobachtet werden.

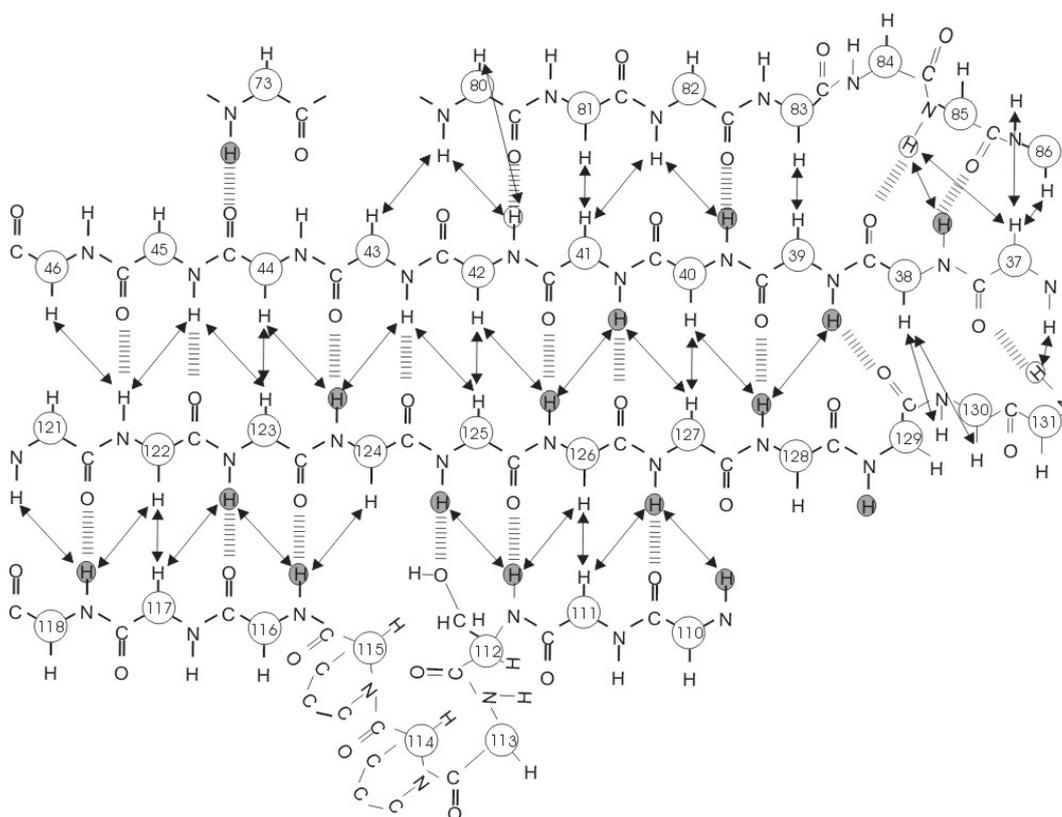


Abb. 4-16: Schematische Darstellung der Faltsblätter $\beta 1$ - $\beta 4$. Beobachtete NOEs (schwarze Pfeile) und auf der Grundlage langsam austauschender Amidprotonen (graue Kreise) postulierte Wasserstoffbrücken (gestrichelte Linien) sind eingezeichnet.

Insgesamt wurden 39 Aminosäuren im D_2O - ^{15}N -HSQC-Spektrum von *hPar14* identifiziert, deren H_N -Proton nach drei Tagen in D_2O nicht vollständig ausgetauscht hatten: Val38, Lys39, Val40, Arg41, His42, Ile43, Leu44, Cys45, Lys50, Ile51, Met52, Glu53, Ala54, Met 55, Glu56, Lys57, Leu58, Lys59, Val67, Ala68, Ala69, Gln70, Tyr71, Ser 72, Asp74, Met85, Ala98, Phe99, Ala100, Leu101, Val110, Asp113, Val116, Thr118, Tyr122, His123, Ile124, Ile125, Met126, Val127, Glu128, Gly129, Arg130.

Wie man aus Abbildung 4-16 entnehmen kann, liegen die genannten Aminosäuren in Sekundärstrukturelementen vor. Nicht austauschende Amidprotonen wurden als „Wasserstoffbrücke“ interpretiert und als Distanzeinschränkung in der anschließenden Strukturberechnung verwendet.

4.2.3.5 Zusammenfassende Charakterisierung der Sekundärstrukturelemente

Die Sekundärstrukturelemente sind schematisch in Abb. 4-17 dargestellt. In dem N-terminalen Teil (Met1 - Gly35) sind keine Sekundärstrukturelemente vorhanden. Die α -helikalen Bereiche befinden sich im Sequenzbereich von Lys50 bis Arg77 („Helix-loop-helix“- Motif, bestehend aus drei α -Helices und dazwischenliegenden *loop*-Regionen) und Pro93 -Leu101 (α -Helix-4). Während α -Helix-3 nur aus einer helikalen Windung besteht (Asp74 - Arg77), erstreckt sich α -Helix-1 über 10 Reste bzw. über 2.5 Windungen (Lys50 - Lys59), die beiden anderen (α_2 , α_4) – je über 9 Reste bzw. über 2.3 Windungen (Arg63 - Tyr71 und Pro93 - Leu101). Es gibt vier β -Stränge, die antiparallel angeordnet sind. Die Aminosäuren Ile43 - Cys45 (β_1) bilden mit dem Abschnitt Gly80 - Met85 (β_2) ein antiparalleles β -Faltblatt aus, das sehr gut durch die entsprechenden NOEs und Wasserstoffbrücken definiert ist (Kapitel 4.2.3.4). Die Aminosäuren Ala37 - Cys45 des ersten Stranges β_1 bilden zusätzlich mit den Resten Phe122 - Gly129 (β_4) noch ein antiparalleles β -Faltblatt aus. Ein drittes antiparalleles β -Faltblatt (β_3) wird durch die Reste Val110 - Thr112 und Val116 - Lys119 gebildet so, dass die beiden aufeinander folgenden Prolinreste (Pro114, Pro115) dem Lösungsmittel exponiert sind.

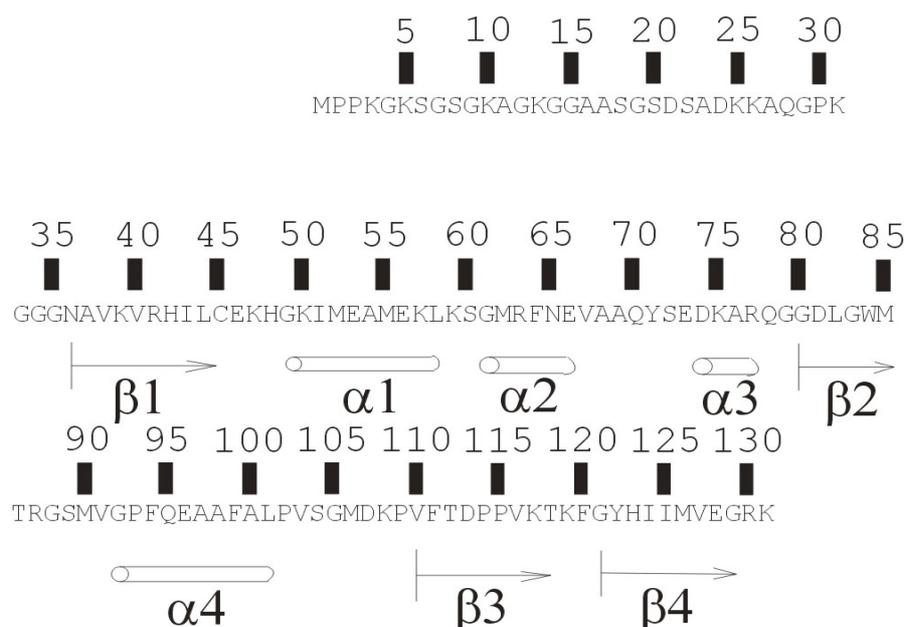


Abb. 4-17: Schematische Darstellung der Sekundärstrukturelemente von *hPar14*. Die Faltslätter sind mit $\beta 1 - \beta 4$, die Helices mit $\alpha 1 - \alpha 4$ bezeichnet. Die Lage der Sekundärstrukturelemente wurde mit Hilfe von typischen NOEs, dihedralen Winkeln und Wasserstoffbrücken bestimmt.

4.2.4 Berechnung und Charakterisierung der dreidimensionalen Struktur

Mit Hilfe der aus den NMR-Spektren gewonnenen Informationen wurde unter Verwendung des X-PLOR-98-Programms die Struktur des *hPar14* berechnet.

4.2.4.1 Strukturberechnung

Die Strukturberechnung erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Peter Bayer, der freundlicherweise die XPLOR-98 Protokolle zur Verfügung stellte.

Die aus den Spektren erhaltenen NOEs und Kopplungskonstanten sowie in D_2O langsam austauschende Amidprotonen wurden als experimentelle Daten wie in Kapitel 3.13 besprochen in ein *simulated annealing* Protokoll gesteckt. Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 1042 NOEs gefunden, davon 120 intraresiduale und 922 interresiduale. Letztere lassen sich noch einmal unterteilen in 397 *long range*-NOEs ($i, i+5$), 167 *medium range*-NOEs ($i, i+2$ bis $i, i+4$) und 358 sequentielle NOEs. Im Durchschnitt wurden für die Strukturberechnung zehn NOEs pro Aminosäure herangezogen. Bereiche niedriger Definition sind vor allem die *loop*-Regionen, solche hoher Definition die rigiden Sekundärstrukturen. Am meisten (bis zu 40) NOEs fanden sich zu langkettigen aliphatischen oder aromatischen Aminosäuren, die in das Proteininnere hereinragen, beispielsweise His42, Ile43, Leu58, Phe64, Val67, Tyr71,

Phe94, Phe122, His123 und Ile125. Daneben dienten 71 $^3J(H_N-H_\alpha)$ -Kopplungskonstanten zur Bestimmung einer gleichen Anzahl an dihedralen Winkeln und 38 in D_2O langsam austauschende Amidprotonen zur Festsetzung von Wasserstoffbrücken. Im Computer wurde das Aufheizen einer ungefalteten Peptidkette mit der Sequenz von *hPar14* auf 2000 K simuliert (10 ps) und das Protein anschließend einer langsamen Abkühlphase unterzogen (*simulated annealing*). Während der Kühlzeit (5ps) erhält die Peptidkette die Möglichkeit, die experimentellen und die als Parameter vorgegebenen Einschränkungen zu erfüllen. Abweichungen werden dabei mit einem energetischen Term bestraft. Eine nach jedem Abkühlschritt eingesetzte Energieminimierungsphase sorgt dafür, dass am Ende der Rechnung ein dreidimensional gefaltetes Molekül entsteht, das alle Einschränkungen weitestgehend erfüllt. Um eine Abhängigkeit des Resultats von den Ausgangskordinaten der ungefalteten Startstruktur auszuschliessen, wurden 50 Strukturen mit jeweils unterschiedlichen Startwerten kalkuliert. Abb. 4-17 zeigt die Auftragung der Gesamtenergie der Strukturen und den Strafterm für NOE-Verletzungen nach steigender Energie. Das Profil des Strafterms zeigt, dass die Strukturen bis etwa 25 nahezu gleiche Energien besitzen und dann ein Anstieg des Energieterms zu sehen ist. Die ersten 25 Strukturen wurden deshalb zu einem Ensemble zusammengefasst, das die Parvulinstruktur repräsentiert.

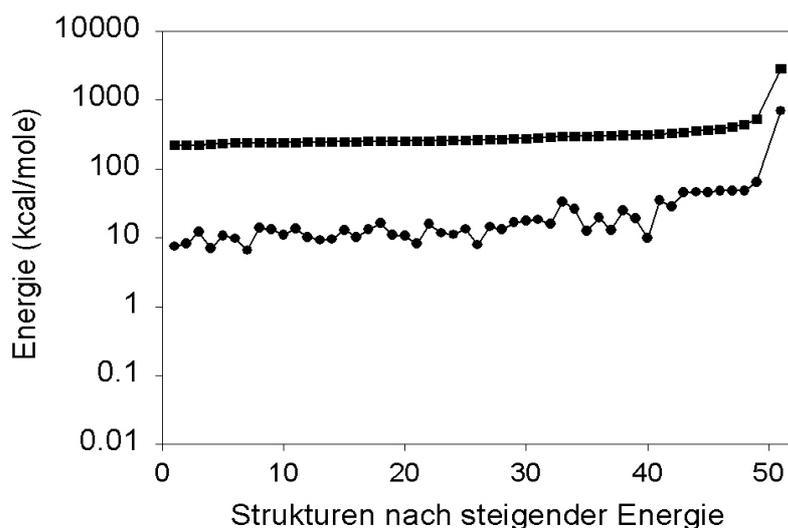


Abb. 4-17: Energieprofil von 50 berechneten Strukturen. ■- Gesamtenergie;●-Energie der Verletzungen der experimentellen Daten (NOEs). Die Skala an der Ordinate ist logarithmisch.

4.2.4.2 Qualität der Strukturen

Die Qualität der berechneten Strukturen kann anhand von Energien und Standardabweichungen abgeschätzt werden. Die einzelnen Energierterme geben dabei einen Anhaltspunkt über die Abweichung der Strukturen von der Idealgeometrie und von den experimentellen Daten. Die Durchschnittswerte der Energien und der Standardabweichungen von der idealen Geometrie sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst.

Der relative hohe RMSD-Wert ($1.45 \pm 0.16 \text{ \AA}$), der aus den 25 ausgewählten Strukturen für das gesamte Proteinrückgrat berechnet wurde, sinkt deutlich bis zu 0.81 \AA , wenn die flexiblen *loop*-Regionen (Cys45 - Lys50, Lys58 - Phe64, Gln70 - Asp81, Thr86 - Pro115, Lys119 - Tyr122) von der Rechnung ausgenommen werden. Die deutlich bessere Konvergenz der Sekundärstrukturelemente deutet darauf hin, dass die globale Struktur gut definiert ist, es aber flexible oder weniger gut definierte Bereiche im Protein gibt.

Tabelle 4-1: Durchschnittliche Energie- und RMSD-Werte für die 25 ausgewählten Strukturen.

Durchschnittliche Energien	Energie, kcal/mol
E_{total}	243±49
E_{WDW}	13.9±2.7
E_{noe}	11.5±2.9
E_{angle}	177±35
E_{bond}	7.1±1.6
E_{improper}	33.9±6.6
E_{dihedral}	0.2±0.01
Standardabweichungen	RMSD
Bindungslängen (Å)	0.002±0.0004
Bindungswinkel (Grad)	0.57±0.115
„improper“ Winkel (Grad)	0.47±0.095
NOE (Å)	0.055±0.008
dihedrale Winkel(Grad)	0.014±0.003
RMSD-Werte der 25 Strukturen untereinander	RMSD(Å)
Proteinrückgrat (Sekundärstrukturbereiche)	0.81±0.07
Schweratome (Sekundärstrukturbereiche)	1.29±0.08
Proteinrückgrat (36-131)	1.45±0.16
Schweratome (36-131)	2.08±0.16

Die unterschiedliche Flexibilität einzelner Sequenzabschnitte ist in Abbildung 4-18 dargestellt. Die flexiblen Bereiche, die für den hohen RMSD-Wert des gesamten Proteinrückgrates verantwortlich gemacht sind, befinden sich in den loop-Regionen von Arg77 - Gly79, Thr86 - Gly92 und Pro102 - Pro109. Die Abschnitte mit niedrigeren lokalen RMSD-Werten stehen in Übereinstimmung mit den Bereichen, in denen sich die Sekundärstrukturelemente befinden

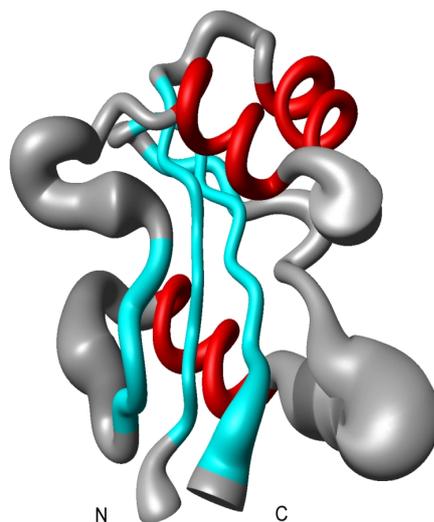


Abb. 4-18: „Wurst“-Darstellung (MOLMOL [97]) einer Überlagerung von 25 Strukturen von *hPar14*₃₆₋₁₃₁. β -Faltblätter sind grün, α -helikale Bereiche rot markiert. Abbildung wurde aus [96] entnommen.

4.2.4.3 Die Tertiärstruktur von *hPar14*

Die Tertiärstruktur von *hPar14*₃₆₋₁₃₁ besteht aus einem viersträngigen gekrümmten β -Faltblatt, das wie die Innenfläche einer Hand um die α -Helix-4 gewunden ist (Anordnung $\beta\alpha\alpha\beta\alpha\beta\beta$). α -Helices-1, 2 und 3 befinden sich auf der konvexen Seite des Faltblattgerüsts. Dies ist dreidimensional in Abb. 4-19 dargestellt. Die Seitenketten der hydrophoben Reste Leu58, Phe64 und Val67 der amphiphatischen α -Helices-1 und 2 machen VDW-Kontakte zu den Seitenketten von Ile43 und Ile124 der Faltblattstränge 1 und 4. Der Kern des Proteins wird durch die hydrophoben Seitenketten der aromatischen Aminosäuren Phe94 und Phe99, der α -Helix-4 und den langkettigen Aminosäuren Leu44, Leu82, Leu125 aus den β -Faltblättern gebildet.

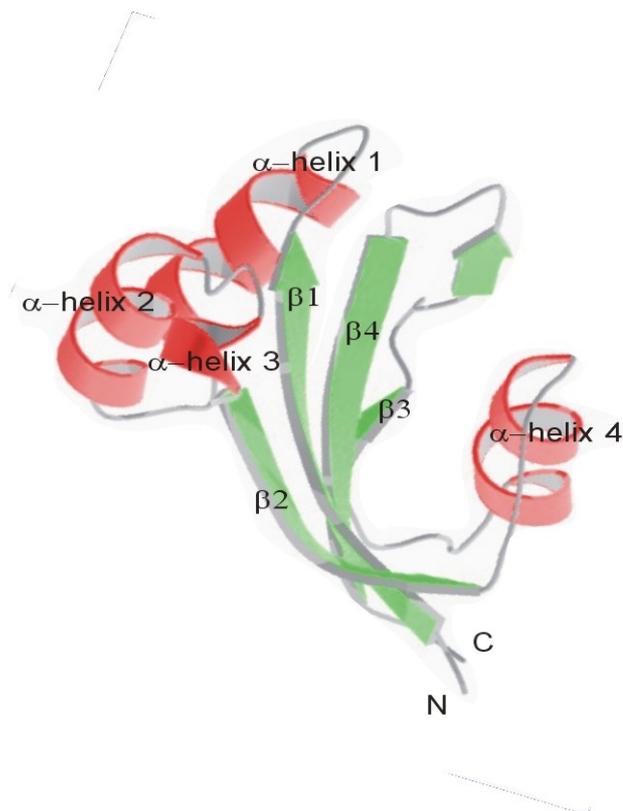


Abb. 4-19: Tertiärstruktur von *hPar14*₃₆₋₁₃₁. Dargestellt (MOLSCRIPT [98]) ist der Verlauf des Proteinrückgrates. Die Sekundärstrukturelemente sind rot für Helices und grün für Faltblätter dargestellt.

4.3 Untersuchungen zur Interaktion von *hPar14* mit einem Modellsubstrat

In einem PPIase-Aktivitätstest wurde nachgewiesen, dass *hPar14* für bestimmte Substrate eine schwache PPIase ist [32]. Bei diesem Assay konnte die *cis/trans*-Isomerisierung der Xaa-Pro-Peptidbindung eines Tetrapeptid-4-Nitroanilids, in dem der Aminosäurerest Xaa zur Ermittlung der Substratspezifitäten von PPIasen durch eine Reihe proteinogener Aminosäurereste ersetzt wurde, spektrophotometrisch verfolgt werden. Für das Oligopeptid Succinyl-Ala-Arg-Pro-Phe-para-nitroanilin ist die Spezifität der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung durch *hPar14* am höchsten mit einem k_{cat}/K_M -Wert von $4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$. Da das natürliche zelluläre Substrat für *hPar14* bis jetzt noch nicht bekannt ist, sollte in der vorliegenden Arbeit die Interaktion zwischen *hPar14* und dem Modellsubstrat aus dem PPIase-Aktivitätstest charakterisiert werden. Es sollte untersucht werden, welche Änderungen in der Struktur von *hPar14* bei der Bindung auftreten.

4.3.1 Einfluß der Substratbindung auf die chemische Verschiebung

Welche Aminosäurereste von *hPar14* mit dem Modelsubstrat wechselwirken, wurde anhand zweidimensionaler ^{15}N -HSQC-Spektren bestimmt (Kap. 3.11.5.1). *hPar14* wurde ^{15}N , ^{13}C -markiert eingesetzt, so dass ausschließlich die vom Protein stammenden Resonanzen in den Spektren sichtbar waren. Eine Änderung der chemischen Verschiebung (^1H oder ^{15}N) der Resonanzen bei der Modelsubstratzugabe deutet auf Bindung hin. So können durch eine Analyse dieser Änderungen Sequenzregionen von *hPar14* identifiziert werden, die an der Bindung des Modelsubstrates beteiligt sind. In Abbildung 4-20 ist eine Überlagerung der ^{15}N -HSQC-Spektren von *hPar14* in An- und Abwesenheit des Modelsubstrates dargestellt.

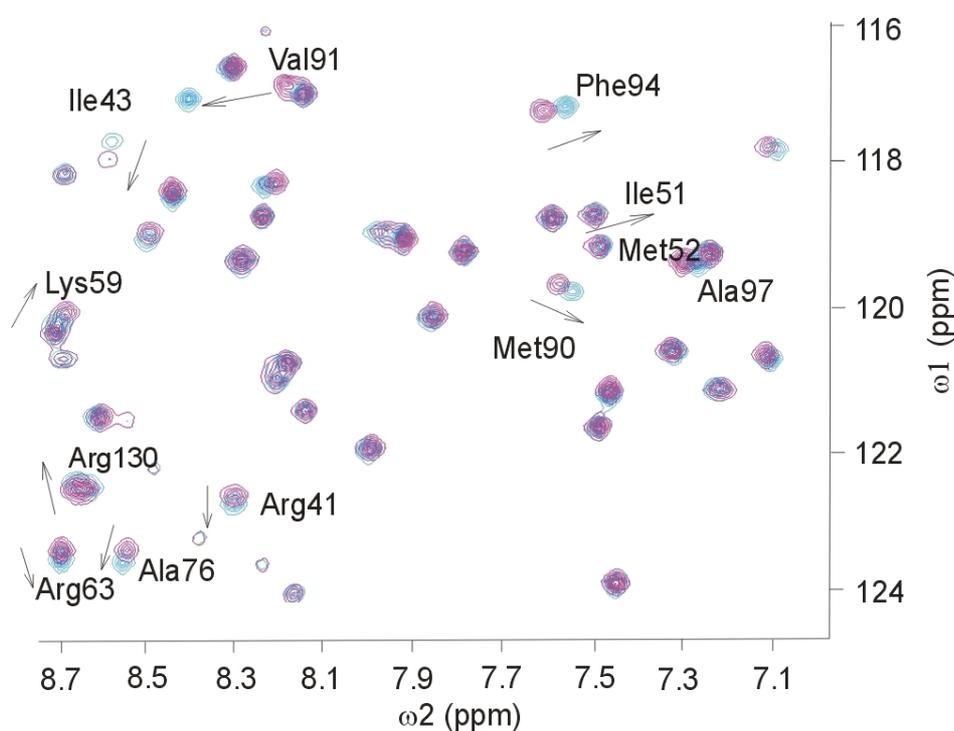


Abb. 4-20: Ausschnitt aus der Überlagerung der ^{15}N -HSQC-Spektren von ^{15}N , ^{13}C -markiertem *hPar14* (0.2 mM) in Anwesenheit (hellblaue Konturlinien) und Abwesenheit (rosa Konturlinien) von 0.2 mM (1:1) Modelsubstrat (Kap. 3.11.5.1). Die Pfeile zeigen die Richtung der Verschiebungen einzelner Resonanzen nach der Modelsubstratzugabe (1:1) an. Die NMR-Spektren wurden bei 300 K 10 mM Phosphatpuffer, pH 6.5 mit 150 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 10% (v/v) D_2O aufgenommen. Die übrigen Parameter für die Aufnahme der Spektren waren wie in Kap. 3.11.4 beschrieben.

Für 55 Resonanzen änderten sich die chemischen Verschiebungen bei Zugabe des Peptids (Anhang A). Die Änderung der chemischen Verschiebung $\Delta\delta_{\text{gesamt}}$ (Abb. 4-21A) wurde als $\Delta\delta_{\text{gesamt}} = \{(\Delta\delta_{\text{NH}})^2 + (\Delta\delta_{\text{H}})^2\}^{1/2}$ ermittelt, wobei $\Delta\delta_{\text{x}}$ einer

Verschiebungsdifferenz in ppm entspricht und die Indizes für die entsprechenden Kerne stehen.

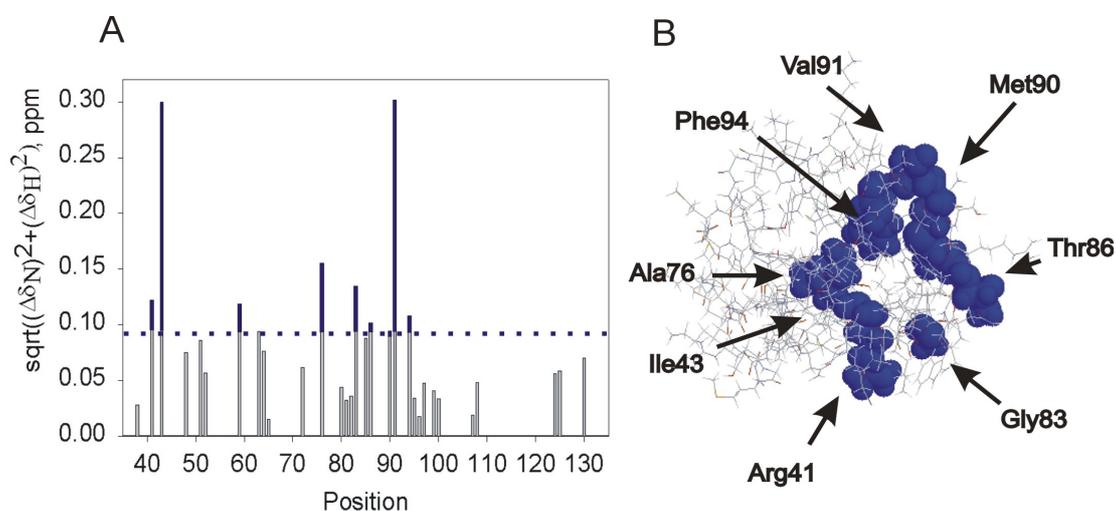


Abb. 4-21: Änderungen der chemischen Verschiebung. A: Auftragung der im ^{15}N -HSQC-Spektrum ermittelten Änderungen der chemische Verschiebung in ppm von NH-Resonanzen nach der Modellschutzzugabe (1:1) gegen die Sequenzposition. B: RASMOL-Darstellung von *hPar14*₃₆₋₁₃₁. Aminosäuren, die im Komplex mit dem Modellschutz im HSQC-Spektrum deutlich verschobene Signale (mehr als 0.09 ppm) zeigen sind blau mit ihren VDW-Radien dargestellt.

Änderungen der chemischen Verschiebung treten sowohl bei Resonanzen von Aminosäuren der β -Stränge-1 und -2 auf, als auch bei Resonanzen von Aminosäuren aus den α -Helices-3 und 4. Änderungen von mehr als 0.09 ppm weisen die Reste Arg41, Ile43, Ala76, Gly83, Thr86, Met90, Val91, Phe94 auf, welche in Abb. 4-21B blaufärbt dargestellt sind.

4.3.2 Einfluß der Substratbindung auf die Austauschraten von H_N -Protonen in D_2O

In D_2O tauschen die meisten labilen Protonen innerhalb der Totzeit des Experiments mit Deuteronen aus (siehe Kap. 3.11.5.3). Die Intensitäten der übrigen Resonanzsignale im ^{15}N -HSQC-Spektrum nehmen mit der Zeit ab. Aus der zeitlichen Abnahme der Intensität des Resonanzsignals, wie es für Val67 im freien und substratgebundenen Zustand von *hPar14* in Abbildung 4-22 dargestellt ist, läßt sich eine Austauschrate k_{ex} bestimmen (Anhang C).

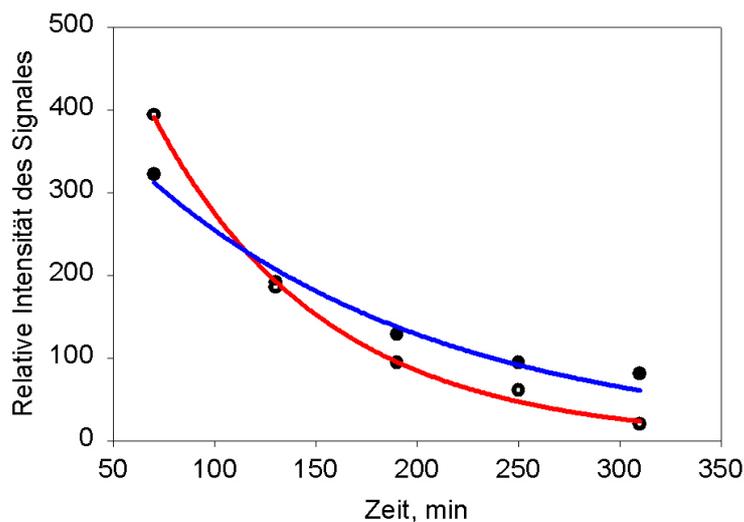


Abb. 4-22: Amidprotonaustausch am Beispiel des Amidprotons von Val67: rot - in Abwesenheit ($k_{\text{ex}} = 0.012 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$), blau - in Anwesenheit ($k_{\text{ex}} = 0.007 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$) des Modellsubstrates (1:1 Komplex).

Diese Austauschraten sind in Abbildung 4-23 invers gegen die Sequenzposition der Aminosäuren aufgetragen.

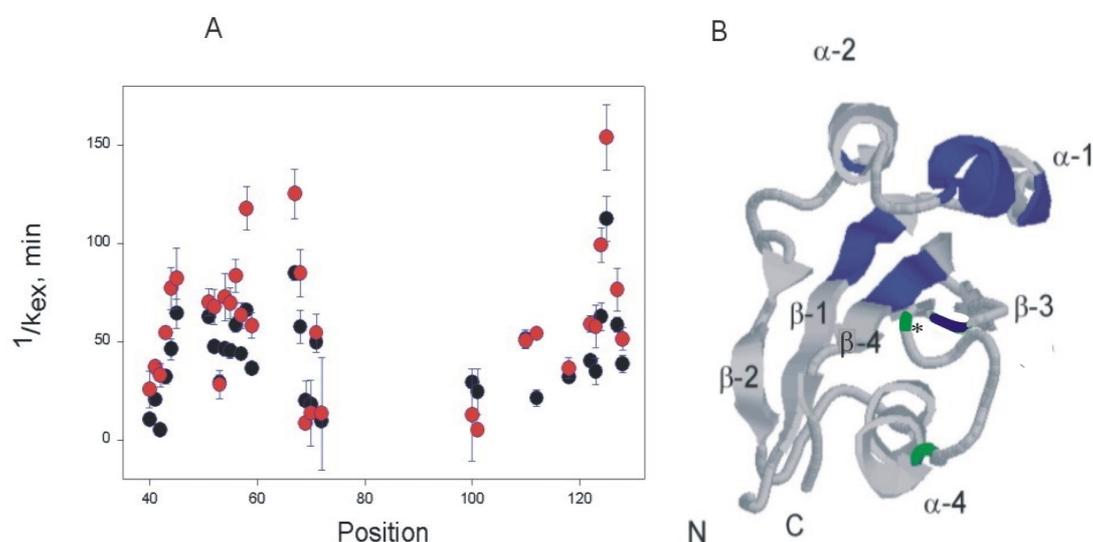


Abb. 4-23: A: Auftragung der im D_2O - ^{15}N -HSQC-Spektrum ermittelten $1/k_{\text{ex}}$ -Werte gegen die Sequenzposition in Anwesenheit (rote Kreise) und Abwesenheit (schwarze Kreise) des Modellsubstrats. B: RASMOL-Darstellung von $h\text{Par}14_{36-131}$. Aminosäuren, die im Komplex mit dem Modellsubstrat Änderungen in den Amidprotonaustauschraten zeigen, sind gefärbt dargestellt. Dabei bedeutet blau: Amidprotonaustauschrate erniedrigt sich; grün: Amidprotonaustauschrate erhöht sich (*-nicht signifikant).

Ein verlangsamter Austausch in Anwesenheit des Modells substrates ist für die Amidprotonen von Resten aus dem mittleren Teil des viersträngigen β -Faltblatts (His42, Ile43, Leu44, His123, Ile124, Ile125) charakteristisch. Die Austauschraten von Amidprotonen aus der oben genannten Region, die sich im Durchschnitt bei einem Wert zwischen $0.025 - 0.030 \text{ min}^{-1}$ in freiem Zustand des Proteins befinden, sinken auf $0.013 - 0.015 \text{ min}^{-1}$ bei Bindung des Modells substrats. Eine Ausnahme macht His42, bei dem die Differenz zwischen den Austauschraten des Amidprotons vor und nach Modells substratzugabe 0.17 min^{-1} beträgt. Die Anwesenheit des Substrats beeinflusst auch die Amidprotonaustauschraten von Met52, Ala54, Met55, Glu56, Lys57, Leu58, Lys59, aus der α -Helix-1 und Ala68 aus α -Helix-2. Allerdings sind die Änderungen in diesem Falle geringer: von durchschnittlich $0.020 - 0.022$ (ohne Substrat) auf $0.018 - 0.019$ (mit Substrat) min^{-1} . Im Gegensatz zu der bisherigen Tendenz, sinkende Austauschraten von Amidprotonen bei Substratzugabe zu beobachten, stehen steigende Austauschraten von Amidprotonen der Reste Leu101 und Val110 (in Abb. 4-23B grün gefärbt), die die *loop*-Region zwischen α -Helix-4 und β -Strang-3 begrenzen. Im Falle von Leu101 steigt die Austauschrate erheblich und die Differenz vor und nach der Substratzugabe beträgt 0.16 min^{-1} .

4.3.3 Einfluß der Substratbindung auf die T_1 - Zeiten

Die Bindung eines Substrats kann sowohl zur Änderung der Molekülbewegung (*tumbling*) als auch zur Änderungen in den Schwingungen des CH und NH Bindungsvektors führen. Beide „Phänomene“ haben Einfluß auf die T_1 - Zeiten (R_1 - Raten) des Amidstickstoffs, welche daher als intrinsische Sonde zur Beschreibung von Änderungen in der Beweglichkeit des Proteins dienen können. Zur Bestimmung der Relaxationszeiten T_1 , wurden Spektren mit *inversion recovery*-Wartezeiten (Kap. 3.11.4) aufgenommen und wie im Kap. 3.11.5.4 beschrieben ausgewertet (Anhang B). Während der Wartezeiten im Experiment kommt es zur Relaxation und damit zu einer Abschwächung der vorhandenen Magnetisierung. Da die Magnetisierung proportional der Intensität einer Resonanzlinie im Spektrum ist, läßt sich aus der wartezeitabhängige Abnahme der Intensität des Resonanzsignals eine Relaxationsrate R_1 bestimmen, die dem T_1 umgekehrt proportional ist. Dies ist in Abbildung 4-24 exemplarisch für Lys117 von *hPar14* im freien und substratgebundenen Zustand dargestellt.

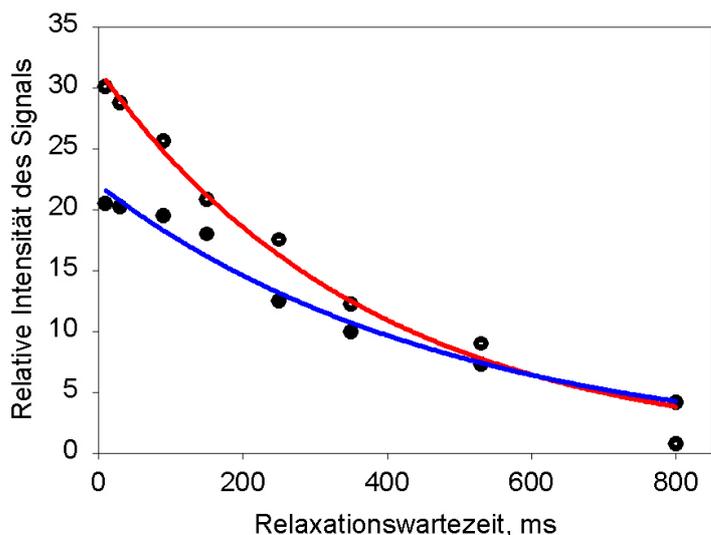


Abb. 4-24: Intensitätsabfall der Amidstickstoffresonanz von Lys117 durch T_1 -Relaxation: rot- in Abwesenheit ($T_1 = 384 \pm 33$ ms), blau – in Anwesenheit ($T_1 = 470 \pm 45$ ms) des Modells substrates.

Die Unterschiede in den Relaxationszeiten (T_1) aller Amidstickstoffatome von *hPar14* zwischen freiem und modells substratgebundenem Zustand sind in Abbildung 4-25 dargestellt.

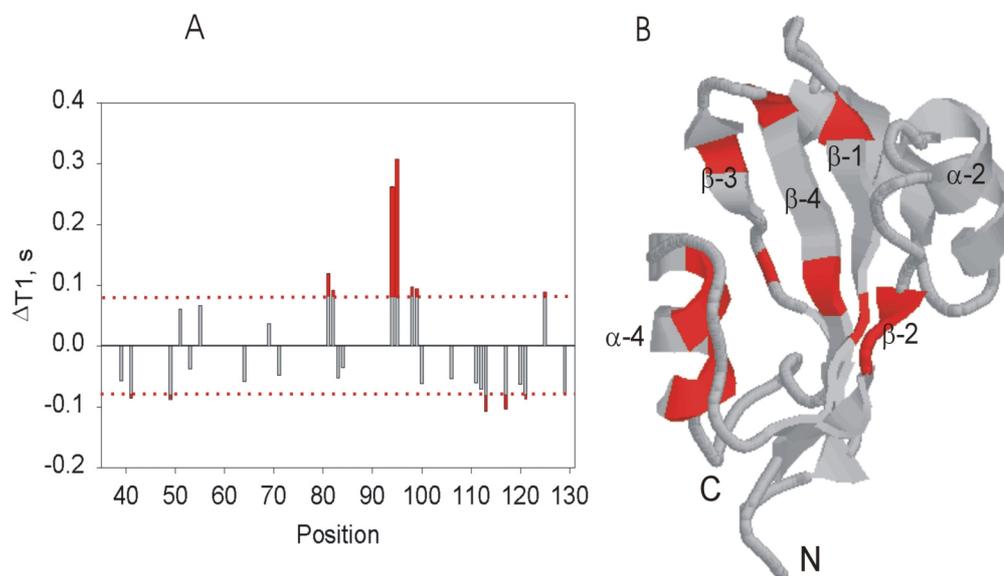


Abb. 4-25: Änderungen in den T_1 -Zeiten der Amidstickstoffatome. A: Auftragung der Änderungen in T_1 -Zeiten, die nach Substratbindung beobachtbar waren, gegen die Sequenzposition der Aminosäurereste. Die roten Linien bezeichnen den Signifikanzbereich (Änderungen von mehr als 80 ms). B: RASMOL-Darstellung von *hPar14*₃₆₋₁₃₁. Aminosäuren, die im Komplex mit dem Modells substrat signifikante Änderungen in den T_1 zeigen, sind rot gefärbt.

Es kommt zu einer Zunahme der T_1 - Zeiten der Amidstickstoffatome der Aminosäuren Asp81, Leu82 aus β -Strang-2 und Phe94, Gln95, Ala98, Phe99, die hydrophober Bestandteil der amphiphatischen α -Helix-4 sind. Die absolute Differenz beträgt im Falle von Phe94 und Gln95 mehr als 250 ms. Eine Verringerung der T_1 - Zeiten von 80 - 100 ms tritt in den β -Faltblättern auf (Arg41, Gly49, Asp113, Lys117, Gly121, Ile125).

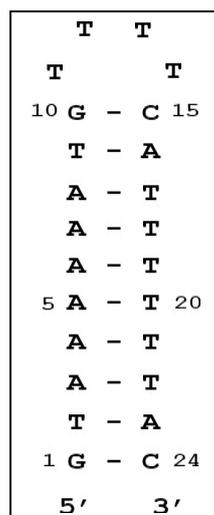
4.4 Untersuchungen des *hPar14*-DNA Komplexes

In Rahmen der Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Zelluläre Biologie der Max-Planck-Forschungstelle in Halle (Dr. Christine Rascher) wurden DNA-Sequenzen gefunden, die in einem *casting*-Verfahren hohe Affinität zu *hPar14* zeigten. Aus diesen Sequenzen konnte eine *consensus*-Sequenz abgeleitet werden - die *CAAAT-box*. Ziel der im Folgenden beschriebenen Experimente war es, die Bindung des *hPar14* an DNA spektroskopisch nachzuweisen und den Einfluss der Variation einzelner Basenpaare aus der *consensus*-Sequenz auf das Bindungsverhalten zu bestimmen.

4.4.1 Untersuchungen an *hPar14*-ds-Oligonukleotid-Komplexen

4.4.1.1 Fluoreszenztitrations zur Bestimmung des Einflusses einzelner Basenpaarvariationen der *consensus*-Sequenz auf die Bindung

Um den Einfluss der Variation einzelner Basenpaare der *consensus*-Sequenz auf das Bindungsverhalten von *hPar14* zu bestimmen, wurden Fluoreszenztitrations mit Oligonukleotiden durchgeführt, deren Sequenzen sich in je einem Basenpaar unterschieden (Kap. 3.10.2). Dafür wurden chemisch synthetisierte Oligonukleotide verwendet (Tabelle 3-2, sowie Tabelle 4-2, Nr. 3-14). Die Oligonukleotidkonstrukte waren so konzipiert, dass nach der Anlagerung des komplementären Stranges 10-bp Doppelstränge entstanden, die durch einen TTTT-Loop verknüpft waren (Abb. 4-27). Ein solches DNA-Konstrukt sollte die monomerische intramolekulare Anlagerung ermöglichen und die Stabilität des Oligonukleotidkonstrukts erhöhen. Mittels zweidimensionaler NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die Oligonukleotide in Lösung in Form eines Doppelstranges (> 90%) vorliegen (Dr. Peter Bayer, persönliche Mitteilung).



An den Oligonukleotiden 3 bis 9 (Tabelle 4-2) wurde der Austausch je eines einzelnen Basenpaares in der *CAAAT-box* vorgenommen, während die Oligonukleotide 10 bis 12 Poly-A-Sequenzen verschiedener Länge enthielten. Das Oligonukleotid 13 besitzt einen Teil der T7-Primersequenz und wurde als unspezifischer Binder verwendet.

Abb. 4-27: Beispiel eines Oligonukleotidkonstruktes, das für spektroskopische Untersuchungen sowie für einen Gelretardationassay verwendet worden ist

Das *hPar14* enthält einen Tryptophanrest, der eine Fluoreszenzanregung bei einer Wellenlänge von 295 nm ermöglicht. Bei dieser Wellenlänge zeigten alle verwendeten Oligonukleotide keinen ausgeprägten *inner filter*-Effekt (Kap. 3.10.2). Wie in Abb. 4-28 dargestellt ist, wird die Tryptophan-Fluoreszenz von *hPar14* bei Zugabe von ds-Oligonukleotiden erniedrigt. Diese Änderung der Fluoreszenz konnte zur Bestimmung einer Dissoziationskonstante (K_d -Wert) genutzt werden.

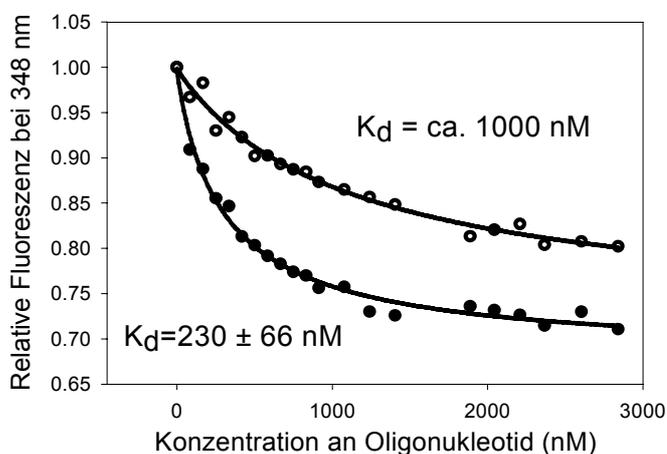


Abb. 4-28: Fluoreszenztitrationskurven. Titration von *hPar14* (200 nM) mit einem ds-Oligonukleotid, dessen Sequenz die *CAAAT-box* enthielt, (untere Kurve) und einem unspezifischen ds-Oligonukleotid (obere Kurve). Die Oligonukleotidsequenzen sind in Tabelle 4-2 (Nr. 3 und 13) angegeben. Die Titration wurde in 20 mM Phosphatpuffer, pH 6,5, 20 mM NaCl bei 285 K durchgeführt.

Für die in Abbildung 4-28 dargestellten Daten (Kap. 3.10.2) ergaben sich ein K_d -Wert von 230 ± 66 nM und ein maximales Quenchen der Fluoreszenz von 30% bei Bindung von *hPar14* an ein ds-Oligonukleotid, das die *CAAAT-box* enthielt, und ein

K_d -Wert von ca. 1000 nM und ein maximales Quenchen von 20% im Falle eines unspezifischen Binders. Die Erniedrigung der Fluoreszenz wurde benutzt, um die Bindungsstöchiometrie und so den Anteil an DNA gebundenen *hPar14* abzuschätzen. Die maximale Änderung der Fluoreszenz sollte erreicht sein, wenn alle *hPar14*-Moleküle an das Oligonukleotid gebunden sind. Die Fluoreszenztitratioskurve fällt im Anfangsteil nahezu linear ab und läuft dann in die Sättigung. Der Schnittpunkt der Anfangsteilung mit der Sättigungsgeraden ergibt die Konzentration an ds-Oligonukleotid, die im Falle des *CAAAT-box* enthaltenden Oligos der eingesetzten *hPar14*-Konzentration (ca. 200 nM) äquivalent ist. Im Falle des unspezifischen Binders (Abb. 4-28, rechts) ist die Analyse der Bindungsstöchiometrie nicht möglich, weil keine Sättigung erreicht wurde. Auf gleiche Weise wurde das Bindungsverhalten anderer Oligonukleotide (2 bis 12 in Tabelle 3-2, sowie Tabelle 4-2) untersucht und in Tabelle 4-2 zusammengefasst.

Tabelle 4-2: Ergebnisse der Fluoreszenztitration von *hPar14* mit verschiedenen Oligonukleotiden (Kap. 3.10.2). Angegeben ist die laufende Nummer des für die Fluoreszenztitration verwendeten Oligonukleotides, die Nukleotidsequenz in 5'→3'-Richtung, die maximale Fluoreszenzänderung bei Titration von *hPar14* mit diesem Oligonukleotid, der K_d -Wert und die Bindungsstöchiometrie von *hPar14* zu jedem Oligonukleotid, sowie die Fluoreszenzänderung bei Titration von BSA mit dem Oligonukleotid. Fett gedruckte Buchstaben bezeichnen das variierte Fragment in der Oligonukleotidsequenz. Es bedeuten: Max% - maximale Fluoreszenzänderung; K_d - Dissoziationskonstante in nM; B - Bindungsstöchiometrie; K - maximale Fluoreszenzänderung im Kontrollversuch mit BSA.

Nr.	Sequenz	<i>hPar14</i> Max%	<i>hPar14</i> , K_d , nM	<i>hPar14</i> B	K
3	GATG CAAAT GTTTTTCATTTGCATC	30	230±60	1:1	-
4	GATG AAAAT GTTTTTCATTTTCATC	20	145±36	1:1	-
5	GATG CCAAT GTTTTTCATTGGCATC	25	280±100	1:1	-
6	GATG CACAT GTTTTTCATGTGCATC	22	256±55	1:1	-
7	GATG CAACT GTTTTTCAGTTGCATC	26	425±190	1:1	-
8	GATG CAAAG GTTTTTCCTTTGCATC	28	320±150	1:1	-
9	GATG AAAAC GTTTTTCGTTTTTCATC	35	350±130	1:1	-
10	GAT AAAAAT GTTTTTCATTTTTATC	16	181±30	1:1	-
11	GT AAAAAAT GTTTTTCATTTTTTAC	18	69±21	1:1	-
12	G AAAAAAAAAG TTTTTCTTTTTTTTC	14	200±40	1:1	-
13	CGACTCACTATTTTTAGTGAGTCG	20	1000	-	-

Wie in der Tabelle 4-2 dargestellt, ist die Affinität von *hPar14* zu solchen ds-Oligonukleotiden am höchsten, die eine *AAAT*- Sequenz besitzen (Oligonukleotide Nummer 3, 4, 10, 11, $K_d < 230$ nM). Änderungen einzelner Basenpaare in dieser *box* führten zu einem geringem Anstieg des K_d -Wertes (Oligonukleotide Nummer 5-9, Tabelle 4-2; $K_d > 230$ nM), der abhängig davon war, an welcher Position ein Basenpaar ausgetauscht wurde. Das Oligonukleotid 13 (Tabelle 4-2), das die T7-Primer-Sequenz enthält und an dem gleichzeitig zwei Basenpaare ausgetauscht wurden, bindet in μ M-Bereich an das *hPar14*. Im Oligonukleotidkonstrukt 11 wurden im Vergleich zu Oligonukleotid 10 die Basenpaare 2 und 3 revertiert, was einen zweifachen Anstieg des K_d -Wertes zur Folge hatte. Der Vergleich zwischen den Oligonukleotiden 11 und 12 zeigt, dass eine poly-A-Sequenz alleine nicht für eine hohe Affinität ausreichend ist. Zwei Thymidin-Reste an den Positionen 3 und 9 der Sequenz sind hierfür zusätzlich notwendig.

4.4.1.2 Gelretardationsassay mit *hPar14* und ds-Oligonukleotid

Um die Bindung von *hPar14* an DNA mit einer unabhängigen Methode zu bestätigen, wurde ein Bindungstest in Form eines Gelretardationsassays durchgeführt. Dazu wurde das Oligonukleotid Nummer 11 mit einem K_d -Wert von 69 ± 21 nM (Tabelle 4-2) am Ende mit 5'-Fluorescein markiert (MWG-Biotech, Ebersberg) und zur Bindung an *hPar14* eingesetzt. Mit diesem Ansatz wurde eine Gelelektrophorese, wie im Kapitel 3.7.1 beschrieben, durchgeführt (Abb. 4-29).



Abb. 4-29: Gelretardationsassay mit *hPar14* und dem ds-Oligonukleotid 11 (K_d -Wert von 69 ± 21 nM), dessen Sequenz das *TAAAAAAT*-Motiv enthält. Auf das 7.5%ige Polyacrylamidgel (Kap.3.7.1) wurden folgende Proben aufgetragen: (1) 1.8 μ g ds-Oligonukleotid und 0.6 μ g *hPar14*; (2) 1.8 μ g ds-Oligonukleotid.

Dabei wird das ungebundene Oligonukleotid bei Bestrahlung mit UV-Licht als einzelne Bande sichtbar (Abb. 4-29, 2). In Bahn 1, wo dem fluoresceinmarkiertem

Oligonukleotid eine äquimolare Menge an *hPar14* zugegeben worden ist, kann man eine zweite Bande mit langsameren Laufverhalten beobachten. Zusammen mit einer Abnahme der Intensität der ds-Oligonukleotid-Bande, läßt dies auf die Ausbildung eines DNA-*hPar14*-Komplexes schließen. Dieser Test ließ keine Rückschlüsse auf die Bindungskonstante zu, weil die Fluoreszenzdetektion nicht sensitiv genug war, um eine quantitative Auswertung vorzunehmen. Es konnte jedoch die Bindung eines Komplexes aus Oligonukleotid 11 (Tabelle 4-2) mit dem TAAAAAAT - Motiv und *hPar14* gezeigt werden.

4.4.1.3 NMR-Spektroskopie

4.4.1.3.1 Beobachtung der Komplexbildung mit ^1H -NMR

Von einer 0.2 mM Lösung des Oligonukleotid 11 (Tabelle 4-2) wurden 1D-Protonenspektren (Kap. 3.11.4) vor und nach der Zugabe einer äquimolaren Menge an *hPar14* (stöchiometrisch 1:1) aufgenommen. Die Überlagerung des Iminprotonenbereiches beider Spektren ist in Abbildung 4-30 zu sehen.

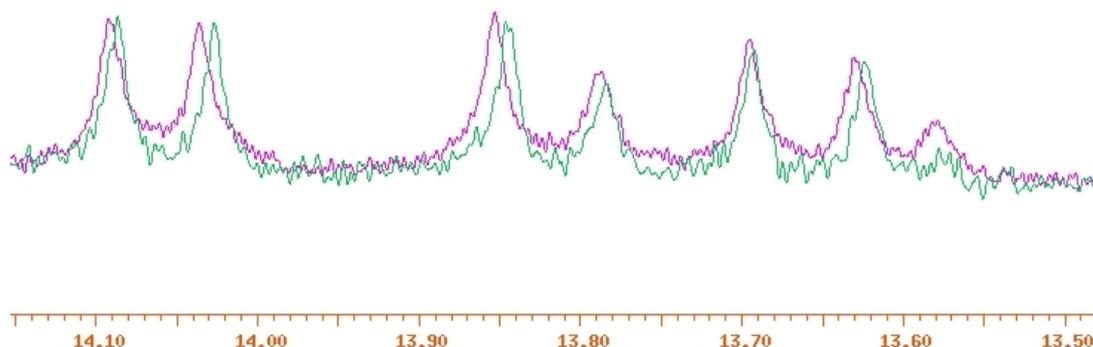


Abb. 4-30: Überlagerung der Iminprotonenbereiche der 1D-Protonenspektren von Oligonukleotid 11 (Tabelle 4-2) in Abwesenheit (violette Konturlinie) und Anwesenheit 1:1 stöchiometrisch des *hPar14* (grüne Konturlinie). Die NMR-Spektren wurden bei 300 K von 0.2 mM Oligonukleotidlösung in 10 mM Phosphatpuffer pH 6.5 mit 150 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10% (v/v) D₂O aufgenommen. Die übrigen Parameter für die Aufnahme der Spektren waren wie in Kap. 3.11.4 beschrieben.

Die Iminprotonen von Thymidinresten, die in A-T-Basenpaaren eingebaut sind, sind vom schnellen Austausch mit dem Lösungsmittel geschützt. Sechs der acht Iminprotonen sind im Spektrum von Oligonukleotid 11 sichtbar. Die Zugabe einer äquimolaren Menge von *hPar14* führt zu Änderungen in der chemischen Verschiebung aller sechs Signale. Dies weist auf eine Änderung in der elektronischen Umgebung der Iminprotonen hin, wie sie bei Komplexbildung auftritt.

4.4.1.3.2 Bestimmung des Bindungsinterfaces von *hPar14*₁₋₁₃₁

Zu einer 200 μM *hPar14*-Lösung wurde konzentrierte DNA-Lösung schrittweise zugesetzt. Dabei wurde die Konzentration des Oligonukleotid 11 (Tabelle 4-2) jeweils um 20 μM erhöht (bis zum Molarverhältnis *hPar14* zu Oligo 1:1.15) und nach jedem Titrationsschritt ein ^{15}N -HSQC-Spektrum aufgenommen. Um die Protonensignale im Amidprotonenbereich von *hPar14* unabhängig vom Oligonukleotid beobachten zu können, wurde ^{15}N -markiertes *hPar14* verwendet. Eine Änderung der chemischen Verschiebung (^{15}N - oder $^1\text{H}_\text{N}$ -) der Proteinresonanzen bei Oligonukleotidzugabe deutet auf Bindung hin. So können durch eine Analyse dieser Änderungen Sequenzregionen von *hPar14* identifiziert werden, die bei der Bindung an das Oligonukleotid beteiligt sind. In Abbildung 4-31 ist eine Überlagerung der ^{15}N -HSQC-Spektren von freiem *hPar14* und Spektren nach jedem Titrationsschritt dargestellt.

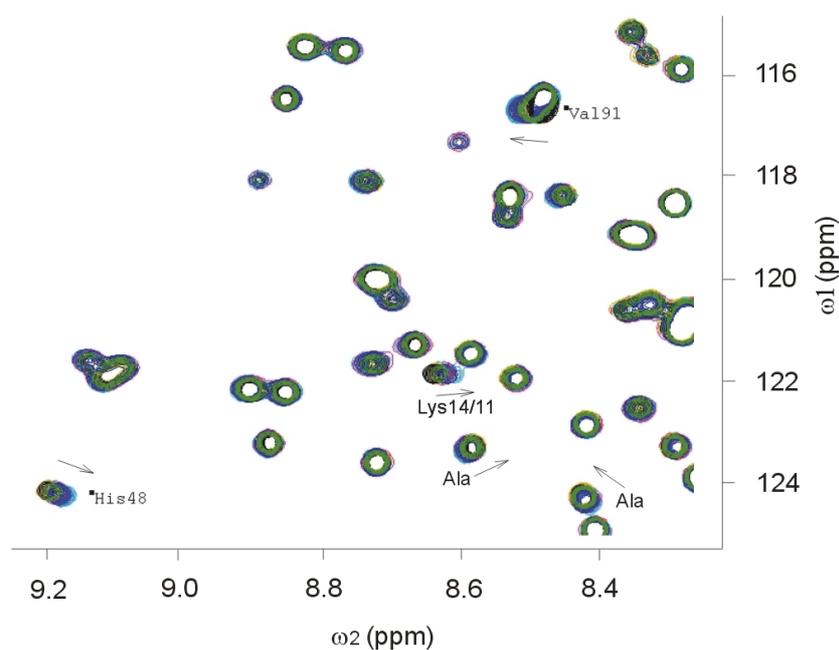


Abb. 4-31: Ausschnitt aus der Überlagerung der ^{15}N -HSQC-Spektren von ^{15}N -markiertem *hPar14* (0.2 mM) bei der Titration mit dem Oligonukleotid 11 (Tabelle 4-2). Die Pfeile zeigen die Richtung der Verschiebung einzelner Resonanzen während der Titration an. Die NMR-Spektren wurden bei 300 K im 10 mM Phosphatpuffer, pH 6.5 mit 150 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 10% (v/v) D_2O aufgenommen. Die übrigen Parameter für die Aufnahme der Spektren waren wie in Kap. 3.11.4 beschrieben.

Für mehrere Proteinresonanzen änderten sich die chemischen Verschiebungen bei Oligonukleotidzugabe. Diese Resonanzen gehören zu Aminosäureresten, die sich auf

einer Seite der PPIase-Domäne konzentrieren (Abb. 4-32) oder sich auch im unstrukturierten N-Terminus des Proteins befinden (Tabelle 4-3).

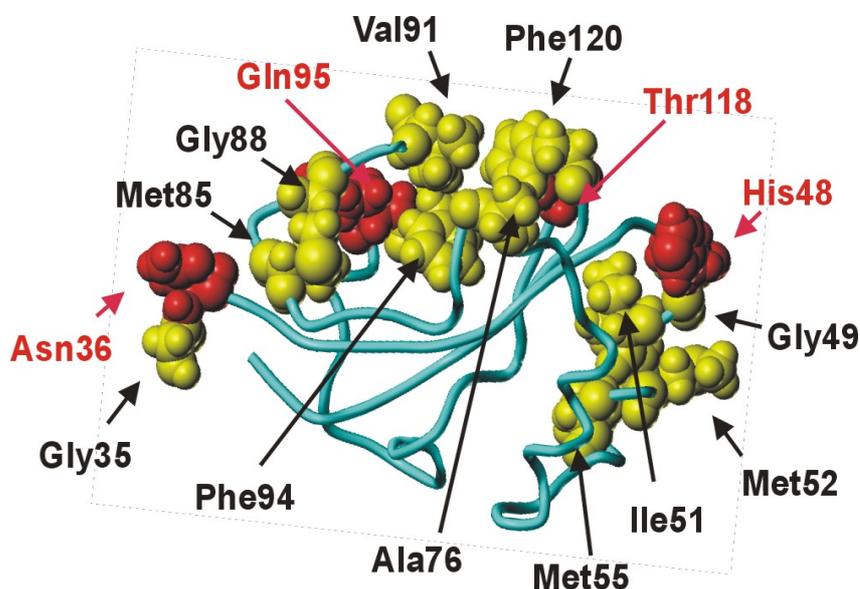


Abb. 4-32: Modelldarstellung der PPIase-Domäne von *hPar14*. Das Proteinrückgrat ist blau gefärbt. Aminosäuren, die im Komplex DNA-*hPar14*₁₋₁₃₁ im HSQC-Spektrum verschobene Signale zeigen, sind farblich mit allen Atomen dargestellt. Gezeigt sind die van der Waals-Radien der einzelnen Atome. Gelb dargestellt sind Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten, rot jene mit hydrophilen.

4.4.1.3.3 Untersuchungen zum Bindungsverhalten von *hPar14*₂₅₋₁₃₁

Die mit *hPar14*₁₋₁₃₁ durchgeführten NMR-Experimente zeigen, dass die Aminosäurereste, die zum unstrukturierten N-terminus von *hPar14* gehören, an der Bindung des Oligonukleotids beteiligt sind. Um zu überprüfen, ob diese Aminosäuren auch essentiell für die Bindung sind oder ihre Abwesenheit die Bindung auf irgendeine Weise beeinflussen könnte, wurde eine ¹⁵N-HSQC-Titration, wie im Kap. 3.11.5.2 beschrieben, mit N-terminal verkürztem *hPar14*₂₅₋₁₃₁ durchgeführt. Während der Titration wurden Änderungen in den ¹H_N-chemischen Verschiebungen der ¹H_N, ¹⁵N-Resonanzsignale von Aminosäuren beobachtet, die im Falle von *hPar14*₁₋₁₃₁ sensitiv auf DNA-Zugabe reagiert hatten (Tabelle 4-3). Wie in Abbildung 4-33 exemplarisch dargestellt, ist die Änderung der ¹H_N-chemischen Verschiebung von Phe94_{NH} bei DNA-Zugabe im Falle von *hPar14*₂₅₋₁₃₁ geringer als bei *hPar14*₁₋₁₃₁.

Die nach *Fitten* der Daten auf eine quadratische Gleichung (siehe Kap. 3.10.2, Gleichung 3-2) gewonnenen Dissoziationskonstanten (K_d -Werten) der Bindung sind in Tabelle 4-3 zusammengefasst.

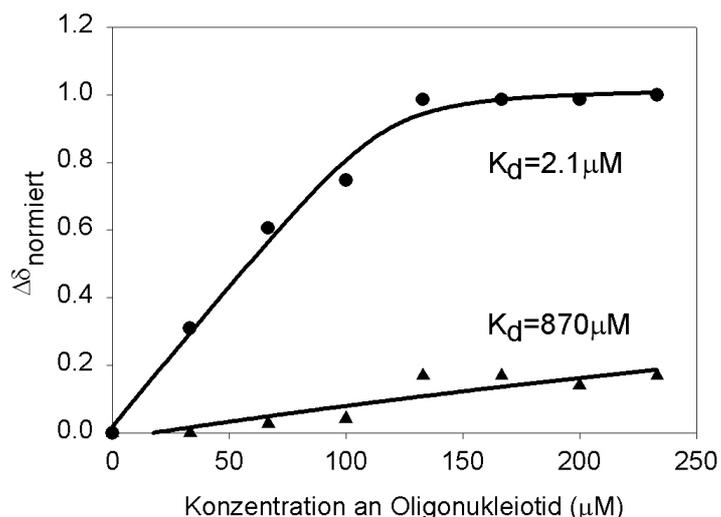


Abb. 4-33: Änderung der $^1\text{H}_\text{N}$ -chemischen Verschiebung während der Titration mit ds-Oligonukleotid 11 (Tabelle 4-2) am Beispiel der NH Gruppe der Aminosäure Phe94. Die Titration von 200 μM $h\text{Par}14_{1-131}$ (obere Kurve) bzw. $h\text{Par}14_{25-131}$ (untere Kurve) erfolgte bei 300 K (10 mM Phosphatpuffer, pH 6.5 mit 150 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 10% (v/v) D_2O) bis zum molaren Verhältniss 1 : 1.15 (Protein : Oligo).

Tabelle 4-3: Ergebnisse der ^{15}N -HSQC-Titration (Kap. 3.11.5.2) von $h\text{Par}14$ mit dem Oligonukleotid 11 (Tabelle 4-2). Angegeben ist der Aminosäurename und die K_d -Werten bei der Bindung von $h\text{Par}14_{1-131}$ und $h\text{Par}14_{25-131}$ an das Oligonukleotid 11. Hochgestellt: 1) keine Bestimmung des K_d -Wertes möglich; 2) die Aminosäuren sind in N-terminal verkürztem $h\text{Par}14$ ($h\text{Par}14_{25-131}$) nicht vorhanden; 3) keine Änderung der $^1\text{H}_\text{N}$ -chemischen Verschiebung der entsprechenden Resonanz während der ^{15}N -HSQC-Titration.

Rest	K_d , μM $h\text{Par}14_{1-131}$	K_d , μM $h\text{Par}14_{25-131}$	Rest	K_d , μM $h\text{Par}14_{1-131}$	K_d , μM $h\text{Par}14_{25-131}$
Gly8	< 1	- ²⁾	Met52	< 50	> 200
Gly10	- ¹⁾	- ²⁾	Met55	- ¹⁾	- ¹⁾
Lys11/14	12.8	- ²⁾	Ala76	5.9	- ³⁾
Gly15	2.4	- ²⁾	Met85	< 50	> 200
Ala17	8.5	- ²⁾	Gly88	15	- ³⁾
Ala18	- ¹⁾	- ²⁾	Val91	1.2	> 500
Gly35	24.3	32.7	Phe94	2.1	> 800
Asn36	6.7	11.1	Gln95	< 1	- ³⁾
His48	6.1	26.5	Thr118	< 50	- ³⁾
Gly49	9.9	39.9	Phe120	10.7	- ³⁾
Ile51	2.5	> 500			

In Abbildung 4-34 sind die Aminosäuren von *hPar14*₂₅₋₁₃₁ graphisch dargestellt, deren K_d -Werte sich durch das Fehlen der N-terminalen 25 Aminosäuren nur gering verschlechtert haben und kleiner 50 μM sind.

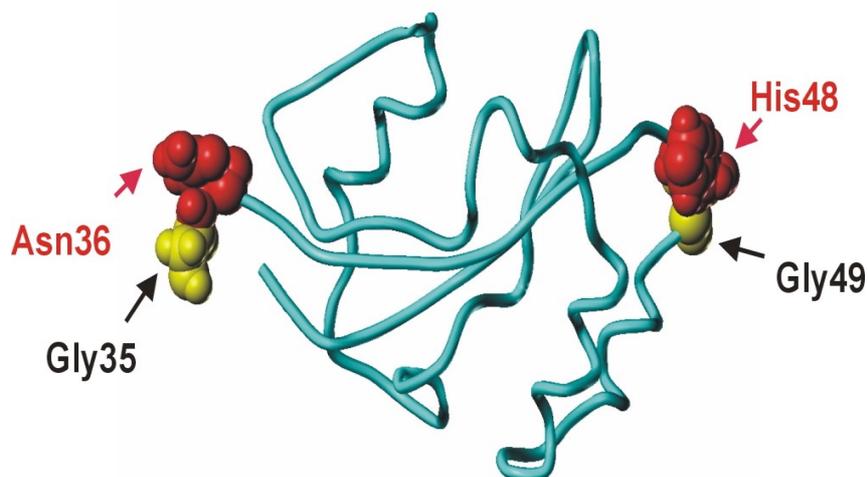


Abb. 4-34: Modelldarstellung der PPIase-Domäne von *hPar14*. Das Proteinrückgrat ist blau gefärbt. Aminosäuren, die im Komplex DNA-*hPar14*₂₅₋₁₃₁, sowie im Komplex DNA-*hPar14*₁₋₁₃₁ gleiche Affinität zu DNA zeigen, sind farbig mit allen Atomen dargestellt. Gezeigt sind die van der Waals-Radien der einzelnen Atome. Gelb dargestellt sind Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten, rot jene mit hydrophilen.

4.4.2 Wechselwirkung von *hPar14* mit ss-Oligonukleotiden

Um die Bindung von *hPar14* an ss-Oligonukleotide zu untersuchen, wurden die Affinitäten von ss-poly-A und ss-poly-T Einzelstrang-DNA zu *hPar14* mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie bestimmt. Die Titrationsexperimente wurden wie im Kap. 3.10.2 beschrieben durchgeführt. In Abbildung 4-35 ist das Ergebnis der Fluoreszenztitration von *hPar14* mit ss-poly-A dargestellt.

Die experimentellen Daten können in bester Näherung mit einer linearen Gleichung beschrieben werden, da bei Zugabe von ss-poly-A keine Sättigung erreicht wurde. Dieser Befund zusammen mit einer Erniedrigung der intrinsischen Fluoreszenz kann sowohl mit der Präzipitation des Proteins durch ss-DNA als auch mit einer niedrigen Affinität des Proteins zu diesem Oligo erklärt werden. Die Titration mit ss-poly-T lieferte das gleiche Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Die NMR-spektroskopische Charakterisierung der Wechselwirkung von *hPar14* mit ss-Oligonukleotiden war nicht durchführbar. Schon während der Probepräparation war die deutliche Trübung der Lösung mit Bildung eines weissen Niederschlags zu erkennen, was auf die

Präzipitation des Proteins durch DNA in diesem Konzentrationsbereich (200 μM) hindeutet.

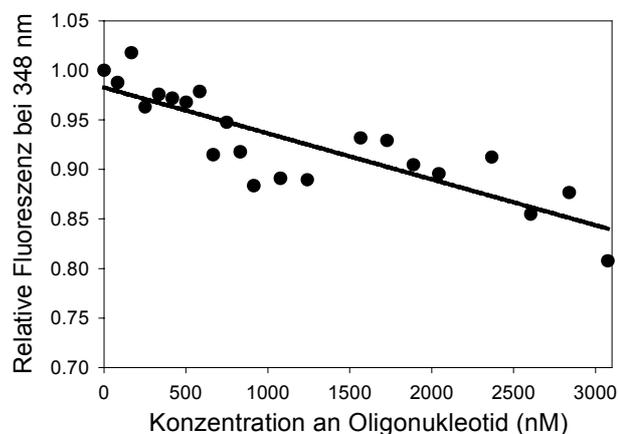


Abb. 4-35: Titration des *hPar14* (200 nM) mit einem ss-poly-A unter Beobachtung der Tryptophan-Fluoreszenz als Bindungssignal. Die Anpassungskurve zeigt den besten Fit der Daten auf eine lineare Gleichung ($R=0.846$). Die Titration wurde in 20 mM Phosphatpuffer, pH 6.5, 20 mM NaCl bei 285 K durchgeführt.

4.4.3 Wechselwirkung von *hPar14* mit einem RNA-Oligonukleotid

Um die Affinität von *hPar14* für RNA zu überprüfen, wurden Fluoreszenztitrationen wie im Kap. 3.10.2 beschrieben mit dem RNA-Oligonukleotid 14 (Tabelle 3-2) durchgeführt. Das Oligonukleotidkonstrukt war wie im Kap. 4.4.1.1 konzipiert, mit der Ausnahme der *loop*-Region, die aus UUCG bestand [99].

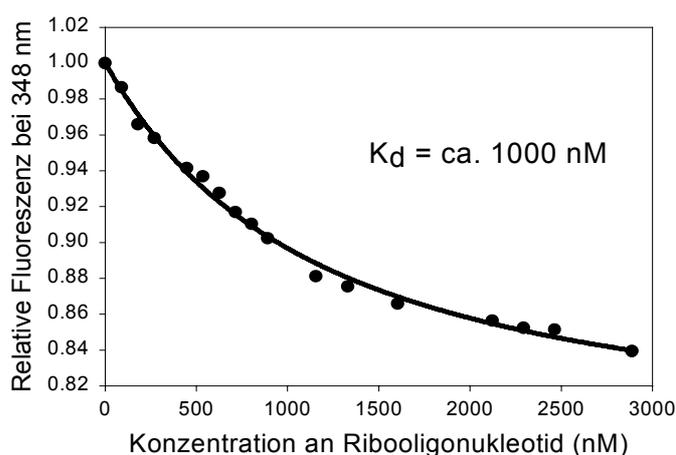


Abb. 4-36: Titration des *hPar14* (200 nM) mit einem Ribooligonukleotid unter Beobachtung der Tryptophan-Fluoreszenz als Bindungssignal. Die Oligonukleotidsequenz ist in Tabelle 4-2 angegeben. Die Anpassungskurve zeigt den besten *Fit* der Daten an eine quadratische Gleichung ($R = 0.997$), die die *hPar14*-Ribooligonukleotid Bindung beschreibt (Kap. 3.10.2). Die Titration wurde in 20 mM Phosphatpuffer, pH 6.5, 20 mM NaCl bei 385 K durchgeführt.

In Abbildung 4-36 ist das Ergebnis der Fluoreszenztitration von *hPar14* mit dem DNA-Oligonukleotid dargestellt. Die Auswertung der Daten (Kap. 3.10.2) ergab einen K_d -Wert von mehr als 1000 nM und ein maximales Quenchen von 16%. Die Analyse der Bindungsstöchiometrie war nicht möglich, weil keine Sättigung erreicht wurde.

5. Diskussion

5.1 *hPar14* besitzt eine FKBP-ähnliche Topologie

Die in dieser Arbeit für *hPar14* aufgeklärte Topologie mit ihrer $\beta\alpha\alpha\beta\alpha\beta\beta$ -Anordnung von Sekundärstrukturelementen wurde in der Literatur bereits für *hPin1* beschrieben [47]. Die Überlagerung der PPIase-Domänen beider Parvuline (Abb. 5-1) mit Hilfe des Programms DALI [100] ergibt einen C_α RMSD-Wert von 2.4 Å, was auf einen hohen topologischen Verwandtschaftsgrad hinweist. Dies ist umso bemerkenswerter, weil die Vergleichsstruktur von *hPin1* mit einem Dipeptid kokristallisiert wurde und damit eine zur freien PPIase-Domäne veränderte Konformation aufweisen sollte.

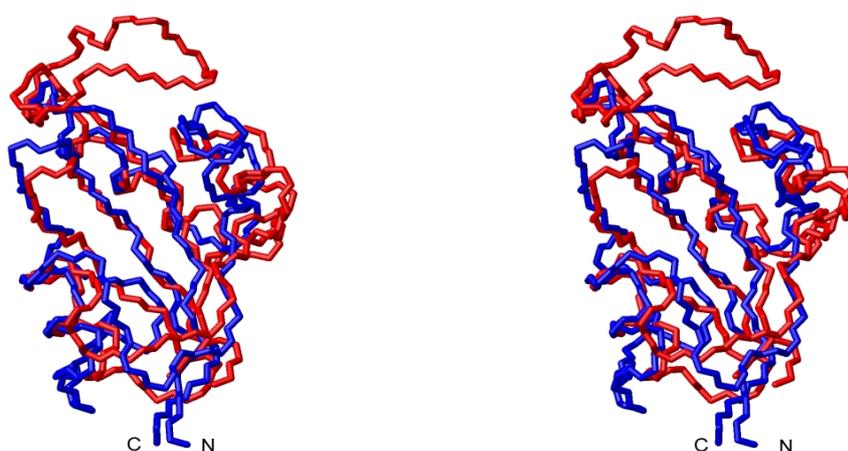


Abb. 5-1: Stereo-Darstellung der Überlagerung von Strukturen der *hPin1*- und *hPar14*-PPIase Domänen. Die Überlagerung erfolgte auf die C_α -Atome folgender Aminosäuren: Val55 - Val62, Thr81 - Ile89, Phe104 - Gln110, Gly121 - Phe126, Pro149 - Asp153, Ile156 - Thr162 von *hPin1* (rot) und Val38 - Cys45, Lys50 - Leu58, Phe64 - Gln70, Asp81 - Thr86, Pro115 - Lys121, Tyr122 - Glu128 von *hPar14* (blau).

Die Rückgrat-atome beider PPIase-Domänen konvergieren in den Bereichen der Sekundärstrukturelemente und unterscheiden sich nur in der Position der α -Helix-4 und der *loop*-Regionen (Abb. 5-1). Ursache dafür könnte in der Bindung des Dipeptids zu finden sein. Solange jedoch keine Struktur des freien *hPin1* vorliegt, bleibt dies spekulativ. Neben der topologischen Verwandtschaft gibt es einen wesentlichen strukturellen Unterschied zwischen beiden PPIase-Domänen: der für die Phosphatgruppen-Bindung verantwortliche Loop (Lys63 - Arg80) in *hPin1* ist in *hPar14* zu einer kurzer Schleife (Glu46 - Gly49) reduziert, was strukturell darauf

hindeutet, daß Parvulin keine hohe Spezifität für phosphorylierte Substratmolekül besitzt. Bei einer Datenbanksuche mit Hilfe von DALI [100] wurde neben *hPin1* auch FKBP12 ($z\text{-score} = 3.4$, $\text{rmsd C}\alpha = 2.3 \text{ \AA}$; PDB-ID: 1fkj) als Strukturhomolog von *hPar14* identifiziert. Die Vermutung, dass die Parvuline eine FKBP-ähnliche Topologie besitzen, wurde bereits nach der Überlagerung der *hPin1*-PPIase-Domäne mit einer FKBP-Domäne aufgestellt [47]. Diese beiden Strukturen konvergieren in den Sekundärstrukturelementen $\beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 4$ und $\alpha 4$ (bezüglich *hPin1*-Nomenklatur) mit einem RMSD-Wert von 4.57 \AA [47]. Anhand der ähnlichen Topologie kann man die Parvuline (*hPin1* und *hPar14*) und die FKBP-Proteine zu einer Gruppe zusammenfassen und das gemeinsame Faltungsmotiv als FKBP – *Superfold* beschreiben. In Abbildung 5-2 sind exemplarisch Vertreter des FKBP – *Superfolds* in einer Schemazeichnung dargestellt. Das vierte vorgestellte Protein (Abb. 5-2D) ist keine PPIase, sondern ein *E.coli* Transkriptspaltungsfaktor (GreA tcf; PDB-ID: 1grj).

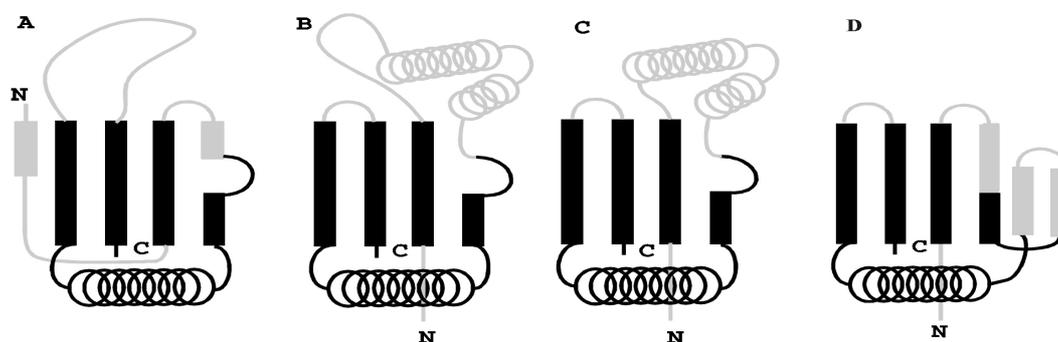


Abb. 5-2: Schemazeichnung der FKBP-ähnlichen Topologien: (a) FKBP12, (b) *hPin1*, (c) *hPar14*, (d) GreA tcf. Sekundärstrukturelemente sind als Vierecke (β -Faltblätter) und Röhren (α -Helices), *loop*-Regionen als Linien dargestellt. Die Sekundärstrukturelemente, die die strukturelle Zugehörigkeit zur FKBP-Topologie bestimmen, sind schwarz dargestellt.

Die Entstehung einer gemeinsamen Topologie in zwei PPIase Familien, die keine Sequenzhomologie zueinander aufweisen [101], läßt sich auf zwei Arten erklären. Entweder stammen Parvuline und FKBP von einer einzigen „Proto-PPIase“ ab [101] (phylogenetische Verwandtschaft) oder es kam zu strukturellen Ähnlichkeiten

unabhängig von einer eventuellen Verwandtschaft (funktionelle Annäherung). Nimmt man die Sequenzhomologie als Maßstab für den evolutionären Abstand zweier Proteine, sollten *hPar14* und *hPin1* (34.2% Identität) näher untereinander verwandt sein als beide zu FKBP Vertretern [102]. Die Suche nach struktureller Verwandtschaft mit Hilfe von DALI [100] brachte Ähnlichkeiten von *hPar14* zu Fragmenten der Proteinkinase C ($z\text{-score} = 3.4$, $\text{rmsd C}\alpha = 3.2 \text{ \AA}$; PDB-ID: 1bdy-A) und der Phospholipase A2 ($z\text{-score} = 2.1$, $\text{rmsd C}\alpha = 3.7 \text{ \AA}$; PDB-ID: 1rlw) ans Tageslicht. Aufgrund der wenigen vorliegenden strukturellen Daten läßt sich nicht eindeutig ableiten, ob es einen FKBP Superfold-Vorläufer gab, aus dem sich Proteine mit spezialisierten Aufgaben und die Proto-PPIase entwickelt haben oder, ob die Parvuline und FKBP sich in Laufe der Evolution funktionell genähert und einen minimalen Fold entwickelt haben, der für die Ausübung der PPIase Aktivität ausreichend ist. Die strukturellen Unterschiede (Abb. 5-2, grau gezeichnete Elemente) sind Träger der Individualität der Proteine und der daraus erwachsenen funktionellen Spezialisierung.

5.2 Die aktiven Zentren der Parvuline sind konserviert

Einen zusätzlichen Beweis für den gemeinsame Ursprung von *hPar14* und *hPin1* liefert ein Vergleich der vermutlichen katalytischen Zentren beider PPIase-Domänen. Die Zugehörigkeit von Aminosäuren zum katalytischen Zentrum von *hPin1* wurde sowohl aufgrund von Mutationsstudien (Cys113Ala/Ser, His157Ala) als auch durch eine räumliche Nachbarschaft zum gebundenen Dipeptid Ala-Pro in der *hPin1*-Kristallstruktur (His59, His157, Cys113, Ser154) festgestellt. Überlagert man die beiden Parvulinstrukturen, dann nehmen die in der Sequenz entsprechenden homologen oder identischen Aminosäuren von *hPar14* auch räumlich ähnliche Positionen ein (Abb. 5-3). Cys113, dessen Austausch durch ein Alanin eine 123-fache und durch ein Serin eine 20-fache Erniedrigung der PPIase Aktivität von *hPin1 in vitro* bewirkt, ist in *hPar14* durch ein Aspartat (Asp74) ersetzt. Die unterschiedlichen funktionellen Gruppen der Seitenketten könnten Ursache der Unterschiede bei der Katalyse oder Substratbindung zwischen beiden Parvulinen sein. Nimmt man an, dass die Thiolgruppe des Cys113 in *hPin1* bei einem nukleophilen Angriff am Carbonylkohlenstoff der zu isomerisierenden Peptidbindung beteiligt ist [47], dann könnte der Carboxylgruppe des Asp74 in *hPar14* auch eine wichtige Rolle bei der

Katalyse zukommen. Zwar haben die bisher untersuchten Cys113-*hPin1*-Mutanten *in vitro* eine niedrigere PPIase-Aktivität, dies könnte jedoch auch durch eine mutationsverursachte lokale Destabilisierung oder partielle Entfaltung an dieser Stelle erklärt werden, nicht nur durch die Abwesenheit der essentiellen katalytischen Aminosäure [47].

Für die beiden Histidinreste, die innerhalb der Parvulin-Familie 100%ige Sequenzkonservierung aufweisen, konnte ebenso eine räumliche Konservierung in *hPar14* und *hPin1*-Strukturen beobachtet werden. Der Austausch von His157 (*hPin1*) zu Alanin bewirkt den Verlust der PPIase-Aktivität *in vitro* und *in vivo* [19], was auf eine essentielle Beteiligung dieses Aminosäurerestes bei der Katalyse hinweist. Die räumliche Position dieses Restes in *hPar14* wird von His123 eingenommen.

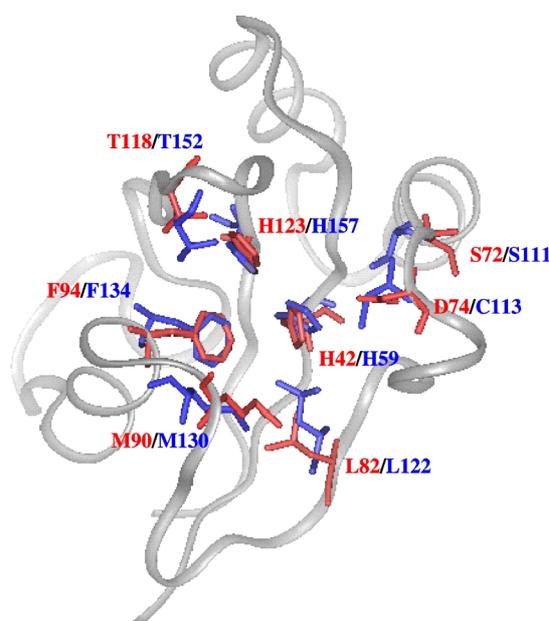


Abb. 5-3: Überlagerung der vermutlichen aktiven Zentren des *hPin1* (blau) und *hPar14* (rot). Das Proteinrückgrat des *hPar14* ist grau gefärbt.

Das Vorkommen einer „Prolinring-Tasche“ in *hPar14*, die analog zu der in *hPin1* [47] aus hydrophoben Seitenketten von Leu82, Met90 und Phe94 (Leu122, Met130 und Phe134 in *hPar14*) gebildet wird, weist darauf hin, dass die Lage des Prolinringes eines Substrates innerhalb des aktiven Zentrums während der Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung räumlich konserviert ist.

5.3 Neuordnung des *alignment* von Parvulinsequenzen bezüglich ihrer PPIase-Domänen

Ein erster Sequenzvergleich von Vertretern der Parvulin-Familie wurde 1999 von Dr. Jens Rahfeld publiziert [32]. Zu dieser Zeit war nur die Tertiärstruktur des *hPin1* bekannt [47], was keinen Struktur-basierten Vergleich mit anderen Vertretern zuließ. Mit Hinblick auf die gewonnene *hPar14*-Struktur läßt sich eine Neuordnung des Sequenzvergleichs zwischen den PPIase-Domänen festlegen (Abb. 5-4). Dabei stellt man fest, dass in mehreren Parvulinsequenzen von verschiedenen Organismen ein Cys (Cys113 in *hPin1*) durch ein Asp ersetzt worden ist. Die phosphatspezifischen Parvuline haben ein Cystein im katalytischen Zentrum, die Parvuline vom *hPar14*-Typ ein Aspartat. In prokaryotischen Parvulinen kommt beides vor.

Ser154, ein weiterer Rest aus dem vermutlichen katalytischen Zentrum von *hPin1* [47], ist bei allen phosphatspezifischen Parvulinen konserviert. An seiner Stelle kommen sowohl in den *hPar14* - Homologen als auch in den prokaryotischen Parvulinen verschiedene hydrophobe (Phe, Val, Leu, Ile, Gly) Aminosäuren vor. Ein möglicher Grund für diesen Austausch könnte sein, dass bei der Katalyse unterschiedliche Substrate isomerisiert werden oder dass Ser154 in *hPin1* keine aktive Rolle bei der Katalyse spielt. Ser154 wurde nur aufgrund seiner räumliche Nähe zum Imidazolring des His157 dem katalytischen Zentrum zugeordnet (Kristallstruktur des *hPin1* [47]). Dies könnte auch für Thr118 in *hPar14* (Thr152 in *hPin1*) gelten (Abb. 5-3), für das in den Parvulinsequenzen von Abb. 5-3 ein konservierter Austausch zu einem Serin möglich ist (die Position wird entweder von einem Threonin in 55% oder einem Serin in 45% aller Sequenzen von Abb. 5-3 eingenommen). Der Abstand zwischen der Hydroxylgruppe des Thr118 und dem ϵ H-Proton des Imidazolrings von His123 in *hPar14* beträgt 2 - 3 Å.

Elf Aminosäurereste sind in den Parvulinsequenzen hochkonserviert (bezüglich der *hPar14*-Sequenz: His42, Leu44, Ala54, Ala68, Ser72, Gly80, Gly83, Phe94, Ala97, Gly121, His123), davon haben nur drei Reste polare Seitenketten: His42, His123 und Ser72. Das Serin befindet sich in direkter Nachbarschaft des katalytisch beteiligten Cys113 (*hPin1*)/Asp74 (*hPar14*) und könnte hypothetisch eine Rolle bei der Katalyse spielen.

Die nicht-phosphatspezifischen eukaryotischen Parvuline unterscheiden sich von allen anderen Vertretern durch die Erweiterung eines Sequenzabschnitts (Abb. 5-4, Region in violet) im C-terminalen Bereich des Proteins. Dies wird eingehend in Kapitel 5.4 diskutiert.

5.4 Unterschiede in *loop*-Regionen und Oberflächenladungen liefern eine Basis für die Funktionalität der Parvuline

In Proteinfamilien, zu denen zahlreiche Vertreter gleicher Topologie gehören, kommt die Vielfalt physiologischer Funktionen durch sekundäre Änderungen innerhalb flexibler *loop*-Regionen zustande. Ein prominentes Beispiel für diese Strategie liefert die Immunoglobulin Familie, eine Gruppe an Proteinen, bei denen variable *loop*-Regionen zur Erkennung von Liganden eingesetzt werden. Antikörper benutzen die Sequenzvariabilität in den *complementary-determining regions* und die darauffolgende dreidimensionale Topologie als Erkennungsmotiv für die Antigenbindung [103].

Auch die Parvuline, *hPin1* und *hPar14*, weisen innerhalb der PPIase-Domänen eine homologe Faltung auf und behalten den Aufbau des aktiven Zentrums bei, katalysieren aber die *cis/trans*-Isomerisierung unterschiedlicher Substrate. Es stellt sich daher die Frage, worin die strukturellen Unterschiede für die funktionelle Varianz liegen.

Wie schon erwähnt, unterscheiden sich die PPIase-Domänen in einer *loop*-Region (Abb. 5-4, Region in gelb) zwischen β -Faltblatt-1 und der α -Helix-1, die bei *hPin1* aus 17 Aminosäuren besteht und bei *hPar14* nur aus 4. In Abbildung 5-1 ist diese *loop*-Region außerhalb der überlagerten Sequenzabschnitte (Unterschrift zu Abb. 5-1) zu sehen. Die Darstellung der Struktur von *hPar14* mit dem Programm GRASP [104] ermöglicht es, die Ladungsverteilung an seiner Oberfläche zu visualisieren und aus dem Vergleich mit der *hPin1*-Oberfläche Aussagen über die Struktur-Funktionbeziehung zu gewinnen. Hierbei wird ersichtlich, daß die *loop*-Region in der *hPin1*-Kristallstruktur, die die Reste Lys63, Arg68 und Arg69 enthält, eine Wechselwirkungsstelle für die negativ geladene dianionische Phosphatgruppe von Phosphoserin oder -threonin des Substrates darstellt [47]. Die drei Aminosäurereste befinden sich in räumlicher Nähe zueinander und bilden dabei eine positiv geladene Grube aus, die die Phosphatgruppe (im Falle von *hPin1*-Kristallstruktur – Sulfat)

umgibt (Abb. 5-5D). Zum Unterschied von *hPin1*, wird bei der *cis/trans* - Isomerisierung im Falle von *hPar14* eine Arg-Pro-Peptidbindung ($k_{\text{cat}}/K_M = 4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$) [32] bevorzugt. Die strukturelle Basis dafür könnte die Existenz einer negativgeladenen Grube in der Nähe des aktiven Zentrums von *hPar14* sein, die eine Wechselwirkung mit einer positiv geladenen Seitenkette der Aminosäure N-terminal zu Prolin favorisiert. Sie liegt bei *hPar14* an der Position, an der bei *hPin1* eine positive Grube ist und wird von den Seitenketten Asp74 und Glu64 geformt (Abb. 5-5A). Deshalb kann die Hypothese erstellt werden, dass ein für *hPar14* geeignetes Substrat eine Xaa-Pro Einheit besitzt, wobei Xaa eine Aminosäure mit positiv geladener Seitenkette oder eine postranslational modifizierte Aminosäure (Arg/Lys) sein könnte. Bei der Analyse der Oberfläche von *hPar14* konnte eine 18 Å-lange Grube identifiziert werden, die von His42 in Richtung des Thr112 und His48 verläuft und in der Lage ist eine gestreckte Polypeptidkette aufzunehmen. Diese Grube hat einen Knick in der Nähe der sogenannten „Prolinring-Tasche“. Nach grober Abschätzung stellt man fest, daß sich sechs bis acht Aminosäuren des Substrates im „Kern“ des Proteins während der Peptidyl-Prolyl *cis/trans*-Isomerisierung befinden können. Eine vergleichbare Polypeptidbindungsstelle wurde auf der Oberfläche des *hCyp18* identifiziert, in die mindestens 9 Aminosäurereste eines HIV-1-p24 Fragmentes hineinpassen [105].

Mit Hilfe der Programme GRASP und INSIGHT98 (Molecular Simulations Inc., USA) konnten in *hPar14* Salzbrücken, die zur Stabilität der PPIase-Domäne beitragen, identifiziert werden. Im Gegensatz zu *hPin1*, wird die α -Helix-2 von *hPar14* durch Wechselwirkung von Seitenketten der Aminosäuren Arg63 und Glu66 stabilisiert. Die rechteckige Anordnung von Ladungen (Abb. 5-5B) auf der äußeren Seite des β -Faltblattgerüst von *hPar14*, bestehend aus zwei Salzbrücken (Seitenketten Glu128 /Lys39 und Asp81/Arg41) und ist in *hPin1* durch eine Triade Asp121 - Arg56 - Glu163 ersetzt.

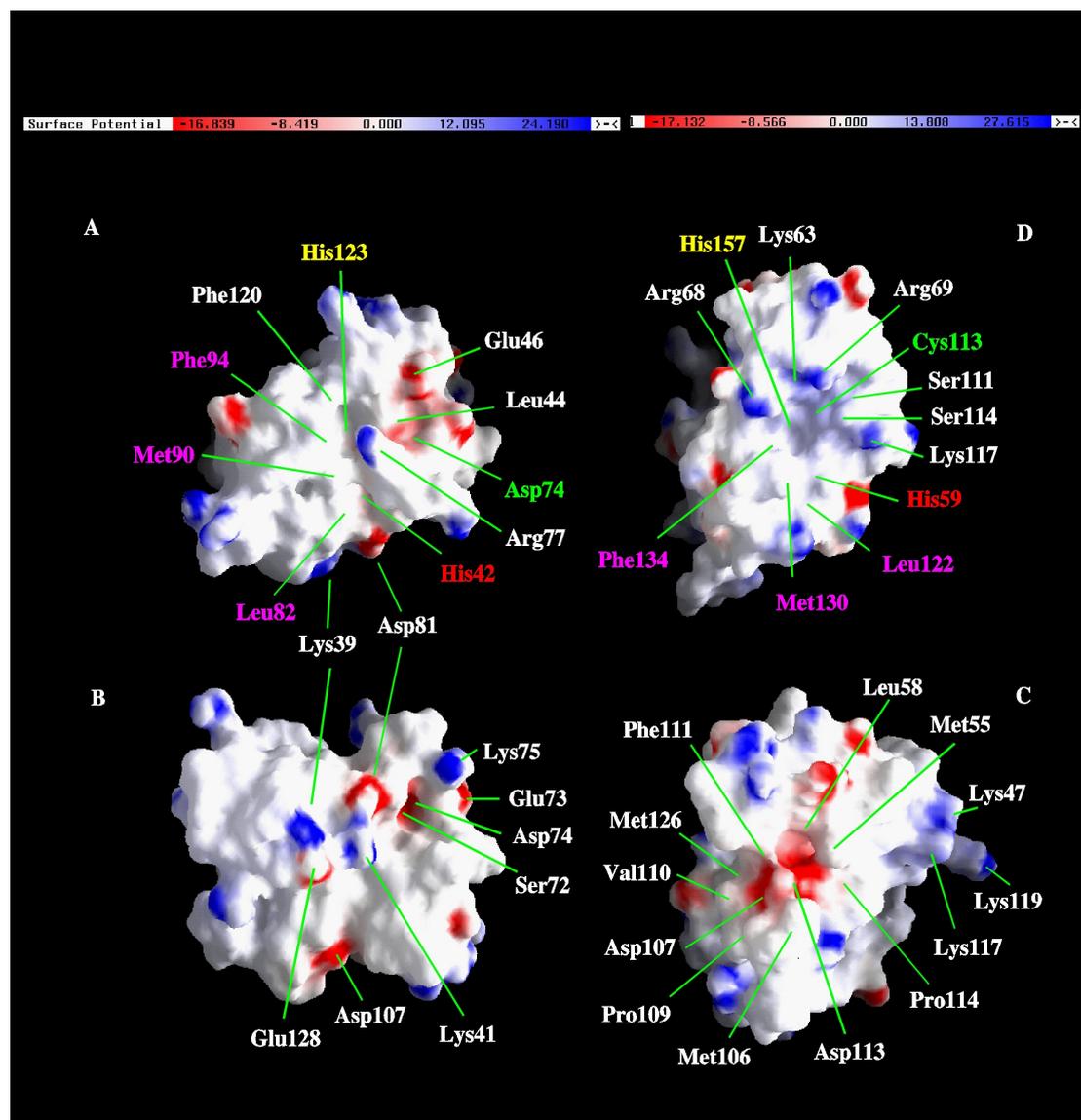


Abb. 5-5: GRASP-Darstellung der Oberfläche der PPlase-Domänen von *hPin1* und *hPar14*. Dargestellt ist die Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche (rot-sauer, blau-basisch). A: Die Lage einiger Aminosäuren in dem vermutlichen aktiven Zentrum von *hPar14*. Konservierte Aminosäurereste sind rot, gelb, grün und violett dargestellt. Die Farben kodieren für die entsprechenden räumlichen Analoga in *hPin1* (siehe 5-4D); B: Aufsicht auf die vier Aminosäuren von *hPar14*, deren Seitenketten zwei Salzbrücken ausbauen (Lys39, Arg41, Asp81, Glu128); C: Die negativ geladene Grube auf *hPar14* (Asp107 und Asp113) mit hydrophober Umgebung (Met55, Leu58, Met106, Pro109, Val110, Phe111, Pro114 und Met126); D: Aufsicht auf das aktive Zentrum von *hPin1*.

Eine weitere strukturelle Besonderheit von *hPar14* betrifft den Aufbau der *loop* – Region, die α -Helix-4 und β -Faltblatt-3 verbindet und im Vergleich zu *hPin1* um drei Aminosäurereste verlängert ist. Der große Abstand (10 Å) des Loops vom vermuteten katalytischen Zentrum und die sequentielle Zusammensetzung der Aminosäuren deuten weniger auf eine Beteiligung bei der Katalyse als auf eine Funktion als

docking-site für Wechselwirkungspartner hin. Diese mutmaßliche Bindungsstelle besteht aus einem negativ geladenen Kerngebiet, das von Seitenketten von Asp107 und Asp113 gebildet wird, und einer hydrophoben Umgebung, die von den Seitenketten der Aminosäuren Met55, Leu58, Met106, Pro109, Val110, Phe111, Pro114 und Met126 geformt wird (Abb. 5-5C).

Der mittlere Teil des β -Strang-3 (Thr112 (i), Asp113 (i+1), Pro114 (i+2), Pro115 (i+3)) ist in *hPar14* am Aufbau des β -Faltblattgerüsts nicht beteiligt (keine Wasserstoffbrücken zu β -Strang-1), wie es bei *hPin1* der Fall ist, sondern bildet eine „Ausbuchtung“ (Abb. 4-16, Kap. 4.2.3.4). Solche „Wendeknickstrukturen“, die keine α -helikale Konformation aufweisen und bei denen der Abstand zwischen $C\alpha(i)$ und $C\alpha(i+3)$ nicht mehr als 7 Å beträgt (5.2 – 5.5 Å im Falle von *hPar14*), werden als β -Turns bezeichnet [106]. β -Turns lassen sich anhand der Rückgrattorsionswinkel der zweiten und dritten Aminosäure des viergliedrigen Turns in 6 (I, I', II, II', VIa, VIb) Klassen einordnen [107]. Dabei treten in den VIb-Turns zwischen den Resten i+1 und i+2 immer *cis*-Peptidbindungen auf. In den meisten Fällen nimmt Prolin die i+2-Position ein. Alle anderen β -Turns zeigen eine *all-trans*-Konformation der Peptidbindungen. In diesen wird Prolin am häufigsten in der Position i+1 gefunden [108]. Die VIb-Turns werden in Proteinen vorwiegend aus strukturellen Gründen „eingesetzt“ und führen zu einer günstigeren Konformation, die lokal zu einer Stabilisierung der Peptidkette beiträgt (z.B. Absättigung von Wasserstoffbrücken, Ladungsneutralität und so weiter) [107].

Für alle Xaa-Pro-Bindungen in *hPar14* mit Ausnahme von Asp113 - Pro114 (Teil der „Ausbuchtung“) konnten die NOEs gefunden werden, die das Vorliegen einer *trans*-Konformation bestätigen. Im Falle von Pro114 lies sich weder die *trans*- noch *cis*-Konformation eindeutig bestätigen. Eine mögliche Erklärung ist das Vorliegen einer gemischten *cis/trans*-Population in diesem Teil der Peptidkette. Welche Konformationszustand stärker populiert ist, läßt sich nicht eindeutig beurteilen. Simulationsrechnungen liefern nahezu gleiche Energiewerte, Struktur und Oberflächenpotenziale für ein Pro114_{cis} und Pro114_{trans} – Protein.

Ein ähnliches Pro-enthaltendes Motiv ist auch in der Struktur des humanen FKBP12 vorhanden [109]. Die hier vorkommende „Bulge“-Region mit der Sequenz Ser(39)–Arg–Asp–Arg–Asn–Lys–Pro(45) unterbricht den β -Strang-5 (Abb. 5-2A). Die relative Position des unterbrochenen β -Strangs zur α -Helix (Teil des gemeinsamen FKBP-

Superfolds, Abb. 5-2) ist in beiden Proteinen (*hPar14* (α -Helix-4) und *hFKBP12*) ähnlich. Das in dem „Bulge“ vorhandene Prolin ist kein *cis*-Prolin, weist aber einen ungewöhnlichen Wert für den Rückgrattorsionswinkel auf. Während alle Xaa-Pro-Bindungen in *hFKBP12* durchschnittlich einen ϕ -Winkel von -53 Grad haben, liegt dieser Wert für Pro45 bei -37 Grad (PDB-ID: 1fkt). Bakterielle FKBP's besitzen auch einen „Bulge“, wie z.B. - *E. coli* SlyD (Ser(25)-Pro-Val-Ser-Ala-Pro(30)). FKBP's aus *Archea* (bis jetzt in 10 Genome gefunden) haben eine 13 Aminosäurerest Erweiterung der „Bulge“-Region [110]. Nach der Deletion der „Bulge“-Region im FKBP17 von Archaeobakterium *Methanococcus thermolithotrophicus* bleiben 0.4% der PPIase-Aktivität (Trypsin-gekoppelter Aktivitätstest) und 62% der Chaperon-Aktivität (Rhodanese-Faltung) erhalten. Diese Änderungen in der Aktivität korrelieren mit Änderungen der Sekundärstruktur, die durch CD bestimmt wurden [110].

Welche Funktion der kleine viergliedrige β -Turn in *hPar14* ausführt ist unbekannt. Es ist aber sehr wahrscheinlich, dass er einen Beitrag zu einer günstigeren Konformation von *hPar14* leistet. Es wäre möglich, daß im Komplex mit dem Substrat bzw. Wechselwirkungspartner die Aminosäuren an dieser Stelle eine andere Konformation annehmen. β -Turns sind die Angriffspunkte an der Oberfläche von Proteinen, welche nicht kovalenten Kräften den kleinsten Widerstand entgegensetzen [106]. Das Vorliegen einer gemischten *cis/trans*-Pro Population im β -Turn von *hPar14* stimmt mit der Tatsache überein, daß alle β -Turns keine stabile Konformation aufweisen [106].

5.5 Die Bindung von Succinyl-Ala-Arg-Pro-Phe-para-nitroanilin an *hPar14* verändert dessen Konformation

Mit Hilfe der Signalverschiebungsanalyse konnte die Bindungsregion für das Modells substrat Succinyl-Ala-Arg-Pro-Phe-para-nitroanilin auf *hPar14* identifiziert werden (Kapitel 4.3.1, Abb. 4-21B). Innerhalb dieser Region liegen zwei Reste (Phe94/Phe134, Met90/Met130), die zwischen *hPar14* und *hPin1* räumlich konserviert sind und zur „Prolinring-Tasche“ gehören [47].

Einige Amidprotonen von Aminosäuren von *hPar14*, die an Wasserstoffbrücken des β -Faltblattgerüsts beteiligt sind (Abb. 5-6) und sich in der Nähe der Bindungsstelle befinden, weisen im Enzym-Substrat-Komplex gegenüber dem freien Protein einen verzögerten Austausch von Amidprotonen gegen Deuteronen auf.

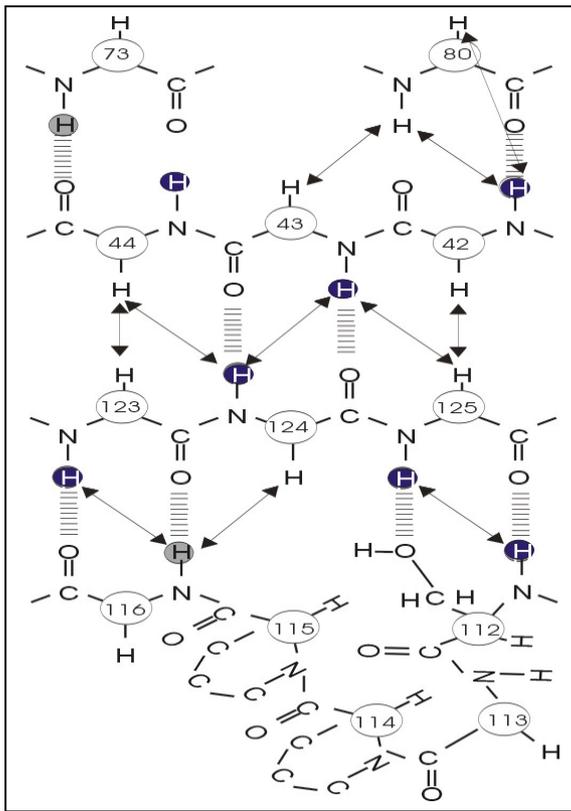


Abb. 5-6: Ausschnitt aus dem β -Faltblattgerüst von *hPar14*, in dem die Änderungen der Amidproton austausch-raten nach Substratzugabe stattfinden. Die Protonen, die im Komplex langsamer austauschen, sind blau gefärbt.

Als Ursache dafür kommt entweder die durch Komplexbildung verminderte Zugänglichkeit des Lösungsmittels zur Wasserstoffbrücke oder die verkleinerte Gleichgewichtskonstante für Bindung und Zerfall der Wasserstoffbrücken in Frage [111]. Letztere könnte durch die Einschränkung der Dynamik des *hPar14*-Moleküls in dieser Region verursacht werden [112]. In der Tat, ist

der verlangsamte Amidprotonaustausch in guter Übereinstimmung mit gleichzeitig sinkenden R_1 -Relaxationsraten (steigenden T_1 -Zeiten) der Amidstickstoffe von Aminosäuren aus dieser Region (Kapitel 4.3.3, Abb. 4-25). Die Abnahme der R_1 -Relaxationsraten bedeutet eine verringerte Dynamik der Rückgratsatome. Das Proteinrückgrat im obengenannten Bereich wird durch die Bindung des Modellsubstrates steifer.

Die Amidprotonen von Aminosäuren Leu101 und Val110, die die letzte Wasserstoffbrücke der α -Helix-4 und die erste des β -Strang-3 aufbauen, tauschen im Enzym-Substrat-Komplex schneller aus. Die größere Moleküldynamik spiegelt sich in den steigenden R_1 -Austauschraten (sinkenden T_1 -Zeiten) der Amidstickstoffe innerhalb der α -Helix-4 wider. Es ist zu vermuten, dass α -Helix-4 in substratgebundener Konformation seine Position bezogen auf das gesamte Proteinrückgrat verändert.

5.6 *hPar14* ist ein DNA-bindendes Protein

Während für die zentrale PPIase-Domäne (*hPar14*₃₆₋₁₃₁) gezeigt werden konnte, dass sie für die *cis/trans*-Isomerisierung von Modellsubstraten verantwortlich ist [32], war

die Funktion der basischen N-terminalen Domäne (*hPar14*₁₋₃₅) unbekannt. Da alle Wechselwirkungen von *hPin1* mit anderen Proteinen durch seine N-terminale WW-Domäne vermittelt werden [45], lag es nahe, dass auch die basische Domäne von *hPar14* an der intermolekularen Wechselwirkung beteiligt ist. Eine ähnliche N-terminale Erweiterung konnte auch in Proteinsequenzen anderer eukaryotischer Parvuline des *hPar14*-Typs gefunden werden (Abb. 5-7). Eine Suche in der ExPasy Datenbank (Molekular Biology Server, Swiss Institute for Bioinformatics) mit Hilfe des Programms PSORT ergab eine bevorzugte Aufenthaltswahrscheinlichkeit (94.1%) dieser Domäne im Zellkern von Eukaryoten.

*hPar14*₁₋₄₅ MPPK G K S G S G K A G K G G A A S G S D S A D K K A Q G P -- K G G G N A V K V R H I L C
 mouse MPPK G K S G S G K G G K G G A A S G S D S A D K K S Q G P -- K G G G N A V K V R H I L C
 D.dis MPPK - K P A E - K N A K K P A A G G - K - A D K K G K G D D A K G G I T Q V K V R H I L C

Abb. 5-7: Sequenzvergleich der N-termini von Parvulinen aus Mensch, Maus und *Dictyostelium*. Die Farbe der Aminosäuren bedeuten: Blau – identisch, rot – Angehörigkeit zur PPIase-Domäne.

In Rahmen der Zusammenarbeit mit Dr. Christine Rascher wurden DNA-Sequenzen erhalten, die in einem *casting*-Verfahren hohe Affinität zu *hPar14* zeigten und die *consensus*-Sequenz *CAAAT* aufwiesen. In *in vitro* Bindungsstudien (Fluoreszenztitrations) mit verschiedenen doppelsträngigen Oligonukleotiden (Kap. 4.4), die Variationen der *consensus*-Sequenz enthielten, konnte ein DNA-Konstrukt gefunden werden, das eine optimale Bindungssequenz ($K_d \sim 60$ nM, 12 °C) besaß und auch für NMR-Studien geeignet war. Strukturelle Untersuchungen dieses Komplexes auf atomarer Ebene mit Hilfe der NMR zeigten, dass die beiden Domänen von *hPar14* an der DNA-Bindung beteiligt sind.

Sechs von einundzwanzig an der DNA-Wechselwirkung beteiligten Aminosäurereste gehören zum N-Terminus von *hPar14*, darunter sind die beiden konservierten (Abb. 5-7) Alanine, Ala17 und Ala18, und eines der konservierten Lysine, Lys11 oder Lys14. Untersuchungen an N-terminal verkürztem Parvulin (*hPar14*₂₅₋₁₃₁) zeigen eine herabgesetzte Affinität zu DNA.

Die an der Wechselwirkung mit der DNA beteiligten Aminosäuren der PPIase-Domäne bilden eine hydrophobe Oberfläche, die von vier polaren Resten begrenzt wird. Eine ähnliche Oberflächentopologie wurde für das *interface* von *high-mobility group B* (HMGB) Domänen beschrieben. HMGB-Domänen sind in sequenz-

spezifischen Transkriptionsfaktoren, wie SRY und Lef-1, sowie in chromosomal assoziierten HMG1 und HMG2 Proteinen vorhanden [113]. Sie zeichnen sich durch eine hochkonservierte L-förmige Anordnung von drei α -Helices aus. Die DNA-Bindungsstelle besteht aus hydrophoben Aminosäuren, die sich der Oberfläche der kleineren Grube der doppelsträngigen DNA so anpassen, dass ihre Seitenketten in direkte Wechselwirkung mit den Basen treten. Im Lef-1/DNA-Komplex interkaliert, beispielsweise, die Methylgruppe von Methionin (Met13) zwischen zwei Adeninbasen [114]. Die Aminosäurereste 9, 12 und 13 aus α -Helix-1 und 43 aus α -Helix-4 sind in allen HMGB-Domänen für die DNA-Bindung essentiell. In Lef-1 sind Leu9, Phe12, Met13, Met16 und Arg43 für die Wechselwirkung verantwortlich. Interessanterweise, besitzt auch *hPar14* ein ähnliches Motiv, das aus His48, Ile51, Met52, Met55 (α -Helix-1) besteht (Abb. 5-8). Dabei ersetzt His48 den Leu9-Rest von Lef-1, während die anderen drei Resten in beiden Proteinen identisch sind. Möglicherweise bindet das so aufgebaute dreidimensionale Modul des *hPar14* in die kleine Grube der doppelsträngigen DNA. Legt man diese Hypothese zugrunde dann könnte der N-terminus die Rolle der C-terminalen basischen Domäne von Lef-1 übernehmen. Sie bindet in die große Grube der DNA und initiiert durch Ladungsneutralisierung eine Beugung des DNA-Doppelstranges.

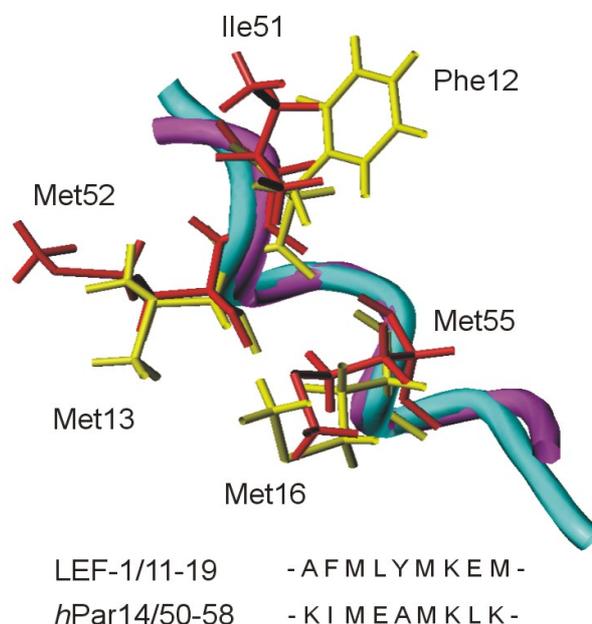


Abb. 5-8: Überlagerung der α -Helices von *hPar14* und Lef-1. Dargestellt sind der Verlauf des Proteinerückgrates von *hPar14*₅₀₋₅₈ (violett) und Lef-1₁₁₋₁₉ (blau) und die Aminosäuren, die am Aufbau der Wechselwirkungsstelle mit der DNA in Lef-1 beteiligt sind (gelb), sowie ihre räumlichen Analoga in *hPar14* (rot).

Hierfür spricht auch die Sequenzhomologie des N-Terminus (*hPar14*₁₋₃₇) zu Proteinsequenzen von HMG17 (HMGN) [32]. HMGN-Proteine sind im Zellkern der Säugetiere vorhanden, wo sie bei der Modifikation der Struktur von Chromatinfasern eine Rolle spielen. Die durch Interaktion von HMGN-Proteinen mit Nukleosomen verursachte partielle Entfaltung von Chromatinfasern ermöglicht die Transkription oder Replikation der DNA, wodurch der Übergang in die S-Phase des Zellzyklus eingeleitet wird [115]. Abbildung 5-9 illustriert die Homologie zwischen dem N-terminalen Sequenzbereich von *hPar14* (*hPar14*₁₋₃₇) und NLS- und CHUD-Sequenzbereich [116] von HMG17. Für die mögliche Beteiligung von *hPar14* während der S-Phase des Zellzyklus spricht auch der Befund, daß die *AAAT-box*, an die *hPar14* bindet, in Promotorsequenzen von verschiedenen Proteinen vorkommt, wie z.B. im transformierenden Wachstumsfaktor β -1 (TGF- β), der die Transkription von Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren hoch-reguliert. Möglich ist jedoch auch, daß *hPar14* eine Rolle bei der Chromosomenkondensation spielt, die während der M-Phase des Zellzyklus auftritt.

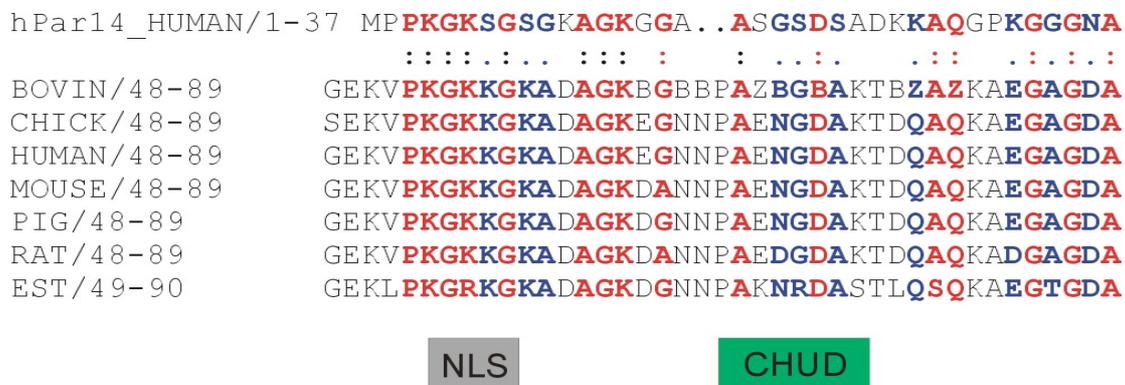


Abb. 5-9: Sequenzvergleich von HMG17-Proteinen aus verschiedenen Species und N-Terminus des *hPar14*. NLS – Kernlokalisierungssignal der HMG17-Proteine; CHUD – Chromatin-entfaltende Domäne der HMG17-Proteine. Aminosäurereste, die innerhalb der bekannten HMG17-Sequenzen und des N-terminalen Sequenzbereichs von *hPar14* identisch sind, wurden rot-gefärbt dargestellt. Aminosäurereste, die ähnlichen Seitenkettencharakter besitzen, wurden blau-gefärbt dargestellt.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Struktur des humanen Parvulin 14 (*hPar14*) in Lösung mit Hilfe zwei- und dreidimensionaler NMR-Experimente untersucht. *hPar14* ist eine PPIase der Parvulin-Familie mit unbekannter zellulärer Funktion.

Durch die Aufnahme und Auswertung von 2D- und 3D-NMR-Spektren konnten 1042 NOEs, davon 120 intraresiduale und 922 interresiduale, 71 dihedrale Winkeln und 38 Wasserstoffbrücken ermittelt werden, die später für die Strukturrechnung als experimentelle Daten eingesetzt worden sind. Die so gewonnene Struktur des *hPar14* ist gut definiert (RMSD-Wert für das gesamte Proteinerückgrat 1.45 ± 0.16 Å) und besteht aus einem viersträngigen gekrümmten β -Faltblatt, das die α -Helix-4 umgibt. α -Helices-1, 2 und 3 befinden sich auf der konvexen Seite des Faltblattgerüsts. Der N-Terminus des Proteins besteht aus 35 Aminosäureresten und liegt unstrukturiert vor.

Die *hPar14*-PPIase-Domäne weist eine *hPin1*-PPIase-Domäne-ähnliche Topologie auf, die als Subtopologie des FKBP-*Superfolds* gesehen werden kann. Ein Vergleich zwischen PPIase-Domänen von *hPar14* und *hPin1* zeigt, dass die räumlichen Positionen der an der Katalyse beteiligten Aminosäuren konserviert sind. Die Position von Aminosäure Cys113 des *hPin1* wird in *hPar14* von Asp74 eingenommen. In *hPar14* ist die *loop*-Region zwischen dem β -Strang-1 und der α -Helix-1 gegenüber *hPin1* verkürzt, was für den Verlust der Affinität zu phosphorylierten Substraten verantwortlich gemacht werden kann. Ein Vergleich der Oberflächenladungen von *hPar14* und *hPin1* zeigt, daß ein *hPar14*-Substrat vermutlich eine Aminosäure mit positiv geladener Seitenkette vor dem Prolin enthalten sollte. Die $\alpha4/\beta3$ -*loop*-Region, die im *hPar14* im Vergleich zu *hPin1* verlängert ist, ist zusammen mit dem Prolin-haltigen VIb-Turn aus dem β -Strang-3 am Aufbau einer mutmaßlicher Bindungsstelle für einen unbekanntem Wechselwirkungspartner beteiligt.

NMR-Untersuchungen zeigen, dass das Modellsupstrat Succinyl-Ala-Arg-Pro-Phe-para-nitroanilin in eine hydrophobe Grube des *hPar14* bindet. Die Bindung des Substrates verursacht Änderungen in den Amidprotonaustauschraten und den T_1 -Zeiten einiger Stickstoffatome des Proteinerückgrats von *hPar14*. Die davon betroffenen Aminosäuren befinden sich im β -Faltblattgerüst und in der $\alpha4/\beta3$ -*loop*-Region.

Mit Hilfe der Fluoreszenz- und NMR-Spektroskopie konnte die Bindung von *hPar14* an DNA nachgewiesen werden. Ein optimal geeignetes DNA-Konstrukt für den spektrometrischen Nachweis der Bindung wurde selektiert und besitzt eine GTAAAAAATGTTTTTCATTTTTTAC-Sequenz, deren mittleren Teil nach der Anlagerung der komplementäre Stränge einen TTTT-Loop ausbildet. Der K_d -Wert für die Bindung von *hPar14* an dieses Oligonukleotid liegt bei 12 °C im nanomolaren (bestimmt durch Fluoreszenztitrationen) und bei 27 °C im mikromolaren Bereich (^{15}N -HSQC-NMR-Titrationen). Untersuchungen mit N-terminal verkürztem Parvulin (*hPar14*₂₅₋₁₃₁) zeigen eine herabgesetzte Affinität zu DNA. Durch ein NMR-*Interfacemapping*, das auf der Änderung der chemischen Verschiebungen von Resonanzen im ^{15}N -HSQC-Spektrum basiert, konnte eine mögliche Bindungsstelle für DNA auf der PPIase-Domäne des *hPar14* identifiziert werden. Sie setzt sich aus Seitenketten von elf hydrophoben und vier polaren Resten zusammen. Sechs Reste aus dem unstrukturierten N-Terminus von *hPar14* sind ebenfalls an der DNA-Wechselwirkung beteiligt. Das DNA-Bindungsmotiv ist vermutlich eine Helix-loop-Helix-Schleife auf der konvexen Seite des Faltblattgerüsts von *hPar14*. Ähnliche Bindungsstellen wurde für HMGB-Domänen beschrieben. Die Rolle des unstrukturierten N-Terminus von *hPar14* bei der DNA-Bindung besteht vermutlich in der Stabilisierung des Komplexes durch Bindung in die große Grube und einer einhergehenden Ladungsneutralisierung, wie es für Transkriptionsfaktoren beschrieben wurde.

Die Frage, welche Funktion erfüllt eine DNA-bindende PPIase im Kern und im Cytoplasma der menschliche Zelle, bleibt unbeantwortet. Eine Rolle bei der Initiation der S-Phase des Zellzyklus oder bei der Chromosomenkondensation während der M-Phase scheint möglich zu sein. Weitere Untersuchungen zur Beantwortung dieser Frage sollten auf zellulärer Ebene durchgeführt werden.

7. Literatur

- [1] Pappenberger, G., Aygun, H., Engels, J.W., Reimer, U., Fischer, G., Kiefhaber, T. (2001) Nonprolyl *cis* peptide bonds in unfolded proteins cause complex folding kinetics. *Nat. Struct. Biol.* **8(5)**, 452-458.
- [2] Ramachandran, G.N., Sasisekharan, V. (1986) Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Prot. Chem.* **23**, 283-438.
- [3] Schmid, F.X., Baldwin, R.L., (1978) Acid catalysis of the formation of the slow-folding species of RNase A: evidence that the reaction is proline isomerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75(10)**, 4764-4768.
- [4] Brandts, J.F., Halvorson, H.R., Brennan, M. (1975) Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to *cis/trans* isomerism of proline residues. *Biochemistry* **14(22)**, 4953-4963.
- [5] Steinmann, B., Bruckner, P., Superti-Furga, A.J. (1991) Cyclosporin A slows collagen triple-helix formation in vivo: indirect evidence for a physiologic role of peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomerase. *Biol. Chem.* **266(2)**, 1299-1303.
- [6] Fischer, G., Schmid, F.X. (1990) The mechanism of protein folding. Implications of *in vitro* refolding models for *de novo* protein folding and translocation in the cell. *Biochemistry* **29(9)**, 2205-2212.
- [7] Fischer, G., Bang, H., Mech, C. (1984) Nachweis einer enzymkatalyse für die *cis-trans*-isomerisierung der peptidbindung in prolihaltigen peptiden. *Biomed. Biochim. Acta* **43**, 1101-1111.
- [8] Siekierka, J.J., Hung, S.H., Poe, M., Lin, C.S., Sigal, N.H. (1989) A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 is a *cis-trans* peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* **341**, 785-760.
- [9] Fischer, G. (1994) Über Peptidyl-Prolyl *cis-trans*-isomerasen und ihre effectoren. *Angew. Chem.* **106**, 1479-1501.
- [10] Rahfeld, J.-U., Schierhorn, A., Mann, K., Fischer, G. (1994) A novel peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **343**, 65-69.
- [11] Rahfeld, J.-U., Ruecknagel, K.P., Schelbert, B., Ludwig, B., Hacker, J., Mann, K., Fischer, G. (1994) Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin. *FEBS Lett.* **352**, 180-184.
- [12] Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., Schmidt, F.X. (1989) Cyclophilin and peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase are probably identical proteins. *Nature* **337**, 476-478.
- [13] Takahashi, N., Hayano, T., Suzuki, M. (1989) Peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* **337**, 473-475.
- [14] Hennig, L., Christner, C., Kipping, M., Schelbert, B., Rucknagel, K.P., Grabley, S., Küllertz, G., Fischer, G. (1998) Selective inactivation of parvulin-like peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases by Juglone. *Biochemistry* **37**, 5953-5960.
- [15] Metzner, M., Stoller, G., Rücknagel, K.P., Lu, K.P., Fischer, G., Luckner, M., Küllertz, G. (2001) Functional replacement of the essential ESS1 in yeast by the plant parvulin DIPar13. *J. Biol Chem* **17**, 13524-13529.
- [16] Harrison, R.K. and Stein, R.L. (1990) Substrate specificities of the peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase activities of cyclophilin and FK-506 binding protein: evidence for the existence of a family of distinct enzymes. *Biochemistry* **29**, 3813-3816.

- [17] Compton, L.A., Davis, J.M., Macdonald, J.R., Bächinger, H.P. (1992) Structural and functional characterization of *Escherichia coli* peptidyl-prolyl cis-trans isomerases. *Eur. J. Biochem.* **206**, 927-934.
- [18] Sudol, M., Sliwa, K., Russo, T. (2001) Functions of WW domains in the nucleus. *FEBS Lett.* **490(3)**, 190-195.
- [19] Lazar, S.W., Kolter, R. (1996) SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins. *J. Bacteriol.* **178 (6)**, 1770-1773.
- [20] Dartigalongue, C., Raina, S. (1998) A new heat-shock gene, *ppiD*, encodes a peptidyl-prolyl isomerase required for folding of outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **17(14)**, 3968-3980.
- [21] Kontinen, V.P., Saris, P., Sarvas, M. (1991) A gene (*prs*) of *Bacillus subtilis* involved in a novel, late stage of protein export. *Mol. Microbiol.* **5(5)**, 1273-1283.
- [22] Vos, P., van Assenlonk, M., van Jeveren, F., Siezen, R., Simons, G., de Vos, W.M. (1989) A maturation protein is essential for production of active forms of *Lactococcus lactis* SK11 serine proteinase located in or secreted from the cell envelope. *J. Bacteriol.* **171**, 2795-2802.
- [23] Jacobson, M.R., Brigle, K.E., Bennett, L.T., Settequist, R.A., Wilson, M.S., Cash, V.L., Beynon, J., Newton, W.E., Dean, D.R. (1989) Physical and genetic map of the major *nif* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **171 (2)**, 1017-1027.
- [24] Ogasawara, N., Nakai, S., Yoshikawa, H. (1994) Systematic sequencing of the 180 kilobase region of the *Bacillus subtilis* chromosome containing the replication origin. *DNA Res.* **1**, 1-14.
- [25] Tomb, J.-F., White, O., Kervalage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., Nelson, K. Quackerbush, J., Zhou, L.X., Kirkness, E.F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D. et al. (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**, 539-547.
- [26] 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., Kurland, C.G. (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria *Nature* **396 (6707)**, 133-140.
- [27] Johansson, A., Ibrahim, A., Goransson, I., Eriksson, U., Gurycova, D., Clarridge, J.E., Sjostedt, A. (2000) Evaluation of PCR-based methods for discrimination of *Francisella* species and subspecies and development of a specific PCR that Distinguishes the two major subspecies of *Francisella tularensis* *J. Clin. Microbiol.* **38(11)**, 4180-4185.
- [28] 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., de Jonge, 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., Trust, T.J. (1999) Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **397(6715)**, 176-180.
- [29] Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y. and Ishikawa, H. (2000) Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera sp.* *APS. Nature* **407(6800)**, 81-86.
- [30] Behrens, S., Maier, R., de Cock, H., Schmid, F.X., Gross, C.A. (2001) The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions *in vivo* and has chaperon activity. *EMBO J.* **20 (1-2)**, 285-294.
- [31] Paul, W., Merrick, M., (1987) The nucleotide sequence of the *nifM* gene of *Klebsiella pneumoniae* and identification of a new *nif* gene: *nifZ*. *Eur. J. Biochem.* **170**, 259-265.

- [32] Uchida, T., Fujimori, F., Tradler, T., Fischer, G., 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**, 278-282.
- [33] Rulten, S., Thorpe, J., Kay, J. (1999) Identification of eukaryotic parvulin homologues: a new subfamily of peptidylprolyl *cis-trans* isomerases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **259(3)**, 557-562.
- [34] Lu, K.P., Hanes, S.D., Hunter, T. (1996) A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* **380**, 544-547.
- [35] Hani, J., Stumpf, G., Domdey, H. (1995) Pft1 encodes an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae*, which shows strong homology with a new putative family of PPIases. *FEBS Lett.* **365**, 198-202.
- [36] Fujimori, F., Takahashi, K., Uchida, C., Uchida T. (1999) Mice lacking Pin1 develop normally, but are defective in entering cell cycle from G(0) arrest. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265(3)**, 658-663.
- [37] Maleszka, R., Hanes, S.D., Hackett, R.L., de Couet, H.G., Miklos, G.L. (1996) The *Drosophila melanogaster* dodo (dod) gene, conserved in humans, is functionally interchangeable with the ESS1 cell division gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93 (1)**, 447-451.
- [38] Winkler, K. E., Swenson, K. I., Kornbluth, S., and Means, A. R. (2000) Requirement of the prolyl isomerase Pin1 for the replication checkpoint. *Science* **287**, 1644-1647.
- [39] Grenshaw, D. G., Yang, J., Means, A. R., and Kornbluth, S. (1998) The mitotic peptidyl-prolyl isomerase, Pin1, interacts with Cdc25 and Plx1. *EMBO J.* **17**, 1315-1327.
- [40] Kops, O., Eckerskorn, C., Hottenrott, S., Fischer, G., Mi, H. F., Tropschug, M. (1998) SSP1, a site-specific parvulin homolog from *Neurospora crassa* active in protein folding. *J. Biol. Chem.* **48**, 31971-31976.
- [41] Dolinski, K., Muir, S., Cardenas, M., Heitman, J. (1997) All cyclophilin and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13093-13098.
- [42] Zhou, X.Z., Lu, P.J., Wulf, G., Lu, K.P. (1999) Phosphorylation-dependent prolyl isomerization: a novel signaling regulatory mechanism. *Cell Mol. Life Sci.* **56**, 788-806.
- [43] Yaffe, M.B., Schutkowski, M., Shen, M.H., Zhou, X.Z., Stukenberg, P.T., Rahfeld, J.-U., Xu, J., Kuang, J., Kirschner, M.W., Fischer, G., Cantley, L.C., and Lu, K.P. (1997) Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism *Science* **278**, 1957-1960.
- [44] Shen, M., Stukenberg, P.T., Kirschner, M.W., Lu, K.P. (1998) The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins. *Genes Dev.* **12**, 706-720.
- [45] Lu, P.J., Zhou, X.Z., Shen, M.H., and Lu, K.P. (1999) Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science* **283**, 1325-1328.
- [46] Zhou, X.Z., Kops, O., Werner, A., Lu, P.J., Shen, M., Stoller, G., Kullertz, G., Stark, M., Fischer, G., Lu, K.P. (2000) Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Mol Cell* **6(4)**, 873-883.
- [47] Ranganathan, R., Lu, K.P., Hunter, T., Noel, J.P. (1997) Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent. *Cell* **89(6)**, 875-886.
- [48] Verdecia, M.A., Bowman, M.E., Lu, K.P., Hunter, T., Noel, J.P. (2000) Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains. *Nat. Struct. Biol.* **7(8)**, 639-643.

- [49] Yao, J.-L., Kops, O., Lu, P.-J., Lu, K.P. (2001) Functional conservation of phosphorylation-specific prolyl isomerases in plants. *J. Biol. Chem.* **17**, 13517-13523.
- [50] Landrieu, I., deVeylder, L., Fruchart, J. S., Odaert, B., Casteels, P., Portelle, D., van Montagu, M., Inze, D., and Lippens, G. (2000) The *Arabidopsis thaliana* PIN1At gene encodes a single-domain phosphorylation-dependent peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase. *J. Biol. Chem.* **275**, 10577-10581.
- [51] Lanrieu, I., Wieruszeski, J.-M., Odaert, B., Inze, D., Grzesiek, S., Lippens, G. (2000) Sequence-specific ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shift backbone NMR assignment and secondary structure of the *Arabidopsis thaliana* Pin1At protein. *J. Biomol. NMR* **17**(3), 271-272.
- [52] Hroch, A., Kessler, H., Gemmecker, G. (1999) Structural investigation of the peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase Parvulin from *E. coli*. 21. Diskussionstagung der Gesellschaft Deutscher Chemiker „Magnetische Resonanz in den Naturwissenschaften und der Medizin an der Schwelle zum 21. Jahrhundert“ **Poster 4**, Universität Würzburg.
- [53] Wüthrich, K. (1986) NMR of protein and nucleic acids, Wiley Interscience, New York, USA
- [54] Pervuschin, K., Riek, R., Wider, G., Wüthrich, K. (1997) Attenuated T_2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12366-12371.
- [55] Montelione, G.T., Wagner, G. (1990) Triple resonance experiments for establishing conformation-independent sequential NMR assignments in isotope-enriched polypeptides. *J. Magn. Res.* **87**, 183-188.
- [56] Ikura, M., Kay, L.E., Bax, A. (1990) A novel approach for sequential assignment of ^1H , ^{13}C and ^{15}N spectra for proteins: heteronuclear triple-resonance three-dimensional NMR spectroscopy. Application to calmodulin. *Biochemistry* **29**, 4659-4667.
- [57] Constantine, K.L., Mueller, L., Goldfarb, V., Witterkind, M., Metzler, W.J., Yanchunas, J.Jr., Robertson, J.G., Malley, M.F., Friedrichs, M.S., Farmer, B.T. II (1997) Characterization of NADP+ binding to perdeuterated MurB: backbone atom NMR assignments and chemical shift changes. *J. Mol. Biol.* **267**, 1223-1246.
- [58] Salzmann, M., Pervuschin, K., Wider, G., Wüthrich, K. (2000) NMR assignment and secondary structure determination of an octameric 110 kDa protein using TROSY in triple resonance experiments. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 7543-7548.
- [59] Wüthrich, K. (2001) New Results from Solution NMR with large structures. Keystone Symposia, Big Sky, Montana, USA, Öffentlicher Vortrag.
- [60] Bayer, P. (2000) Strukturaufklärung von Biomolekülen mit Hilfe der mehrdimensionalen Kernspinresonanz: Proteine aus der Signaltransduktion und der Regulation von Zellkernprozessen. *Habilitationsarbeit*, Universität Halle.
- [61] Powers, R., Garrett, D.S., March, C.J., Frieden, E.A., Gronenborn, A.M., Clore, G.M. (1992) ^1H , ^{15}N , ^{13}C and ^{13}CO assignments of human interleukin-4 using three-dimensional double- and triple-resonance heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **31**, 4334-4346.
- [62] Zamenhof, P.J., Villarejo, M. (1972). Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting complementation of galactosidase fragments in vivo. *J. Bacteriol.* **110**, 171-178.
- [63] Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stueber, D., Mueller, M., Ibrahimi, I., Haeuptle, M.T., Dobberstein, B. (1987) A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vitro* and *in vivo*. *Methods Enzym.* **155**, 416-433.
- [64] Gentz, R., Bujard, H. (1985). Promoters recognized by *Escherichia coli* RNA polymerase selected by function: highly efficient promoters from bacteriophage T5. *J. Bacteriol.* **164**, 70-77.

- [65] Scutcliffe, J.G. (1979) Complete nucleotide sequence of the *E. coli* plasmid pBR322. *Methods Enzym.* **43**, 77-90.
- [66] Miller, J.H. (1992). A short course of bacterial genetics: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [67] Farabough, P.J. (1978). Sequence of the *lacI* gene. *Nature* **274**, 765-769.
- [68] Müller, B., Restle, T., Reinstein, J., Goody, R.S. (1991) Interaction of fluorescently labeled dideoxynucleotides with HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry* **30**, 3709-3715.
- [69] Markley, J.L., Bax, A., Arata, Y., Hilbers, C.W., Kaptein, R., Sykes, B., Wright, P.E. und Wüthrich, K. (1998) Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids. *J. Biomol. NMR* **12** 1-23.
- [70] Marion, D., Wüthrich, K. (1983) Application of phase sensitive two-dimensional correlated spectroscopy (COSY) for measurements of ^1H - ^1H spin-spin coupling constants in proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **113**, 967-974.
- [71] Piotto, M., Saudek, V., and Sklenar, V., (1992) Gradient tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy in aqueous solution. *J. Biomol. NMR* **2**, 661-665.
- [72] Griesinger, C., Otting, G., Wüthrich, K. Ernst, R.R. (1989) Clean TOCSY for ^1H spin system identification in macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 7870-7872.
- [73] Macura, S., Ernst, R.R. (1980) Elucidation of cross relaxation in liquids by two-dimensional NMR-spectroscopy. *Mol. Phys.* **41**, 95-117.
- [74] Kay, L.E., Keifer, P., Saarinen, T. (1992a) Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 10663-10665.
- [75] Grzesiek, S., Bax, A. (1992b) Correlating backbone amide and side chain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 6291-6293.
- [76] Kay, L.E., Ikura, M., Tschudin, R., Bax, A. (1990) Three-dimensional triple-resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins. *J. Magn. Res.*, **98**, 469-514.
- [77] Bax, A., Ikura, M. (1991) An efficient 3D NMR technique for correlating the proton and ^{15}N backbone amide resonances with the α -carbon of the preceding residue in uniformly $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ enriched proteins. *J. Biomol. NMR* **9**, 359-369.
- [78] Vuister, G.W., Bax, A. (1993) Quantitative J-correlation: A new approach for measuring homonuclear three-bond $J(\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\text{A}})$ coupling constants in ^{15}N -enriched proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7772-7777.
- [79] Grzesiek, S., Bax, A. (1993c) Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ enriched proteins. *J. Biomol. NMR*, **3**, 185-204.
- [80] Logan, T.M., Olejniczak, E.T., Xu, R.X., Fesik S.W. (1992) Side chain and backbone assignments in isotopically labeled proteins from the heteronuclear triple resonance experiments. *FEBS Lett.* **314**, 413-418.
- [81] Bax, A., Clore, G.M., Gronenborn, A.M. (1990) ^1H - ^1H correlation via isotopic mixing of ^{13}C Magnetization, a new three-dimensional approach for assigning ^1H and ^{13}C spectra of ^{13}C enriched proteins. *J. Magn. Reson.* **88**, 425-431.
- [82] Spera, S., Bax, A. (1991) Empirical correlation between protein backbone conformation and $\text{C}\alpha$ and $\text{C}\beta$ carbonyl-13 NMR chemical shifts. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 5490-5492.

- [83] Marion, D., Kay, L., Sparks, S., Torchia D., Bax, A. (1989) Three-dimensional heteronuclear NMR of nitrogen-15 labeled proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 1515-1517.
- [84] Kay, L.E., Torchia, D.A. and Bax, A. (1989) Backbone dynamics of proteins as studied by ^{15}N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy. *Biochemistry* **28**, 8972-8979.
- [85] Peng, J.W., and Wagner, G., (1994) Investigation of protein motions via relaxation measurements, *Methods in Enzymol.* **239**, 563-596.
- [86] Wagner, G., Braun, W., Havel, T.F., Schaumann, T., Go, N., Wüthrich, K. (1987) Protein structures in solution by nuclear magnetic resonance and distance geometry. The polypeptid fold of the basic pancreatic trypsin inhibitor determined using two different algorithms, DISGEO und DISMAN. *J. Mol. Biol.* **196**, 661-639.
- [87] Güntert, P., Wüthrich, K. (1992) FLATT-a new procedure for high-quality baseline correction of multidimensional NMR spectra, *J. Magn. Reson.* **96**, 403-407.
- [88] Kraulis, P.J., Clore, G.M., Nigles, M., Jones, T.A., Petterson, G., Knowles, J, Gronenborn, A.M. (1989) Determination of the three-dimensional structure of the C-terminal domain of cillobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. A study using nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing. *Biochemistry* **28**, 7241-7257.
- [89] Pardi, A., Billeter, M., Wüthrich, K. (1984) Calibration of the angular dependence of the amide proton- C_α proton coupling constants, $^3\text{JHN}_\alpha$, in a globular protein. Use of $^3\text{JHN}_\alpha$ for identification of helical secondary structure. *J. Mol. Biol.* **180**, 741-751.
- [90] Wishart, D.S., Sykes, B.D, Richard, F.M (1992) The chemical shift index: A fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry* **31**, 1647-1651.
- [91] Oldfield E. (1995) Chemical shifts and three-dimensional protein structures. *J. Biomol. NMR* **5(3)**, 217-225
- [92] Wishart, D.S., Bigam, C.G., Holm, A, Hodges, S.G, Sykes, B.D. (1995) ^1H , ^{13}C and ^{15}N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. *J. Biomol. NMR* **5**, 1995, 67-81.
- [93] Brünger, A.T.(1993) X-PLOR Version 3.1, Howard Hughes Medical Institute and Yale University, New Haven, CT
- [94] Parath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598-599.
- [95] http://www.bmrb.wisc.edu/data_library/data/bmr4768.str.html
- [96] Sekerina, E., Rahfeld, J.-U., Fanghänel, J., Müller, J., Rascher, C., Fischer, G., Bayer, P. (2000) NMR solution structure of *hPar14* reveals similarity to the peptidyl prolyl cis/trans isomerase domain of the mitotic regulator *hPin1* but indicates a different functionality of the protein. *J.Mol.Biol.* **301**, 1003-1017.
- [97] Koradi, R., Bileter, M., Wüthrich, K. (1996) MOLMOL: A program for displaying and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graphics* **14**, 51-55.
- [98] Kraulis, P.J (1991) MOLSCRIPT: a program to produce both detailed und schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallog.* **24**, 946-950.
- [99] Allain, F.H.-T., Gubser, C.C., Howe P.W., Nagai K., Neuhaus D., Varani G. (1996) Specificity of ribonucleoprotein interaction determined by RNA folding during complex formation. *Nature* **380**, 646-650.
- [100] Holm, L., Sander, C. (1993) Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J. Mol. Biol.* **233**, 123-138.

- [101] Fischer, G. (2000) Chemical aspects of peptide bond isomerisation [Review]. *Chem. Soc. Reviews* **29**(2), 119-127.
- [102] Orengo, C.A., Jones, D. T., Thornton, J.M. (1994) Protein superfamilies and domain superfolds. *Nature* **372**, 631-634.
- [103] Davis, D.R., Padlan, E.A., Sheriff, S., (1990) Antibody-antigen complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 439-473.
- [104] Nichollis, A., Sharp, K.A., Honig, B. (1991) Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Struct. Funct. Genet.* **11**, 282-296.
- [105] Zhao, Y., Chen, Y., Schutkowski, M., Fischer, G., Ke, H. (1997) Cyclophilin A complexed with a fragment of HIV-1 gag protein: insights into HIV-1 infectious activity. *Structure* **5**, 139-146.
- [106] Schulz, G.E., Shimer, R.H. (1979) Principles of protein structure. Springer-Verlag New York Inc.
- [107] Pal, D., Chakrabarti, P. (1999) *Cis* peptide bonds in proteins: residues involved, their conformations, interactions and locations. *J. Mol. Biol.* **294**, 271-288.
- [108] Reimer, U., (1998) NMR-Untersuchungen zur struktur und dynamik des peptidrückgrates in der nachbarschaft von prolinresten. *Dissertation*. Universität Halle.
- [109] Moore, J.M., Peattie, D.M., Fitzgibbon, M.J., Thomson, J.A. (1991) Solution structure of the major binding protein for the immunosuppressant FK506. *Nature* **351**, 248-250.
- [110] Maruyama, T., Furutani, M., (2000) Archaeal peptidyl prolyl *cis-trans* isomerases (PPIases). *Front. Biosci.* **5D**, 821-836.
- [111] Kipping, M. (2001) Untersuchung der Raumstruktur von Peptiden und Proteinen mittels H/D-Austausch-MALDI-TOF-Massenspektrometrie. *Dissertation*. Universität Halle.
- [112] Habazettl, J.M., Myers, C., Feng, Y., Verdine, G., Wagner, G. (1996) Backbone dynamics, amide hydrogen exchange, and resonance assignments of the DNA methylphosphotriester repair domain of *E.coli* Ada using NMR. *Biochemistry* **35**, 9335-9348.
- [113] Travers, A. (2000) Recognition of distorted DNA structures by HMG domains. *Curr. Opp. Struc. Biol.* **10**, 102-109.
- [114] Love, J.J., Xiang, L., Case, D.A., Giese, K., Grosschedl, R., Wright, P.E. (1995) Structural basis for DNA bending by the architectural transcription factor Lef-1. *Nature* **376**, 791-795.
- [115] Bustin, M.(2001) Chromatin unfolding and activation by HMGN chosomal proteins. *TIBS* **26**, 431-437.
- [116] Trieschmann, L., Postnikov, Y.V., Rickers, A., Bustin M. (1995) Modular structure of chromosomal proteins HMG-14 and HMG-17 - definition of a transcriptional enhancement domain distinct from the nucleosomal binding domain. *Mol. Cell. Biol.* **145**, 6663-6669.
- [117] Riek, R., Wider, G., Pervuschin, K., Wüthrich K. (1999) Polarization transfer by cross-correlated relaxation in solution NMR with very large molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 4918-4923.

8. Anhang

Anhang A: Änderungen der chemische Verschiebung von N-H – Resonanzen in ^{15}N -HSQC-Spektrum durch Bindung eines Komplexes von *hPar14* mit dem Modelsubstrat, pH 6.5, 300K.

Rest	Δ ^1H -Schift, Hz	Δ ^{15}N -Schift, Hz	Rest	Δ ^1H -Schift, Hz	Δ ^{15}N -Schift, Hz
Val38	-	-0.0280	Asp81	-0.0210	0.0250
Lys39	0.004	0.012	Leu82	0.0210	-0.0290
Val40	0.007	0.049	Gly83	-0.0190	-0.1330
Arg41	-	0.1220	Met85	0.006	0.0880
His42	0.004	0.037	Thr86	0.005	-0.1010
Ile43	-0.0140	-0.2980	Arg87	0.007	0.037
Leu44	-	0.049	Ser89	0.02	0.037
Glu46	0.007	-	Met90	-0.034	0.0840
Lys47	0.013	0.086	Val91	0.223	0.203
His48	-	-0.0750	Phe94	-0.0450	-0.098
Ile51	-0.005	-0.0860	Gln95	0.0260	0.0220
Met52	-0.009	-0.0560	Glu96	0.011	-0.0140
Leu58	0.007	-	Ala97	-0.0290	-0.0380
Arg63	0.006	0.0940	Phe99	0.0230	-0.0340
Phe64	0.0290	0.0710	Ala100	0.005	-0.0330
Gln65	0.008	-0.0130	Leu101	-0.014	0.030
Glu66	0.011	0.012	Asp107	-	-0.0190
Val67	0.011	0.024	Lys108	0.005	-0.0480
Ala68	0.017	0.061	Phe111	0.010	-0.050
Ala69	-0.009	0.078	Lys117	-	0.055
Ser72	0.0190	-0.0590	Phe120	-	0.086
Glu73	0.009	0.024	Tyr122	0.007	0.116
Asp74	-0.020	0.033	Ile124	0.0320	-0.0460
Lys75	0.011	-	Ile125	0.0210	0.0550
Ala76	0.011	0.1550	Met126	0.0180	0.132
Gly80	0.0380	-0.0220	Glu128	0.004	0.122
			Lys130	-0.0210	-0.0670

Anhang B: Relaxationszeiten T_1 bei 11.74 T (Protonenfrequenz 500,130 MHz) und 300 K für ^{15}N -markiertes *hPar14* in Abwesenheit und Anwesenheit von Modelsubstrat.

Rest	T_1 , s ohne Modelsubstrat	T_1 , s mit Modelsubstrat	Rest	T_1 , s ohne Modelsubstrat	T_1 , s mit Modelsubstrat
Ala37	0.303 ± 0.044	0.295 ± 0.022	Ala76	0.330 ± 0.055	0.359 ± 0.028
Val38	0.346 ± 0.035	0.365 ± 0.030	Gly80	0.388 ± 0.074	0.350 ± 0.036
Lys39	0.283 ± 0.032	0.340 ± 0.026	Asp81	0.366 ± 0.057	0.247 ± 0.047
Val40	0.483 ± 0.156	0.459 ± 0.039	Leu82	0.415 ± 0.049	0.323 ± 0.032
Arg41	0.365 ± 0.039	0.450 ± 0.050	Gly83	0.325 ± 0.035	0.377 ± 0.037
His42	0.376 ± 0.040	0.361 ± 0.040	Met85	0.287 ± 0.027	0.322 ± 0.038
Ile43	0.296 ± 0.040	0.270 ± 0.041	Thr86	0.329 ± 0.054	0.368 ± 0.022
Leu44	0.293 ± 0.043	0.331 ± 0.032	Arg87	0.360 ± 0.075	0.403 ± 0.031
Glu46	0.384 ± 0.050	0.392 ± 0.037	Met90	0.297 ± 0.037	0.313 ± 0.038
Lys47	0.375 ± 0.032	0.351 ± 0.022	Phe94	0.318 ± 0.040	0.055 ± 0.008
Gly49	0.269 ± 0.049	0.358 ± 0.063	Gln95	0.375 ± 0.044	0.067 ± 0.010
Lys50	0.369 ± 0.043	0.394 ± 0.040	Glu96	0.351 ± 0.036	0.319 ± 0.037
Ile51	0.375 ± 0.043	0.314 ± 0.018	Ala98	0.284 ± 0.019	0.187 ± 0.004
Met52	0.321 ± 0.036	0.354 ± 0.024	Phe99	0.438 ± 0.053	0.344 ± 0.028
Glu53	0.323 ± 0.028	0.360 ± 0.022	Ala100	0.345 ± 0.034	0.406 ± 0.028
Ala54	0.369 ± 0.032	0.364 ± 0.009	Leu101	0.365 ± 0.036	0.401 ± 0.039
Met55	0.382 ± 0.058	0.315 ± 0.033	Val103	0.426 ± 0.058	0.480 ± 0.040
Glu56	0.354 ± 0.029	0.335 ± 0.026	Ser104	0.366 ± 0.035	0.346 ± 0.029
Lys57	0.316 ± 0.021	0.332 ± 0.030	Gly105	0.422 ± 0.056	0.402 ± 0.017
Leu58	0.309 ± 0.064	0.334 ± 0.019	Met106	0.304 ± 0.026	0.357 ± 0.036
Ser60	0.400 ± 0.038	0.415 ± 0.025	Asp107	0.327 ± 0.032	0.325 ± 0.023
Gly61	0.376 ± 0.040	0.359 ± 0.025	Val110	0.354 ± 0.073	0.334 ± 0.035
Met62	0.370 ± 0.031	0.379 ± 0.016	Phe111	0.360 ± 0.045	0.421 ± 0.033
Arg63	0.374 ± 0.039	0.364 ± 0.024	Thr112	0.343 ± 0.039	0.415 ± 0.020
Phe64	0.334 ± 0.034	0.392 ± 0.035	Asp113	0.398 ± 0.055	0.504 ± 0.030
Gln65	0.353 ± 0.049	0.347 ± 0.028	Lys117	0.368 ± 0.033	0.470 ± 0.037
Glu66	0.375 ± 0.053	0.363 ± 0.025	Thr118	0.380 ± 0.045	0.395 ± 0.026
Val67	0.402 ± 0.054	0.398 ± 0.021	Phe120	0.257 ± 0.025	0.320 ± 0.026
Ala68	0.368 ± 0.038	0.353 ± 0.031	Gly121	0.381 ± 0.060	0.461 ± 0.027
Ala69	0.341 ± 0.028	0.303 ± 0.026	Tyr122	0.308 ± 0.032	0.343 ± 0.042
Gln70	0.397 ± 0.049	0.375 ± 0.035	His123	0.334 ± 0.038	0.370 ± 0.017
Tyr71	0.365 ± 0.040	0.413 ± 0.036	Ile125	0.379 ± 0.049	0.289 ± 0.024
Ser72	0.374 ± 0.037	0.363 ± 0.031	Val127	0.368 ± 0.060	0.368 ± 0.033
Glu73	0.295 ± 0.047	0.328 ± 0.036	Glu128	0.334 ± 0.035	0.333 ± 0.021
Asp74	0.375 ± 0.035	0.353 ± 0.038	Gly129	0.297 ± 0.027	0.374 ± 0.017

Anhang C: Austauschraten von Amidprotonen (*hPar14*) gegen Deuteronen in Abwesenheit und Anwesenheit des Modells substrats bei pD 6.5 und 300 K.

Rest	Austauschrate ohne Modells substrat, min ⁻¹	Austauschrate mit Modells substrat, min ⁻¹	Rest	Austauschrate ohne Modells substrat, min ⁻¹	Austauschrate mit Modells substrat, min ⁻¹
Val40	0.0560 ± 0.0135	0.033 ± 0.0086	Ala68	0.0174 ± 0.0025	0.0118 ± 0.0017
Arg41	0.0487 ± 0.0021	0.0267 ± 0.0022	Ala69	0.0422 ± 0.0140	0.0379 ± 0.0046
His42	~ 0.2	0.0268 ± 0.018	Tyr71	0.0201 ± 0.0005	0.0184 ± 0.0033
Ile43	0.0308 ± 0.0308	0.0184 ± 0.0008	Ser72	0.0242 ± 0.0062	0.0108 ± 0.0026
Leu44	0.0213 ± 0.0023	0.013 ± 0.0018	Ala100	0.0343 ± 0.0028	0.0743 ± 0.0080
Cys45	0.0155 ± 0.0018	0.0122 ± 0.0023	Leu101	0.0298 ± 0.0081	~ 0.2
Ile51	0.0160 ± 0.0008	0.0143 ± 0.0014	Val110	0.0195 ± 0.0017	0.0198 ± 0.0016
Met52	0.0211 ± 0.0008	0.0148 ± 0.002	Thr112	0.0471 ± 0.0092	0.0185 ± 0.0010
Glu53	0.0343 ± 0.0049	0.0299 ± 0.0042	Thr118	0.0313 ± 0.0013	0.027 ± 0.003
Ala54	0.0216 ± 0.0017	0.0138 ± 0.0023	Tyr122	0.0249 ± 0.0006	0.0170 ± 0.0012
Met55	0.0217 ± 0.0011	0.0144 ± 0.0014	His123	0.0275 ± 0.0046	0.0174 ± 0.0033
Glu56	0.0171 ± 0.0011	0.0112 ± 0.0012	Ile124	0.0155 ± 0.0013	0.0101 ± 0.0009
Lys57	0.0227 ± 0.0004	0.0158 ± 0.0016	Ile125	0.089 ± 0.0009	0.0065 ± 0.0007
Leu58	0.0152 ± 0.0005	0.0085 ± 0.0008	Val127	0.0171 ± 0.0011	0.0131 ± 0.0019
Lys59	0.0276 ± 0.0008	0.0172 ± 0.0017	Glu128	0.0253 ± 0.0020	0.0192 ± 0.0019
Val67	0.0120 ± 0.0005	0.0068 ± 0.0008			

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Dank sagen, die mir durch Ihre Unterstützung die Anfertigung der vorliegender Arbeit ermöglicht haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Gunter Fischer bedanke ich mich für die Überlassung des interessanten Themas und die für den Fortgang der Arbeiten hilfreichen Hinweise und Diskussionen.

Mein herzlichen Dank gilt Herrn PD Dr. Peter Bayer für die hervorragende Einführung in die Welt der NMR, seine Lehre und die Betreuung der vorliegenden Arbeit.

I would like to cordially thank Tatiana Surmacz for her big open heart and professional advises. I enjoyed friendship and mutual work with her.

Herrn Dr. Jens-Ulrich Rahfeld möchte ich für die Bereitstellung von rekombinantem Protein und konstruktive Diskussionen danken.

Bei Frau Monika Seidel möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und ihre Freundschaft bedanken.

Ich möchte mich bei allen technischen und wissenschaftlichen Mitarbeitern der Max-Planck-Forschungstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ in Halle und der Arbeitsgruppe „Molekulare und strukturelle Biophysik“ am MPI Dortmund für das konstruktive Arbeitsklima bedanken.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Freund bedanken, deren Unterstützung diese Arbeit ermöglichte und erleichterte.

Lebenslauf

Name:		Elena Sekerina
geboren am:		1. Dezember 1976 in Ismajlowo, Gebiet Moskau, Russland
Nationalität:		Russisch
Bildungsgang:		
Schulausbildung:	1983 - 1993	Schule in Mytischki, Gebiet Moskau Abiturzeugnis „Mit Auszeichnung“
Studium:	1993-1998	Studium an der Moskauer medizinischen Akademie, Moskau, Russland Fachrichtung Pharmazie Diplom „Mit Auszeichnung“
	Sep. – Dez. 1997	Gaststudentin für Pharmakoinformatik an der Pharmazeutischen Fakultät der Uni- versität Utrecht, Niederlanden
Wissenschaftliche Aufenthalt:	Okt. 1998 – März 1999	Gastwissenschaftlerin am „Leiden Amsterdam Center for Drug Reseach“, Gorlaeus Laboratorium, Leiden, Niederlanden
Promotion:	Apr. 1999- Jan. 2002	Anfertigung der vorliegenden Disser- tation bei der Forschungsstelle der MPG „Enzymologie der Proteinfaltung“ in Halle und bei der Arbeitsgruppe „Mole- kulare und Strukturelle Biophysik“ am MPI Dortmund

Halle,

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere weiterhin, daß alle anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet sind.

Halle,

.....

Elena Sekerina