

# Konformerspezifität der Proteinphosphatase 2A bei der Dephosphorylierung prolinspezifischer Phosphorylierungsstellen



## Dissertation

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

vorgelegt dem

Fachbereich Biochemie/Biotechnologie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Andreas Werner

geb. am 5. Juni 1971  
in Karl-Marx-Stadt (heute Chemnitz)

Gutachter:

1. Prof. Dr. G. Fischer  
Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft, Halle
2. Prof. Dr. R. Wetzker  
Friedrich-Schiller-Universität Jena, Arbeitsgruppe „Molekulare Zellbiologie“
3. Prof. Dr. E. Mandelkow  
Arbeitsgruppen für Strukturelle Molekularbiologie der Max-Planck-Gesellschaft, Hamburg

Halle (Salle), Oktober 2001

verteidigt am 19. 02. 2002

**urn:nbn:de:gbv:3-000003115**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003115>]

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>I. EINLEITUNG</b> .....	1
1.1 Phosphatgruppentransfer als Regulationsprinzip .....	1
1.2. Die Proteinphosphatase 2A (PP2A) .....	2
1.3. Prolin und prolinspezifische Enzyme .....	7
1.4. Konformationelle Heterogenität nativer Proteine und isomerspezifische Prozesse ...	11
1.5. Zielstellung der Arbeit .....	13
<b>II. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	14
2.1. Verwendete Chemikalien, Peptide und Proteine .....	14
2.2. Proteinreinigung .....	15
2.2.1. Isolierung der PP2A <sub>I</sub> .....	15
2.2.2. Isolierung der katalytischen Untereinheit PP2A <sub>C</sub> .....	15
2.3. Proteinchemische Analyse .....	16
2.3.1. SDS-PAGE .....	16
2.3.2. Sequenzanalyse .....	16
2.3.2.1. Edman-Abbau .....	16
2.3.2.2. Sequenzanalyse mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie .....	17
2.3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration .....	17
2.3.3.1. Titration der aktiven Konzentration an PP2A <sub>I</sub> und PP2A <sub>C</sub> .....	17
2.3.3.2. Titration der aktiven Chymotrypsinkonzentration .....	19
2.4. Messung der Phosphataseaktivität .....	19
2.4.1. Allgemeine Bemerkungen .....	19
2.4.2. Aktivität gegenüber 4-Nitrophenylphosphat (pNPP) .....	20
2.4.2.1. pH-Abhängigkeit des molaren Extinktionskoeffizienten von 4-Nitrophenol .....	20
2.4.2.2. Messungen mit 4-Nitrophenylphosphat .....	20
2.4.3. Aktivität gegenüber Phosphopeptiden .....	21
2.4.3.1. Chymotrypsin gekoppelter Test .....	21
2.4.3.2. HPLC .....	22
2.4.3.3. Molybdat – Ascorbinsäure –Test .....	24
2.5. Untersuchungen zur Isomerspezifität der PP2A .....	25
2.5.1. Isomerspezifische Proteolyse .....	25
2.5.2. Herstellung von <i>cis</i> -Xaa-Xaa-Thr(PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> )-Pro-Phe-NH-Np .....	25
2.5.2.1. Ala-Ala-Thr(PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> )-Pro-Phe-NH-Np .....	25
2.5.2.2. Pro-Leu-Thr(PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> )-Pro-Phe-NH-Np .....	26
2.5.3. Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten $k_{\text{obs}}$ der Isomerisierung von <i>cis</i> -Ala-Ala-Thr(PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> )-Pro-Phe-NH-Np .....	26
2.5.4. Untersuchungen zur Konformerspezifität von Phosphatasen .....	26
<b>III. ERGEBNISSE</b> .....	28
3.1. Reinigung und Charakterisierung der PP2A <sub>I</sub> .....	28
3.1.1. Reinigung der PP2A <sub>I</sub> .....	28
3.1.2. Identifizierung der Untereinheiten .....	30
3.1.3. Isolierung der katalytischen Untereinheit PP2A <sub>C</sub> .....	35

3.1.4. Inhibierbarkeit durch Okadasäure und Calyculin A .....	37
3.1.5. Titration der aktiven Konzentration an PP2A <sub>1</sub> und PP2A <sub>C</sub> .....	38
3.1.6. Beeinflussung der Phosphataseaktivität durch Histon .....	40
3.1.7. Einfluss des pH-Wertes und der Ionenstärke auf die PP2A-Aktivität .....	41
3.2. Untersuchungen zur Substratspezifität der PP2A .....	42
3.2.1. Einfluss der P+1 Position auf die Dephosphorylierung .....	42
3.2.2. Bestimmung der katalytischen Konstanten für ausgewählte Peptide .....	45
3.3. Untersuchungen zur <i>cis/trans</i> Konformerspezifität von Phosphatasen .....	49
3.3.1. Allgemeine Bemerkungen .....	49
3.3.2. Herstellung von <i>cis</i> -Ala-Ala-Thr(PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> )-Pro-Phe-NH-Np .....	50
3.3.3. Bestimmung der Isomerisierungsgeschwindigkeit von <i>cis</i> -Ala-Ala-Thr(PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> )-Pro-Phe-NH-Np bei 0 °C .....	51
3.3.4. Untersuchungen zur Konformerspezifität der PP2A <sub>1</sub> .....	52
3.3.5. Einfluss von Pin1 und seinen Mutanten auf die Dephosphorylierung des Cdc25-Peptids Pro-Leu-Thr(PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> )-Pro-Phe-NH-Np .....	55
<b>IV. DISKUSSION</b> .....	<b>58</b>
4.1. Die PP2A – Isolierung und Substratspezifität .....	58
4.2. Die PP2A – eine prolinspezifische Phosphatase ? .....	64
4.3. Isomerspezifische Dephosphorylierung - ein neuer Regulationsmechanismus .....	68
<b>V. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>76</b>
<b>VI. LITERATUR</b> .....	<b>79</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
Bis-Tris-Propan (BTP)	1,3-bis{tris(Hydroxymethyl)methylamino}propan
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
Cdc25	cell division cycle 25, eine dualspezifische Phosphatase
Cdk	cyclin dependent kinase, Cyclinabhängige Kinase
CHES	2-(N-Cyclohexylamino)ethansulfonsäure
DTT	Dithiothreitol
E <sub>0</sub>	Anfangsenzymkonzentration
IC <sub>50</sub>	Inhibitorkonzentration, die eine 50 %ige Inhibierung des Enzyms bewirkt
k	Geschwindigkeitskonstante
k <sub>cat</sub>	Katalysekonstante
K <sub>i</sub>	Inhibitionskonstante
K <sub>M</sub>	Michaeliskonstante
MAP Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
-NH-Np	4-Nitroanilidrest
-Np	4-Nitrophenylrest
P+1 Position	der Phosphorylierungsstelle C-terminal benachbarte Aminosäure
P <sub>1</sub> , P <sub>2</sub> , P <sub>3</sub> -Position	Aminosäurereste, die mit den Bindungsstellen der Protease wechselwirken, Nomenklatur nach Schechter und Berger (1967)
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
pNPP	4-Nitrophenylphosphat
PP1	Proteinphosphatase-1
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PP2A <sub>1</sub>	heterotrimere PP2A mit einer regulatorischen Untereinheit der B-Familie
PP2A <sub>C</sub>	katalytische Untereinheit der PP2A
PP2A <sub>D</sub>	dimere PP2A aus katalytischer und Strukturuntereinheit
PPIase	Peptidyl-Prolyl <i>cis/trans</i> Isomerase
PR55/PR65	regulatorische Untereinheiten der PP2A (Molekulargewicht ca. 55 bzw. 65 kDa)
pSer/pThr	phosphorylierter Threonin- bzw. Serinrest
PTPA	Protein-Tyrosinphosphatase-Aktivator
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie
S	Substratkonzentration
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
Thr(PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> )/Ser(PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> )	phosphorylierte Threonin- bzw. Serinrest
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
UE	Untereinheit
v	Geschwindigkeit einer Enzymreaktion
Xaa	beliebiger Aminosäurerest

# I. Einleitung

## 1.1 Phosphatgruppentransfer als Regulationsprinzip

Eine Zelle hat während ihres Lebens vielfältige Aufgaben zu erfüllen. Die Voraussetzung für das Funktionieren aller zellulären Abläufe stellt eine genaue Regulation aller beteiligten Prozesse dar. Jahrzehnte nach der Entdeckung der ersten phosphorylierten Proteine und der Regulation von Enzymaktivitäten durch Phosphorylierung am Beispiel der Glycogenphosphorylase (Fischer, E. H. und Krebs, 1955; Sutherland und Wosilait, 1955), ist die überragende Rolle der reversiblen Proteinphosphorylierung bei der Koordination des zellulären Geschehens unumstritten. Die enorme Bedeutung wird durch die große Anzahl von Proteinkinasegenen in eukaryotischen Genomen verdeutlicht. In *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Caenorhabditis elegans* gehören Proteinkinasen zu den Proteinfamilien mit den meisten Vertretern. In allen drei Organismen stellen sie 2 % des Proteoms dar (Rubin et al., 2000). Wahrscheinlich enthalten bis zu 30 % aller zellulären Proteine kovalent gebundenes Phosphat, ein abnormer Phosphorylierungsgrad ist eine der Ursachen oder Konsequenzen häufiger Krankheiten, wie Krebs, Diabetes, Alzheimer oder rheumatischer Arthritis (Cohen, P., 2000). Die Modifikation durch einen Phosphatrest kann ganz unterschiedliche Auswirkungen auf das Zielprotein haben. Sehr häufig reguliert Phosphorylierung die Aktivität von Enzymen (Gabrielli et al., 1997; Sugiura et al., 1999; Davis, R. J., 2000). Des Weiteren werden sowohl die Stabilität (Szilak et al., 1997; Nosworthy et al., 1998; Brondello et al., 1999) als auch die Fähigkeit zur Wechselwirkung mit anderen Proteinen (Di Paolo et al., 1997; Kann et al., 1999) oder DNA (Steege et al., 1996), zur Bindung von Metallionen (Taborsky, 1991) oder zur Translokation zwischen verschiedenen zellulären Kompartimenten (Jans, 1995; Petersen et al., 1999) durch Phosphorylierung beeinflusst. Es sind verschiedene Proteine und Proteindomänen bekannt, die ihre Bindungspartner innerhalb zellulärer Signalkaskaden nur in phosphorylierter Form erkennen (Übersichtsartikel: Yaffe und Cantley, 1999; Yaffe und Elia, 2001; Yaffe und Smerdon, 2001). Beispiele für solche spezifischen Module sind die SH2-Domänen (Schaffhausen, 1995), WW-Domänen (Lu, P. J. et al., 1999b), FHA-Domänen (Durocher et al., 2000) oder 14-3-3 Proteine (Aitken, 1996; Yaffe et al., 1997a).

Die häufigsten Phosphorylierungen in Eukaryoten erfolgen an Seitenketten von Serin-/Threonin- oder Tyrosinresten. Die Dephosphorylierung dieser beiden unterschiedlichen Seitenketten erfolgt nach verschiedenen Mechanismen (Übersichtsartikel: Denu et al., 1996b; Barford et al., 1998). Die Tyrosinphosphatasen bilden nach einem nukleophilen Angriff eines

Thiolat-Anions einer Cysteinseitenkette am Phosphoratom ein kovalentes Phospho-Enzym-Intermediat (Denu et al., 1996a), während bei den Serin/Threonin-Phosphatasen der nukleophile Angriff am Phosphoratom durch ein von zwei Metallionen aktiviertes Wassermolekül erfolgt und es deshalb zu keiner vorübergehenden Übertragung des Phosphates aufs Enzym kommt (Egloff et al., 1995; Griffith et al., 1995).

### 1.2. Die Proteinphosphatase 2A (PP2A)

Die PP2A gehört zusammen mit der PP1, der PP2B (Calcineurin), der PP4 und der PP5 zur PPP-Familie der Protein-Serin/Threonin-Phosphatasen. Die Vertreter dieser Familie haben keinerlei Sequenzhomologie zur PPM-Familie, zu der u.a. die  $Mg^{2+}$ -abhängige PP2C gehört (Übersichtsartikel: Wera und Hemmings, 1995; Barford, 1996; Zolnierowicz und Bollen, 2000).

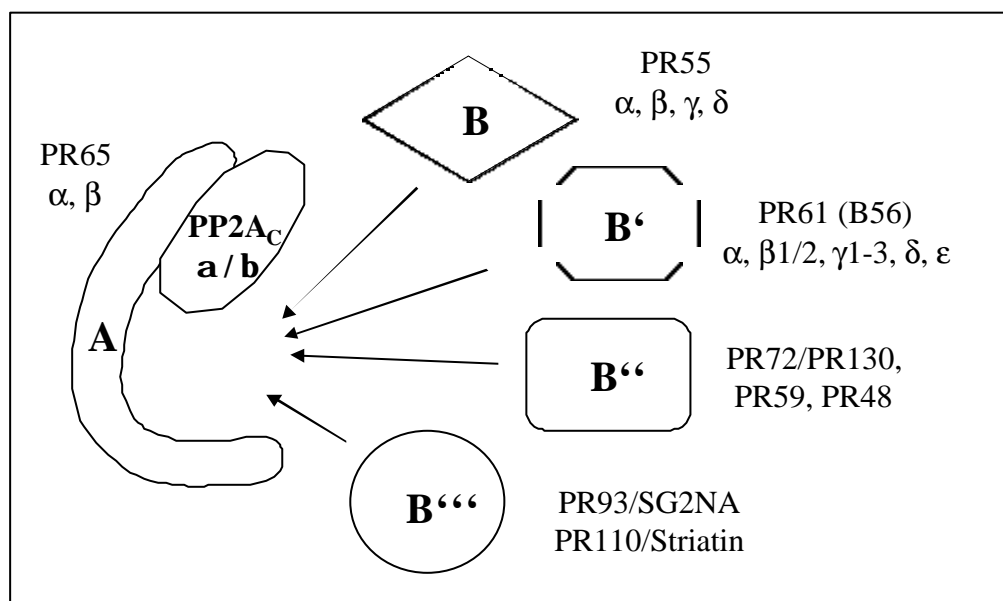
Die PP2A ist ein heterotrimeres Enzym mit vielfältigen zellulären Funktionen (Übersichtsartikel: Mayer-Jaekel und Hemmings, 1994; Goldberg, Y., 1999; Millward et al., 1999; Zolnierowicz, 2000; Virshup, 2000; Sontag, 2001; Janssens und Goris, 2001). Von der katalytischen Untereinheit (PP2A<sub>C</sub>) mit einem ungefähren Molekulargewicht von 36 kDa sind in Säugern zwei Isoformen ( $\alpha$  und  $\beta$ ) bekannt, die sich nur in 8 von insgesamt 309 Aminosäuren unterscheiden (Stone et al., 1987). Beide werden in allen Geweben exprimiert, wobei allerdings die  $\alpha$ -Isoform in höheren Konzentrationen auftritt (Khew-Goodall und Hemmings, 1988). Trotz hoher Sequenzhomologie zur  $\beta$ -Isoform ist die  $\alpha$ -Isoform ein essentielles Protein. Ihre Abwesenheit kann von der  $\beta$ -Isoform nicht vollständig kompensiert werden. So ist z. B. die Deletion der  $\alpha$ -Isoform letal in Mausembryonen (Gotz et al., 1998). Die Ursache dafür scheint die unterschiedliche Lokalisation der beiden Isoformen zu sein (Gotz et al., 2000). Sequenzvergleiche mit PP2A<sub>C</sub> aus niederen Eukaryoten wie *Saccharomyces cerevisiae* (Sneddon et al., 1990), *Schizosaccharomyces pombe* (Kinoshita et al., 1990), *Xenopus laevis* (Vanhoof et al., 1995b), *Drosophila melanogaster* (Orgad et al., 1990) oder Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* (Perezcallejón et al., 1998) und *Brassica napus* (MacKintosh, R. W. et al., 1990) zeigen, dass die PP2A<sub>C</sub> zu den am höchsten konservierten Enzymen während der Evolution gehört.

Die PP2A ist ein Metalloenzym mit  $Fe^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  im aktiven Zentrum (Nishito et al., 1999a; Nishito et al., 1999b).

Die katalytische Untereinheit ist relativ fest mit einer strukturellen Untereinheit von rund 65 kDa (PR65 oder A-Untereinheit) assoziiert, von der in Säugern ebenfalls zwei Isoformen mit

87 % Sequenzidentität vorliegen (Hemmings et al., 1990). Die scheinbare Dissoziationskonstante dieser Wechselwirkung liegt bei ungefähr 85 pM (Turowski et al., 1997).

Kürzlich konnte die dreidimensionale Struktur der A-Untereinheit aufgeklärt werden (Groves et al., 1999). Ihr äußeres Erscheinungsbild ist ein langgestrecktes, hakenförmig gebogenes Molekül. Sie besteht aus einer Abfolge von 15 HEAT-Motiven von 39 Aminosäuren Länge. HEAT (*huntingtin/ elongation/ A subunit/ target of rapamycin*)-Motive wurden nach den ersten Proteinen benannt, in denen sie gefunden wurden (Andrade und Bork, 1995; Groves und Barford, 1999). Sie sind repetitive Sequenzen mit einer Länge von 37-43 Aminosäuren, die in Proteinen in 3- bis 22-facher Wiederholung gefunden wurden. Alle 15 HEAT-Motive der A-Untereinheit bilden prinzipiell eine ähnliche Struktur, nämlich zwei antiparallele Helices. Diese sind parallel zu ihren Gegnern im benachbarten Motiv angeordnet, so dass sich eine Struktur ergibt, die an eine Doppelschicht aus  $\alpha$ -Helices erinnert. Die Loops zwischen beiden Helices eines Motives enthalten konservierte Aminosäuren und exponierte hydrophobe Oberflächen und stellen somit wahrscheinlich die Interaktionsstellen mit katalytischer und regulatorischer Untereinheit dar.



**Abb. 1.1** Zusammensetzung der PP2A-Holoenzyme

Griechische Buchstaben zeigen verschiedene Isoformen an. Eine Nummerierung bedeutet die Existenz mehrerer Spleißvarianten eines Gens.

Das Dimer aus katalytischer und A-Untereinheit (auch Kerndimer oder PP2A<sub>D</sub>) stellt bereits einen Teil der zellulär vorhandenen PP2A dar (Kremmer et al., 1997). Das komplette heterotrimere Holoenzym wird durch Assoziation des Dimers mit einer regulatorischen

Untereinheit gebildet. Bisher sind in Säugern drei verschiedene Familien von Untereinheiten (B/PR55, B'/PR61/B56 und B''/PR72) bekannt, die untereinander keine Sequenzhomologie aufweisen. Alle Familien bestehen aus verschiedenen Isoformen, von denen zum Teil mehrere Spleißvarianten existieren (**Abb. 1.1**). Trimere Holoenzyme mit B-Untereinheit werden oft auch als PP2A<sub>1</sub>, solche mit B'-Untereinheit häufig als PP2A<sub>0</sub> bezeichnet.

Die vier Isoformen der B-Familie werden gewebespezifisch exprimiert (Mayer et al., 1991; Zolnierowicz et al., 1994; Strack et al., 1999) und enthalten 6 WD-Repeats (Neer et al., 1994). Diese schwach konservierten Sequenzmotive aus ungefähr 40 Aminosäuren dienen wahrscheinlich der Interaktion mit anderen Proteinen (Smith, T. F. et al., 1999). So wurde für die B $\alpha$ -Untereinheit eine Assoziation mit dem Typ1-TGF- $\beta$ -Rezeptor gezeigt, die in einer Phosphorylierung der Phosphataseuntereinheit durch die Rezeptorkinase resultiert (Griswold-Prenner et al., 1998).

Die B'-Familie besteht aus mindestens vier Genprodukten (McCright und Virshup, 1995; Csortos et al., 1996; Tehrani et al., 1996). Ihre Vertreter besitzen einen homologen zentralen Bereich, der wahrscheinlich für die Interaktion mit dem PP2A-Dimer verantwortlich ist, und variable N- und C-Termini (Zolnierowicz et al., 1996). Fast alle Vertreter sind *in vivo* Phosphoproteine, die in unterschiedlichen Kompartimenten lokalisiert sind (McCright et al., 1996).

Zur Familie der B''-Untereinheiten gehören die Proteine PR72 und PR130, die wahrscheinlich Spleißprodukte eines Gens sind (Hendrix et al., 1993a) sowie die vor kurzem mittels Hefe-Zwei-Hybrid System identifizierte Proteine PR59 und PR48 (Voorhoeve et al., 1999; Yan et al., 2000).

Kürzlich wurde die Existenz einer vierten Untereinheitsfamilie B''' postuliert. Die beiden Vertreter Striatin und SG2NA (*S/G<sub>2</sub> nuclear autoantigen*) enthalten konservierte Epitope, die auch in der B'-Familie zu finden sind, besitzen WD-Repeats wie die B-Familie und interagieren mit PP2A<sub>D</sub> (Moreno et al., 2000).

Ein weiteres Protein, welches an die dimere (und in geringerem Maße an die monomere) PP2A bindet, ist der PTPA (Protein-Tyrosinphosphatase-Aktivator) (Cayla et al., 1990). Seit langem ist bekannt, dass die PP2A eine intrinsische Tyrosinphosphataseaktivität besitzt, die sich von der Serin-/Threoninaktivität hinsichtlich ihrer katalytischen Eigenschaften und Thermostabilität unterscheidet (Hermann et al., 1988; Goris et al., 1988). Der PTPA aktiviert die Tyrosinphosphataseaktivität der dimeren PP2A, ohne die Aktivität gegenüber Phosphoserin-/Phosphothreonin substraten zu beeinflussen. Er wurde ursprünglich aus



Kaninchenmuskel isoliert, homologe Proteine existieren aber auch im Krallenfrosch, in der Fruchtfliege und in Hefe (Hoof et al., 1994; Vanhoof et al., 1995a; Hoof et al., 2000).

Ein weiterer Effektor der PP2A in Säuger- und Hefezellen ist der *second messenger* Ceramid. Eine Aktivierung der Phosphatase durch Ceramide ist für die monomere, dimere sowie die trimere Form der PP2A beschrieben (Law und Rossie, 1995; Dobrowsky et al., 1993). Zelluläre Ziele der Ceramid-aktivierten PP2A sind die Transkriptionsfaktoren c-myc (Wolff et al., 1994) und c-Jun (Reyes et al., 1996) sowie das antiapoptotische Protein Bcl2 (Ruvolo et al., 1999).

Für die PP2A existieren zwei zelluläre hitzestabile Proteininhibitoren, die in Analogie zu Inhibitoren der PP1 als  $I_1^{PP2A}$  und  $I_2^{PP2A}$  bezeichnet wurden (Li et al., 1995). Sie inhibieren alle Holoenzymformen der PP2A durch Bindung an die katalytische Untereinheit. Interessanterweise können beide Inhibitoren in Gegenwart von  $Mn^{2+}$  die Aktivität der PP1 gegenüber ausgewählten Substraten stimulieren (Katayose et al., 2000). Möglicherweise sind die beiden Proteine an der Koordination verschiedener zellulärer Phosphatasen oder Signalwege beteiligt.

Außerdem wird die PP2A *in vivo* durch posttranslationale Modifikationen reguliert. Die katalytische Untereinheit wird am C-terminalen Leucinrest reversibel methyliert (Lee und Stock, 1993; Xie und Clarke, 1994). Mittlerweile sind die spezifische Methyltransferase und Methylesterase identifiziert (Baere et al., 1999; Ogris et al., 1999). Der Methylierungsgrad ist in bestimmten Phasen des Zellzyklus ( $G_0/G_1$ - und  $G_1/S$ -Übergang) erniedrigt (Turowski et al., 1995). Welche Rolle die Methylierung bei der Regulation der PP2A spielt, bedarf allerdings weiterer Untersuchung. Kontrovers diskutiert wird im Moment der Einfluss auf die Phosphataseaktivität. Methylierung verursachte sowohl geringe Aktivierung (Favre et al., 1994) als auch Inaktivierung (Zhu et al., 1997) der PP2A oder blieb ohne Einfluss auf die Aktivität (Baere et al., 1999). Wahrscheinlich reguliert die Methylierung die Phosphataseaktivität nicht direkt, sondern indirekt, indem sie die Zusammensetzung des Holoenzym beeinflusst (Tolstykh et al., 2000; Wu et al., 2000; Ogris et al., 1997; Chung et al., 1999).

Die Enzymaktivität der PP2A<sub>C</sub> wird außerdem durch Phosphorylierung reguliert. Die katalytische Untereinheit kann von den Tyrosinkinasen pp60<sup>v-src</sup>, pp56<sup>lck</sup>, EGF- und Insulinrezeptor am Tyr<sup>307</sup> *in vitro* phosphoryliert und damit inaktiviert werden (Chen, J. et al., 1992). *In vivo* wurde diese Phosphorylierung transient beobachtet in aktivierten humanen T-Zellen, nach EGF-Stimulation oder Transformation von Fibroblasten mit pp60<sup>v-src</sup> (Chen, J. et al., 1994) sowie nach Stimulation von Muskelzellen mit Insulin (Begum und Ragolia, 1999).

*In vitro* wurde außerdem eine Threoninphosphorylierung durch die *autophosphorylation activated protein kinase* gefunden (Guo und Damuni, 1993). Bisher sind weder die genaue Phosphorylierungsstelle noch die physiologische Funktion bekannt. Allerdings führte die Phosphorylierung ebenfalls zur Inaktivierung der PP2A<sub>C</sub> (Damuni et al., 1994). Neben der katalytischen Untereinheit werden auch die regulatorischen Untereinheiten (besonders der B'-Familie) phosphoryliert (McCright et al., 1996). Für die PR61 $\alpha$  wurde eine Interaktion mit der PKR (*double-stranded-RNA-dependent protein kinase*) *in vitro* und *in vivo* gezeigt. Die Phosphorylierung erhöhte die Aktivität der trimeren PP2A gegenüber den untersuchten Proteinsubstraten (Xu und Williams, 2000). Auch für die 74 kDa B'' $\delta$  Untereinheit ist eine *in vitro*-Phosphorylierung durch Proteinkinase A an mehreren Positionen und damit einhergehende Änderung der katalytischen Aktivität beschrieben worden (Usui et al., 1998).

Die PP2A ist ein essentielles Enzym, das an der Regulation von fast allen zellulären Prozessen beteiligt ist (Janssens und Goris, 2001). Eine große Erleichterung bei der Suche nach der Funktion der PP2A und anderer Protein-Serin/Threoninphosphatasen *in vivo* brachte die Anwendung natürlich vorkommender Inhibitoren. Der meistgenutzte ist die Okadasäure, ein aus marinen Dinoflagellaten isolierter Polyether (Cohen, P. et al., 1990). Sie inhibiert die PP2A mit einem K<sub>i</sub> von 0.2 nM und die PP1 mit einem K<sub>i</sub> von 2 nM, während Calcineurin wesentlich schlechter (K<sub>i</sub> = 10  $\mu$ M) und die PP2C gar nicht inhibiert wird. Auch die Tyrosinphosphataseaktivität der PP2A wird mit Okadasäure mit vergleichbarem K<sub>i</sub> inhibiert (Takai und Mieskes, 1991). Neben der Okadasäure existieren noch andere natürliche Phosphataseinhibitoren, wie z.B. Calyculin A, Microcystin, Nodularin, Tautomycin, Cantharidin, die die Phosphatasen unterschiedlich gut inhibieren (MacKintosh, C. R. W., 1994; Zolnierowicz, 2000). Die Anwendung dieser Inhibitoren zur Untersuchung der *in vivo* Funktion einzelner Phosphatasen ist trotz der unterschiedlichen Inhibierungskonstanten sicher problematisch, da die exakte Einstellung einer intrazellulären Inhibitorkonzentration schwierig ist, und außerdem mehrere der in letzter Zeit neu entdeckten Proteinphosphatasen ebenfalls sensitiv gegenüber diesen Inhibitoren sind (Cohen, P. T. W., 1997). Trotzdem sind wahrscheinlich Effekte, die durch Verabreichung solcher Inhibitoren erzielt wurden, auf die Inhibierung sensitiver Phosphatasen zurückzuführen. (Tapia et al., 1999; Kim et al., 1999; Pryde et al., 1998; Sonoda et al., 1997).

Der Aufbau der PP2A aus verschiedenen Untereinheiten ermöglicht eine Regulation durch unterschiedliche Zusammensetzung des Holoenzym. Tatsächlich entscheidet in vielen Fällen

die variable Untereinheit über Enzymaktivität gegenüber bestimmten Substraten und die zelluläre Lokalisation.

Für alle drei Untereinheiten der PP2A sind eine Vielzahl von Wechselwirkungspartnern beschrieben, von denen jeder spezifische Auswirkungen hat (Übersichtsartikel: Millward et al., 1999; Janssens und Goris, 2001). Einige beeinflussen die Aktivität/ Substratspezifität oder die Lokalisation, wie die Inhibitoren  $I_1^{PP2A}$  und  $I_2^{PP2A}$  (Li et al., 1995), der Transkriptionsfaktor HOX11 (Kawabe et al., 1997), der Terminationsfaktor eRF1 (Andjelkovic et al., 1996) oder die viralen Proteine E4orf4 (Shtrichman et al., 1999) und vpr (Hrimech et al., 2000); andere sind Substrate, wie z.B. das Filamentprotein Vimentin (Turowski et al., 1999), die p70 S6 Kinase (Westphal et al., 1999), die  $Ca^{2+}$ /Calmodulin abhängige Kinase IV (Westphal et al., 1998) oder das Mikrotubuli-assoziierte Protein tau (Sontag et al., 1999). Für die Caspase 3 (Santoro et al., 1998), die PKR (Xu und Williams, 2000), die PP2A-Methylesterase-1 (Ogris et al., 1999) und die Janus-Kinase-2 (Begum und Ragolia, 1999) stellt die PP2A selbst ein Substrat dar.

### 1.3. Prolin und prolinspezifische Enzyme

Unter den 20 proteinogenen Aminosäuren nimmt Prolin als einzige Iminosäure eine besondere Position ein. Das an der Peptidbindung zur vorherigen Aminosäure beteiligte Stickstoffatom ist gleichzeitig Teil eines relativ starren Pyrrolidinringes und kann außerdem nicht mehr als Wasserstoffbrückendonator wirken. Die Drehbarkeit um die N-C $\alpha$ -Bindung ist sehr stark eingeschränkt. Diese einzigartigen Eigenschaften des Prolins haben strukturelle Konsequenzen in Proteinen. In Polypeptidketten wird Prolin häufig als N-terminale Begrenzung von  $\alpha$ -Helices (Forood et al., 1993), als Helixbrecher (Gunasekaran et al., 1998) oder in  $\beta$ -Schleifen (Rose et al., 1985) gefunden.

Aufgrund der von anderen Aminosäuren abweichenden Eigenschaften können prolinhaltige Substrate von Enzymen oft nicht oder nur mit geringer Effizienz umgesetzt werden. So verhindert z. B. die Anwesenheit eines Prolins in bestimmten Positionen innerhalb einer Polypeptidkette die Hydrolyse durch die meisten Peptidasen und Proteasen (Yaron und Naider, 1993; Perona und Craik, 1995). Serin- und Threoninreste mit C-terminal benachbartem Prolin können von den meisten Protein-Serin/Threonin Kinasen nicht phosphoryliert werden (Pinna und Ruzzene, 1996). Sowohl im Fall der Peptidasen als auch der Kinasen existieren prolinspezifische Vertreter, die im aktiven Zentrum auf die Erkennung und Umsetzung prolinhaltiger Substrate spezialisiert sind. Die prolinspezifischen Peptidasen

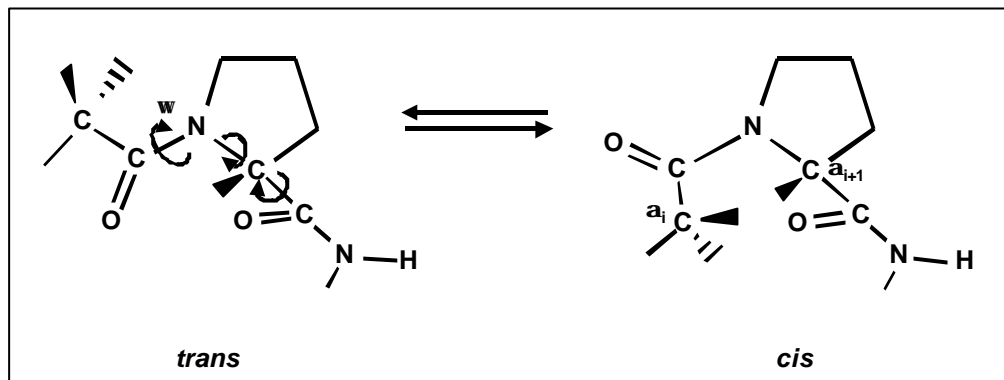
hydrolysieren ihre Substrate entweder N-terminal vom Prolin (Prolidase, Aminopeptidase P, HIV-Protease) oder C-terminal vom Prolin (Prolinase, Prolin-Imino-peptidase, Prolyl-Oligopeptidase, Carboxypeptidase P) (Medrano et al., 1998; Yaron und Naider, 1993; Cunningham und Oconnor, 1997).

Die Phosphorylierung von Ser/Thr-Pro Motiven wird von prolinspezifischen Kinasen katalysiert, die im Lauf der letzten Jahre immer mehr in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt sind, weil alle Vertreter der beiden bekannten Familien Schlüsselpositionen innerhalb zellulärer Signalkaskaden besetzen. Die cyclinabhängigen Proteinkinasen sind entscheidend an der Regulation des Zellzyklus beteiligt, besonders beim Übergang zwischen den einzelnen Phasen (Pines, 1995; Morgan, 1997; Yang und Kornbluth, 1999). Beim Eintritt in die Mitose werden durch die stark erhöhte Aktivität der Cdc2 Kinase eine Vielzahl von Proteinen an Ser/Thr-Pro Motiven phosphoryliert und damit die nachfolgenden mitotischen Prozesse ausgelöst (Norbury und Nurse, 1992). Die Konsensussequenz für die Phosphorylierung durch die Cdc2 Kinase ist -Ser/Thr-Pro-Xaa-Lys/Arg-.

Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP Kinasen) sind Schlüsselenzyme eines Netzwerkes, das der Weiterleitung von Signalen von der Zelloberfläche zum Zellkern dient (Schaeffer und Weber, 1999; Garrington und Johnson, 1999). Die MAP Kinase ERK2 phosphoryliert ihre Substrate vorwiegend an Motiven der Sequenz -Leu/Pro-Xaa-Ser/Thr-Pro-.

Die Verknüpfung zweier Aminosäuren über eine Peptidbindung trägt partiellen Doppelbindungscharakter. Daraus resultiert die planare Anordnung der Peptidbindung und ein mögliches Vorliegen in *cis* oder *trans* Konformation ( $\omega = 0$  bzw.  $180^\circ$ ) (**Abb. 1.2**). Während in nicht prolinhaltigen Peptidbindungen das *trans* Konformer energetisch bevorzugt ist, sind in Peptidyl-Prolyl Bindungen beide Konformere von vergleichbarer thermodynamischer Stabilität (Stein, 1993). Das führt zu einer stark erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Peptidyl-Prolyl Bindungen in *cis* Konformation (MacArthur und Thornton, 1991; Fischer, G., 2000). Aufgrund einer hohen Rotationsbarriere von ungefähr 80–90 kJ/mol ist die *cis/trans*-Isomerisierung von Prolylbindungen ein relativ langsamer Prozess, der allerdings von Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen (PPIasen) katalysiert werden kann (Übersichtsartikel: Fischer, G., 1994; Galat und Metcalfe, 1995; Hunter, 1998; Gothel und Marahiel, 1999; Schiene und Fischer, 2000).

Die Einteilung der PPIasen in die Familien der Cyclophiline, der FK506 bindenden Proteine (FKBPs) und der Parvuline beruht auf spezifischen Inhibitoren und Sequenzhomologien innerhalb der Familien. Cyclophiline werden spezifisch von Cyclosporin A, FKBPs von FK506 und Rapamycin inhibiert. Parvuline können durch Juglon inhibiert werden, allerdings beinhaltet diese Inhibierung eine irreversible Modifikation von Cysteinseitenketten und ist deshalb nicht unbedingt spezifisch für diese Enzymfamilie (Hennig et al., 1998).



**Abb. 1.2** Die *cis/trans* Isomerisierung der Peptidyl-Prolyl Bindung (nach Fischer, G., 1994)

Vertreter der Parvulinfamilie sind mittlerweile aus vielen Organismen bekannt (Übersichtsartikel: Schelbert, 2001). Aus verschiedenen Prokaryoten konnten neben dem namensgebenden Parvulin10 aus *E. coli* (Rahfeld et al., 1994b; Rahfeld et al., 1994a) mehrere homologe Proteine mit unterschiedlicher Lokalisation und Funktion beschrieben werden (Lazar und Kolter, 1996; Dartigalongue und Raina, 1998; Kontinen und Sarvas, 1993).

In Eukaryoten können hinsichtlich der Spezifität für phosphorylierte Substrate zwei Klassen von Parvulinen unterschieden werden. Von großer Bedeutung für diese Arbeit sind diejenigen Parvuline, die bevorzugt die Isomerisierung von Prolylbindungen in phosphorylierten Substraten katalysieren. Zu ihnen gehören die Proteine Pin1 aus Mensch (Lu, K. P. et al., 1996), Maus (Fujimori et al., 1999), und *Xenopus laevis* (Winkler et al., 2000), Ess1/Ptf1 aus *Saccharomyces cerevisiae* (Hani et al., 1995), Dodo aus *Drosophila melanogaster* (Maleszka et al., 1996), PINA aus *Aspergillus nidulans* (Crenshaw et al., 1998), SspI aus *Neurospora crassa* (Kops et al., 1998), sowie AtPin1 aus *Arabidopsis thaliana* (Landrieu et al., 2000), DPar13 aus *Digitalis lanata* (Metzner et al., 2001) und MdPin1 aus *Malus domestica* (Yao et al., 2001). Kürzlich wurde mit dem humanen Parvulin14 das erste eukaryotische Parvulin identifiziert, das nicht pSer(pThr)-spezifisch ist, sondern positiv geladene Aminosäuren vorm Prolin bevorzugt (Uchida et al., 1999), obwohl die Proteinstruktur große Ähnlichkeit zur Isomerase-domäne von hPin1 aufweist (Sekerina et al., 2000; Terada et al., 2001).

Pin1 wurde ursprünglich entdeckt als Bindungspartner der NIMA Kinase, die in *Aspergillus nidulans* essentiell an der Mitose beteiligt ist (Lu, K. P. et al., 1996). Das homologe Protein aus Hefe Ptf1 wurde entdeckt bei einer Suche nach essentiellen Faktoren, die an der mRNA 3'-Prozessierung/Transkriptionstermination in *S. cerevisiae* beteiligt sind (Hani et al., 1999). Humanes Pin1 besteht aus 163 Aminosäuren, die eine N-terminale WW-Domäne und eine C-terminale PPIase-Domäne bilden (Übersichtsartikel: Zhou et al., 1999). WW-Domänen vermitteln Proteininteraktionen durch Bindung von prolinhaltigen Motiven. Sie werden aufgrund ihrer Spezifitäten in verschiedene Gruppen aufgeteilt (Sudol und Hunter, 2000). Ihr charakteristisches Merkmal sind zwei Tryptophanreste im Abstand von 20-22 Aminosäuren. Die dreidimensionale Struktur wird von einem dreisträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt gebildet (Zarrinpar und Lim, 2000). Die Erkennung und Bindung von Wechselwirkungspartnern durch die WW-Domäne von Pin1 setzt die Phosphorylierung von Ser/Thr-Pro-Motiven durch prolinspezifische Kinasen in den Substraten voraus (Lu, P. J. et al., 1999b). Vor kurzem konnte die Struktur von humanem Pin1 im Komplex mit dem an der WW-Domäne gebundenen Peptid Tyr-pSer-Pro-Thr-pSer-Pro-Ser gelöst werden (Verdecia et al., 2000). Dieses Peptid entspricht dem phosphorylierten Heptamer, das in vielfacher Wiederholung die C-terminale Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II bildet und dort wahrscheinlich das Bindungsmotiv für Pin1 darstellt (Morris et al., 1999). Bei allen bisher bekannten pflanzlichen Pin1-homologen Proteinen fehlt die WW-Domäne (Landrieu et al., 2000; Metzner et al., 2001; Yao et al., 2001).

Die PPIase-Aktivität von Pin1 ist gekennzeichnet durch eine sehr deutliche Bevorzugung von phosphorylierten Serin- oder Threoninresten N-terminal vom Prolin (Yaffe et al., 1997b). Die Überexpression von Pin1 in HeLa Zellen und *Xenopus*-Extrakten bewirkt eine Inaktivierung der Phosphatase Cdc25 und verhindert damit den Eintritt in die Mitose (Lu, K. P. et al., 1996; Shen et al., 1998). Die Depletion in *S. cerevisiae* oder HeLa Zellen führt zu einem Arrest in der Mitose (Lu, K. P. et al., 1996). Pin1 ist in humanen Tumoren überexprimiert und an der Regulation der Transkriptionsaktivität von c-Jun gegenüber Cyclin D1 beteiligt (Wulf et al., 2001). Es interagiert mit einer Vielzahl regulatorischer Proteine, u. a. Cdc25, Wee1, Myt1, Plk1 (Shen et al., 1998), rab4 (Gerez et al., 2000), mit der C-terminalen Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II (Albert et al., 1999) und dem Transkriptionsfaktor NFAT (Liu et al., 2001) sowie mit dem Mikrotubuli-assoziierten Protein tau (Lu, P. J. et al., 1999a). Die Voraussetzung für die Interaktion ist die Phosphorylierung der Zielproteine an prolinspezifischen Phosphorylierungsstellen. Mit dem Antikörper MPM-2, der ebenfalls pSer/pThr-Pro Motive erkennt, konnte gezeigt werden, dass sich die Anzahl dieser Epitope

am G<sub>2</sub>/M-Übergang des Zellzyklus aufgrund der erhöhten Aktivität der prolinspezifischen Proteinkinasen um ein Vielfaches erhöht (Davis, F. M. et al., 1983; Stukenberg et al., 1997; Yaffe et al., 1997b).

#### 1.4. Konformationelle Heterogenität nativer Proteine und isomerspezifische Prozesse

Einige Proteine existieren in mehreren nativen Zuständen, die sich nur in der Konformation einer oder mehrerer Peptidbindungen voneinander unterscheiden. Diese durch *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidbindungen hervorgerufene konformationelle Heterogenität wird auch als *native-state* Isomerisierung bezeichnet (Schiene, 1999). Einige Beispiele für Proteine, die in mehreren isomeren Formen vorliegen, sind die Staphylokokken-Nuklease (Evans, P. A. et al., 1987), das Calcium bindende Protein Calbindin D<sub>9k</sub> (Chazin et al., 1989), verschiedene Toxine (O'Keefe et al., 1996; Adjadj et al., 1997; Dementieva et al., 1999), das Cytokin Interleukin-3 (Feng et al., 1997), eine Lipase aus *Candida rugosa* (Grochulski et al., 1994), die Adenylat Kinase (Sheng et al., 1997), der Gerinnungsfaktor Prothrombin (Evans, T. C. und Nelsestuen, 1996), das HIV-1 Capsid Protein (Gitti et al., 1996), das Vitamin K-abhängige Protein S (Muranyi et al., 2000), die TB- (*transforming growth factor b binding protein-like*) Domäne (Yuan et al., 1998), der Angiotensin II AT<sub>1A</sub> Rezeptor (Franzoni et al., 1999), verschiedene Lectine (Ng und Weis, 1998; Bouckaert et al., 2000) sowie Cytochrom c554 aus *Nitrosomonas europaea* (Iverson et al., 2001). In vielen der aufgezählten Beispiele hat die Isomerisierung einer Peptidbindung beträchtliche strukturelle oder funktionelle Folgen für das Protein. Am Beispiel des Subtilisins E konnte kürzlich gezeigt werden, dass aus einer Aminosäuresequenz zwei strukturell unterschiedliche native Proteine mit verschiedener Sekundärstruktur, Thermostabilität und Substratspezifität entstehen können (Shinde et al., 1997).

In letzter Zeit konnte an mehreren Beispielen gezeigt werden, dass die durch eine relativ hohe Rotationsbarriere getrennten *cis* und *trans* Konformere in biochemischen Reaktionen unterschiedlich reagieren. Für viele Proteasen wurde eine ausgeprägte Selektivität für das *trans* Konformer in prolinhaltigen Substraten festgestellt, dabei ist die Selektivität keineswegs auf die zu hydrolysierende Peptidbindung beschränkt. Auch die Konformation weiter entfernt liegender Bindungen (z. B. zwischen P<sub>2</sub> und P<sub>3</sub> Position) ist entscheidend für eine effiziente Hydrolyse des Substrates (Fischer, G. et al., 1984a; Merker et al., 1993; Yaron und Naidar, 1993; Vance et al., 1997). Für den intestinalen H<sup>+</sup>/Peptid Symporter PEPT1 konnte gezeigt werden, dass er selektiv *trans* Konformere von Dipeptiden bindet und transportiert (Brandsch

et al., 1998). Auch die Bindung von Peptiden an Peptidrezeptoren ist sensitiv gegenüber der Konformation des Peptidrückgrates. Die Rezeptor-bindende bioaktive Form kann sowohl das *cis* Konformer (Liakopoulou-Kyriakides und Galardy, 1979; Yamazaki et al., 1993; Frank, 1999), als auch das *trans* Konformer sein (Ottleben et al., 1997; Tong et al., 2000). Im Fall des Hormons Oxytocin binden möglicherweise *cis* und *trans* Konformer am Rezeptor, wirken aber unterschiedlich, das *trans* Konformer als Agonist und das *cis* Konformer als Antagonist (Belec et al., 2000). Auch Antikörper sind in der Lage, zwischen *cis* und *trans* Konformeren von Xaa-Pro Bindungen in linearen und zyklischen Peptiden zu unterscheiden (Wittelsberger et al., 2000).

Indirekte Hinweise auf isomerspezifische Reaktionen liefern Untersuchungen, bei denen katalytisch aktive PPIasen andere Proteine beeinflussen. So werden zum Beispiel der EGF- und der TGF $\beta$ -Rezeptor von der PPIase FKBP12 reguliert. In beiden Fällen wird bei Verwendung katalytisch inaktiver Mutanten oder in Anwesenheit der FKBP12-Inhibitoren FK506 oder Rapamycin kein FKBP12-Effekt beobachtet (Lopezilasaca et al., 1998; Chen, Y. G. et al., 1997).



### 1.5. Zielstellung der Arbeit

Durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen werden eine Vielzahl zellulärer Prozesse reguliert. Sowohl die beteiligten Kinasen und Phosphatasen als Katalysatoren der Reaktion, als auch die Auswirkungen der posttranslationalen Modifikation auf die Zielproteine werden seit langer Zeit intensiv untersucht. Über die für die Phosphorylierung von Ser/Thr-Pro Motiven verantwortlichen prolinspezifischen Kinasen konnten in letzter Zeit viele neue Erkenntnisse gewonnen werden. Für viele Vertreter der MAP Kinasen und der cyclinabhängigen Kinasen konnten die Signalkaskaden, die zu ihrer Aktivierung führen, vervollständigt oder *in vivo* Substrate identifiziert werden. Verglichen mit dem Wissen über prolinspezifische Kinasen ist wenig darüber bekannt, wie die Dephosphorylierung der pSer/pThr-Pro Motive erfolgt. Einige der bekannten Proteinphosphatasen sind zwar durchaus in der Lage, diese Motive zu dephosphorylieren, jedoch werden in allen Fällen nicht prolinhaltige Substrate wesentlich effizienter umgesetzt. Deshalb ist es durchaus vorstellbar, dass bisher unbekannte Phosphatasen existieren, die als direkte Gegenspieler der prolinspezifischen Kinasen wirken. Aus diesem Grund sollte eine Proteinphosphatase mit hoher Aktivität gegenüber pSer/pThr-Pro Motiven isoliert und charakterisiert werden. Die Substratspezifität sollte mit Hilfe verschiedener Peptide näher untersucht werden.

Ein weiterer wesentlicher Teil bestand in der Untersuchung der Konformerspezifität der gereinigten Phosphatase. Die Besonderheiten der Peptidyl-Prolyl Bindung fördern das gleichzeitige Auftreten von *cis* und *trans* Konformer in Peptiden und Proteinen. An Peptiden konnte gezeigt werden, dass sowohl die Dynamik des Peptidrückgrates, als auch die Lage des Isomerengleichgewichtes durch Phosphorylierung beeinflusst wird. In dieser Arbeit sollte zum ersten Mal untersucht werden, ob die Dephosphorylierung prolinspezifischer Motive konformerspezifisch verläuft. Die einzigen bisher bekannten Enzyme, die während ihres Katalysezyklusses zwischen *cis* und *trans* Konformer unterscheiden, sind die Proteasen. Sollten die beiden Konformere des pSer/pThr-Pro Motives bei der Dephosphorylierung unterschiedlich reagieren, könnten sich aus dem Zusammenspiel von Phosphatasen (und möglicherweise Kinasen) und Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen völlig neue Regulationsmechanismen für Proteine ergeben.

## II. Material und Methoden

### 2.1. Verwendete Chemikalien, Peptide und Proteine

Alle gängigen Chemikalien, Puffer und Salze stammen aus den üblichen kommerziellen Quellen. Weiterhin wurden verwendet:

Fluka (Deisenhofen):	<i>p</i> NPP (Dinatriumsalz) Diisopropylfluorophosphat
Biomol (Hamburg):	Okadasäure Calyculin A
Merck (Darmstadt):	Trypsin (aus Rinderpankreas) Chromatographiematerialien: Fractogel EMD-Propyl 650(S); EMD DEAE 650(M); TSK HW-55(S)
Boehringer Mannheim (Mannheim):	Chymotrypsin Endoproteinase Lys C ( <i>sequencing grade</i> ) Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm) Saure Phosphatase (aus Kartoffel)
Sigma (Deisenhofen):	Eglin C Subtilisin (bakterielle Protease Typ VIII) Histon H1 (aus Kälberthymus)

Humanes rekombinantes Pin1 wurde freundlicherweise von Dr. J. Rahfeld und Dr. G. Stoller, die verwendeten Pin1-Mutanten (Glutathion S-Transferase-Fusionsproteine) von der Arbeitsgruppe um K. P. Lu (Boston) zur Verfügung gestellt.

Die Peptide Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np und Ala-Ala-Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np wurden nach üblichen Verfahren in Lösung synthetisiert (Werner, 1996). Die Peptide der Serie Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Xaa-Phe-Gly-NH<sub>2</sub> wurden freundlicherweise von M. Drewello nach Synthese an der festen Phase als Rohpeptide zur Verfügung gestellt. Sie wurden vor ihrer Verwendung über präparative HPLC aufgereinigt.

Alle weiteren verwendeten Peptide wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Dr. M. Schutkowski / Dr. F. Bordusa synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

## 2.2. Proteinreinigung

### 2.2.1. Isolierung der PP2A<sub>1</sub>

Die Isolierung der PP2A<sub>1</sub> erfolgte aus frischem Schweinehirn, das bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert wurde. Alle Reinigungsschritte wurden bei 6 °C durchgeführt. 150 g Schweinehirn wurden zerkleinert und nach Zugabe von 300 ml Puffer A (50 mM Tris/HCl, 1 mM DTT, pH 7.5) homogenisiert. Nach Ultrazentrifugation (60 min, 100000 × g) wurde zum Überstand langsam unter ständigem Rühren Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 25 % zugegeben und danach weitere 30 min gerührt. Die ausgefallenen Proteine wurden durch Zentrifugation entfernt (45 min, 100000 × g). Der Überstand wurde auf eine Fractogel EMD-Propyl 650(S)-Säule (20 × 2.5 cm, equilibriert mit zu 25 % gesättigtem Ammoniumsulfat in Puffer A) aufgetragen. Nach gründlichem Spülen der Säule mit Equilibrierungspuffer wurden die gebundenen Proteine mit einem 540 ml Gradienten (25 – 0 % Ammoniumsulfat, 0 – 30 % (v/v) Ethylenglykol, 0 – 0.1 % (v/v) Triton X-100,) bei einer Flußrate von 2 ml/min eluiert. Die Fraktionen mit Phosphataseaktivität gegenüber dem Peptid Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np wurden vereint, über Nacht gegen 6 l Puffer B (10 mM Tris/HCl, 1 mM DTT, 0.1 % (v/v) Triton X-100, pH 7.5) dialysiert und auf eine Fractogel EMD-DEAE 650(M)-Säule (equilibriert mit Puffer B) aufgetragen. Die Säule wurde mit 150 mM KCl in Puffer B gespült, bis im Durchlauf keine Proteine mehr nachweisbar waren. Die gebundenen Proteine wurden mit einem Salzgradienten (150 – 550 mM KCl, 400 ml) bei einer Flußrate von 1 ml/min eluiert. Die Fraktionen mit Phosphataseaktivität eluierten bei ungefähr 450 mM KCl. Sie wurden vereint, mittels einer Filtron-Zelle (Omegacell, 10 kDa Ausschlußvolumen) auf 1.5 ml eingengt und auf eine Fractogel TSK HW-55(S)-Gelfiltrationssäule (95 × 1.6 cm, equilibriert mit 150 mM KCl in Puffer B) mit 0.6 ml/min aufgetragen. Die phosphataseaktiven Fraktionen wurden vereint und erneut auf eine Fractogel EMD-DEAE 650(M)-Säule (7 × 1 cm, equilibriert mit 150 mM KCl in Puffer B) aufgetragen und mit einem 200 ml Gradienten von 150-700 mM KCl eluiert (1 ml/min). Die Homogenität der Fraktionen mit PP2A<sub>1</sub> wurde durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung überprüft. Die Phosphatase wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.2. Isolierung der katalytischen Untereinheit PP2A<sub>C</sub>

Die katalytische Untereinheit wurde aus dem trimeren Holoenzym isoliert. Als Ausgangsmaterial dienten Fraktionen, die nach Reinigung entsprechend Punkt 2.2.1. noch Fremdproteine enthielten und deshalb nicht für Messungen verwendet werden konnten. Die Fraktionen wurden durch Lyophilisation rund 3fach konzentriert und in 50 µl Aliquots auf

eine Superdex 75 Gelfiltrationssäule (30 × 0.32 cm, SMART System, Pharmacia) aufgetragen. Die Gelfiltration erfolgte in 10 mM CHES, 1 M NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, pH 9.0 bei 10 °C und einer Flußrate von 40 µl/min. Die Fraktionsgröße betrug 40 µl. Durch Vorlegen von 1 M Tris/HCl, 1 mM DTT, pH 7.5 in den Sammelgefäßen wurde der pH-Wert unmittelbar nach der Trennung wieder auf 7.5 eingestellt. Die Fraktionen mit homogener PP2A<sub>C</sub> (überprüft durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung) von 20 Gelfiltrationsläufen wurden vereint, mit Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 0.1 % (v/v) versetzt und in Aliquots bei -80 °C gelagert.

## 2.3. Proteinchemische Analyse

### 2.3.1. SDS-PAGE

Die SDS-PAGE erfolgte nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Die verwendeten Acrylamidkonzentrationen lagen zwischen 10 und 17.5 %. Verwendet wurde eine Lösung aus 30 % Acrylamid mit 0.8 % Bisacrylamid (rotiphorese<sup>®</sup> Gel 30) der Firma ROTH (Karlsruhe). Als Molekulargewichtsmarker dienten Trypsin-Inhibitor aus Rinderlunge (6,5 kDa), Cytochrom C (12,5 kDa), Trypsin-Inhibitor aus Sojabohne (21 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Albumin aus Hühnerei (45 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa) und Phosphorylase β (92,5 kDa). Die Anfärbung der Gele erfolgte durch Coomassie- oder Silberfärbung (Werner, 1996).

### 2.3.2. Sequenzanalyse

#### 2.3.2.1. Edman-Abbau

Die automatische Aminosäuresequenzierung wurde freundlicherweise von P. Rücknagel (MPG, Halle) durchgeführt. Die gereinigte PP2A<sub>1</sub> wurde mit TCA gefällt. Nach Pyridylethylierung wurden die Untereinheiten durch RP-HPLC an einer Nucleosil 500-5C<sub>3</sub>-PPN Säule (125 × 2 mm) von Macherey-Nagel (Düren, BRD) aufgetrennt. Als Lösungsmittel dienten 0.09 % TFA in H<sub>2</sub>O (A) und 0.08 % TFA in Acetonitril (B). Die Säule war äquilibriert mit 1 % B. Die Untereinheiten wurden mit einem linearen Gradienten von 30-60 % Acetonitril in 30 min bei 40 °C und einer Flußrate von 0.2 ml/min eluiert. Sie wurden über Nacht in 100 mM Ammoniumcarbonat pH 8.5 mit Trypsin (Endkonzentration 250 µg/ml) verdaut. Die entstandenen Peptide wurden mittels RP-HPLC aufgetrennt und einige von ihnen mit einem 476A Gasphasensequenzierer der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) sequenziert.

### 2.3.2.2. Sequenzanalyse mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Analysen wurden freundlicherweise von T. Pfeifer (MPG, Halle) durchgeführt. Die getrennten Untereinheiten wurden über Nacht mit Endoproteinase LysC verdaut und das entstandene Peptidgemisch direkt analysiert. Die Messungen wurden an einem MALDI-TOF Reflex Massenspektrometer der Firma Bruker (Bremen, BRD), ausgestattet mit einem N<sub>2</sub>-UV Laser (337 nm), im linearen Modus durchgeführt. PSD-Spektren (post source decay) zur Sequenzierung einzelner Peptide wurden im Reflektormodus aufgenommen. Als Matrix diente  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure. Die beobachteten Spektren wurden mit bekannten Sequenzen von PP2A-Untereinheiten und ihren theoretischen Verdauungsmustern, die mit Hilfe des Programmes „MS-Digest“ (<http://prospector.ucsf.edu/ucshtml3.4/msdigest.htm>) erstellt wurden, verglichen.

Die ESI-Massenspektren synthetisierter Peptide wurden an einem VG BIO-Q-Spektrometer (Fisons Instruments) aufgenommen.

### 2.3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) mit BSA als Standard.

#### 2.3.3.1. Titration der aktiven Konzentration an PP2A<sub>I</sub> und PP2A<sub>C</sub>

Die Konzentrationen der PP2A<sub>I</sub>- und PP2A<sub>C</sub>-Stammlösungen wurden durch Titration mit dem hochaffinen Inhibitor Okadasäure bestimmt (Takai und Mieskes, 1991). Hochaffine Inhibitoren bewirken schon in geringen Konzentrationen eine Inhibierung. Wenn die Inhibitorkonzentration geringer als die Enzymkonzentration ist, wird ein beträchtlicher Teil des Inhibitors enzymgebunden vorliegen:

$$I_{\text{total}} = I_{\text{frei}} + I_{\text{gebunden}} \quad (1)$$

Nach (Henderson, 1972) gilt:

$$I_{\text{frei}} = K_i \left( \frac{v_0}{v_i} - 1 \right) \quad (2)$$

und

$$I_{\text{gebunden}} = E_{\text{total}} \left( 1 - \frac{v_i}{v_0} \right) \quad (3)$$

wobei  $v_0$  und  $v_i$  die Reaktionsgeschwindigkeiten in Ab- und Anwesenheit des Inhibitors und  $E_{\text{total}}$  die Enzymkonzentration sind.  $K_i$  ist die scheinbare Dissoziationskonstante des

Inhibitors, die von der Substratkonzentration abhängig ist. Unter den Bedingungen  $E_{\text{total}} \gg K_i$  und  $I_{\text{total}} < E_{\text{total}}$  sind alle Inhibitormoleküle an das Enzym gebunden (Goldstein, 1944), d.h.  $I_{\text{total}} = I_{\text{gebunden}}$ . Aus Gleichung (3) wird dann:

$$\frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{I_{\text{total}}}{E_{\text{total}}} \quad (4)$$

Aus einer Auftragung  $v_i/v_0$  gegen  $I_{\text{total}}$  kann somit  $E_{\text{total}}$  aus dem Schnittpunkt der Verlängerung des linearen Abschnittes mit der Abszisse ermittelt werden.

Eine andere Auftragung wurde von Henderson vorgeschlagen (Henderson, 1972):

Aus den Gleichungen (1), (2) und (3) folgt

$$I_{\text{total}} = E_{\text{total}} \left( 1 - \frac{v_i}{v_0} \right) + K_i \left( \frac{v_0}{v_i} - 1 \right) \quad (5)$$

Division durch  $(1 - v_i/v_0)$  ergibt:

$$\frac{I_{\text{total}}}{1 - \frac{v_i}{v_0}} = E_{\text{total}} + K_i \left( \frac{v_0}{v_i} \right) \quad (6)$$

Die Auftragung von  $I_{\text{total}}/(1 - v_i/v_0)$  gegen  $v_0/v_i$  ergibt eine Gerade mit  $E_{\text{total}}$  als Ordinatenschnittpunkt.

Die Titration wurde an einem Specord S10 Spektrometer (Carl Zeiss Jena) mit 4-Nitrophenylphosphat als Substrat bei 30 °C durchgeführt. Ein typischer Ansatz zur Titration einer PP2A<sub>1</sub>-Stammlösung enthielt folgende Komponenten:

530 µl 50 mM Bis-Tris-Propan pH 7.5

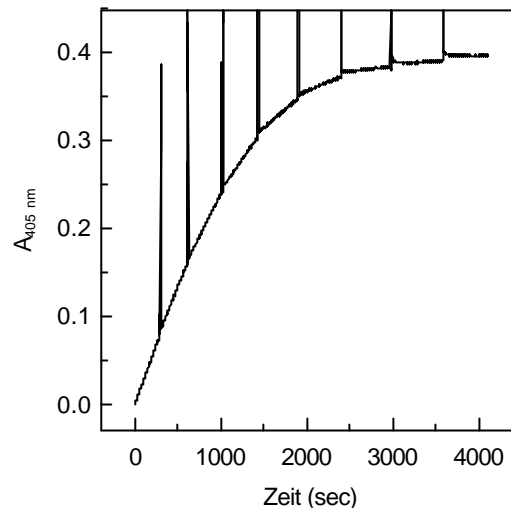
80 µl BSA-Lösung (5 mg/ml)

100 µl 4-Nitrophenylphosphat (40 mM in 50 mM Bis-Tris-Propan pH 7.5)

90 µl PP2A<sub>1</sub>

Zu diesem Ansatz wurde Okadasäure (1/1000 Verdünnung einer 1 mM Stammlösung in DMSO) kumulativ in Aliquots von 1 µl zugegeben. Nach jeder Zugabe wurde der Ansatz gründlich durchmischt und die Extinktionsänderung bei 405 nm (Referenzwellenlänge 510 nm) zwischen 3 und 10 min lang verfolgt (**Abb. 2.1**).

Die Titration der PP2A<sub>C</sub> erfolgte in Gegenwart von 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 0.2 mg/ml BSA und 8 mM 4-Nitrophenylphosphat.



**Abb. 2.1** Titration einer PP2A<sub>1</sub>-Lösung.

Genauere Beschreibung im Text. Die Spitzen zwischen den einzelnen linearen Abschnitten resultieren aus der Unterbrechung des Lichtstrahles durch Zugabe von 1  $\mu$ l Okadasäure und dem anschließenden Rühren des Ansatzes. Ohne Zugabe von Okadasäure wurde im gesamten Zeitintervall eine gleichbleibende Phosphataseaktivität beobachtet.

#### 2.3.3.2. Titration der aktiven Chymotrypsinkonzentration

Bei der Hydrolyse von Estern durch Chymotrypsin ist die Deacylierung des Serinrestes im aktiven Zentrum der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Hartley und Kilby, 1954). Das kann zur Bestimmung der aktiven Chymotrypsinkonzentration ausgenutzt werden. Die Titration der in dieser Arbeit verwendeten Enzymcharge mit 4-Nitrophenylacetat an einem HP 8452A Diodenarray-Spektrometer (Bernhardt, 1997) ergab einen Gehalt an aktivem Chymotrypsin von 62 %.

## 2.4. Messung der Phosphataseaktivität

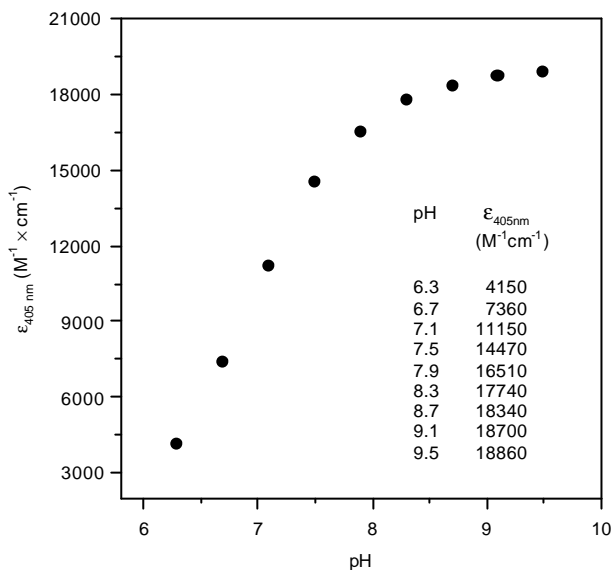
### 2.4.1. Allgemeine Bemerkungen

Sofern nichts anderes vermerkt ist, erfolgten alle Aktivitätsmessungen mit PP2A<sub>1</sub> in 50 mM Bis-Tris-Propan pH 7.5 bei 30 °C, für Messungen mit der katalytischen Untereinheit PP2A<sub>C</sub> wurden 100 mM MgCl<sub>2</sub> und 2 mM DTT zugesetzt. Alle Analysen und Kurvenanpassungen von Meßdaten, sowie die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgten mit dem Programm SigmaPlot 2.0 (Jandel Corp.).

## 2.4.2. Aktivität gegenüber 4-Nitrophenylphosphat (pNPP)

### 2.4.2.1. pH-Abhängigkeit des molaren Extinktionskoeffizienten von 4-Nitrophenol

Zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von 4-Nitrophenol bei unterschiedlichen pH-Werten wurde eine 4-Nitrophenolstammlösung (2.8 mM) mit 50 mM Bis-Tris-Propan im pH-Bereich 6.3 – 9.5 auf eine Endkonzentration von 47  $\mu\text{M}$  verdünnt und an einem Specord S10 Spektrophotometer (Carl Zeiss Jena) die Extinktion bei 405 nm gemessen (**Abb. 2.2**).



**Abb. 2.2** pH-Abhängigkeit des molaren Extinktionskoeffizienten von 4-Nitrophenol. Die erhaltenen Werte für  $\epsilon$  bei den jeweiligen pH-Werten sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung.

### 2.4.2.2. Messungen mit 4-Nitrophenylphosphat

Zur Messung der pNPP-Aktivität während der Proteinreinigung wurden in einer Mikrotiterplatte 20  $\mu\text{l}$  Fraktion mit 100  $\mu\text{l}$  einer 5 mM Lösung von pNPP in 50 mM Bis-Tris-Propan pH 7.5 versetzt und die Extinktionsänderung bei 405 nm mit einem Mikrotiterplattenleser MR7000 (Dynatech, Chantilly, USA) verfolgt. In Titerplatten ist die Schichtdicke der Probe vom Probenvolumen abhängig. Zur Berechnung von Enzymaktivitäten wurden alle gemessenen Extinktionsänderungen über folgende Beziehung (Gleichung 7) auf 1 cm Schichtdicke umgerechnet.

$$E_{1\text{cm}} = \frac{E_{\text{Kavität}} \times 374}{\text{Volumen}_{\text{Kavität}} (\text{in } \mu\text{l})} \quad (7)$$

Die Bestimmung der kinetischen Konstanten erfolgte an einem Specord S10 Spektrophotometer (Carl Zeiss Jena). Dem Reaktionsansatz wurden 0.5 mg/ml BSA zugesetzt. Die beobachteten Extinktionsänderungen bei 405 nm wurden mit einem molaren



Extinktionskoeffizienten von  $14500 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  (für pH-Wert 7.5) in Konzentrationsänderungen umgerechnet.

### 2.4.3. Aktivität gegenüber Phosphopeptiden

#### 2.4.3.1. Chymotrypsin gekoppelter Test

Zur Messung der Phosphataseaktivität gegenüber Phosphopeptiden bei der Reinigung der PP2A diente ein in der Arbeitsgruppe entwickelter Protease-gekoppelter Test (Werner, 1996). Peptide der Sequenz Ala-Ala-Ser/Thr-Pro-Phe-NH-Np stellen gute Substrate für Chymotrypsin dar, da Chymotrypsin Substrate mit aromatischen Aminosäuren in P<sub>1</sub> Position rasch hydrolysiert. Die Freisetzung des 4-Nitroanilins kann spektroskopisch bei 390 nm verfolgt werden. Liegt der Serin- oder Threoninrest in P<sub>3</sub>-Position in phosphorylierter Form vor, verschlechtern sich die Substrateigenschaften des Peptids. Nach Phosphorylierung erniedrigt sich der  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$  Wert für die Hydrolyse durch Chymotrypsin im Fall des Serinsubstrates um Faktor 45 im Fall des Threoninsubstrates um Faktor 8 (Bernhardt, 1997). Bei niedrigen Chymotrypsinkonzentrationen wird in einem Gemisch aus phosphoryliertem und unphosphoryliertem Peptid also nur das unphosphorylierte Peptid detektierbar hydrolysiert. Unter der Bedingung, dass die verwendeten Peptidkonzentrationen unterhalb des  $K_{\text{M}}$ -Wertes für Chymotrypsin liegen, besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration des unphosphorylierten Peptids im Gemisch und dem Anfangsanstieg der Proteolyse durch Chymotrypsin. Der Phosphatasetest besteht somit aus zwei Schritten. Erst wird das Phosphopeptid mit der Phosphatase für eine definierte Zeit inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von Chymotrypsin. Aus dem beobachteten Anfangsanstieg der Proteolyse wird über eine Eichkurve die im Ansatz vorhandene Konzentration an unphosphoryliertem Peptid bestimmt und die Phosphataseaktivität errechnet. Die Meßzeit der Proteolyse sollte gegenüber der Inkubationszeit mit Phosphatase kurz gehalten werden, um Fehlbestimmungen durch während der Proteolyse entstehendes unphosphoryliertes Peptid zu vermeiden.

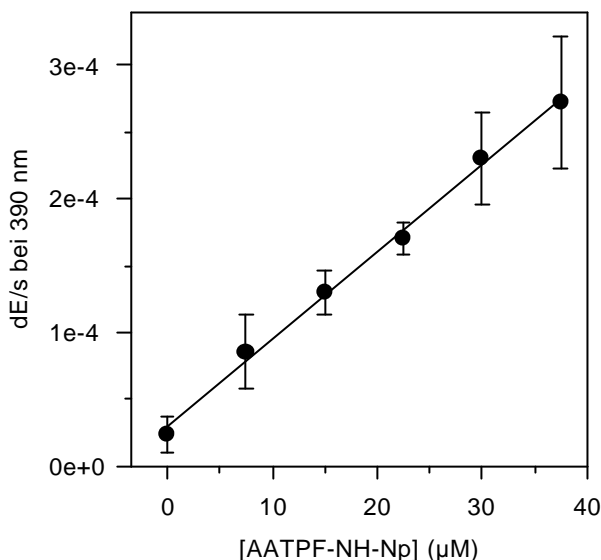
Die Aktivitätsmessungen wurden in Titerplatten folgendermaßen durchgeführt:

5  $\mu\text{l}$  Peptid-Stammlösung (1.5 mM)  
150  $\mu\text{l}$  20 mM Tris pH 7.5  
20  $\mu\text{l}$  Phosphatase

5 - 60 min bei Raumtemperatur inkubieren.

Starten der Proteolyse durch Zugabe von 25  $\mu\text{l}$  Chymotrypsin (Stammlösung von 7 mg/ml unmittelbar vor Gebrauch 1/1500 verdünnt)

Aus den bei 390 nm gemessenen Anfangsanstiegen können unter Verwendung einer Eichkurve (**Abb. 2.3**) und der Inkubationszeit die Phosphataseaktivitäten berechnet werden. Dieser Test ist aufgrund der Limitierung der verwendbaren Substratkonzentrationen für enzymkinetische Messungen nur bedingt anwendbar. Sein großer Vorteil liegt im wesentlich geringeren Arbeits- und Zeitaufwand bei hohem Probendurchsatz, verglichen mit anderen Phosphataseaktivitätstests (Freisetzung von Radioaktivität, HPLC, CE).



**Abb. 2.3** Eichkurve des Chymotrypsin-gekoppelten Phosphataseaktivitätstests. Substratgemische mit gleicher Peptidkonzentration (37.5 µM), aber unterschiedlichen Anteilen an phosphoryliertem und unphosphoryliertem Peptid wurden mit 0.58 µg/ml Chymotrypsin versetzt. Der Anfangsanstieg der Proteolyse wurde bei 390 nm gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung  $\pm$  Standardabweichung.

#### 2.4.3.2. HPLC

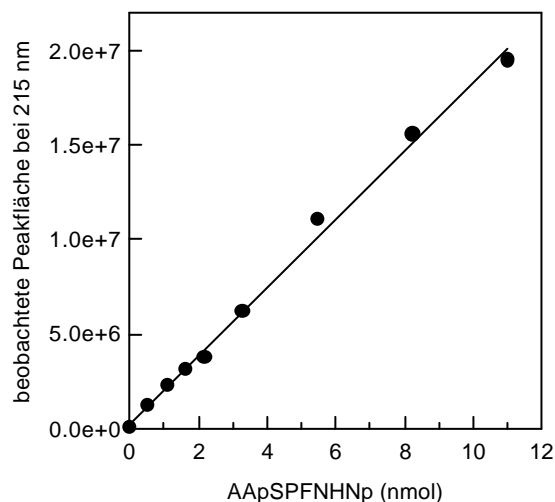
Die Bestimmung der katalytischen Konstanten für die Dephosphorylierung verschiedener Phosphopeptide durch die PP2A erfolgte im diskontinuierlichen Test mittels RP-HPLC. Puffer und Substrat wurden im Wasserbad bei 30 °C temperiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von PP2A gestartet. Es kamen PP2A-Konzentrationen zwischen 27 pM und 10 nM zum Einsatz. Nach mindestens drei verschiedenen Zeiten wurden Aliquots zwischen 30 und 300 µl entnommen, durch Zugabe von 1 bis 10 µl 25 %iger (v/v) TFA abgestoppt und mittels RP-HPLC an einem LC-10A HPLC System der Firma Shimadzu (Kyoto, Japan) analysiert. Die Trennung der phosphorylierten und unphosphorylierten Peptide erfolgte an einer Nucleosil 300-5 C<sub>18</sub> Säule (125 × 3 mm) der Firma Macherey-Nagel (Düren, BRD) mit einer Flußrate von 0.5 ml/min. Als Eluenten dienten 0.09 % (v/v) TFA und ACN mit 0.08 % (v/v)

TFA. Die Steilheit der verwendeten Gradienten lag zwischen 0.7 und 2 % Zunahme an ACN pro Minute.

Die Detektion der Peptide erfolgte bei 215 nm. Zur Quantifizierung der Umsätze wurden die integrierten Peakflächen verwendet. Die Integration erfolgte mit Hilfe der Software von Shimadzu. Im untersuchten Bereich bestand ein linearer Zusammenhang zwischen eingespritzter Peptidmenge und beobachteter Peakfläche (**Abb. 2.4**). Die Berechnung der Konzentration des unphosphorylierten Peptides ( $c_{\text{unphosphPeptid}}$ ) erfolgte nach Gleichung (8), wobei  $c_{\text{Substrat}}$  die Substratkonzentration im Ansatz zu Beginn der Reaktion darstellt.

$$c_{\text{unphosphPeptid}} = \frac{\text{Peakfläche}_{\text{unphosphPeptid}}}{\text{Peakfläche}_{\text{phosphPeptid}} + \text{Peakfläche}_{\text{unphosphPeptid}}} \times c_{\text{Substrat}} \quad (8)$$

Die Phosphataseaktivität wurde aus der linearen Auftragung der Konzentration an unphosphoryliertem Peptid gegen die Inkubationszeit ermittelt. Um den linearen Zusammenhang zu gewährleisten, wurden die Phosphatasekonzentrationen so gewählt, dass im untersuchten Zeitraum maximal 15 % des Substrates dephosphoryliert werden konnten. Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten wurden die Enzymaktivitäten bei mindestens sechs Substratkonzentrationen (im Bereich 0.3 bis  $3 \times K_M$ ) bestimmt. Die Konstanten  $K_M$  und  $V_{\text{max}}$  wurden aus der nichtlinearen Anpassung der Messwerte nach Michaelis-Menten berechnet.



**Abb. 2.4** Linearer Zusammenhang zwischen eingespritzter Peptidmenge und beobachteter Peakfläche bei 215 nm.

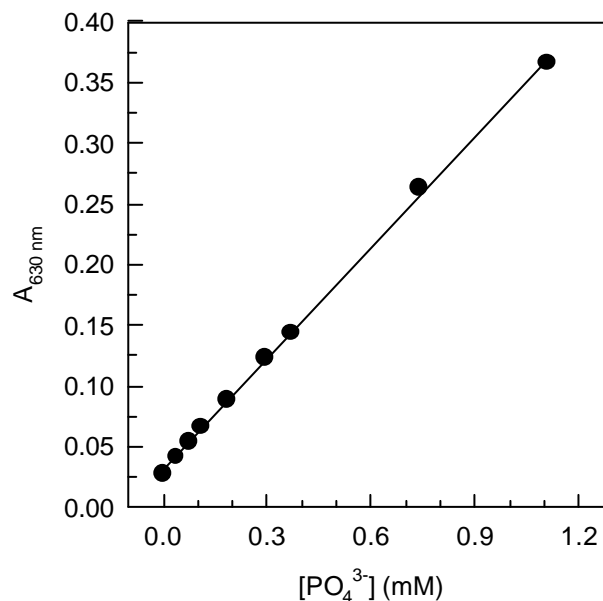
Auf die Säule aufgetragen wurden 10 bis 200  $\mu\text{l}$  einer 55  $\mu\text{M}$  Lösung des Peptids Ala-Ala-Ser( $\text{PO}_3\text{H}_2$ )-Pro-Phe-NH-Np. Da sich der Extinktionskoeffizient des unphosphorylierten Peptids bei 215 nm nicht von dem des phosphorylierten unterscheidet, gilt dieser Zusammenhang auch für das unphosphorylierte Peptid.

### 2.4.3.3. Molybdat – Ascorbinsäure -Test

Mit dieser Methode erfolgte die Bestimmung der kinetischen Konstanten der Dephosphorylierung von Phosphopeptiden durch Alkalische und Saure Phosphatase. Die Methode beruht auf der Reduktion eines Phosphat-Molybdat-Komplexes durch Ascorbinsäure in saurer Lösung und der Detektion der dabei auftretenden Farbänderung (Saheki et al., 1985; Drucekes et al., 1995).

Unmittelbar vor Gebrauch wurden 6 Teile Lösung A (10 % Ascorbinsäure in  $\text{H}_2\text{O}$ ) mit 1 Teil Lösung B (0.42 % Ammoniumheptamolybdat-tetrahydrat in 1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) gemischt. 100  $\mu\text{l}$  dieser Lösung wurden in einer Mikrotiterplatte zu 10  $\mu\text{l}$  Probe gegeben und für 20 min bei 38 °C inkubiert. Mit einem Mikrotiterplattenleser MR7000 (Dynatech, Chantilly, USA) wurde die Extinktion bei 630 nm gemessen und die in der Probe enthaltene Phosphatkonzentration mittels einer Eichkurve ermittelt (**Abb. 2.5**).

Die kinetischen Konstanten der Alkalischen Phosphatase wurden in 50 mM Bis-Tris-Propan pH 7.5, die der Sauren Phosphatase in 50 mM MES pH 5.2 bestimmt. Es wurden die Umsatzgeschwindigkeiten bei mindestens sieben Substratkonzentrationen gemessen. Nach Vorinkubation des Ansatzes bei 30 °C wurde die Reaktion durch Phosphatasezugabe gestartet. Nach verschiedenen Zeiten wurden 10  $\mu\text{l}$  Aliquots entnommen und die Konzentration an freigesetztem Phosphat ermittelt. Die Phosphataseaktivitäten wurden aus den linearen Anfangsanstiegen der Produkt-Zeit-Kurven berechnet. Die Konstanten  $V_{\text{max}}$  und  $K_{\text{M}}$  wurden aus der Anpassung nach Michaelis-Menten berechnet.



**Abb. 2.5** Eichreihe zur Phosphatbestimmung mittels Molybdat-Ascorbinsäure-Test

## 2.5. Untersuchungen zur Isomerspezifität der PP2A

### 2.5.1. Isomerspezifische Proteolyse

Die Bestimmung der Geschwindigkeit der *cis/trans* Isomerisierung und des *cis*-Gehaltes prolinhaltiger Peptide erfolgte mittels isomerspezifischer Proteolyse (Fischer, G. et al., 1984b). In einem ersten schnellen Schritt wird alles vorhandene *trans*-Konformer während der Mischzeit hydrolysiert, für die weitere Hydrolyse ist die *cis/trans* Isomerisierung geschwindigkeitsbestimmend. Die Geschwindigkeitskonstante  $k_{cis \rightarrow trans}$  wird durch nichtlineare Regression nach einem Geschwindigkeits-Zeit-Gesetz erster Ordnung ermittelt. Der *cis*-Gehalt ergibt sich aus dem Amplitudenverhältnis zwischen langsamer und schneller kinetischer Phase. Für Messungen mit Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np wurde  $\alpha$ -Chymotrypsin, für Pro-Leu-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np wurde  $\alpha$ -Chymotrypsin oder Subtilisin Carlsberg verwendet. Nach Temperierung von Puffer und Protease wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates aus einer Stammlösung in H<sub>2</sub>O oder Puffer gestartet. Die Messungen erfolgten in 50 mM Bis-Tris-Propan pH 7.5 bei 10 °C an einem HP 8452A Diodenarray-Spektrometer bei 390 nm über einen Zeitraum von 10 min. Die Substratkonzentration im Ansatz betrug 37.5  $\mu$ M.

### 2.5.2. Herstellung von *cis*-Xaa-Xaa-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np

#### 2.5.2.1. Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np

Die Herstellung von *cis*-Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np erfolgte mittels isomerspezifischer Proteolyse durch  $\alpha$ -Chymotrypsin. Alle Reaktionen wurden bei 0 °C in einem Wasser/Eis-Bad durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen wurden mindestens 10 min vortemperiert. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe einer 1.5 mM Peptidstammlösung in H<sub>2</sub>O zu einer Lösung von 43  $\mu$ M Chymotrypsin (Stammlösung 3.2 mM in 1 mM HCl) in 50 mM Bis-Tris-Propan pH 7.5. Die Peptidkonzentration im Ansatz betrug 75  $\mu$ M. Die Herstellung von *cis*-Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np zur Bestimmung der Isomerisierungsgeschwindigkeit bei 0 °C erfolgte in Gegenwart von 9.8  $\mu$ M Chymotrypsin und 0.5 M NaCl. Nach dem Reaktionsstart wurde kräftig gemischt. Nach 2 min war das *trans* Konformer vollständig an der 4-Nitroanilidbindung hydrolysiert und Chymotrypsin wurde durch Zugabe eines 1.4 fachen molaren Überschusses an Eglin C (Stammlösung 1.16 mM in 0.5 mM HCl) inaktiviert. Das verbleibende *cis*-Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np isomerisiert nach einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung bis zur Wiedereinstellung des *cis/trans*-Gleichgewichtes.

### 2.5.2.2. *Pro-Leu-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np*

Die Herstellung von *cis*-Pro-Leu-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np erfolgte analog zu 2.5.2.1. außer dass statt Chymotrypsin Subtilisin Carlsberg in einer Konzentration von 49 µM verwendet wurde. Die Reaktion wurde 150 sec nach dem Start durch Zugabe von Diisopropyl-fluorphosphat (Stammlösung 5.4 M) bis zu einer Endkonzentration von 7.2 mM abgestoppt.

### 2.5.3. Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{obs}}$ der Isomerisierung von *cis*-Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np bei 0 °C

Das Peptid *cis*-Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np wurde wie in 2.5.2.1. beschrieben hergestellt und bei 0 °C inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Aliquots von 1.3 ml entnommen und mittels isomerspezifischer Proteolyse der Anteil an *cis* Isomer ermittelt. Nach Abgleichen des Spektrometers auf die bereits gelb gefärbte Lösung erfolgte der Start durch Zugabe von 25 µl einer 3.2 mM Chymotrypsinlösung. Das entspricht einem 4.3 fachen molaren Überschuß gegenüber dem vorhandenen Eglin C. Zwischen Entnahme der Aliquots und Start der Reaktion vergingen weniger als 40 sec. Während dieser Zeit kann nur ungefähr 1 % des vorhandenen Peptids von *cis* nach *trans* isomerisieren. Die Endextinktion in der Küvette nach der Reaktion betrug ungefähr 0.86.

Zur Beschleunigung der *cis/trans* Isomerisierung wurde in einigen Experimenten 2 min vor Entnahme des ersten Aliquots humanes Pin1 in einer Konzentration von 135 nM zugesetzt.

### 2.5.4. Untersuchungen zur Konformerspezifität von Phosphatasen

Zur Untersuchung der Isomerspezifität wurde das Peptid *cis*-Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np wie in Punkt 2.5.2.1. beschrieben hergestellt und bei 0 °C inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Aliquots von 600 µl entnommen und für 2 min mit 1.3 nM PP2A<sub>1</sub> inkubiert. Durch Zugabe von 5 µl Trifluoressigsäure wurde die Phosphatasereaktion abgestoppt. Zur Untersuchung der Alkalischen Phosphatase wurden 300 µl Aliquots des Peptids für 3 min mit 10 µl Phosphatase (Stammlösung 20 U/µl) inkubiert.

Die Untersuchungen mit dem vom Cdc25 abgeleiteten Peptid Pro-Leu-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np wurden in analoger Weise durchgeführt. Zu verschiedenen Zeiten nach dem Abstoppen der isomerspezifischen Proteolyse wurden 600 µl der äquilibrierenden Peptidlösung für 3 min mit 6.2 nM PP2A<sub>1</sub> inkubiert.

Den entnommenen Aliquots wurden in einigen Fällen 2 min vor dem Starten der Phosphatasereaktion humanes rekombinantes Pin1 oder Pin1-Mutanten in Konzentrationen zwischen 135 nM und 260 nM zugesetzt.

Die Analyse aller Aliquots erfolgte mittels RP-HPLC analog zu Punkt 2.4.3.2. Nach dem Auftragen der Probe wurde die Säule 10 min mit 20 % ACN gespült. Anschließend folgte ein ACN-Gradient von 20%-40% ACN in 30 min. Die Detektion der Peptide erfolgte bei 320 nm, dem Absorptionsmaximum des 4-Nitroanilids.

## III. Ergebnisse

### 3.1. Reinigung und Charakterisierung der PP2A<sub>1</sub>

#### 3.1.1. Reinigung der PP2A<sub>1</sub>

Die reversible Phosphorylierung von Ser/Thr-Pro Motiven spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation verschiedenster zellulärer Vorgänge. Verglichen mit den prolinspezifischen Kinasen, die hinsichtlich Funktion, Struktur und Substratspezifität relativ gut erforscht sind, ist wenig darüber bekannt, wie die Dephosphorylierung dieser prolingerichteten Phosphorylierungsstellen in der Zelle erfolgt. Bisher sind keine Phosphatasen bekannt, die, analog zu den Kinasen, aufgrund ihrer eng definierten Substratspezifität als prolinspezifisch bezeichnet werden könnten. Deshalb sollte im Verlauf dieser Arbeit eine Phosphatase mit hoher Aktivität gegenüber pSer/pThr-Pro-Motiven gereinigt werden. Als Substrat dienten dabei das Peptid Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np und 4-Nitrophenylphosphat (pNPP) zur Detektion unspezifischer Phosphatasen. Die Detektion der Phosphataseaktivität gegenüber dem Phosphopeptid erfolgte mit Hilfe eines gekoppelten Tests, der die unterschiedlichen Eigenschaften von phosphoryliertem und unphosphoryliertem Peptid als Substrat von Chymotrypsin ausnutzt (s. Kap. 2.4.3.1.). Obwohl dieser Test für exakte enzymkinetische Messungen aufgrund seiner vielen Limitierungen nur beschränkt anwendbar ist, stellt er ein hervorragendes Werkzeug zur Reinigung von Phosphatasen dar, da er verglichen mit herkömmlichen Tests (HPLC, CE, Radioaktivität) die Messung vieler Proben in wesentlich kürzerer Zeit und mit geringem Aufwand ermöglicht.

In Vorversuchen wurden verschiedene tierische Gewebe auf Phosphataseaktivitäten getestet, die höchste Aktivität wurde in Schweinehirn detektiert. Eine Fraktionierung dieser Aktivität durch Ionenaustauschchromatographie ergab einen Aktivitätspeak gegenüber dem Phosphopeptid und mehrere mit pNPP (Werner, 1996).

Die Phosphatase mit hoher Aktivität gegenüber dem Peptidsubstrat konnte gereinigt werden. Als absolut notwendig erwies sich dabei die Verwendung von ganz frischem Schweinehirn, da in über mehrere Stunden bei 5 °C gelagertem Material kaum noch Aktivität meßbar war. Im Verlauf der Reinigung kamen eine Fällung mit zu 25 % gesättigtem Ammoniumsulfat, hydrophobe Interaktionschromatographie, Anionenaustauschchromatographie und Gel-filtration zur Anwendung. Die **Tabelle 3.1** zeigt das Reinigungsschema einer typischen Präparation. Unspezifische Phosphatasen mit hoher Aktivität gegenüber pNPP und geringer Aktivität gegenüber dem Peptid wurden durch Ammoniumsulfatfällung und hydrophobe Interaktionschromatographie entfernt. In allen nachfolgenden Schritten konnte nur noch eine

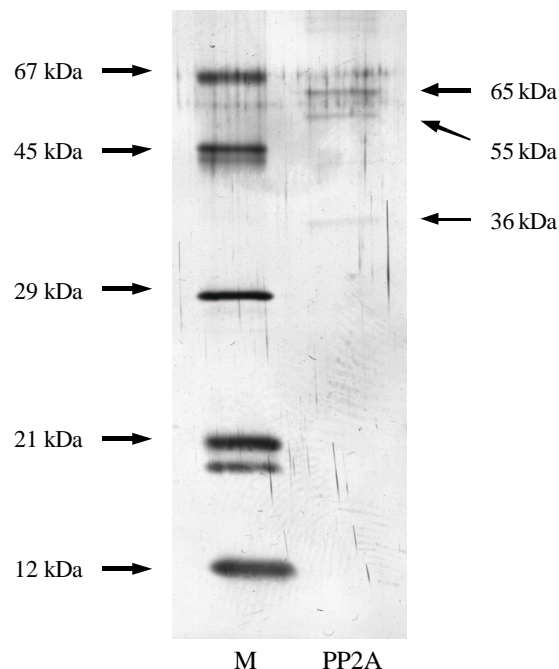


Phosphatase detektiert werden, die allerdings gegenüber beiden verwendeten Substraten aktiv war. Nach dem letzten Reinigungsschritt waren mittels SDS-PAGE in den aktiven Fraktionen noch drei Proteine mit Molekulargewichten von ungefähr 36 kDa, 55 kDa und 65 kDa nachweisbar, die nachfolgend als Untereinheiten der PP2A identifiziert werden konnten (**Abb. 3.1**). Aus 150 g Schweinehirn konnten in typischen Präparationen zwischen 100 µg und 400 µg heterotrimere PP2A gereinigt werden.

Schritt	Volumen (ml)	Protein (mg)	<i>p</i> NPP-Akt. (mU)	spez. <i>p</i> NPP-Akt. (mU/mg)	Faktor ( <i>p</i> NPP)	<i>p</i> TP-Akt. (mU)	spez. <i>p</i> TP-Akt. (mU/mg)	Faktor <i>p</i> TP
Homog.	175	21875	9020	0.41	1	-	-	-
Fällg.	175	19687	5340	0.27	0.7	-	-	-
Propyl	115	126	141	1.1	2.7	91	0.7	1
DEAE	42	23	288	13	31	127	5.6	7.7
Gelfiltr.	20	2.1	151	71	172	97	45	63
DEAE	11	0.28	72	262	637	43	156	217

**Tab. 3.1** Reinigungstabelle einer typischen PP2A-Präparation

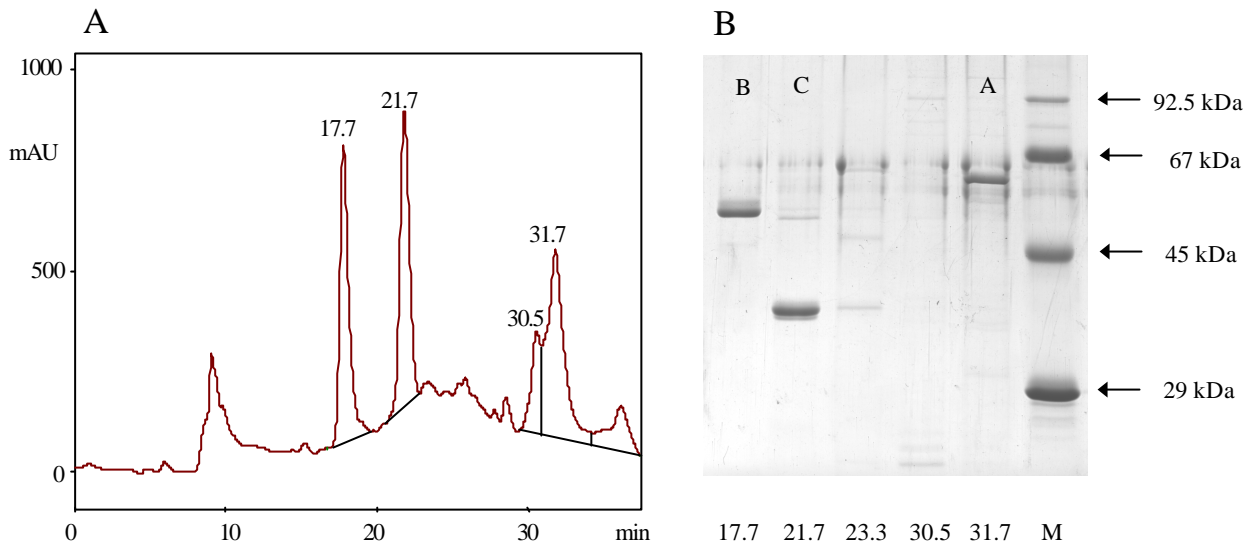
Dargestellt sind die Phosphataseaktivitäten gegenüber den Substraten *p*NPP und Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np (*p*TP).



**Abb. 3.1** Silbergefärbtes SDS-Gel der gereinigten heterotrimeren PP2A aus Schweinehirn

### 3.1.2. Identifizierung der Untereinheiten

Zur genaueren Identifizierung der Untereinheiten wurde ein Teil der gereinigten Phosphatase mit Trichloressigsäure gefällt und die Proteine nach Reduktion der Disulfidbrücken und Umsetzung der SH-Gruppen mit 4-Vinylpyridin mittels RP-HPLC aufgetrennt (**Abb. 3.2**).



**Abb. 3.2** Trennung der Untereinheiten der heterotrimeren PP2A<sub>1</sub> mittels RP-HPLC zur Identifizierung der jeweiligen Isoform (**A**) und Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der erhaltenen Fraktionen im Vergleich zum Molekulargewichtsstandard M (**B**). Die einzelnen Untereinheiten sind im Gel mit B (regulatorische UE), C (katalytische UE) und A (Struktur-UE) beschriftet.

Da der Versuch einer N-terminalen Sequenzierung für die Proteine von 36 kDa und 55 kDa an einer N-terminalen Modifikation scheiterte, wurden diese mit Trypsin verdaut und nach Auftrennung der Spaltprodukte für jedes Protein ein internes Peptid sequenziert. Die erhaltenen Peptidsequenzen AHQLVMEGYNWCHDR für das 36 kDa Protein und GEYNVYSTFQSHEPEFDYLK für das 55 kDa Protein identifizieren diese beiden eindeutig als katalytische und als regulatorische B-Untereinheit der PP2A (**Abb. 3.3 und 3.5**). Das Protein mit einer Größe von 65 kDa wurde daraufhin nicht sequenziert, da mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen war, dass es sich um die A-Untereinheit handelt und aus der Literatur bekannt ist, dass diese in vielen Fällen ebenfalls N-terminal blockiert ist (Hemmings et al., 1990).

Von allen PP2A-Untereinheiten sind mehrere Isoformen bekannt. Die beiden sequenzierten Peptide befinden sich in stark konservierten Regionen und erlauben keine Aussage darüber, welche Isoformen die isolierte PP2A enthält. Deshalb wurden alle drei Untereinheiten separat

mit Endoproteinase Lys C verdaut und das entstandene Peptidgemisch direkt mittels MALDI-Massenspektrometrie analysiert. Die Aminosäuresequenzen der PP2A-Untereinheiten vom Schwein sind entweder bekannt oder sehr stark homolog zu den bekannten humanen Sequenzen. Deshalb konnten durch den Vergleich des theoretischen Spaltmusters der einzelnen Isoformen mit den experimentell ermittelten Peptidmassen alle drei Untereinheiten eindeutig identifiziert werden (**Abb. 3.3/ 3.4/ 3.5, Tab. 3.2**). Das 65 kDa Protein wurde als  $\alpha$ -Isoform der strukturellen A-Untereinheit identifiziert. Die B-Untereinheit war ebenfalls die  $\alpha$ -Isoform. Die katalytische Untereinheit erwies sich als Gemisch aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isoform. Der Anteil beider Isoformen der katalytischen Untereinheit im heterotrimeren Komplex konnte aus diesen Daten nicht ermittelt werden. Die isolierte Phosphatase ist somit eine PP2A<sub>1</sub> der Zusammensetzung C $\alpha$ / $\beta$ A $\alpha$ B $\alpha$ .

Die Massen der N-terminalen Peptide der A- und B-Untereinheit waren verglichen mit der theoretischen Masse um jeweils 42 Da zu groß, was auf eine Acetylierung hindeutet. Das N-terminale Peptid der katalytischen Untereinheit konnte aufgrund seiner geringen Größe nicht detektiert werden. Allerdings muß die katalytische Untereinheit auch N-terminal modifiziert sein, da sonst eine N-terminale Sequenzierung möglich gewesen wäre.

Ein zusätzlich aufgetretener Peak, der anhand seiner Masse keinem erwarteten Peptid zugeordnet werden konnte, hatte eine um 14 Da größere Masse als das gefundene C-terminale Peptid. Da diese Massendifferenz genau der erwarteten für eine Carboxymethylierung des C-Terminus entspricht, kann mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass die isolierte PP2A teilweise die in der Literatur beschriebene Carboxymethylierung am C-terminalen Leu<sup>309</sup> aufweist.

Während bei den regulatorischen A- und B-Untereinheiten die Sequenzunterschiede zwischen den verschiedenen Isoformen eine eindeutige Identifizierung ermöglichen, sind die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isoform der katalytischen Untereinheit sehr stark homolog. Sie unterscheiden sich in lediglich 8 von 309 Aminosäuren, wobei sich 7 Austausche am N-Terminus befinden. Um das Vorhandensein beider Isoformen der katalytischen Untereinheit zweifelsfrei zu zeigen, wurden zwei Peptide der kritischen Region mittels *post source decay* – Analyse sequenziert (**Tab. 3.2**).

Unter- einheit	Pep- tid	m/z theoret.	m/z beob.	Sequenz position	Sequenz	Iso- form
C	C1	1754.0	1754.0	9-21 <sup>a</sup>	ELDQWIEQLNECK	α
	C2	1740.0	1739.9	9-21	ELDQWVEQLNECK	β
	C3	1680.9	1680.7	22-34 <sup>a</sup>	QLNENQVRTLCEK	β
	C4	3912.5	3912.3	42-74	ESNVQEVRCPVTVCGDVHGFHDLMEFRIGGK	α/β
	C5	3431.9	3431.9	75-104	SPDTNYLFMGDYVDRGYYSVETVTLLVALK	α/β
	C6	4106.7	4107.3	105-136	VRYRERITILRGNHESRQITQVYGFYDECLRK	α
	C7	4047.7	4048.2	105-136	VRYPERITILRGNHESRQITQVYGFYDECLRK	β
	C8	3167.6	3167.4	284-309	YSFLQFDPAPRRGEPHVTRRTPDYFL	α/β
		3181.6 <sup>b</sup>	3181.9 <sup>b</sup>			
A	A1	3571.0	3571.1	1-32 <sup>c</sup>	AAADGDDSLYPIAVLIDELRNEDVQLRLNSIK	α
	A2	8093.3	8092.8	34-106	LSTIALALGVERTRESELLPFLTDTIYDEDEVLLALAE QLGTFTTLVGGPEYVHCLLPPLSLATVEETVVRDK	α
	A3	2870.2	2870.0	107-132	AVESLRAISHEHSPSDLEAHFVPLVK	α
	A4	3434.0	3433.7	133-162	RLAGGDWFTSRTSACGLFSVCYPRVSSAVK	α
	A5	5932.8	5933.0	202-254	SEIIPMFSNLADEQDSVRLLAVEACVNIAQLLPQE DLEALVMPTLRQAEDK	α
	A6	1377.7	1378.4	280-291	TDLVPAFQNLMK	α
	A7	1492.7	1492.7	292-304	DCEAEVRAAASHK	α
	A8	3086.7	3086.8	307-330	EFCENLSADCRENVIMTQILPCIK	α
	A9	1866.2	1866.5	358-373	DNTIEHLLPLFLAQLK	α
	A10	4832.6	4832.5	374-415	DECPEVRLNIISNLDVCVNEVIGIRQLSQSLLPAIVELA EDAK	α/β
	A11	3095.7	3095.8	416-441	WRVRLAIIEMPLLAGQLGVEFFDEK	α/β
	A12	2925.5	2925.8	442-466	LNSLCMAWLVDHVYAIAREAATSNLK	α
	A13	3982.7	3982.9	485-518	VLAMSGDPNYLHRMTTLFCINVLSEVCGQDITTK	α
	A14	2538.1	2538.5	519-541	HMLPTVLRMAGDPVANVRFNVAK	α
	A15	2195.6	2195.9	546-565	IGPILDNSTLQSEVKPILEK	α
B	B1	1886.1	1886.0	2-18 <sup>c</sup>	AGAGGGNDIQWCFSQVK	α
	B2	3090.3	3090.4	19-48	GAVDDDVAEADIISTVEFNHSGELLATGDK	α
	B3	1632.8	1633.1	49-62	GGRVVIFQQEQENK	α
	B4	3163.4	3163.4	63-88	IQSHSRGEYNVYSTFQSHEPEFDYLK	α
	B5	941.2	941.1	99-105	IRWLPQK	α
	B6	2344.8	2344.9	249-267	GTIRLCDMRASALCDRHSK	α
	B7	2874.1	2874.4	268-292	LFEEPEDPSNRSFFSEIISISDVK	α
	B8	2922.3	2922.6	310-332	IWDLNMENRPVETYQVHEYLRSK	α
	B9	1774.1	1774.3	333-345	LCSLYENDCIFDK	α/β/γ
	B10	1103.3	1102.9	419-427	ILHTAWHPK	α
	B11	2068.3	2068.2	428-445	ENIIAVATTNNLYIFQDK	α

<sup>a</sup> Die Sequenz dieser Peptide wurde durch post source decay Analysen bestätigt. <sup>b</sup> Entspricht einer C-terminalen Carboxymethylierung. <sup>c</sup> N-terminale Peptide liegen in acetylierter Form vor.

**Tab. 3.2** Identifizierung der PP2A<sub>1</sub>-Untereinheiten mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie nach Verdau mit Endoproteinase LysC

	1	15 16	30 31	45 46	60 61	75
Cα (SS,HS)	MDEKVF <del>FTK</del> <u>ELDQWIE</u> <u>QLNECKQL</u> SESQVKS	LCEKAKEILTKESNV	QEVRC	PVTVC	GDVHG	QFHDLMELFRIGGKS
Cβ (HS)	::D:A::	:::V::	:::N:N::	:RT	:::~::~	:::~::~
	76	90 91	105 106	120 121	135 136	150
Cα (SS,HS)	PD <del>TNYL</del> F <del>MGD</del> YVDRG	YYSVETV <del>TL</del> LVALKV	RYRERITIL	RGNHES	RQITQVYGFYDECLR	KYGNANVWKYFTDLF
Cβ (HS)	:::~::~	:::~::~	:::P::	:::~::~	:::~::~	:::~::~
	151	165 166	180 181	195 196	210 211	225
Cα (SS,HS)	DYLPLTALVDGQIFC	LHGGLSPSIDTL	DHI	RALDRLQEV	PHEGPM	CDLLWSDPDDRGGWG
Cβ (HS)	:::~::~	:::~::~	:::~::~	:::~::~	:::~::~	:::~::~
	226	240 241	255 256	270 271	285 286	300
Cα (SS,HS)	ETFNHANG <del>LTL</del> VSFA	HQLVMEGYNWCHDRN	VVITIFSAPNYCYRCG	NQAAIMELDDTLKYS	FLQFDPAPRRGEPHV	
Cβ (HS)	:::~::~	:::~::~	:::~::~	:::~::~	:::~::~	:::~::~
	301	309				
Cα (SS,HS)	TRRTPDYFL					
Cβ (HS)	:::~::~					

**Abb. 3.3** Identifizierung der katalytischen Untereinheit der PP2A als Gemisch aus α- und β-Isoform durch Vergleich der Sequenzen (Swissprot P05323, P11082) mit dem gefundenen Spaltmuster (HS – Mensch; SS – Schwein).

Die Schweinesequenz der β-Isoform existiert in Swissprot nur als Fragment ab Leu<sup>17</sup> (P11493), ab dort ist sie aber identisch zur humanen Sequenz. Das grau unterlegte Peptid wurde durch Aminosäuresequenzanalyse nach tryptischem Verdau sequenziert. Unterstrichene Peptide wurden im Peptidgemisch nach LysC-Verdau durch MALDI-TOF Massenspektrometrie anhand ihrer Massen identifiziert. Ein zusätzliches Peptid mit einer um 14 Da größeren Masse als das C-terminale Peptid deutet auf eine teilweise Carboxymethylierung des Leu<sup>309</sup>.

	1	15 16	30 31	45 46	60	
PR65α	<u>AAADGDDSLYPIAVL</u>	<u>IDELRNEDVQLRLNS</u>	<u>IKKLSTIALALGVER</u>	<u>TRSELLPFLDTTIYD</u>		
PR65β	NSAGAAAPGTGPVA:GG::	:::~::~	:::~::~	:::~::~	:::T::	
	61	75 76	90 91	105 106	120 121	135
PR65α	<u>EDEVLLALAEQLGTF</u>	<u>TTLVGGPEYVHCLLP</u>	<u>PLESLATVEETVVRD</u>	<u>KAVESLRAISHEHSP</u>	<u>SDLEAHFVPLVKRLA</u>	
PR65β	:::~::~	:N:G:::DFA::	:::~::~	:::~::~	:::~::~	:::~::~
	136	150 151	165 166	180 181	195 196	210
PR65α	<u>GGDWFTSRTSACGLF</u>	<u>SVCYPRVSSAVKAEL</u>	<u>RQYFRNLCSDDTPMV</u>	<u>RRAAASKLGEFAKVL</u>	<u>ELDNVKSEIIPMFSN</u>	
PR65β	S:::~::~	:::~::~	:A:N:::I	:H:S::	:::~::~	:::S:::V:L:T:
	211	225 226	240 241	255 256	270 271	285
PR65α	<u>LASDEQDSVRLlave</u>	<u>ACVNIAQLLPOEDLE</u>	<u>ALVMP<del>TL</del>RQAEDKS</u>	<u>WAVRYMVADKFTELQ</u>	<u>KAVGPEITK<del>TL</del>DLVPA</u>	
PR65β	:::~::~	:::S:::S:D::	:::~::~	:::~::~	:::~::~	R:::K::LN::I::
	286	300 301	315 316	330 331	345 346	360
PR65α	<u>FQNLMKDCEAEVRAA</u>	<u>ASHKVKEFCENLSAD</u>	<u>CRENVIMTQILPCIK</u>	<u>ELVSDANQHVKsALA</u>	<u>SVIMGLSPILGK<del>QNT</del></u>	
PR65β	:::L::	:A:::L:::PIE	G::TI::N::	:::~::~	:::~::~	:::~::~
	361	375 376	390 391	405 406	420 421	435
PR65α	<u>IEHLLPLFLAQLKDE</u>	<u>CPEVRLNIISNLDCV</u>	<u>NEVIGIRQLS<del>QSLP</del></u>	<u>AIVELAE<del>DAK</del>WRVRL</u>	<u>AIIEYMP<del>LL</del>AGQLGV</u>	
PR65β	:::~::~	:::~::~	:::~::~	:::~::~	:::~::~	:::~::~
	436	450 451	465 466	480 481	495 496	510
PR65α	<u>EFFDEKLNSLCMAWL</u>	<u>VDHVYAIREAATS<del>NL</del></u>	<u>KKLVEKFGKEWAHAT</u>	<u>IIPKVLAMSGDPNYL</u>	<u>HRMTT<del>L</del>FCINVLSEV</u>	
PR65β	:::~::~	:::~::~	N::M::Q::T::QN:	V:::V:AN::	:::~::~	A
	511	525 526	540 541	555 556	570 571	588
PR65α	<u>CGQDITTKHMLPTVL</u>	<u>RMAGDPVANVRFNVA</u>	<u>KSLQKIGPILDNSTL</u>	<u>QSEVKPILEKLTQDQ</u>	<u>DVDVKYFAQEALTVL</u>	<u>SLA</u>
PR65β	:::E:::Q:::I::	K:::Q::	:::~::~	TDA:	E:::V:Q::G::E	M:::~::~

**Abb. 3.4** Identifizierung der A-Untereinheit der PP2A als α-Isoform durch Vergleich der Sequenzen (Swissprot P54612, P54613; Schwein) mit dem gefundenen Spaltmuster. Unterstrichene Peptide wurden im Peptidgemisch nach LysC-Verdau durch MALDI-TOF Massenspektrometrie anhand ihrer Massen identifiziert.

	1	15 16	30 31	45 46	60 61	75
PR55α (HS)	<u>MAGAGGGNDIQWCFS</u>	<u>QVKGA</u> <u>VDDDAEADI</u>	<u>ISTVEFNHSGELLAT</u>	<u>GDKGGRVVIFQQEQE</u>	<u>NKIQSHSRGEYNVYS</u>	
PR55β (HS)	:EEDIDTRK:NNS:L	RDH----SYAT:::	:::::T:::	:::::R:::	S:N:V:R:::	
PR55β (SS)	:EEDIDTRK:NNS:L	RDH----SYAT:::	:A:::T:::	:::::R:::	S:N:V:R:::	
PR55γ (OC)	:GEDTDTRK:NHS:L	RDH----SY:T:::	:::::T:::	:::::R:P:	S:NAP:Q:::D:::	
	76	90 91	105 106	120 121	135 136	150
PR55α (HS)	<u>TFQSHPEPEFDYLKSL</u>	<u>EIEEKINKIRWLPQK</u>	<u>NAAQFLLSTNDKTIK</u>	<u>LWKISERDKRPEGYN</u>	<u>LKEEDGRYRDPPTVT</u>	
PR55β (HS)	:::::T:::	:::::Q	:::::Y:::V:::	:::::V:::V:::	:::::D:E::L:::A:I:	
PR55β (SS)	:::::T:::	:::::Q	:::::Y:::V:::	:::::V:::V:::	:::::D:E::L:::A:I:	
PR55γ (OC)	:::::T:::	:::::K:::Q	:::::HS:::V:::	:::::T:::C:::M:::	:::::D:E:KLK:LS:::	
	151	165 166	180 181	195 196	210 211	225
PR55α (HS)	TLRVPVFRPMDLMVE	ASPRRIFANAHTYHI	NSISINSYETYLSA	DDLRLNLWHLEITDR	SFNIVDIKPANMEEL	
PR55β (HS)	:::::L:::V:::	:T:::V:::M:::	:::::V:::M:::	:::::NF:::NQ	:::::A:::I:	
PR55β (SS)	:::::L:::V:::	:T:::V:::M:::	:::::V:::M:::	:::::NF:::NQ	:::::A:::I:	
PR55γ (OC)	S:Q:::LK:::V:::	V:::G:::V:::	:::::V:::C:::M:::	:::::AV:::D:::	:::::A:::I:	
	226	240 241	255 256	270 271	285 286	300
PR55α (HS)	TEVITAAEFHPNSCN	TFVYSSSKGTIRLCD	<u>MRASALCDRHSKLFE</u>	<u>EPEDPSNRSFFSEII</u>	<u>SSISDVKFHSHSGRYM</u>	
PR55β (HS)	:::::HH:::	:::::D:::	:::::T:F:::	:::::I:::I:::	:::::I:::I:::	
PR55β (SS)	:::::HH:::	:::::D:::	:::::CVTGT	PNFLK	:::::SLKLS	:::::QQWEDI
PR55γ (OC)	:::::S:::HH:::	L:::SL:::	:::::A:::K:::	:::::V:::V:::	:::::V:::V:::	
	301	315 316	330 331	345 346	360 361	375
PR55α (HS)	MTRDYLSVKIWDLNM	<u>ENRPVETYQVHEYLR</u>	<u>SKLCSLYENDCIFDK</u>	<u>FECCWNGSDSVVMTG</u>	<u>SYNNFFRMFDRNTKR</u>	
PR55β (HS)	:::::T:::V:::	:::::I:::D:::	:::::I:::I:::	:::::V:::V:::	:::::I:::I:::	
PR55β (SS)	:::::T:::V:::	:::::I:::N:::	:::::I:::I:::	:::::V:::V:::	:::::I:::I:::	
PR55γ (OC)	L:::T:::V:::	:A:::I:::D:::	:::::I:::I:::	:::::A:::I:::	A:::I:::I:::	
	376	390 391	405 406	420 421	435 436	451
PR55α (HS)	DITLEASRENNKPRPT	VLKPRKVCASGKRKK	DEISVDSLDFNKKIL	<u>HTAWHPKENIIAVAT</u>	<u>TNNLYIFQDKVN----</u>	
PR55β (HS)	:V:::S:::A	I:::VG:::R:	:::::S:::S:::	:::::S:::S:::	:::::A:::A:::	:::::A:::A:::
PR55β (SS)	:V:::S:::A	I:::VG:::R:	:::::S:::S:::	:::::S:::S:::	:::::A:::A:::	:::::A:::A:::
PR55γ (OC)	:V:::SS:::A	:::::R:::VG:::RR	:D:::T:::	:::::A:::I:::	A:::I:::A:::	:::::SDVH

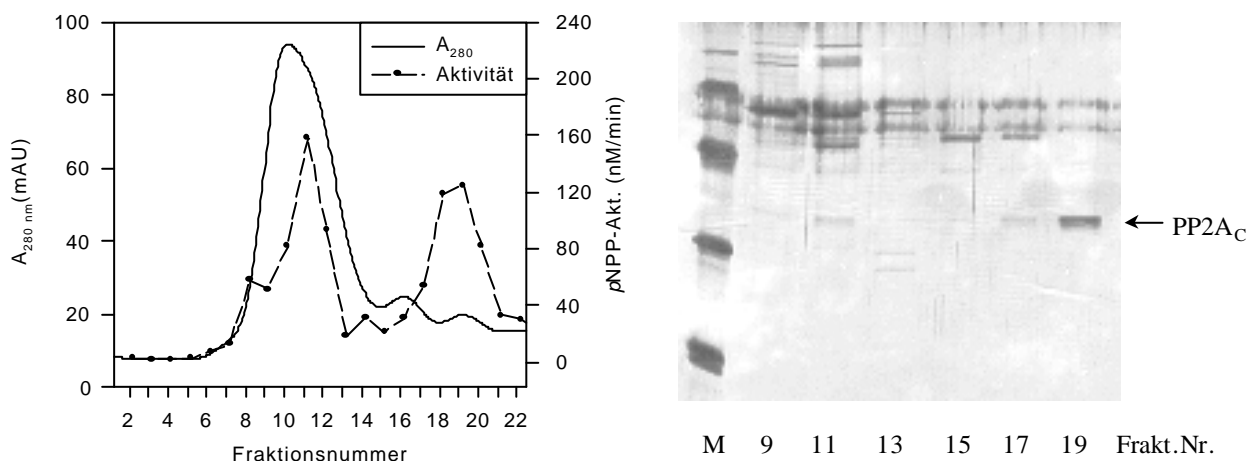
**Abb. 3.5** Identifizierung der B-Untereinheit der PP2A als α-Isoform durch Vergleich der Sequenzen (Swissprot P50409, Q00005, P54614, P50410) mit dem gefundenen Spaltmuster (HS – Mensch; SS – Schwein; OC - Kaninchen).

Die Schweinesequenz für die α-Isoform existiert in Swissprot nur als Fragment ab Asp<sup>22</sup> (Q29090). Ab da ist sie allerdings identisch zur humanen Sequenz. Das grau unterlegte Peptid wurde durch Aminosäuresequenzanalyse nach tryptischem Verdau sequenziert. Unterstrichene Peptide wurden im Peptidgemisch nach LysC-Verdau durch MALDI-TOF Massenspektrometrie anhand ihrer Massen identifiziert.

### 3.1.3. Isolierung der katalytischen Untereinheit PP2A<sub>C</sub>

Die katalytischen Eigenschaften der PP2A gegenüber vielen Substraten werden von den regulatorischen Untereinheiten variiert. Um den Einfluss auf die katalytischen Konstanten der Dephosphorylierung genauer zu untersuchen, sollte die trimere PP2A<sub>I</sub> mit der katalytischen Untereinheit verglichen werden. Die Reinigung der katalytischen Untereinheit aus Geweben wurde mehrfach beschrieben (Tung, H. Y. et al., 1984; Stone et al., 1987). In allen diesen Fällen konnte sie von dimeren und trimeren Formen durch Anionenaustauschchromatographie getrennt werden. Allerdings wird angenommen, dass die katalytische Untereinheit in der Zelle nicht frei vorliegt (Kremmer et al., 1997), da die strukturelle Untereinheit sehr fest an die katalytische gebunden ist (Turowski et al., 1997). Oft wird in den publizierten Reinigungsprotokollen deshalb neben der trimeren auch die dimere PP2A angereichert (Tung, H. Y. L. et al., 1985; Usui et al., 1988; Mumby et al., 1987; Waelkens et al., 1987; Hendrix et al., 1993b). Das Auftreten der separaten katalytischen Untereinheit in den oben genannten Fällen stellt wahrscheinlich einen durch die Präparation verursachten Artefakt dar.

Bei der Reinigung der PP2A<sub>I</sub> aus Schweinehirn wurde zu keiner Zeit der Prozedur eine Aufspaltung der Aktivität in mehrere Peaks beobachtet. Auch die Isolierung der katalytischen Untereinheit aus dem trimeren Komplex durch eine Ethanol-fällung nach (Cohen, P. et al., 1988) gelang im Verlauf dieser Arbeit nicht. Die wahrscheinlichste Ursache dafür ist die geringe Proteinkonzentration der verwendeten Phosphatase.



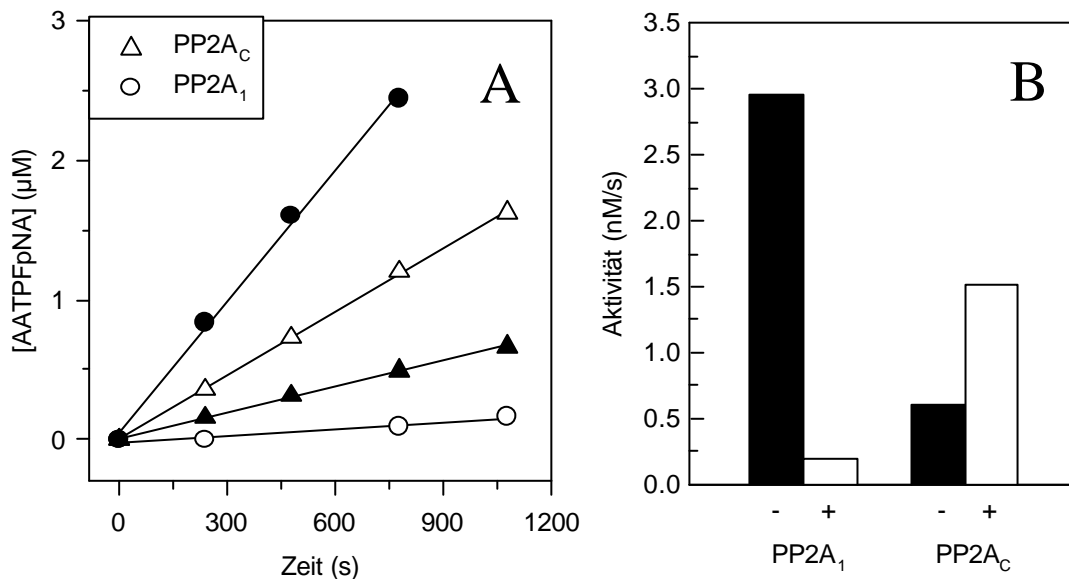
**Abb. 3.6** Isolierung der katalytischen Untereinheit PP2A<sub>C</sub> aus teilgereinigten PP2A<sub>I</sub>-Fraktionen mittels Gelfiltration.

Die Trennung erfolgte in 10 mM CHES, 1 M NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, pH 9.0 an einer Superdex 75-Säule am Smart-System (Pharmacia). Die Überprüfung der beiden erhaltenen Aktivitätsmaxima (pNPP als Substrat) mittels silbergefärbter SDS-PAGE identifizierte den zweiten Peak (Fraktion 19) als reine katalytische Untereinheit. Die beiden durchgehenden Banden im höhermolekularen Bereich des Gels sind keine Proteine in der Probe sondern Artefakte der Silberfärbung.

Die Präparation der katalytischen Untereinheit aus teilgereinigten PP2A<sub>1</sub>-Fraktionen gelang schließlich mittels Gelfiltration bei pH 9 in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen, sowie von DTT, Mg<sup>2+</sup>, und Ca<sup>2+</sup> (**Abb. 3.6**). Unmittelbar nach der Trennung wurde der pH-Wert wieder auf 7.5 eingestellt, so dass die Phosphatase den relativ drastischen Bedingungen nur während des Gelfiltrationslaufes (rund 30 min) ausgesetzt war.

Das Elutionsprofil der Gelfiltration zeigte zwei voneinander getrennte Aktivitätsmaxima mit dem Substrat *p*NPP, von denen das erste noch komplette trimere Phosphatase enthielt, das zweite aber aus sauberer katalytischer Untereinheit bestand.

Mit dieser Methode konnte also keine vollständige Zerstörung aller PP2A-Heterotrimeren erreicht werden, aber es konnten für enzymkinetische Untersuchungen ausreichende Mengen an reiner katalytischer Untereinheit gewonnen werden. Diese erwies sich bei Lagerung und während den Messungen stabil, zeigte allerdings, verglichen mit der trimeren Form, ein anderes Verhalten gegenüber MgCl<sub>2</sub> und DTT. Während die Aktivität der PP2A<sub>1</sub> durch DTT nicht beeinflusst wird und 100 mM MgCl<sub>2</sub> eine drastische Inhibierung bewirken, wird die Aktivität der PP2A<sub>C</sub> durch gleichzeitige Zugabe von 2 mM DTT und 100 mM MgCl<sub>2</sub> zum Dephosphorylierungsansatz um den Faktor 2.5 erhöht (**Abb. 3.7**).



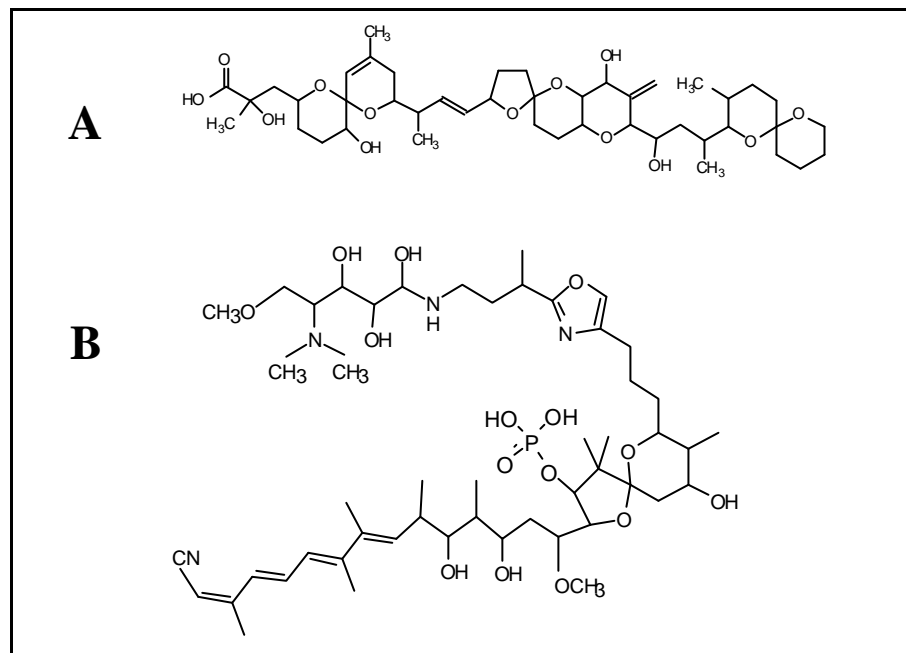
**Abb. 3.7** Einfluss von MgCl<sub>2</sub>/DTT auf die Aktivität der PP2A<sub>1</sub> und PP2A<sub>C</sub> gegenüber dem Peptid Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np.

Das Peptid (12.8 μM) wurde mit 0.1 nM PP2A<sub>1</sub> oder 1 nM PP2A<sub>C</sub> in 50 mM BTP pH 7.5 in Ab- oder Anwesenheit von 100 mM MgCl<sub>2</sub>/2 mM DTT bei 30 °C inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Aliquots entnommen und mittels HPLC analysiert. Dargestellt sind (A) die Produkt-Zeit-Kurven der Reaktion und (B) der Vergleich der Aktivität in Ab- und Anwesenheit von 100 mM MgCl<sub>2</sub>/2 mM DTT. Ausgemalte Symbole zeigen Abwesenheit und offene Symbole Anwesenheit der Effektoren.



### 3.1.4. Inhibierbarkeit durch Okadasäure und Calyculin A

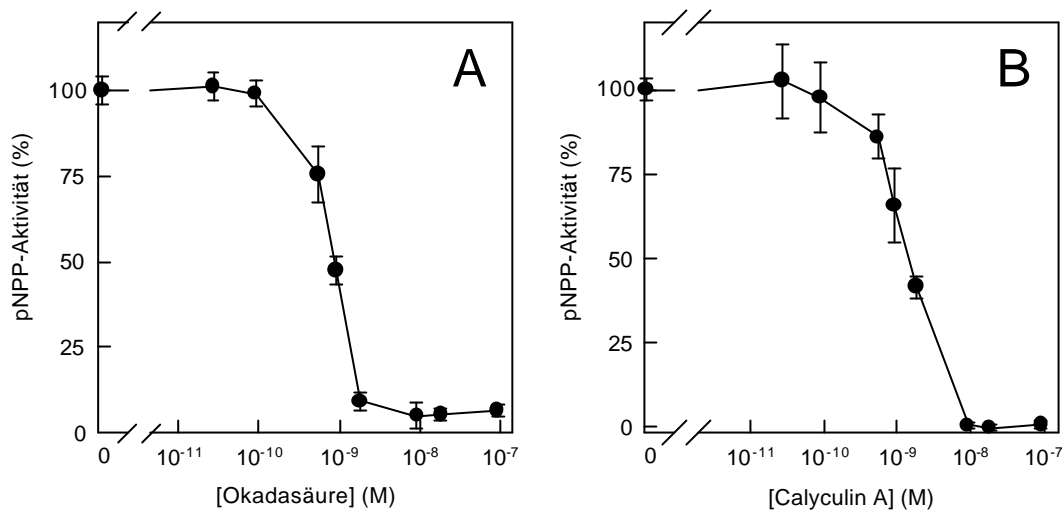
Die aus Schweinehirn gereinigte PP2A<sub>1</sub> zeigte noch Aktivität gegenüber dem tyrosinphosphatanalogen *p*NPP. Obwohl im SDS-Gel keine Fremdproteine erkennbar waren und eine intrinsische Tyrosinphosphataseaktivität der PP2A seit langem bekannt ist (Goris et al., 1988), konnte zum jetzigen Zeitpunkt eine Verunreinigung der Präparation durch geringe Mengen an Alkalischer Phosphatase nicht ausgeschlossen werden. Eine Unterscheidung zwischen Proteinphosphatasen und Alkalischer Phosphatase ist durch Anwendung von spezifischen Inhibitoren möglich. Unter anderem sind die Naurstoffe Okadasäure und Calyculin A ausgezeichnete Inhibitoren der PP2A, während sie die Alkalische Phosphatase nicht beeinflussen (Bialojan und Takai, 1988). Ursprünglich wurden Okadasäure und Calyculin A aus den marinen Schwämmen *Halichondria okadii* und *Discodermia calyx* isoliert (Ishihara et al., 1989). Wahrscheinlich werden sie aber von marinen Dinoflagellaten produziert und im Verlauf der Nahrungskette angereichert. Beide Verbindungen sind trotz unterschiedlicher Struktur (**Abb. 3.8**) hochaffine Inhibitoren der PP1 und PP2A (Übersichtsartikel: Cohen, P. et al., 1990; MacKintosh, C. R. W., 1994).



**Abb. 3.8** Strukturformeln der Okadasäure (A) und des Calyculin A (B)

Die Inhibierungsversuche wurden mit *p*NPP als Substrat durchgeführt. Die aus Schweinehirn isolierte PP2A<sub>1</sub> wurde durch Okadasäure bzw. Calyculin A mit IC<sub>50</sub>-Werten von 0.8 nM bzw. 1.5 nM inhibiert (**Abb. 3.9**). Die vollständige Inhibierbarkeit der PP2A<sub>1</sub> durch beide Inhibitoren zeigt, dass die relativ hohe Aktivität gegenüber dem künstlichen Substrat *p*NPP

intrinsisch ist und nicht von einer Verunreinigung der Präparation durch Alkalische Phosphatase verursacht wird.



**Abb. 3.9** Inhibierung der *p*NPP-Aktivität der PP2A<sub>1</sub> durch Okadasäure (A) und Calyculin A (B)

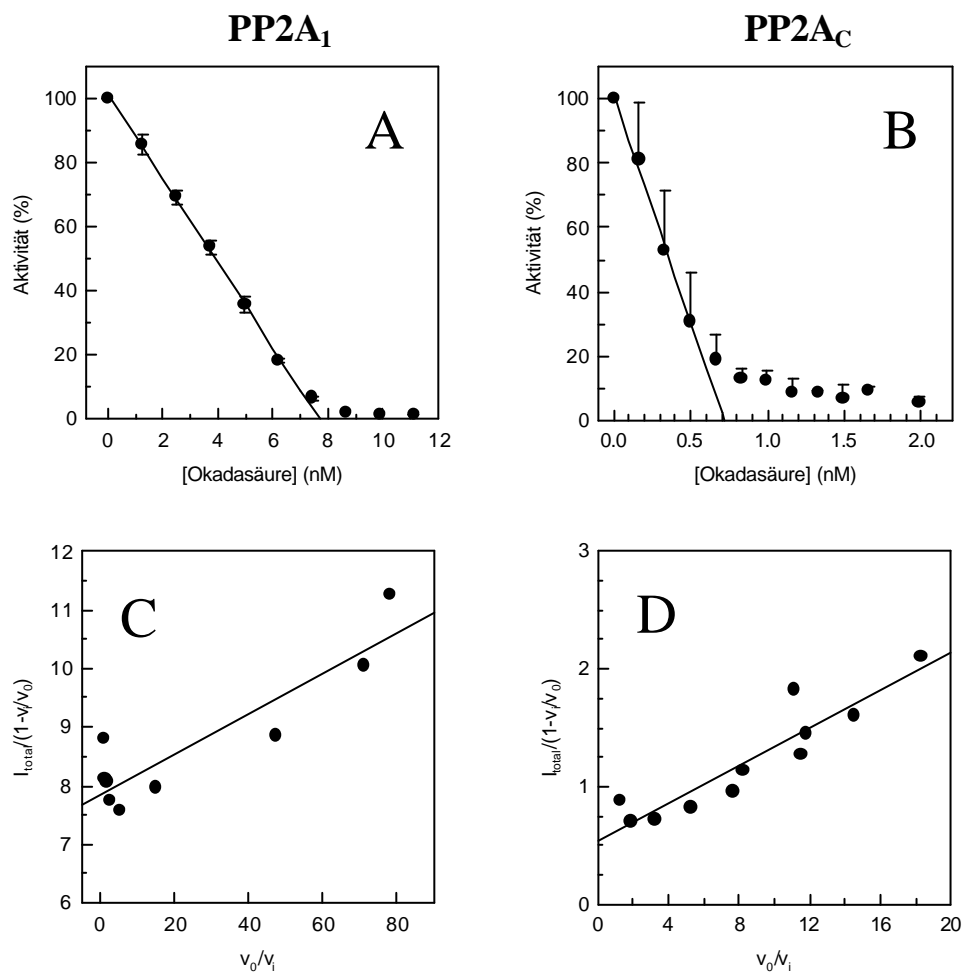
Die Messungen erfolgten in 20 mM Tris, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA pH 7.5 in Gegenwart von 5 mM *p*NPP und 9 nM PP2A<sub>1</sub> bei 30 °C. Die Daten stellen Mittelwerte ± Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen dar.

### 3.1.5. Titration der aktiven Konzentration an PP2A<sub>1</sub> und PP2A<sub>C</sub>

Für enzymkinetische Messungen ist die Kenntnis der möglichst exakten Proteinkonzentration unbedingt erforderlich. Bekannterweise sind viele Methoden zur Proteinbestimmung erheblich fehlerbehaftet, sei es, weil die Probe abweichende Eigenschaften von verwendeten Eichproteinen (Farbstoffbindung) aufweist oder katalytisch inaktives Protein enthält. Eine genaue Methode zur Proteinbestimmung stellt die Titration der aktiven Enzymmoleküle mit hochaffinen Inhibitoren dar. Im Fall der PP2A steht mit der Okadasäure ein solcher Inhibitor zur Verfügung. Sie inhibiert die PP2A mit einem K<sub>i</sub>-Wert von 32 pM (Takai und Mieskes, 1991; Takai et al., 1992). Deshalb wurden alle verwendeten PP2A-Stammlösungen vor Verwendung titriert. Alle in dieser Arbeit angegebenen bzw. zur Berechnung von Konstanten benutzten PP2A-Konzentrationen stellen katalytisch aktive Enzymkonzentrationen dar.

Die Titration wurde mit *p*NPP als Substrat durchgeführt, da die Aktivität in diesem Fall kontinuierlich mittels eines Spektrometers gemessen werden kann. Die Inhibierungskurve wurde in einem Meßansatz aufgenommen, die Zugabe von Okadasäure erfolgte kumulativ (Takai und Mieskes, 1991). Die Auswertung der Messungen erfolgte durch Auftragung der Restaktivität in Gegenwart des Inhibitors gegen die jeweilige Okadasäurekonzentration (**Abb. 3.10 A/B**). Nach Gleichung (4) (Kap. 2.3.3.1.) sollte sich eine Gerade ergeben, deren Schnittpunkt mit der Abszisse die aktive Enzymkonzentration darstellt. Die reell beobachtete

Abweichung von der Linearität bei höheren Inhibitorkonzentrationen ist zurückzuführen auf die Verringerung der Phosphatasekonzentration im Ansatz durch Inhibitorbindung. Damit ist die Bedingung für die Linearität  $E_{\text{total}} \gg K_i$  nicht mehr erfüllt. Eine alternative Methode zur Auswertung ist die Auftragung nach Henderson (Henderson, 1972) (Kap. 2.3.3.1. Gleichung (6)), bei der die Phosphatasekonzentration aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate ermittelt wird (Abb. 3.10 C/D). Die Konzentrationen aller verwendeten PP2A<sub>1</sub>-Stammlösungen lagen zwischen 50 und 70 nM und waren damit teilweise bis zu Faktor 3 niedriger als die mittels Bradford-Test ermittelten Proteinkonzentrationen. Die Konzentration der PP2A<sub>C</sub>-Stammlösung betrug 57 nM.

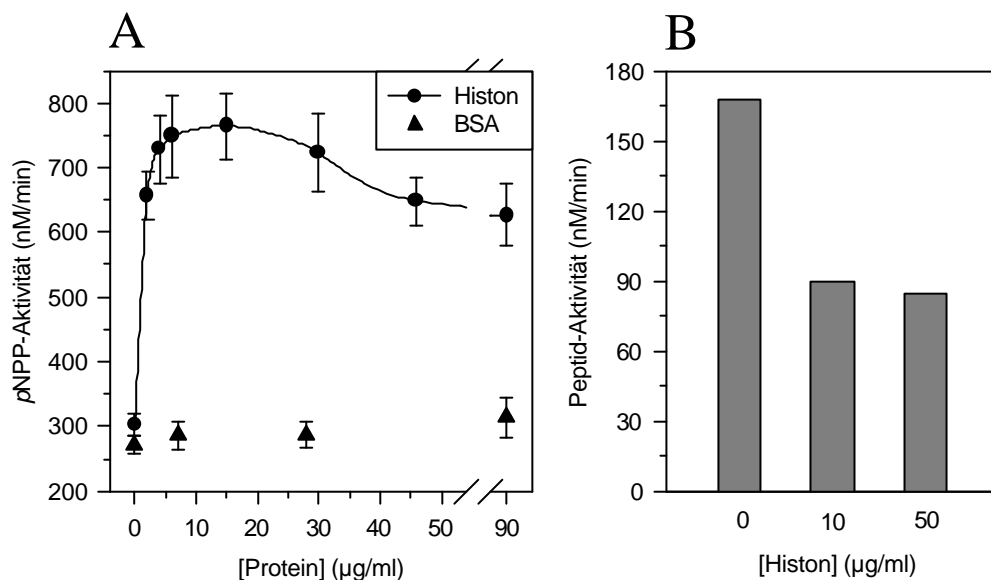


**Abb. 3.10** Titration einer PP2A<sub>1</sub>-Lösung (A, C) und einer PP2A<sub>C</sub>-Lösung (B, D) mit Okadasäure.

Die detaillierte Beschreibung ist im Text zu finden. Die Auftragung der Restaktivität gegen die vorhandene Inhibitorkonzentration und nachfolgende Extrapolation des linearen Abschnittes zur Abszisse ergeben eine PP2A<sub>1</sub>-Konzentration von 7.7 nM (A) und eine PP2A<sub>C</sub>-Konzentration von 0.7 nM (B) in der Küvette. Die Auftragung der Messwerte nach Henderson (Kap. 2.3.3.1.) ergibt vergleichbare Werte (C, D).

### 3.1.6. Beeinflussung der Phosphataseaktivität durch Histon

Zur weiteren Charakterisierung der gereinigten PP2A<sub>1</sub> wurde der Einfluss von Histon H1 auf die Phosphataseaktivität untersucht. Dieses basische Protein kann genau wie Heparin oder Polykationen (Protamin) verschiedene Holoenzyme der PP2A aktivieren. Es wurden die beiden Substrate *p*NPP und Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np getestet. Messungen mit *p*NPP erfolgten spektroskopisch in der Titerplatte, Messungen mit Peptidsubstrat wurden mittels HPLC-Methode durchgeführt, d.h. der Ansatz wurde für bestimmte Zeit inkubiert, abgestoppt und danach mittels HPLC analysiert. Alle Messungen erfolgten in 20 mM Bis-Tris-Propan, 1 mM DTT, 100 mM KCl, pH 7.5 bei 30 °C. Während das Kontrollprotein BSA keinen Einfluss auf die Phosphataseaktivität hatte, konnte durch Zusatz von Histon H1 eine bis zu 2.5fach höhere PP2A<sub>1</sub>-Aktivität gegenüber *p*NPP erzielt werden (**Abb. 3.11.**).



**Abb. 3.11** Einfluss von Histon H1 auf die Aktivität der PP2A<sub>1</sub>.

Die Messungen erfolgten in 20 mM BTP, 1 mM DTT, 100 mM KCl, pH 7.5 bei 30 °C. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte einer Dreifachbestimmung dar.

(A) Die Aktivität gegenüber *p*NPP (5 mM) wurde in der Titerplatte spektroskopisch gemessen. Zur Kontrolle, dass kein Wandeffekt vorliegt, wurde die Messung auch mit BSA durchgeführt. Die PP2A<sub>1</sub> (9 nM) wurde vor dem Starten der Reaktion durch Substrat für 10 min mit Histon vorinkubiert.

(B) Die Aktivität gegenüber Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np (25 µM) wurde mittels HPLC-Methode gemessen. Nach 10minütiger Vorinkubation der PP2A<sub>1</sub> (0.14 nM) mit Histon wurde die Reaktion durch Substratzugabe gestartet.

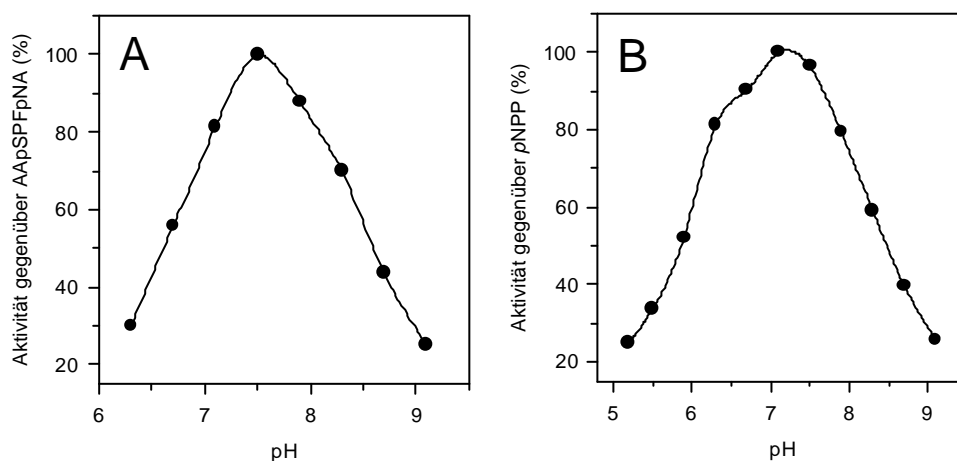
Die Abhängigkeit von der Histonkonzentration ergab eine Optimumskurve. Die maximale Aktivierung erfolgte bei einer Histonkonzentration von 15 µg/ml. Im Gegensatz dazu bewirkten ähnliche Histonkonzentrationen eine fast 50 %ige Inhibierung der PP2A<sub>1</sub>-Aktivität gegenüber dem Peptid Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np. Die wahrscheinliche Ursache

für diese Effekte ist die Dissoziation der B-Untereinheit vom Komplex und die dadurch veränderte Substratspezifität der PP2A.

### 3.1.7. Einfluss des pH-Wertes und der Ionenstärke auf die PP2A-Aktivität

Die Ermittlung des pH-Optimums der PP2A<sub>1</sub> erfolgte für die beiden Substrate *p*NPP und Ala-Ala-Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np. Die Abhängigkeit für das Peptidsubstrat wurde mittels HPLC-Methode gemessen. Bei der spektroskopischen Bestimmung des pH-Optimums für *p*NPP ist zu beachten, dass der molare Extinktionskoeffizient des *p*NPP unterhalb pH 9 selbst abhängig vom pH-Wert ist (vgl. Abb. 2.2). Aus diesem Grunde wurde der Aktivitätstest diskontinuierlich durchgeführt. Nach Inkubation der PP2A<sub>1</sub> mit *p*NPP bei den jeweiligen pH-Werten wurden die Proben durch Zugabe von KOH alkalisiert und damit gleichzeitig abgestoppt und auf den gleichen alkalischen pH-Wert eingestellt. Die gemessenen Extinktionen können jetzt direkt verglichen werden, ohne dass eine Korrektur des Extinktionskoeffizienten nötig ist.

Der Vergleich der pH-Abhängigkeiten für *p*NPP und das Peptid Ala-Ala-Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np (Abb. 3.12) zeigt das sehr ähnliche Verhalten beider Substrate. Mit dem Peptidsubstrat ist die maximale Aktivität bei pH 7.5 zu finden, bei *p*NPP ist dieses Maximum lediglich etwas ins Saure zu pH 7.1 verschoben. Bei beiden Substraten ergibt sich ein relativ enges Optimum mit steil abfallenden Flanken.

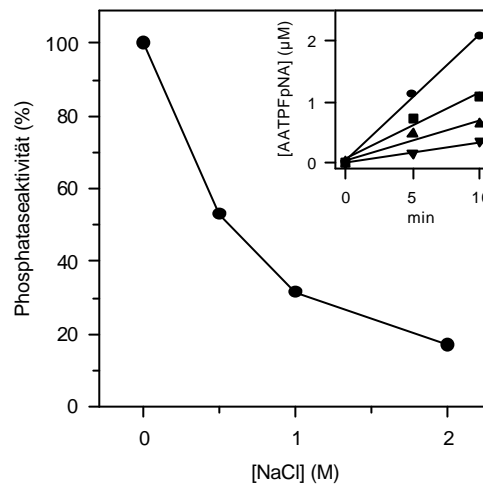


**Abb. 3.12** Abhängigkeit der PP2A<sub>1</sub>-Aktivität vom pH-Wert.

Die Messungen erfolgten in 50 mM MES (zwischen pH 5.2 und 5.9) oder BTP (zwischen pH 6.3 und 9.1) bei 30 °C.

Die Aktivität gegenüber Ala-Ala-Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np (A) wurde mittels HPLC-Methode in Gegenwart von 50 μM Substrat und 9 nM PP2A<sub>1</sub> gemessen. Die maximale Aktivität von 233 nM × min<sup>-1</sup> wurde als 100 % gesetzt. Die Aktivität gegenüber *p*NPP (B) wurde spektroskopisch in Gegenwart von 5 mM Substrat und 2.5 nM PP2A<sub>1</sub> gemessen. Die höchste Aktivität von 451 nM × min<sup>-1</sup> wurde als 100 % gesetzt.

Ähnlich wie bei Proteinkinasen bewirken hohe Salzkonzentrationen eine dramatische Verminderung der enzymatischen Aktivität der PP2A<sub>1</sub>. Dies wurde am Beispiel des Einflusses von NaCl auf die Aktivität gegenüber dem Peptid Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np gezeigt (**Abb. 3.13**). Bereits bei einer NaCl-Konzentration von 0.5 M beträgt die Restaktivität der PP2A<sub>1</sub> nur noch 53 %. Möglicherweise behindern hohe Ionenkonzentrationen die Erkennung und Bindung des Substrates, die ja zum großen Teil auf ionischen Wechselwirkungen zwischen Phosphatrest im Substrat und positiven Aminosäureseitenketten im Protein beruht.



**Abb. 3.13** Einfluss von NaCl auf die Aktivität der PP2A<sub>1</sub> gegenüber dem Peptid Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np.

Das Peptid (25 µM) wurde in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an NaCl in 50 mM BTP pH 7.5 für 5 bzw. 10 min mit 0.14 nM PP2A<sub>1</sub> inkubiert. Nach dem Abstoppen wurde der Ansatz mittels HPLC analysiert. Das eingefügte Bild zeigt die Produkt-Zeit-Kurven. Die Aktivität in Abwesenheit von NaCl ( $0.21 \mu\text{M} \times \text{min}^{-1}$ ) wurde als 100 % gesetzt.

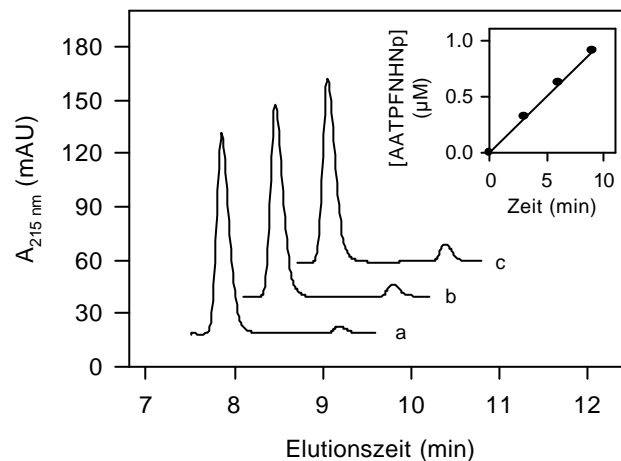
### 3.2. Untersuchungen zur Substratspezifität der PP2A

#### 3.2.1. Einfluss der P+1 Position auf die Dephosphorylierung

Untersuchungen zur Substratspezifität sind heutzutage Standardmethode bei der Charakterisierung von Enzymen, da sie oftmals wichtige Rückschlüsse bezüglich Anforderung an native Substrate, Reaktionsmechanismen oder Aufbau des aktiven Zentrums erlauben. Für die meisten zum jetzigen Zeitpunkt bekannten Proteinkinasen ist die Substratspezifität sehr gut untersucht. Basierend auf diesen Untersuchungen wurden für diese Kinasen Konsensussequenzen der bevorzugten Phosphorylierungsmotive definiert und in Nachschlagewerken erfaßt (Kreegipuu et al., 1998; Kreegipuu et al., 1999). Oft läßt sich anhand dieser Konsensussequenzen vorhersagen, welche Proteinkinase für die

Phosphorylierung des interessierenden Motives verantwortlich ist (Blom et al., 1999). Im Vergleich dazu existieren relativ wenige Arbeiten, die die Substratspezifität von Protein-Serin/Threonin-Phosphatasen systematisch mit Peptidsubstraten untersuchen. Über den Einfluss eines C-terminal zur phosphorylierten Aminosäure gelegenen Prolinrestes auf die Dephosphorylierung von Substraten liegen unterschiedliche Ergebnisse mit PP2A-Enzymen vor. Aus diesem Grunde sollte für die PP2A der Einfluss der der Phosphorylierungsstelle folgenden Aminosäure auf die Substrateigenschaften genauer untersucht werden. Die Versuche wurden mit Hexapeptiden der allgemeinen Sequenz Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Xaa-Phe-Gly-NH<sub>2</sub>, in denen Xaa durch jede proteinogene Aminosäure außer Cystein ersetzt wurde, durchgeführt. Diese Substrate wurden freundlicherweise von M. Drewello als Rohpeptide zur Verfügung gestellt. Sie wurden mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Vor ihrer Verwendung wurde die Reinheit durch analytische HPLC und ESI-Massenspektrometrie bestätigt.

Zur Untersuchung des Einflusses der der Phosphorylierungsstelle benachbarten Aminosäure auf die Dephosphorylierung des Substrates wurden für alle Peptide die  $k_{\text{cat}}/K_M$ -Werte der Dephosphorylierung durch die PP2A bestimmt. Die Phosphataseaktivität wurde mittels RP-HPLC gemessen. Dazu wurden die Substrate bei 30 °C mit PP2A inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Aliquots entnommen, durch Ansäuern abgestoppt und mittels HPLC analysiert (**Abb. 3.14**).



**Abb. 3.14** Messung der Phosphataseaktivität mittels RP-HPLC.

Die Dephosphorylierung wurde durch Zugabe von 0.11 nM PP2A<sub>1</sub> zu einer äquilibrierten Lösung von Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np (10.8 μM) gestartet. Nach 3 (a), 6 (b) and 9 (c) min wurden Aliquots von 55 μl entnommen, durch Zugabe von 1 μl 25 %iger (v/v) TFA abgestoppt und mittels RP-HPLC, wie im Methodenteil beschrieben, analysiert. Die Peaks bei Elutionszeiten von 7.9 und 9.2 min entsprechen dem phosphorylierten und dephosphorylierten Peptid. Die Menge an unphosphoryliertem Peptid wurde aus den integrierten Peakflächen berechnet und gegen die Inkubationszeit aufgetragen (eingefügtes Bild). Aus der Auftragung wurde eine Phosphataseaktivität von 0.1 μM × min<sup>-1</sup> errechnet.

Bei Verwendung kleiner Substratkonzentrationen ( $S \ll K_M$ ) kann  $k_{cat}/K_M$  direkt aus den gemessenen Initialgeschwindigkeiten berechnet werden (Gl. 9).

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{v}{E_0 \times S_0} \quad (\text{Gl. 9})$$

Um Schwankungen des Peptidgehaltes der verschiedenen synthetischen Peptide zu berücksichtigen, wurden die tatsächlichen Konzentrationen der Peptidstammlösungen spektroskopisch bestimmt. Als Messsignal diente die Absorption des in allen Peptiden vorhandenen Phe bei 257 nm, im Falle des Tyr- und Trp-haltigen Peptids die Absorption bei 275 und 280 nm. Die so erhaltenen Peptidgehalte der Stammlösungen betragen zwischen 61 % (Xaa = Trp) und 97 % (Xaa = Phe). Sie wurden in die Berechnung der  $k_{cat}/K_M$ -Werte einbezogen (Gl. 10).

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{v}{E_0 \times S_{\text{Einwaage}} \times \text{Pept.geh.}} \quad (\text{Gl. 10})$$

$S_{\text{Einwaage}}$  : eingewogene Substratkonzentration

Pept.geh.: Peptidgehalt

Um den Einfluss der regulatorischen Untereinheiten auf die Substratspezifität zu bestimmen, wurden sowohl die trimere PP2A<sub>1</sub> als auch die monomere PP2A<sub>C</sub> untersucht, die verwendete Substratkonzentration betrug 5  $\mu\text{M}$ . Um die Gültigkeit der Voraussetzung  $S \ll K_M$  zu bestätigen, wurde die Messreihe bei einer Peptidkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  wiederholt. Wie für die doppelte Substratkonzentration erwartet, wurden doppelte Initialgeschwindigkeiten und damit identische  $k_{cat}/K_M$ -Werte für alle Peptide gefunden (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der Messreihen (**Tab. 3.3**) zeigen einen großen Einfluss der C-terminal zur Phosphorylierungsstelle gelegenen Aminosäure auf die Substrateigenschaften der Peptide. Bestes (Xaa = Ile) und schlechtestes Substrat (Xaa = Asp) der PP2A<sub>1</sub> unterscheiden sich im  $k_{cat}/K_M$ -Wert ungefähr um Faktor 13. Relativ schlechte Substrate enthalten Gly, Pro oder Asp, bei dem besonders der große Unterschied zum Glu überrascht. Die besten Substrate enthalten in der untersuchten Position hydrophobe oder positiv geladene Aminosäuren.

Generell führt die Abwesenheit der regulatorischen Untereinheiten zu einer Verschlechterung der enzymatischen Eigenschaften der PP2A, allerdings scheint die Spezifität, zumindest in dieser Position, weitgehend unbeeinflusst von den regulatorischen Untereinheiten zu sein. Ein Vergleich der Spezifitätskonstanten relativ zu Ala in der untersuchten Position zeigt ungefähr gleiches Muster für die beiden PP2A-Formen (**Abb. 3.15**). Zwei Ausnahmen sind das Serin- und das Tryptophan-haltige Peptid. Sie werden von der PP2A<sub>1</sub> besser, von der PP2A<sub>C</sub> jedoch schlechter als das Alanin-haltige Peptid dephosphoryliert. Außerdem scheinen in



Anwesenheit der regulatorischen Untereinheiten (PP2A<sub>1</sub>) in einigen Fällen die aktivierenden (Phe, Tyr, Thr) oder inhibierenden Effekte (Gly) größer zu sein.

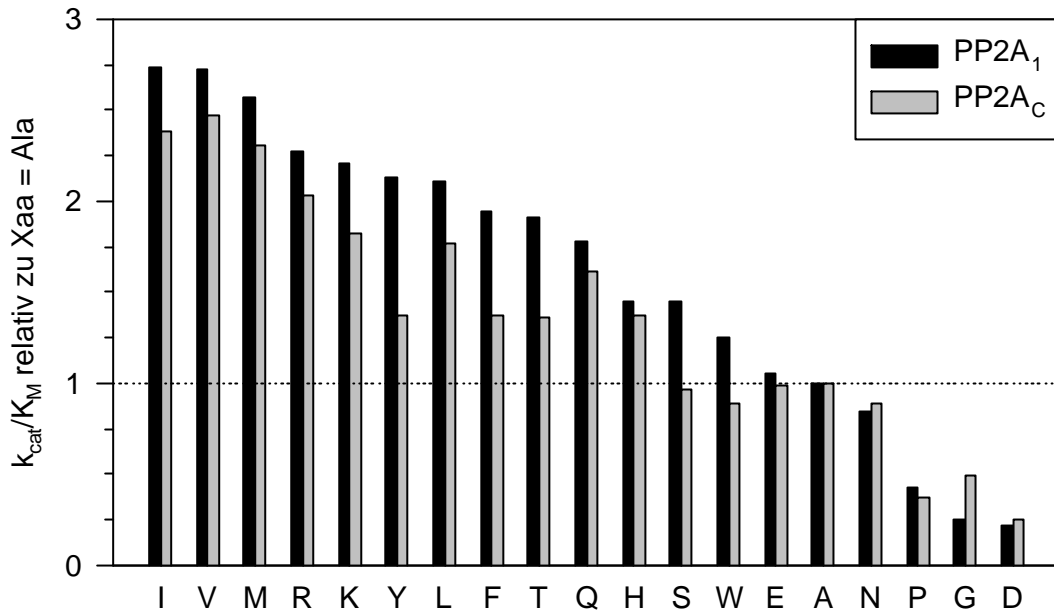
-Xaa-	$k_{\text{cat}}/K_M$ in $(\mu\text{M} \times \text{min})^{-1}$		Quotient PP2A <sub>1</sub> /PP2A <sub>C</sub>
	PP2A <sub>1</sub>	PP2A <sub>C</sub>	
Ile	548.1	29.8	18.4
Val	544.4	30.9	17.6
Met	514.8	28.8	17.9
Arg	455.6	25.4	17.9
Lys	440.7	22.8	19.3
Tyr	425.9	17.2	24.8
Leu	422.2	22.1	19.1
Phe	388.9	17.2	22.6
Thr	381.5	17.0	22.4
Gln	355.6	20.2	17.6
Ser	288.9	12.1	23.9
His	288.9	17.2	16.8
Trp	250.0	11.1	22.5
Glu	211.1	12.3	17.2
Ala	200.0	12.5	16.0
Asn	168.6	11.1	15.2
Pro	85.2	4.6	18.5
Gly	50.0	6.1	8.2
Asp	42.6	3.1	13.7

**Tab. 3.3** Dephosphorylierung von Peptiden der Sequenz Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Xaa-Phe-Gly-NH<sub>2</sub> durch PP2A<sub>1</sub> and PP2A<sub>C</sub> bei 30 °C.

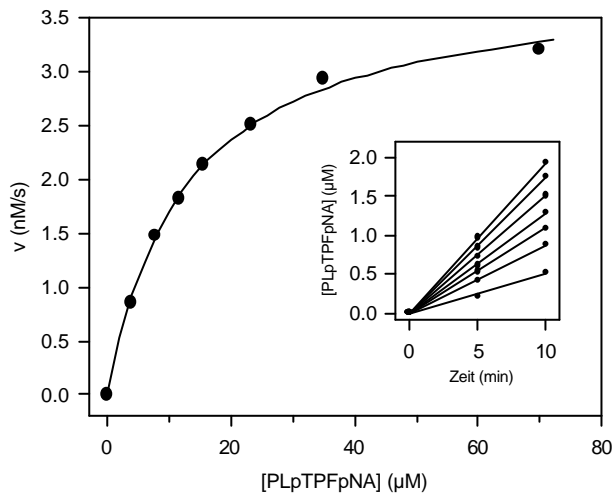
Die Peptidkonzentration betrug 5  $\mu\text{M}$ . Die PP2A<sub>1</sub> und die PP2A<sub>C</sub> wurden in Konzentrationen von 27 pM und 570 pM eingesetzt. Die Standardabweichungen sind zur besseren Übersichtlichkeit nicht gezeigt, liegen aber generell unter 6 %. Die Wiederholung der Messreihe mit 10  $\mu\text{M}$  Substratkonzentration ergab vergleichbare Resultate.

### 3.2.2. Bestimmung der katalytischen Konstanten für ausgewählte Peptide

Zur genaueren Analyse der Substratspezifität wurden für mehrere Phosphopeptide und *p*NPP die katalytischen Konstanten einzeln bestimmt. Mit Ausnahme des *p*NPP, für das spektrometrische Aktivitätsmessungen durchgeführt wurden, erfolgte dies wiederum mit Hilfe der RP-HPLC (s. auch Kap. 2.4.3.2.). In allen Fällen wurden die Phosphataseaktivitäten bei mindestens sechs Substratkonzentrationen (im Bereich 0.3 bis  $3 \times K_M$ ) bestimmt. In **Abb. 3.16** ist dies am Beispiel des Peptids Pro-Leu-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np gezeigt. Die katalytischen Konstanten wurden aus der nichtlinearen Anpassung der Messwerte nach Michaelis-Menten ermittelt.



**Abb. 3.15** Einfluss der P+1 Position auf die Dephosphorylierung von Peptiden der Sequenz Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Xaa-Phe-Gly-NH<sub>2</sub>. Die  $k_{cat}/K_M$ -Werte sind relativ zu dem von Xaa = Ala dargestellt.



**Abb. 3.16** v-S-Charakteristik der Dephosphorylierung von Pro-Leu-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np durch PP2A<sub>1</sub>.

Peptidkonzentrationen zwischen 3.8 μM und 69.9 μM wurden für 5 bzw. 10 min mit 0.32 nM PP2A<sub>1</sub> inkubiert, mit TFA abgestoppt und mittels RP-HPLC analysiert. Die Phosphataseaktivitäten wurden aus der Auftragung der Menge an dephosphoryliertem Peptid gegen die Inkubationszeit errechnet (eingefügtes Bild). Im untersuchten Zeitraum wurden bei allen Peptidkonzentrationen weniger als 15 % der Gesamtmenge umgesetzt, um lineare Abhängigkeit zu garantieren.

Um den Einfluss der regulatorischen Untereinheiten zu untersuchen, wurden die Konstanten für mehrere Substrate sowohl für die trimere als auch die monomere PP2A bestimmt (**Tab. 3.4**). Das Entfernen der regulatorischen Untereinheiten bewirkt eine Verschlechterung der katalytischen Eigenschaften der PP2A gegenüber allen untersuchten Peptidsubstraten. Lediglich für *p*NPP bewirkt die Abwesenheit der regulatorischen Untereinheiten eine Verbesserung des  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wertes trotz einer schlechteren Substratbindung. Der Vergleich der Konstanten für AApTPF-NH-Np und AApSPF-NH-Np zeigt die deutliche Bevorzugung von Phosphothreonin gegenüber Phosphoserin aufgrund besserer Bindung und schnellerer Umsetzung. Ein Prolinrest C-terminal der phosphorylierten Aminosäure führt zwar, verglichen mit Alanin, zu einer zwei- bis dreifachen Verringerung des  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wertes, allerdings stellen die untersuchten Peptide AApTPF-NH-Np und AApTPFG-NH<sub>2</sub> mit  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werten von 2900 und 2500 (mM × s)<sup>-1</sup> nach wie vor ausgezeichnete Substrate der PP2A<sub>I</sub> dar. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass der für die späteren Untersuchungen zur Isomerspezifität wichtige C-terminale 4-Nitroanilinrest kaum negative Auswirkungen auf die Substrateigenschaften der Peptide hat. Viel drastischere Effekte bewirkt eine weitere Verkürzung des Peptidrückgrates von AApTPF-NH-Np oder AApTPFG-NH<sub>2</sub> auf ein reines Pentapeptid. Dies resultiert in einem 7fach (PP2A<sub>C</sub>) bzw. 18fach (PP2A<sub>I</sub>) höheren  $K_{\text{M}}$ -Wert. Die generell niedrigere Effizienz ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ) der monomeren PP2A<sub>C</sub> für alle Peptidsubstrate ist das Resultat eines schlechteren  $K_{\text{M}}$ - und  $k_{\text{cat}}$ -Wertes.

		$K_M$	$k_{cat}$	$k_{cat}/K_M$
		( $\mu\text{M}$ )	( $\text{s}^{-1}$ )	( $\text{mM} \times \text{s}$ ) <sup>-1</sup>
PP2A <sub>1</sub>	<i>p</i> NPP	1400 ± 200	3.7 ± 0.2	2.6 ± 0.3
	AApTPF-NH-Np	13 ± 3	37.9 ± 3.9	2900 ± 380
	AApSPF-NH-Np	233 ± 14	20.5 ± 0.7	88.0 ± 2.3
	AApTAF-NH-Np	44 ± 18	253.3 ± 38.3	5800 ± 1800
	AApTPF-OH	239 ± 54	69.5 ± 9.0	290 ± 22
	AApTPFG-NH <sub>2</sub>	23 ± 2	57.9 ± 0.7	2500 ± 100
	AApTAFG-NH <sub>2</sub>	49 ± 3	343.8 ± 5.2	7000 ± 254
	PLpTPF-NH-Np	13 ± 0.7	11.9 ± 0.3	940 ± 35
PP2A <sub>C</sub>	<i>p</i> NPP	4000 ± 300	17.1 ± 0.5	4.3 ± 0.2
	AApTPF-NH-Np	32 ± 6	4.9 ± 0.4	150 ± 16
	AApSPF-NH-Np	1700 ± 400	10.3 ± 1.7	6.1 ± 0.4
	AApTAF-NH-Np	84 ± 29	29.3 ± 4.6	350 ± 58
	AApTPF-OH	241 ± 22	5.8 ± 0.3	24.1 ± 1.1

**Tab. 3.4** Katalytische Konstanten der Dephosphorylierung verschiedener Phosphopeptide und *p*NPP durch PP2A<sub>1</sub> und PP2A<sub>C</sub> bei 30 °C.

Die angegebenen  $K_M$ -Werte für prolinhaltige Peptide resultieren aus Messungen mit äquilibrierten Gemischen aus *cis* und *trans*-Isomer. Da das *cis*-Isomer nicht dephosphoryliert wird (s. Kap. 3.2.2.3) müssten die  $K_M$ -Werte um den *cis*-Gehalt korrigiert werden. Dieser beträgt allerdings bei den verwendeten Peptiden und Bedingungen weniger als 10 %, so dass der korrigierte  $K_M$ -Wert sich kaum vom angegebenen unterscheidet und in jedem Fall innerhalb des Messfehlers der Bestimmung liegt.

Verglichen mit der PP2A zeigen unspezifische Phosphatasen (Alkalische und Saure Phosphatase) eine höhere Aktivität gegenüber dem künstlichen Substrat *p*NPP, sowie eine deutlich geringere Aktivität gegenüber Phosphopeptiden (**Tab. 3.5**). Die katalytischen Konstanten der Alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm und der Sauren Phosphatase aus Kartoffel wurden mittels Molybdat-Ascorbinsäure-Test bestimmt (vgl. Kap.2.4.3.3.). Für die Alkalische Phosphatase erfolgten die Messungen bei pH 7.5, für die Saure Phosphatase bei

pH 5.2. Diese Phosphatasen bevorzugen im Gegensatz zur PP2A Phosphoserin gegenüber Phosphothreonin. In früheren Untersuchungen konnten mit anderen Peptiden teilweise sogar größere Unterschiede als bei den hier verwendeten Substraten detektiert werden (Donella-Deana et al., 1991; Pinna und Donella-Deana, 1994).

		$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_M$ ( $mM \times s$ ) $^{-1}$
Alkalische Phosph.	<i>p</i> NPP	$0.017 \pm 0.001$	$12.4 \pm 0.2$	$721 \pm 41$
	AApTPF-NH-Np	$1.9 \pm 0.5$	$0.74 \pm 0.1$	$0.39 \pm 0.06$
	AApSPF-NH-Np	$1.2 \pm 0.2$	$2.6 \pm 0.2$	$2.2 \pm 0.3$
Saure Phosph.	PNPP	$0.54 \pm 0.05$	$19.2 \pm 0.5$	$35.8 \pm 2.9$
	AApTPF-NH-Np	$9.0 \pm 1.4$	$0.58 \pm 0.06$	$0.064 \pm 0.004$
	AApSPF-NH-Np	$2.4 \pm 0.5$	$0.21 \pm 0.02$	$0.085 \pm 0.008$

**Tab. 3.5** Katalytische Konstanten der Dephosphorylierung verschiedener Substrate durch Alkalische Phosphatase (bei pH 7.5) und Saure Phosphatase (bei pH 5.2)

### 3.3. Untersuchungen zur *cis/trans* Konformerspezifität von Phosphatasen

#### 3.3.1. Allgemeine Bemerkungen

Die ausgezeichneten Substrateigenschaften des Peptids Ala-Ala-Thr( $PO_3H_2$ )-Pro-Phe-NH-Np waren Voraussetzung, um die Konformerspezifität der PP2A an diesem Substrat zu untersuchen. Neben den PPIasen, die die *cis/trans* Isomerisierung der Peptidyl-Prolyl Bindung katalysieren, sind die Proteasen die bisher einzige Enzymklasse, für die eine Konformerspezifität bei der Katalyse beschrieben ist. Von vielen Proteasen ist seit langem bekannt, dass sie ihre Substrate nur hydrolysieren, wenn diese in *trans* Konformation vorliegen. Dabei ist die Selektivität keineswegs auf die zu hydrolysierende Peptidbindung beschränkt, auch die Konformation weiter entfernt liegender Peptidbindungen ist von entscheidender Bedeutung für die Proteolyse. Da alle Peptide mit Peptidyl-Prolylbindungen in Lösung als Gemisch aus *cis* und *trans* Isomer vorliegen, sollte untersucht werden, ob die PP2A beide Konformere des pThr-Pro-Motives als Substrate akzeptiert, oder ob sie zwischen ihnen unterscheiden kann.

Die größte Schwierigkeit bei der Untersuchung der Konformerspezifität besteht darin, dass die beiden Isomeren keine stabilen Verbindungen darstellen, sondern miteinander im Gleichgewicht stehen. Die Lage des Gleichgewichtes und die Isomerisierungsgeschwindigkeit

hängen nicht nur von den äußeren Bedingungen wie Temperatur und Lösungsmittel, sondern auch von der Aminosäuresequenz des Peptids ab (Reimer et al., 1997; Reimer et al., 1998).

### 3.3.2. Herstellung von *cis*-Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np

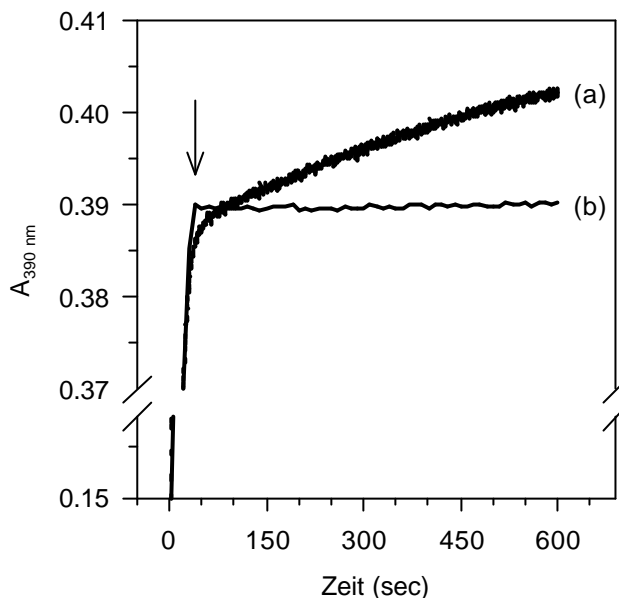
Im Rahmen dieser Arbeit wurde die isomerspezifische Proteolyse zur Herstellung von reinem *cis* Isomer aus einem äquilibrierten Gemisch von *cis* und *trans* Konformer genutzt. Diese Methode findet seit langem Anwendung bei der Messung von Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerase-Aktivitäten (Fischer, G. et al., 1984b). Sie nutzt die Tatsache, dass Serinproteasen wie Chymotrypsin, Trypsin oder Subtilisin Peptide nur hydrolysieren, wenn die Peptidbindung zwischen P<sub>2</sub> und P<sub>3</sub>-Position (entsprechend der Nomenklatur nach Schechter und Berger, 1967) in *trans* Konformation vorliegt.

Um die aktive Proteasekonzentration zu bestimmen, wurde das verwendete Chymotrypsin mit 4-Nitrophenylacetat titriert (Bernhardt, 1997). Es enthielt 62 % katalytisch aktives Enzym.

Für das Substratpeptid Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np konnte mittels isomerspezifischer Proteolyse eine Geschwindigkeitskonstante für die *cis* nach *trans* Isomerisierung von  $(1.7 \pm 0.3) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  und ein *cis*-Gehalt von  $5.7 \pm 0.4 \%$  (bei 10 °C und pH 7.8) bestimmt werden (Schutkowski et al., 1998). Der *cis*-Gehalt konnte auf  $10.5 \pm 0.2 \%$  erhöht werden, wenn die isomerspezifische Proteolyse mit in Wasser gelöstem Peptid gestartet wurde, da das Peptid als TFA-Salz vorliegt und beim Lösen in Wasser ein stark saurer pH-Wert resultiert.

Die Herstellung von *cis*-Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np erfolgte durch isomerspezifische Proteolyse mit Chymotrypsin. Sollte das *cis*-Konformer zur Bestimmung der Isomerisierungsgeschwindigkeit eingesetzt werden (Kap. 3.3.3), wurden dem Ansatz 0.5 M NaCl zugesetzt, da in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen die Hydrolyse von Phosphopeptiden schneller verläuft und somit die Proteasekonzentration im Ansatz verringert werden konnte. Die Isomerisierungsgeschwindigkeit wird davon nicht beeinflusst (Bernhardt, 1997). Die Herstellung des *cis*-Konformers für einen nachfolgenden Phosphataseassay erfolgte wegen der Inhibierung der PP2A<sub>1</sub> durch hohe Salzkonzentrationen (vgl Kap. 3.1.7) ohne Zusatz von NaCl. Nach dem Reaktionsstart erfolgte die Hydrolyse des vorhandenen *trans*-Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np unter Freisetzung von 4-Nitroanilin. Das verbleibende *cis*-Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np isomerisiert nach einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung bis zur Wiedereinstellung des *cis/trans* Gleichgewichtes. Um weitere Proteolyse des entstehenden *trans*-Konformers zu verhindern, muß das Chymotrypsin schnell und vollständig inhibiert werden. Dazu wurde Eglin C, ein

Proteaseinhibitor aus dem Blutegel *Hirudo medicinalis* (Rink et al., 1984) verwendet. Durch Zugabe eines mindestens 1.4fachen molaren Überschusses an Eglin C erfolgte eine sofortige und vollständige Inaktivierung des Chymotrypsins (**Abb 3.17**). Damit liegt unmittelbar nach dem Abstoppen des Chymotrypsins alles vorhandene Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np in *cis*-Konformation vor. Die Gesamtkonzentration beträgt allerdings nur noch 10.5 % der ursprünglich für die Proteolyse eingesetzten Konzentration.



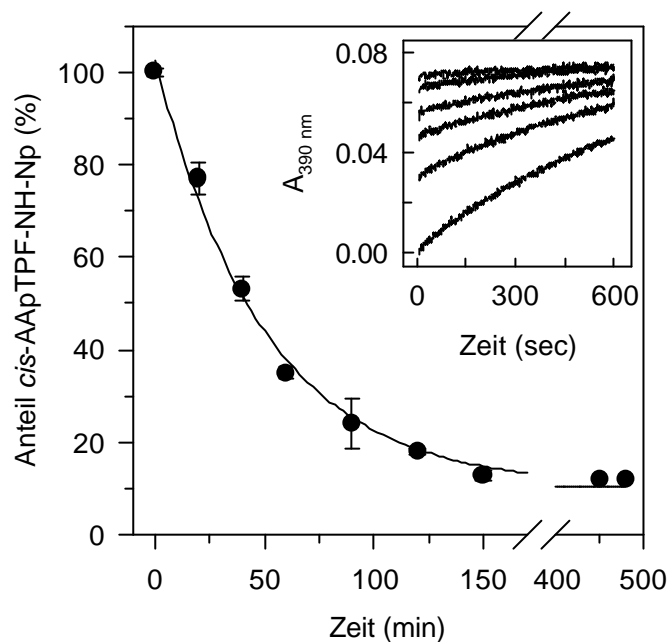
**Abb. 3.17** Abstoppen der isomerspezifischen Proteolyse von Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np

Die Hydrolyse des Peptids (37.5  $\mu$ M) erfolgte in Gegenwart von 0.5 M NaCl bei 10  $^{\circ}$ C. Unmittelbar nach Zugabe von 5  $\mu$ M Chymotrypsin (active site titriert) wird das *trans*-Konformer hydrolysiert. Das verbleibende *cis*-Konformer isomerisiert nach einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung, dabei entstehendes *trans*-Konformer wird sofort hydrolysiert (a). Die Zugabe von 7.9  $\mu$ M Eglin C 40 sec nach dem Start der Reaktion (Pfeil) bewirkt eine sofortige und vollständige Inhibierung des Chymotrypsins. Nachfolgend entstehendes *trans*-Konformer wird nicht hydrolysiert (b).

### 3.3.3. Bestimmung der Isomerisierungsgeschwindigkeit von *cis*-Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np bei 0 $^{\circ}$ C

Das durch isomerspezifische Proteolyse hergestellte *cis*-Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np isomerisiert nach einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung mit  $k_{\text{obs}} = k_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}} + k_{\text{trans} \rightarrow \text{cis}}$  bis zur Wiedereinstellung des *cis/trans* Gleichgewichtes. Die Voraussetzung für die späteren Untersuchungen zur Konformerspezifität der PP2A war die genaue Kenntnis der isomeren Zusammensetzung der Substratlösung zu beliebigen Zeitpunkten. Aus diesem Grund wurde die Isomerisierungsgeschwindigkeit für das Peptid bestimmt. Um die Isomerisierungsgeschwindigkeit so weit wie möglich zu verlangsamen, wurden alle Reaktionen bei 0  $^{\circ}$ C durchgeführt. Zur experimentellen Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten bei 0  $^{\circ}$ C

wurde das *cis*-Konformer in einem Wasser/Eis Gemisch inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Aliquots entnommen und mittels isomerspezifischer Proteolyse der *cis*-Gehalt bestimmt. Dazu wurde zu den Aliquots erneut Chymotrypsin in einem 4.3fachen molaren Überschuß zum vorhandenen Eglin C gegeben und die Reaktion spektroskopisch verfolgt (**Abb. 3.18**). Die Anpassung der Ergebnisse nach einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung ergab eine Geschwindigkeitskonstante für die *cis/trans* Isomerisierung von  $k_{\text{obs}} = 0.020 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$  sowie einen *cis*-Gehalt im Gleichgewicht von  $10.3 \pm 1.8 \%$ .



**Abb. 3.18** Bestimmung der Isomerisierungsgeschwindigkeit von *cis*-Ala-Ala-Thr( $\text{PO}_3\text{H}_2$ )-Pro-Phe-NH-Np bei  $0^\circ\text{C}$

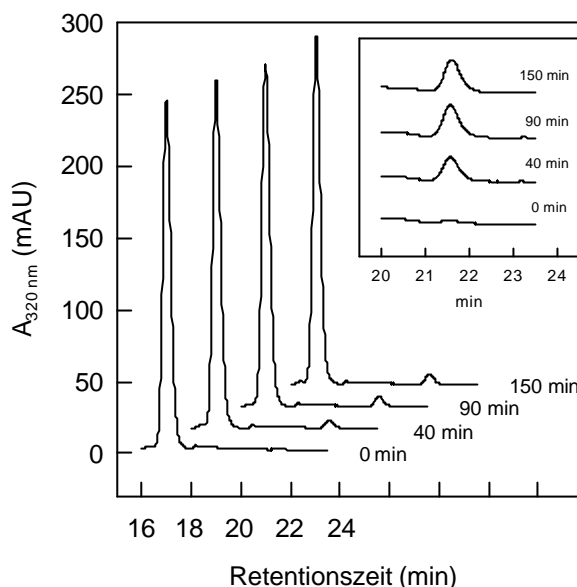
Das *cis*-Konformer des Substrates wurde bei  $0^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Aliquots entnommen und der Anteil an *cis*-Ala-Ala-Thr( $\text{PO}_3\text{H}_2$ )-Pro-Phe-NH-Np mittels isomerspezifischer Proteolyse bestimmt. Die Meßkurven für die Proteolyse nach 0, 20, 40, 60, 90 und 150 min Inkubation (von unten nach oben) sind im eingefügten Bild gezeigt. Die erhaltenen Daten ( $n = 3$ ) wurden nach einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung angepasst.

### 3.3.4. Untersuchungen zur Konformerspezifität der PP2A<sub>1</sub>

Um festzustellen ob die Konformation der pThr-Pro-Bindung im Substrat einen Einfluss auf die Dephosphorylierung durch die PP2A<sub>1</sub> hat, wurde das *cis*-Ala-Ala-Thr( $\text{PO}_3\text{H}_2$ )-Pro-Phe-NH-Np wie oben beschrieben hergestellt und bei  $0^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Aliquots entnommen, für kurze Zeit mit PP2A<sub>1</sub> inkubiert und anschließend mittels RP-HPLC analysiert. Die selektive Detektion der Dephosphorylierung des Substrates in einem Gemisch aus vielen Komponenten in hohen Konzentrationen (hydrolysiertes Peptid



und freies 4-Nitroanilin, Chymotrypsin, Eglin C) erfolgte anhand des C-terminalen 4-Nitroanilidrestes, der bei 320 nm sein Absorptionsmaximum besitzt (**Abb. 3.19**).



**Abb. 3.19** Messung der Isomerspezifität von Phosphatasen mittels HPLC.

Gezeigt sind die Elutionsprofile des Substrates nach zweiminütiger Inkubation mit PP2A<sub>1</sub>. Vor dem Start der Phosphatasereaktion wurde die Isomerisierung des Substrates für 0, 40, 90 und 150 min ermöglicht. Die Peaks bei 16.7 min und 21.5 min (im eingefügten Bild) entsprechen dem Substrat Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np und dem unphosphorylierten Produkt. Dies wurde bestätigt durch Vergleich der Elutionszeiten mit Referenzsubstanzen und Untersuchung mittels ESI-Massenspektrometrie. Die selektive Detektion des 4-Nitroanilids bei 320 nm ermöglichte die Messung der Dephosphorylierung selbst in einem komplexen Substanzgemisch.

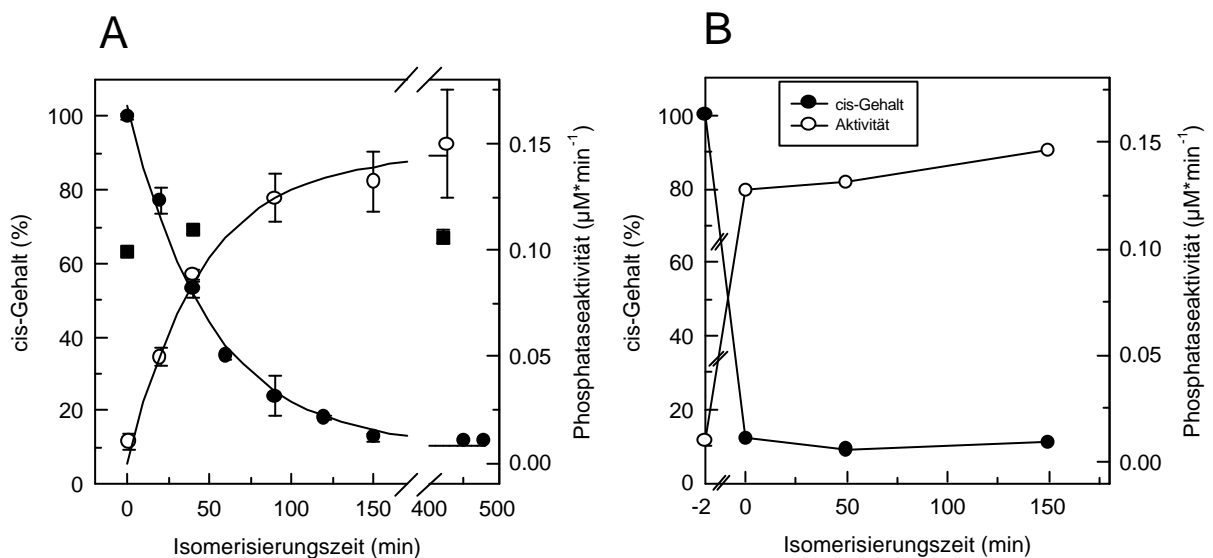
In den Aliquots, die mit PP2A<sub>1</sub> inkubiert wurden, war die Peptidkonzentration konstant, lediglich die Isomerenzusammensetzung, d. h. der Anteil *cis* bzw. *trans* Konformer, änderte sich. Mit 7.5 μM lag die Substratkonzentration unterhalb des K<sub>M</sub>-Wertes für die PP2A<sub>1</sub>. Folglich sollten schon geringe Änderungen der Substratkonzentration, verursacht durch die Isomerisierung, zu detektierbaren Aktivitätsveränderungen führen, wenn beide Konformere unterschiedliche Substrateigenschaften besitzen. Andererseits sollte die Isomerisierungszeit keinen Einfluss auf die Phosphataseaktivität haben, wenn beide Isomere gleich gute Substrate für die Phosphatase darstellen.

Die Untersuchungen mit der PP2A<sub>1</sub> ergaben eine nahezu absolute Spezifität für das *trans* Konformer. Mit zunehmender Isomerisierungszeit (und damit zunehmendem *trans*-Gehalt) erhöhte sich die Phosphataseaktivität (**Abb 3.20 A**). Die gemessenen Enzymaktivitäten konnten nach einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung angepasst werden. Die Kurvenanpassung ergab eine Geschwindigkeitskonstante von  $0.022 \pm 0.003 \text{ min}^{-1}$ , die

identisch zur Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{obs}}$  der *cis/trans* Isomerisierung unter diesen Bedingungen ist. Damit ist unter diesen Bedingungen die Isomerisierung geschwindigkeitsbestimmend für die Dephosphorylierung des Substrates.

Eine kurze Vorinkubation des *cis*-Ala-Ala-Thr( $\text{PO}_3\text{H}_2$ )-Pro-Phe-NH-Np mit katalytischen Mengen der für pSer/pThr-Pro Motive spezifischen Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerase Pin1 bewirkt die sofortige Einstellung des *cis/trans* Gleichgewichts und damit auch volle Aktivität der PP2A<sub>1</sub> gegenüber dem Substrat (**Abb. 3.20 B**). Die PP2A<sub>1</sub> ist damit eine *trans*-spezifische Phosphatase, deren Aktivität durch Pin1-katalysierte Isomerisierung erhöht werden kann.

Für die Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm wurde zu jedem Zeitpunkt der Isomerisierung die gleiche Enzymaktivität gemessen. Eine Änderung der Isomerenzusammensetzung von 100 % *cis* zu 10 % *cis*-Konformation hatte keinen Einfluss auf die Dephosphorylierung des Substrates, obwohl die Substratkonzentration mit 7.5  $\mu\text{M}$  sehr weit unterhalb des  $K_M$ -Wertes von 1.9 mM lag. Die Alkalische Phosphatase ist also während ihres Katalysezyklusses nicht in der Lage, zwischen *cis* und *trans* Konformer zu unterscheiden.

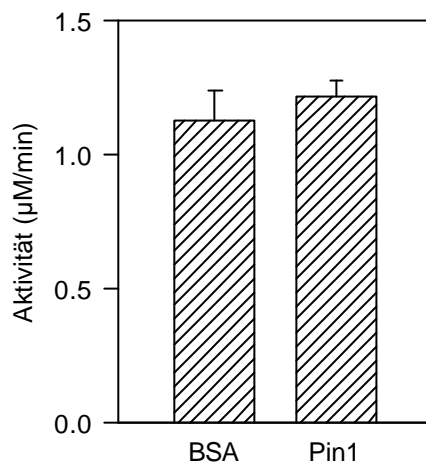


**Abb. 3.20** Abhängigkeit der Phosphataseaktivität von der zeitabhängigen Isomerenzusammensetzung des Peptids Ala-Ala-Thr( $\text{PO}_3\text{H}_2$ )-Pro-Phe-NH-Np.

(A) Das *cis*-Konformer von Ala-Ala-Thr( $\text{PO}_3\text{H}_2$ )-Pro-Phe-NH-Np wurde bei 0 °C bis zur Einstellung des Gleichgewichtes belassen (ausgemalte Kreise, Kurve entnommen aus Abb. 3.18). Während dieser Reaktion wurden zu verschiedenen Zeiten Aliquots entnommen und für 2 min mit 1.3 nM PP2A<sub>1</sub> (offene Kreise) oder für 3 min mit Alkalischer Phosphatase (0.32 mg/ml, Quadrate) inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit TFA wurden die Aliquots mittels RP-HPLC analysiert und die Enzymaktivitäten berechnet.

(B) Die Experimente wurden analog zu (A) und Abb. 3.18 durchgeführt, allerdings wurde der Ansatz vor Entnahme des ersten Aliquots für 2 min mit 135 nM humanem rekombinatem Pin1 inkubiert.

Um zu überprüfen, ob die höhere Aktivität der PP2A<sub>1</sub> in Gegenwart von Pin1 in Abb. 3.20 B tatsächlich nur auf die Isomerisierung des Substrates und damit die Bereitstellung einer höheren Substratkonzentration zurückzuführen ist, und nicht auf einer direkten Aktivierung der PP2A<sub>1</sub> durch Pin1 beruht, wurde die Enzymaktivität der PP2A<sub>1</sub> gegenüber einem nichtprolinhaltigen Substrat gemessen. Im Peptid Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Ala-Phe-NH-Np liegen alle Peptidbindungen in *trans*-Konformation vor und Pin1 kann die Isomerisierung nichtprolinhaltiger Peptide nicht katalysieren (Scholz et al., 1998). Wie in **Abb. 3.21** zu sehen ist, hat die Anwesenheit von Pin1 in diesem Fall innerhalb der Fehlergrenzen keinen Einfluss auf die Aktivität der PP2A<sub>1</sub>.



**Abb. 3.21** Einfluss von Pin1 auf die Dephosphorylierung des nicht prolinhaltigen Peptids Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Ala-Phe-NH-Np.

100 µM Phosphopeptid wurden in 50 mM Bis-Tris-Propan pH 7.5 in Gegenwart von 235 nM BSA oder Pin1 mit 45pM PP2A<sub>1</sub> inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Aliquots abgestoppt, mittels HPLC analysiert und mit Hilfe der integrierten Peakflächen die Phosphataseaktivitäten berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 3). Zur Gewährleistung linearer Abhängigkeiten betrug der Gesamtumsatz weniger als 10 %.

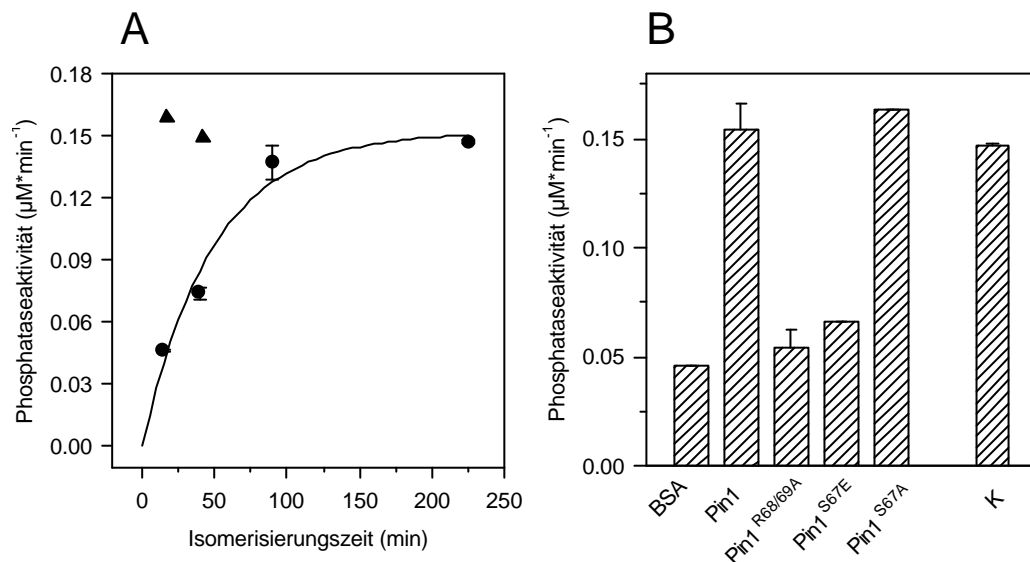
### 3.3.5. Einfluss von Pin1 und seinen Mutanten auf die Dephosphorylierung des Cdc25-Peptids Pro-Leu-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np

Die dualspezifische Phosphatase Cdc25C ist ein wichtiges Regulatorprotein beim Eintritt der Zelle in die Mitose. Ihre Regulation erfolgt durch reversible Phosphorylierung an mehreren Ser/Thr-Pro Motiven. Eine dieser *in vivo* Phosphorylierungsstellen ist das Thr<sup>48</sup> des *Xenopus*-Cdc25C (Kumagai und Dunphy, 1992; Izumi und Maller, 1993). Diese Position ist außerdem eine bevorzugte Bindungsstelle für Pin1 (Lu, P. J. et al., 1999b) und sie ist zwischen *Xenopus* und Mensch konserviert (**Abb. 3.22**).

Cdc25 xen      PEQPLT<sup>48</sup>PVT  
 Cdc25 hum      \*DV\*RT<sup>48</sup>\*\*G

**Abb. 3.22** Sequenzalignment der Phosphorylierungsstelle T<sup>48</sup> des Cdc25C aus *Xenopus* (Swissprot-Eintrag P30309) und Mensch (Swissprot-Eintrag P30307)

Mit Hilfe des Peptids Pro-Leu-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np, das von dieser Phosphorylierungsstelle abgeleitet wurde, sollte der Einfluss verschiedener Pin1-Mutanten auf die Regulation der Dephosphorylierung dieses Substrates untersucht werden. Die Charakterisierung des Peptids mittels isomerspezifischer Proteolyse ergab eine Geschwindigkeitskonstante  $k_{cis \rightarrow trans} = 1.5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$  (bei 10 °C) sowie einen *cis*-Gehalt von 11.1 % (beim Start der Proteolyse mit in Wasser gelöstem Peptid). Analog zu Kap. 3.3.4 wurde die Konformerspezifität der PP2A<sub>1</sub> untersucht.



**Abb. 3.23** Isomerspezifität der PP2A<sub>1</sub> und Einfluss von Pin1 gegenüber dem Cdc25-Peptid Pro-Leu-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np.

(A) Reines *cis*-Konformer des Cdc25-Peptids wurde bei 0 °C bis zur Einstellung des Gleichgewichts belassen. Zu verschiedenen Zeiten wurden der Lösung Aliquots entnommen und für 3 min mit 6.2 nM PP2A<sub>1</sub> inkubiert (Messung zum Zeitpunkt 0 min war nicht möglich, s. Text). Nach dem Abstoppen der Reaktion mit TFA wurden die Phosphataseaktivitäten mittels HPLC quantifiziert (Kreise). In einigen Experimenten wurde vor Zugabe der PP2A<sub>1</sub> für 2 min mit 260 nM Pin1 inkubiert (Dreiecke). Die Aktivitäten sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung, die Standardfehler sind kleiner als 5 %.

(B) Ein Gemisch aus 79 % *cis*- und 21 % *trans*-Konformer des Cdc25-Peptids wurde für 2 min mit Kontrollpuffer (BSA), Pin1 oder verschiedenen Pin1-Mutanten inkubiert, bevor es als Substrat für PP2A<sub>1</sub> eingesetzt wurde. Als Kontrolle (K) ist die Aktivität der PP2A<sub>1</sub> gegenüber einer ohne Isomerasezusatz equilibrierten Substratlösung (ca. 7 % *cis*-Konformer) mit gezeigt.

Allerdings musste zur Herstellung des *cis*-Konformers anstelle von Chymotrypsin die verwandte Protease Subtilisin verwendet werden, da die katalytische Aktivität des Chymotrypsins gegenüber diesem Peptid sehr schlecht war. Zur Inhibierung des Subtilisins wurde Diisopropylfluorophosphat benutzt. Leider konnte damit die Proteasereaktion nicht so plötzlich wie im Falle des Eglin C abgestoppt werden. Trotz Einsatz eines 147fachen molaren Überschusses an Inhibitor konnte bei spektroskopischen Vorversuchen zur Inhibierung noch bis 10 min nach Inhibitorzugabe eine geringe Proteaserestaktivität gemessen werden. Da sowohl die PP2A<sub>1</sub> als auch Pin1 proteaselabil sind, konnten in dieser Zeit keine Aktivitätsmessungen vorgenommen werden. Trotzdem ergibt sich mit dem Cdc25-Peptid ein zu Kap. 3.3.4 identisches Bild.

Die PP2A<sub>1</sub> dephosphoryliert bevorzugt das *trans*-Konformer, allerdings kann das *cis*-Konformer in Gegenwart von Pin1 in ein gutes Substrat umgewandelt werden (**Abb. 3.23 A**). Die Anpassung der Kurve für die gemessenen Phosphataseaktivitäten in Abhängigkeit von der Isomerisierungszeit nach einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung ergab eine Geschwindigkeitskonstante von  $0.020 \pm 0.004 \text{ min}^{-1}$ .

Um zu überprüfen, ob wirklich die Isomerisierung des *cis*-Substrates zum *trans*-Substrat die Ursache für die erhöhte PP2A-Aktivität ist, wurden mehrere Pin1-Mutanten untersucht (**Abb. 3.23 B**). Als Substrat diente ein Gemisch aus 79 % *cis* und 21 % *trans* Isomer des Cdc25-Peptids. Dieses Gemisch entstand durch isomerspezifische Proteolyse von Pro-Leu-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np mit Subtilisin, Zugabe von Diisopropylfluorophosphat und 15 minütige Inkubation zur vollständigen Inhibierung der Protease. Die maximale PP2A<sub>1</sub>-Aktivität konnte nur nach kurzer Vorinkubation mit Pin1-Wildtyp oder mit der katalytisch voll aktiven Mutante Pin1<sup>S67A</sup> erreicht werden. Die Vorinkubation mit den katalytisch inaktiven Mutanten Pin1<sup>R68/69A</sup> (Restaktivität 0.4 %) und Pin1<sup>S67E</sup> (Restaktivität 0.3 %) brachte keine nennenswerte Erhöhung der Phosphataseaktivität. Die katalytische Aktivität von Pin1 und damit die Isomerisierung eines Substrates von der *cis*- zur *trans*-Konformation ist Voraussetzung für eine effektive Dephosphorylierung durch die PP2A<sub>1</sub>.

## IV. Diskussion

### 4.1. Die PP2A – Isolierung und Substratspezifität

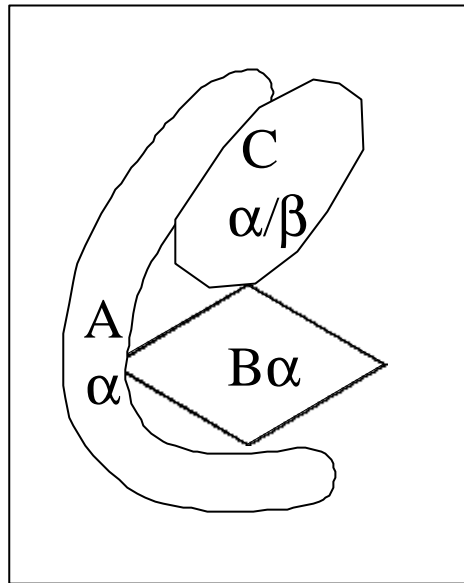
Am Beginn der Arbeit stand die Aufgabe, eine prolinpezifische Phosphatase zu isolieren. Als Substrat für diese Suche wurde das Pentapeptid Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np benutzt. Die höchste Phosphataseaktivität gegenüber diesem Substrat wurde in Schweinehirn gefunden. In diesem Gewebe sind zweifelsfrei die meisten bekannten Protein-Serin/Threonin Phosphatasen in relativ hoher Konzentration vorhanden (Price und Mumby, 1999). Trotzdem konnte nur ein Peak mit hoher Aktivität gegenüber dem prolinhaltigen Phosphopeptid detektiert werden. Mit dem artefiziellen Substrat *p*NPP wurden dagegen mehrere Aktivitätspeaks beobachtet. Verantwortlich für diese Aktivitäten könnten alkalische Phosphatasen oder Tyrosinphosphatasen sein, aber auch für die Serin/Threonin Phosphatasen Calcineurin und PP2A ist eine Aktivität gegenüber diesem tyrosinphosphatanalogen Substrat beschrieben (Hengge und Martin, 1997; Hermann et al., 1988). Die Phosphatase mit hoher Aktivität gegenüber dem Phosphopeptid konnte gereinigt und als Mitglied der PP2A-Familie identifiziert werden. Diese multifunktionale Familie spielt eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle zellulärer Vorgänge. Die PP2A ist z.B. beteiligt an der Regulation der Apoptose (Deng et al., 1998), der DNA-Replikation (Lin et al., 1998), des Zellzyklus (Clarke et al., 1993; Bastians et al., 1999) und der Neurofilament-Organisation (Saito et al., 1995b). Sie ist ein entscheidender Angriffspunkt viraler Proteine bei der Transformation von Zellen durch SV40 oder Polyomaviren (Campbell et al., 1995; Rundell und Parakati, 2001), ein putativer Tumor Suppressor (Wang, S. S. et al., 1998) und möglicherweise mit beteiligt an der Entstehung der Alzheimer'schen Krankheit (Billingsley und Kincaid, 1997; Merrick et al., 1997).

PP2A-Holoenzyme wurden schon aus verschiedenen Organismen und Geweben, u.a. Skelettmuskel vom Kaninchen (Tung, H. Y. L. et al., 1985), Ratten- und Mäusehirn (Galadari et al., 1998; Nishiwaki et al., 1991), Herzmuskel vom Rind (Mumby et al., 1987) oder humanen Erythrocyten (Usui et al., 1988) isoliert.

Eigentlich sind die katalytische und einige regulatorische Untereinheiten der PP2A schon relativ lange bekannt. Allerdings zeigt die ständig wachsende Zahl von neu identifizierten Untereinheiten und Bindeproteinen sowie die komplizierter werdende Verflechtung mit anderen Proteinen, dass die vielfältigen physiologischen Funktionen dieses Enzymes bis heute nur ansatzweise verstanden sind. Das Dimer aus der katalytischen und der Strukturuntereinheit (von beiden existieren in Säugern je zwei Isoformen) kann mit einer

Vielzahl von regulatorischen Untereinheiten assoziieren (Übersichtsartikel: Janssens und Goris, 2001).

Die Untereinheiten der gereinigten PP2A wurden mittels Aminosäuresequenzanalyse und MALDI-TOF-Massenspektrometrie genau identifiziert. Das Kerndimer aus einem Gemisch von  $\alpha$  und  $\beta$  Isoform der katalytischen Untereinheit sowie der  $\alpha$ -Isoform der Strukturuntereinheit ist mit der  $\alpha$ -Isoform der B-Untereinheit (PR55) assoziiert (**Abb. 4.1**).



**Abb. 4.1** Zusammensetzung des PP2A<sub>1</sub>-Holoenzym aus Schweinehirn aus katalytischer (C), Struktur- (A) und regulatorischer (B) Untereinheit.

Trimere Komplexe mit Vertretern der B-Familie regulatorischer Untereinheiten werden in der Literatur auch als PP2A<sub>1</sub> bezeichnet. Die beiden Isoformen der katalytischen Untereinheit werden ubiquitär exprimiert, allerdings schwankt der Gehalt in den unterschiedlichen Geweben. Außerdem konnte in vielen Geweben ein zehnfacher Überschuss an  $\alpha$ -Isoform im Vergleich zur  $\beta$ -Isoform detektiert werden (Khew-Goodall und Hemmings, 1988). Die Gegenwart beider Isoformen in einer Präparation erscheint aufgrund des ubiquitären Vorkommens und der äußerst hohen Identität beider Proteine sehr wahrscheinlich und ist auch bereits beschrieben (Kamibayashi et al., 1992). Auch die beiden Isoformen der Strukturuntereinheit (PR65), die in Säugern ungefähr 87 % Sequenzidentität aufweisen, werden ubiquitär exprimiert (Hemmings et al., 1990). Da auch hier die  $\alpha$ -Isoform in höheren Konzentrationen als die  $\beta$ -Isoform vorliegt, wird sie auch vorrangig in gereinigten Enzymen gefunden (Hendrix et al., 1993b). In *Xenopus* Oocyten scheint die  $\beta$ -Isoform die vorrangige Untereinheit zu sein, allerdings wechseln die Zellen zur verstärkten Expression der  $\alpha$ -Isoform während der späteren Entwicklung (Bosch et al., 1995).

Die regulatorische Untereinheit ist von entscheidender Bedeutung für die subzelluläre Lokalisation und die Substratspezifität der PP2A (Übersichtsartikel: Sontag, 2001). Der in dieser Arbeit isolierte heterotrimere Komplex mit der  $\alpha$ -Isoform der B-Untereinheit (PR55 $\alpha$ ) stellt das bisher häufigste und am weitesten verbreitete PP2A-Holoenzym dar. Die B $\alpha$  und die B $\delta$ -Untereinheit sind in allen Geweben vorhanden, während die B $\beta$  und die B $\gamma$ -Untereinheit im Gehirn angereichert sind (Mayer et al., 1991; Zolnierowicz et al., 1994; Strack et al., 1999). B $\alpha$ , B $\beta$  und B $\gamma$  sind jeweils in unterschiedlichen Regionen des Gehirns und verschiedenen Kompartimenten von Neuronen angereichert, außerdem werden B $\beta$  und B $\gamma$  im Gegensatz zu B $\alpha$  entwicklungspezifisch exprimiert (Strack et al., 1998). Die B $\alpha$ -Untereinheit scheint für die Assoziation an Mikrotubuli verantwortlich zu sein (Sontag et al., 1995). Die Anwesenheit einer B-Untereinheit ist notwendig für die effiziente Bindung und Dephosphorylierung des Filamentproteins Vimentin (Turowski et al., 1999). Die Abwesenheit von funktioneller B-Untereinheit führt in Hefe und Drosophila zu Störungen im Ablauf der Mitose (Wang, Y. C. und Burke, 1997; Mayer-Jaekel et al., 1993; Mayer-Jaekel et al., 1994). Die Regulation der PP2A kann nicht nur durch die Zusammensetzung des Holoenzym erfolgen, sondern auch durch posttranslationale Modifikationen. Mindestens vier verschiedene Proteinkinasen wurden als direkte Interaktionspartner der PP2A identifiziert (Heriche et al., 1997; Westphal et al., 1998; Westphal et al., 1999). Die katalytische Untereinheit kann *in vitro* von den Tyrosinkinasen p60<sup>v-src</sup>, pp56<sup>lck</sup>, EGF- und Insulin-Rezeptor am Tyr<sup>307</sup> phosphoryliert und damit inaktiviert werden (Chen, J. et al., 1992). *In vivo* wurde Tyrosinphosphorylierung beobachtet nach der Wachstumsstimulation oder v-src Transformation von Fibroblasten (Chen, J. et al., 1994) oder als Antwort auf Interleukin-1 und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (Guy et al., 1995) oder Insulin (Begum und Ragolia, 1999). Zusätzlich kann die katalytische Untereinheit an einem oder mehreren Threoninresten phosphoryliert werden, die genaue Position ist allerdings noch unklar (Guo und Damuni, 1993).

In der gereinigten PP2A<sub>1</sub> konnten nach Verdau mit der Endoproteinase Lys C und der Identifizierung der erhaltenen Peptide keine Hinweise auf eine Phosphorylierung gefunden werden, allerdings konnten auch nicht alle threoninhaltigen Peptide detektiert werden. Ein phosphoryliertes Peptid ist aufgrund der um 80 Da größeren Masse relativ einfach zu identifizieren, wenn es in ausreichender Menge vorliegt. An allen bisher bekannten Phosphorylierungsstellen der katalytischen Untereinheit wurde eine rasche Autodephosphorylierung durch die PP2A beobachtet. Aus diesem Grund ist wahrscheinlich



die Reinigung einer phosphorylierten Form nur in ständiger Gegenwart hoher Inhibitorkonzentrationen möglich.

In dem durch Proteaseverdau der katalytischen Untereinheit erhaltenen Peptidgemisch wurde ein Peptid gefunden, das genau 14 Da größer als das C-terminale Peptid Tyr<sup>284</sup>-Leu<sup>309</sup> war und keinem anderen Peptid zugeordnet werden konnte. Diese Massendifferenz entspricht genau der erwarteten für eine C-terminale Carboxymethylierung, so dass die gereinigte PP2A sicherlich teilweise am Leu<sup>309</sup> carboxymethyliert vorliegt. Die reversible Methylierung dient wahrscheinlich zur Regulation der Holoenzymzusammensetzung der PP2A (Tolstykh et al., 2000; Wu et al., 2000). Der Methylierungsgrad variiert während verschiedener Zellzyklusphasen (Turowski et al., 1995). Neben einem intakten C-Terminus der katalytischen Untereinheit (Ogris et al., 1997; Evans, D. R. H. und Hemmings, 2000) scheint auch die Carboxymethylierung des Leu<sup>309</sup> eine Voraussetzung für die Bindung der B $\alpha$ -Untereinheit zu sein (Bryant et al., 1999; Yu, X. X. et al., 2001). In *S. cerevisiae* führte die Deletion der Methyltransferase zur massiven Reduktion der Bindung von Cdc55p (B-Untereinheit der Hefe-PP2A) und Tpd3p (Strukturuntereinheit der Hefe-PP2A) an die katalytische Untereinheit der PP2A und damit zur Ausprägung eines Phänotyps ähnlich einer Deletion von Cdc55 oder Tpd3 (Wei et al., 2001).

Neben der katalytischen können auch einige regulatorische Untereinheiten in phosphorylierter Form vorliegen. Das trifft besonders für die B'-Familie zu (McCright et al., 1996). Bisher einziges bekanntes Beispiel für die Phosphorylierung einer regulatorischen Untereinheit der B-Familie ist die Phosphorylierung von B $\alpha$  durch den TGF-Rezeptor (Griswold-Prenner et al., 1998). Die proteinchemische Analyse der regulatorischen und der Strukturuntereinheit in der gereinigten PP2A ergab außer einer N-terminalen Blockierung, die auch in früheren Arbeiten schon detektiert wurde (Hemmings et al., 1990; Kamibayashi et al., 1991), keinen Hinweis auf weitere posttranslationale Modifikationen. Die N-terminalen Peptide der beiden Untereinheiten wurden beide mit einer um 42 Da größeren Masse detektiert, was einer Acetylierung entspricht.

Um den Einfluss der regulatorischen und der Strukturuntereinheit auf die Substratspezifität der PP2A zu untersuchen, wurden beide Untereinheiten von der katalytischen Untereinheit abgetrennt. In vielen Fällen wurde während der Präparation der PP2A eine Aufspaltung in mehrere Aktivitätspeaks beobachtet. Diese Auftrennung wurde durch das gleichzeitige Vorhandensein mehrerer PP2A-Holoenzyme (monomer, dimer und trimer) verursacht (Tamura et al., 1980; Mumby et al., 1987; Usui et al., 1988). Nicht endgültig geklärt ist, ob die Abspaltung einzelner Untereinheiten Artefakte der Präparation darstellen oder ob alle

Enzymformen bereits in der Zelle vorliegen. Das Vorkommen der isolierten katalytischen Untereinheit in der Zelle wird bezweifelt (Sontag, 2001), eher wird das Vorhandensein einer bestimmten Menge an dimerer PP2A vermutet, die je nach zellulärem Bedarf mit verschiedenen Untereinheiten wechselwirkt (Kremmer et al., 1997). So wurde zum Beispiel während der Differenzierung von HL-60 Zellen ein transienter und reversibler Austausch der regulatorischen B- gegen eine B'-Untereinheit beobachtet (Zhu et al., 1997). Aufgrund der sehr festen Assoziation der katalytischen mit der Strukturuntereinheit erfordert die Isolierung der katalytischen Untereinheit aus dem dimeren oder trimeren Komplex ziemlich drastische Methoden, wie die Behandlung mit 80 % EtOH (Cohen, P. et al., 1988), 6 M Harnstoff (Chen, S. C. et al., 1989) oder 2 M  $MgCl_2$  (Virshup und Kelly, 1989). In dieser Arbeit erfolgte die Isolierung mittels Gelfiltration bei hohen Salzkonzentrationen und basischem pH-Wert. Die gereinigte katalytische Untereinheit zeigte volle katalytische Aktivität nur in Gegenwart von 2 mM DTT und 100 mM  $MgCl_2$ , während das heterotrimere Enzym von DTT nicht beeinflusst wird und diese  $MgCl_2$ -Konzentration inhibierend wirkt.

Auch durch Langzeitlagerung inaktivierte PP2A kann durch Zugabe zweiwertiger Metallionen, wie  $Mn^{2+}$  oder  $Co^{2+}$ , sowie durch Inkubation mit  $Fe^{2+}$  in Gegenwart von Ascorbat oder DTT reaktiviert werden (Cai et al., 1995; Yu, J. S., 1998). Die pNPP-Aktivität einer dimeren PP2A wird durch Zugabe millimolarer  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen gesteigert (Cayla et al., 1990). Bei der eng verwandten Proteinphosphatase-1 (49 % Identität zur PP2A in der katalytischen Domäne) ist die Aktivität der rekombinant hergestellten Form abhängig vom Vorhandensein von  $Mn^{2+}$ -Ionen (Zhang et al., 1996). Die Kristallstruktur der PP1 zeigt, dass die Bindungsstellen der beiden für die Katalyse essentiellen Metallionen relativ weit an der Oberfläche des Proteins liegen und die Metalle damit möglicherweise ziemlich anfällig für komplexierende Reagenzien und Puffer sind (Goldberg, J. et al., 1995; Egloff et al., 1995).

Die Aktivität verschiedener PP2A-Holoenzyme kann von unterschiedlichen Effektoren beeinflusst werden. Der second messenger Ceramid aktiviert die monomere, dimere und trimere PP2A (Dobrowsky et al., 1993; Law und Rossie, 1995). Die Aktivierung einer mitochondrialen PP2A durch Ceramid führt zur Dephosphorylierung des Anti-Apoptose Proteins Bcl2 und damit wahrscheinlich zur Einleitung der Apoptose in HL-60 Zellen (Ruvolo et al., 1999).

Auch Histone, Protamin oder Heparin können die Aktivität der PP2A *in vitro* beeinflussen. Während Protamin auf alle untersuchten PP2A-Formen aktivierend wirkt (Tung, H. Y. L. et al., 1985; Usui et al., 1988), hatte Heparin unterschiedliche Wirkung. Es aktivierte die trimere PP2A, die dimere und monomere Form dagegen wurden nicht beeinflusst oder leicht

inhibiert. Die Ursache für die Aktivierung durch Heparin ist wahrscheinlich die Dissoziation der regulatorischen Untereinheit (Pelech und Cohen, 1985; Kamibayashi et al., 1991). Die in dieser Arbeit isolierte PP2A zeigte bei Zugabe von Histon H1 eine bis zu 2.5fach höhere Aktivität gegenüber *p*NPP als Substrat. Bei Verwendung eines Phosphopeptidsubstrates und ähnlichen Histonkonzentrationen resultierte eine fast 50 %ige Inhibierung. Dieser Effekt könnte ebenfalls durch die Dissoziation der regulatorischen Untereinheit erklärt werden, da *p*NPP für die entstehende dimere PP2A ein besseres, das Phosphopeptid dagegen ein schlechteres Substrat darstellt.

Die Aktivität und Substratspezifität der PP2A wird in starkem Maße von der Anwesenheit und Identität der Struktur- und der regulatorischen Untereinheit beeinflusst (Usui et al., 1988; Kamibayashi et al., 1991; Zolnierowicz et al., 1996; Turowski et al., 1997; Inoue et al., 1999). Allerdings scheinen die Proteinphosphatasen allgemein keine so eng begrenzten Substratspezifitäten aufzuweisen wie die Proteinkinasen, so dass die Ermittlung von Konsensussequenzen für die Phosphatasen bisher nicht möglich war.

Leider existieren keine umfassenden systematischen Untersuchungen darüber, welchen Einfluss die der Phosphorylierungsstelle benachbarten Aminosäuren auf die Substraterkennung und -umsetzung durch verschiedene Proteinphosphatasen haben. Außer dem schon erwähnten Effekt des Prolinrestes ist für die PP2A lediglich bekannt, dass Glutamatreste an beiden Seiten der phosphorylierten Aminosäure toleriert werden und mehrere N-terminale Argininreste zu einer schnelleren Umsetzung des Substrates führen (Übersichtsartikel: Pinna und Donella-Deana, 1994).

Deshalb wurde mit einer Serie von Peptiden der Sequenz Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Xaa-Phe-Gly-NH<sub>2</sub> der Einfluss der C-terminal zur Phosphorylierungsstelle gelegenen Aminosäure untersucht. Es konnte ein relativ großer Effekt dieser Position beobachtet werden, schlechtestes und bestes Substrat unterschieden sich im  $k_{\text{cat}}/K_M$ -Wert um Faktor 13. Als besonders vorteilhaft für eine Dephosphorylierung des Substrates durch die PP2A erwiesen sich hydrophobe (Ile, Val, Met) oder positiv geladene Reste (Arg, Lys). Die mit Abstand schlechtesten Substrate enthielten Aspartat, Glycin oder Prolin. Verglichen mit der trimeren PP2A<sub>1</sub> zeigte die katalytische Untereinheit allein deutlich geringere Effizienz gegenüber allen Substraten. In Abwesenheit der Struktur- und der regulatorischen Untereinheit erniedrigten sich die  $k_{\text{cat}}/K_M$ -Werte etwa um Faktor 20. Dagegen blieb die Substratspezifität nach Abtrennung der Untereinheiten weitestgehend erhalten. Die isolierte katalytische Untereinheit wies die gleichen Vorlieben und Abneigungen auf wie die trimere PP2A. Die Steigerung der katalytischen Effizienz der PP2A gegenüber den Phosphopeptiden nach Komplexierung mit

den regulatorischen Untereinheiten ist auf bessere Substratbindung und schnellere Umsetzung zurückzuführen. Obwohl ein Prolinrest verglichen mit Alanin zur Halbierung der katalytischen Effizienz gegenüber den Peptiden führt, sind diese Peptide in Anwesenheit der Struktur- und der regulatorischen Untereinheit immer noch ausgezeichnete Substrate. Wesentlich drastischere Verschlechterungen der Substrateigenschaften als die Einführung eines Prolinrestes scheint die Verkürzung eines Hexapeptides oder Pentapeptid-4-nitroanilids zum Pentapeptid zu verursachen. Diese Verkürzung des Substrates beeinträchtigt kaum die Katalysekonstante, vergrößert jedoch dramatisch den  $K_M$ -Wert. Möglicherweise wird mit dieser Verkürzung die kritische Länge von Substraten, die für eine effektive Bindung nötig ist, unterschritten.

Der artefizielle C-terminale 4-Nitroanilidrest hat dagegen kaum Einfluss auf die Substrateigenschaften, wie aus dem Vergleich der katalytischen Konstante für Ala-Ala-Thr( $\text{PO}_3\text{H}_2$ )-Pro-Phe-NH-Np und Ala-Ala-Thr( $\text{PO}_3\text{H}_2$ )-Ala-Phe-NH-Np mit Ala-Ala-Thr( $\text{PO}_3\text{H}_2$ )-Pro-Phe-Gly-NH<sub>2</sub> und Ala-Ala-Thr( $\text{PO}_3\text{H}_2$ )-Ala-Phe-Gly-NH<sub>2</sub> hervorgeht.

#### 4.2. Die PP2A – eine prolinspezifische Phosphatase ?

Eine Reihe von Enzymen hat sich im aktiven Zentrum auf die Erkennung und Umsetzung von prolinhaltigen Substraten spezialisiert. Die Peptidasen Prolidase, Aminopeptidase P, Prolinase, Prolin-Iminopeptidase, Prolyl-Oligopeptidase und Carboxypeptidase P gelten alle als prolinspezifisch. Sie hydrolisieren ihre Substrate nur N- oder C-terminal vom Prolin, während prolinhaltige Substrate gegenüber den meisten anderen Aminopeptidasen resistent sind (Übersichtsartikel: Yaron und Naider, 1993; Cunningham und Oconnor, 1997). Die Prolyl-Oligopeptidase erkennt ihre Substrate an einer fürs Prolin maßgeschneiderten Tasche sowie am Fehlen eines Wasserstoffbrückendonors in S1-Position (Fulop et al., 1998).

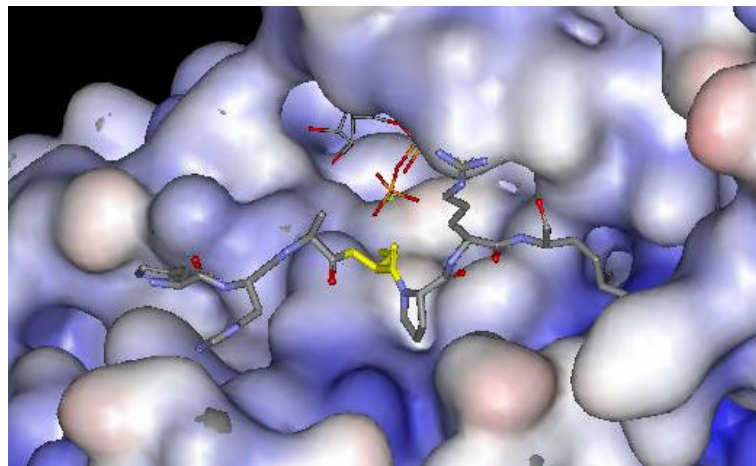
Die Enzymfamilie der PPIasen katalysiert die *cis/trans* Isomerisierung von Peptidyl-Prolylbindungen. Auch bei diesen Enzymen scheint Prolin wichtig für den Erkennungs- und Katalysemechanismus zu sein, da nach bisherigem Erkenntnisstand die Isomerisierung „normaler“ Peptidbindungen von ihnen nicht katalysiert wird (Fischer, G., 1994; Scholz et al., 1998; Pappenberger et al., 2001). Obwohl je nach Substrattyp die Konformation des Grundzustandes, in der Substrate vorzugsweise gebunden werden, unterschiedlich ist, ist klar, dass beide Isomere umgesetzt werden (Kakalis und Armitage, 1994; Konno et al., 1996; Zhao, Y. D. und Ke, 1996; Zhao, Y. et al., 1997; Ranganathan et al., 1997).

Das Phänomen der Prolinspezifität ist keineswegs auf Enzymreaktionen beschränkt, sondern wird auch bei Protein-Interaktionen beobachtet. Sowohl in *Drosophila melanogaster* als auch in *Caenorhabditis elegans* sind prolinreiche Regionen die am häufigsten gefundenen Proteindomänen (Rubin et al., 2000). Die Erkennung und Bindung prolinreicher Regionen erfolgt mittels spezifischer Domänen. Die am besten untersuchten sind die SH3- sowie die WW-Domäne (Sudol, 1996; Aghazadeh und Rosen, 1999; Zarrinpar und Lim, 2000; Sudol und Hunter, 2000). Die Konsensussequenzen für die Bindung dieser Module sind PXXP (SH3) und PPXY oder PPLP (WW). Die Bindung wird verhindert, wenn die Proline gegen andere Aminosäuren ausgetauscht werden (Yu, H. et al., 1994).

Die Phosphorylierung von Ser/Thr-Pro Motiven wird von prolinspezifischen Proteinkinasen katalysiert zu denen die cyclinabhängigen Kinasen und die MAP Kinasen gehören. Alle Vertreter dieser Familien phosphorylieren ihre Substrate nur an Serin- oder Threoninresten unmittelbar vor einem Prolinrest. Vor kurzem wurde eine neue Kinase identifiziert, die keine Homologien zu bisher bekannten Vertretern aufweist. Untersuchungen zur Substratspezifität dieser Kinase KIS (*kinase interacting with stathmin*) mit Peptiden ergaben eine deutlich bevorzugte Phosphorylierung von Serinresten N-terminal zum Prolin (Maucuer et al., 2000). Auch die Glykogensynthase-Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) wurde in einigen Arbeiten als prolinspezifische Kinase bezeichnet, da sie Ser/Thr-Pro Motive im Mikrotubuli-assoziierten Protein 2 und tau phosphorylieren konnte (Sanchez et al., 1996; Singh et al., 1996; Godemann et al., 1999; Schneider et al., 1999). Allerdings ist die GSK-3 $\beta$  auch zur Phosphorylierung vieler anderer Sequenzmotive in der Lage und deshalb nicht unbedingt prolinspezifisch (Williams et al., 1999). Wahrscheinlich toleriert sie im Gegensatz zu anderen Kinasen einfach ein Prolin in P+1 Position (Harwood, 2001; ter Haar et al., 2001; Dajani et al., 2001).

Die molekularen Ursachen der engen Substratspezifität der prolinspezifischen Kinasen konnten kürzlich anhand zweier Röntgenkristallstrukturen verdeutlicht werden. Am Beispiel eines Komplexes aus phosphorylierter Cdk2, Cyclin A und dem Substrat HHASPRK, sowie der Struktur der aktivierten MAP Kinase ERK2 mit einem modellierten Thr-Pro-Dipeptid konnten die Ähnlichkeiten im Substraterkennungsmechanismus der beiden Familien prolingerichteter Kinasen gezeigt werden (Brown et al., 1999; Canagarajah et al., 1997). Die Spezifität der Cdk2 für Prolin in P+1-Position kann durch eine passend geformte Tasche erklärt werden (**Abb. 4.2**). Der Rest Val<sup>164</sup> der Cdk2 nimmt eine ungewöhnliche Konformation ( $\Phi = 72.5^\circ$ ,  $\Psi = 130.8^\circ$ ) ein, die in einer Orientierung des Carbonylsauerstoffs weg vom Substrat resultiert. Diese besondere Anordnung, die durch zwei zusätzliche

Wasserstoffbrückenbindungen kompensiert wird, hat zur Folge, dass die Bindung jedes Restes außer Prolin in P+1-Position wegen einer unkompensierten Wasserstoffbrücke vom Stickstoff im Substratrückgrat unvorteilhaft wäre. Die Situation im aktiven Zentrum der aktivierten ERK2 ist ähnlich. Der Rest Ala<sup>187</sup> hat eine ähnliche ungewöhnliche Konformation wie Val<sup>164</sup> in der Cdk2. Damit steht für die P+1-Position des Substrates kein Wasserstoffbrückenakzeptor zur Verfügung, eine Bindung wäre für alle Aminosäuren außer Prolin deshalb energetisch unvorteilhaft.



**Abb. 4.2** Aktives Zentrum des phospho-Cdk2-CyclinA3 Komplexes mit dem Substratpeptid HHASPRK (PDB-Eintrag 1QMZ). Deutlich zu sehen ist die Ausrichtung des Serins (gelb) zur  $\gamma$ -ständigen Phosphatgruppe des ATP sowie die Bindungstasche für Prolin in P+1 Position.

Die Phosphorylierung von Ser/Thr-Pro-Motiven wird bei bestimmten Prozessen drastisch erhöht. Während des G<sub>2</sub>/M-Übergangs des Zellzyklus werden durch einen plötzlichen Anstieg der Aktivität der cdc2 Kinase eine Vielzahl dieser Motive in unterschiedlichen Proteinen phosphoryliert und bilden damit ein gemeinsames Epitop für den Antikörper MPM-2 aus (Davis, F. M. et al., 1983; Stukenberg et al., 1997; Yaffe et al., 1997b). Wenn die Phosphorylierung von Ser/Thr-Pro Motiven ein besonderes Signal in der Zelle darstellt, ist zwangsläufig auch die Dephosphorylierung von großer Bedeutung für eine exakte Regulation. Während mittlerweile für viele Phosphorylierungsstellen die verantwortlichen Kinasen bekannt sind (Pinna und Ruzzene, 1996; Smith, C. M. et al., 1997; Kreegipuu et al., 1999), ist in vielen Fällen unklar, wie die Dephosphorylierung erfolgt. Bisher sind keine im engen Sinne prolinspezifischen Phosphatasen bekannt, d.h. Phosphatasen, die ausschließlich phosphorylierte Aminosäuren vorm Prolin als Substrat akzeptieren. Allerdings scheinen Phosphatasen generell keine so eng definierte Substratspezifität wie Kinasen zu besitzen.

Deshalb wäre auch denkbar, dass bereits bekannte Proteinphosphatasen, eventuell im Komplex mit spezifischen Untereinheiten, für die Dephosphorylierung prolinspezifischer Motive zuständig sind.

Die anhand einer hohen Aktivität gegenüber prolingerichteten Phosphorylierungsstellen isolierte PP2A<sub>1</sub> der Zusammensetzung C $\alpha$  $\beta$ A $\alpha$ B $\alpha$  stellt wahrscheinlich die vorrangige Isoform im Gehirn dar (Kamibayashi et al., 1994). Sie wurde bereits in einigen Arbeiten als möglicher Gegenspieler prolingerichteter Kinasen betrachtet. Sie dephosphoryliert effizient die mittels cyclinabhängiger Kinasen phosphorylierten Substrate Histon H1 und Caldesmon (Sola et al., 1991; Ferrigno et al., 1993) sowie Neurofilamentproteine (Veeranna et al., 1995). Die Drosophila-Mutanten *aar1* und *twinsP*, die aufgrund von beschädigten Genen der B-Untereinheit einen reduzierten Proteingehalt dieser Untereinheit besitzen, weisen mitotische Defekte auf. Die PP2A-Aktivität in Zellextrakten dieser Mutanten gegenüber Substraten, die von cdc2 phosphoryliert wurden, ist im Vergleich zu Wildtypfliegen deutlich reduziert. Die Aktivität gegenüber Phosphorylase a ist dagegen in beiden Extrakten gleich (Mayer-Jaekel et al., 1994). Neben Calcineurin ist die PP2A verantwortlich für die Dephosphorylierung prolingerichteter Phosphorylierungsstellen im Mikrotubuli-assoziierten Protein tau (Goedert et al., 1995; Saito et al., 1995a; Yamamoto et al., 1995). Die heterotrimere PP2A<sub>1</sub> ist dabei effizienter als andere trimere oder dimere PP2A-Isoformen (Drewes et al., 1993). Auch bei der Verwendung verschiedener von Cdc2 Substraten abgeleiteter Phosphopeptide wird für die trimere PP2A im Vergleich zur dimeren und monomeren Form eine wesentlich größere Dephosphorylierungsgeschwindigkeit beobachtet (Agostinis et al., 1992).

Im scheinbaren Widerspruch zur Rolle der PP2A als Gegenspieler der prolinspezifischen Kinasen steht die Beobachtung, dass ein C-terminal zur phosphorylierten Aminosäure stehendes Prolin im Vergleich zu anderen Aminosäuren (Valin, Glutamat) eine drastische Verschlechterung der Substrateigenschaften bewirkt bzw. dazu führt, dass das Peptid überhaupt nicht mehr dephosphoryliert wird, ein N-terminal benachbartes Prolin hat keinen Effekt (Agostinis et al., 1987; Donella-Deana et al., 1990; Ansai et al., 1996). Tatsächlich führt das Vorhandensein eines Prolins in P+1-Position verglichen mit Alanin zu einer etwa sechsfach geringeren Katalysekonstante, allerdings wird dieser Nachteil durch einen zwei- bis dreifach besseren K<sub>M</sub>-Wert teilweise ausgeglichen. Obwohl Substrate mit Prolin in P+1-Position von der PP2A weniger effizient als andere umgesetzt werden, bewirkt die Anwesenheit der Struktur- und der regulatorischen Untereinheit eine rund 20fache Steigerung der katalytischen Effizienz gegenüber der isolierten katalytischen Untereinheit. Damit stellen für die trimere PP2A<sub>1</sub> auch prolinhaltige Peptide ausgezeichnete Substrate dar.

Trotzdem stellt die PP2A im engeren Sinne keine prolinspezifische Phosphatase dar, da sie, im Gegensatz zu den prolinspezifischen Kinasen, die nur Substrate mit Prolin in P+1-Position akzeptieren, Substrate mit anderen Aminosäuren in P+1-Position teilweise wesentlich effizienter dephosphoryliert. Bisher als prolinspezifisch bezeichnete Enzyme akzeptieren dagegen ausschließlich prolinhaltige Substrate.

Trotzdem spielt die PP2A eine entscheidende Rolle bei der Dephosphorylierung von pSer/pThr-Pro Motiven. Die regulatorische Untereinheit, die für eine hohe Effizienz gegenüber diesen Substraten verantwortlich ist, scheint die B-Untereinheit zu sein. In direkten Vergleichen verschiedener Holoenzyme stellt die B-haltige PP2A<sub>1</sub> die beste Phosphatase für pSer/pThr-Pro Motive dar und Experimente mit Mutanten der B-Untereinheit zeigen eine Beteiligung dieser Untereinheit an der Dephosphorylierung prolingerichteter Phosphorylierungsstellen.

#### **4.3. Isomerspezifische Dephosphorylierung - ein neuer Regulationsmechanismus**

Peptidbindungen liegen wegen ihres partiellen Doppelbindungscharakters ausschließlich in *cis* oder *trans* Konformation ( $\omega = 0$  bzw.  $180^\circ$ ) vor. Während bei den meisten Peptidbindungen das *trans*-Konformer energetisch bevorzugt ist, sind beide Konformere in Peptidyl-Prolyl Bindungen von vergleichbarer Energie. In prolinhaltigen Peptiden werden aus diesem Grund bis zu 50 % *cis* Konformer gefunden (Fischer, G., 2000). Die Analyse von Proteinstrukturen zeigte, dass zwischen 5.2 % und 6.5 % aller Xaa-Pro Bindungen in *cis* Konformation vorliegen. Nicht prolinhaltige Bindungen liegen dagegen nur zu 0.03 %-0.05 % in *cis* Konformation vor (Stewart et al., 1990; MacArthur und Thornton, 1991; Jabs et al., 1999). Die beobachtete Zahl von *cis* Konformationen liegt dabei für die Xaa-Pro Bindungen um Faktor 6 und für Xaa-nichtPro Bindungen um Faktor 50 niedriger als bei den thermodynamischen Konstanten zu erwarten wäre. Eine Ursache dafür könnten zum einen zusätzliche Einschränkungen in den Proteinstrukturen darstellen, andererseits wäre denkbar, dass viele *cis* Bindungen in Proteinen aufgrund ungenügender Auflösung oder getroffener Annahmen in verwendeten Protokollen der Strukturaufklärung bisher unentdeckt blieben. Tatsächlich wurde kürzlich ein Zusammenhang zwischen Auflösung der Proteinstruktur und Zahl der gefundenen *cis* Bindungen publiziert. In Strukturen mit einer Auflösung unter 2 Å war der *cis* Anteil von Xaa-Pro fast doppelt und von Xaa-nichtPro mehr als dreimal so hoch wie in Strukturen mit einer Auflösung über 2.5 Å (Weiss et al., 1998).



Die *cis/trans* Isomerisierung von Prolylbindungen ist ein relativ langsamer Prozess. Sie ist in vielen Fällen der limitierende Schritt während der Proteinfaltung (Lang et al., 1987; Scholz et al., 1997). Der Grund dafür ist die hohe Rotationsbarriere zwischen *cis* und *trans* Isomer von ungefähr 80-90 kJ/mol (Stein, 1993). Sie ist auch die Ursache dafür, dass beide Konformere in biochemischen Reaktionen unterschiedlich reagieren können. Isomerspezifische Prozesse wurden direkt beobachtet bei Protein-Ligand- oder Enzym-Substrat-Interaktionen (Yaron und Naider, 1993; Brandsch et al., 1998; Stoddard und Pietrokovski, 1998; Charbonnier et al., 1999; Frank, 1999; Wittelsberger et al., 2000) und während der Proteinfaltung (Schmid, 1993). Indirekte Hinweise lieferte die Beeinflussung nativer Proteine durch katalytisch aktive PPIasen (Chen, Y. G. et al., 1997; Lopezilasaca et al., 1998).

Moleküle mit koexistierenden *cis/trans* Isomeren schließen sowohl native Proteine, als auch Peptidketten verschiedener Faltungszustände und Länge ein (Evans, P. A. et al., 1987; Gitti et al., 1996; Adjadj et al., 1997; Ng und Weis, 1998; Cheetham et al., 1998). Obwohl strukturelle Daten bisher fehlen, ist zu vermuten, dass phosphorylierte Ser/Thr-Pro Motive eine ähnliche isomere Heterogenität aufweisen können. Die Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NFAT1 an mehreren pSer-Pro Motiven bewirkt eine Konformationsänderung und Freilegung eines Kernlokalisierungssignals. Eine kürzliche Untersuchung dieses Prozesses schlug einen Mechanismus vor, bei dem vollständig phosphoryliertes NFAT1 sowohl in einer aktiven als auch einer inaktiven Konformation vorliegen kann, die Wahrscheinlichkeit für den aktiven Zustand ist im phosphorylierten Protein gering, erhöht sich aber durch Dephosphorylierung (Okamura et al., 2000). An Modellpeptiden konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Ser/Thr-Pro Motiven die Dynamik des Peptidrückgrates beeinflusst. Die Geschwindigkeitskonstanten der *cis/trans* Isomerisierung waren nach Phosphorylierung der Peptide bis zu Faktor 8 geringer (Schutkowski et al., 1998) und auch das thermodynamische Gleichgewicht (*cis*-Gehalt) änderte sich (Ramelot und Nicholson, 2001). Interessanterweise sind sowohl die Isomerisierungsgeschwindigkeit als auch der *cis*-Gehalt der Phosphopeptide im physiologischen Bereich sehr stark abhängig vom pH-Wert. Normalerweise ist die Prolylisomerisierung unphosphorylierter Peptide unabhängig vom pH-Wert (Reimer et al., 1998).

Im Verlauf dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Dephosphorylierung von pSer/pThr-Pro Motiven durch die PP2A<sub>1</sub> isomerspezifisch verläuft. Von zwei sich nur in der Konformation unterscheidenden Substraten wird ausschließlich das *trans* Konformer dephosphoryliert. Neben den PPIasen, die die *cis/trans* Isomerisierung katalysieren, waren

Proteasen bisher die einzigen bekannten Enzyme, die bei der Umsetzung ihrer Substrate eine strikte Isomerspezifität aufweisen (Fischer, G. et al., 1984a; Merker et al., 1993; Cunningham und Oconnor, 1997; Vance et al., 1997).

Die Phosphorylierung/Dephosphorylierung von Proteinen erfolgt oft sehr rasch nach einem „Alles oder nichts“-Mechanismus und führt zur sofortigen Aktivierung oder Deaktivierung (Ferrell, 1996). Damit können Zellen außerordentlich schnell auf veränderte Bedingungen reagieren. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass aufgrund der Selektivität der PP2A<sub>1</sub> für Substrate in *trans* Konformation für eine sofortige und vollständige Dephosphorylierung aller in einem Konformerengleichgewicht stehender Substratmoleküle die Hilfe einer pSer/pThr-Pro-spezifischen PPIase nötig ist, da sonst die relativ langsame *cis-trans* Isomerisierung zur limitierenden Größe wird. Der am besten untersuchte Vertreter dieser speziellen PPIasen ist das humane Parvulin Pin1. Es katalysiert ausschließlich die Isomerisierung von pSer/pThr-Pro Motiven. Im Verlauf der Arbeit konnte an zwei verschiedenen Peptiden gezeigt werden, dass in Anwesenheit katalytischer Mengen Pin1 alle vorhandenen *cis* Konformere in *trans* und damit in PP2A<sub>1</sub> Substrate umgewandelt werden. Die Verwendung von katalytisch inaktiven Pin1-Mutanten, sowie nichtprolinhaltigen Substraten zeigte eindeutig, dass die Prolylisomerisierung die Ursache für die erleichterte Dephosphorylierung durch die PP2A<sub>1</sub> darstellt. Das Peptid Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np wurde für die Untersuchungen verwendet, weil es ein ausgezeichnetes Substrat für die PP2A<sub>1</sub> und Pin1 darstellt. Das zweite Peptid Pro-Leu-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np wurde aus der Sequenz um das Thr<sup>48</sup> der Phosphatase Cdc25 aus *Xenopus laevis* abgeleitet. Cdc25 wird durch Mehrfachphosphorylierung reguliert und ist Schlüsselenzym beim G<sub>2</sub>/M-Übergang des Zellzyklus. Das Thr<sup>48</sup> des Cdc25 ist sowohl *in vivo* Phosphorylierungsstelle (Izumi und Maller, 1993) als auch bevorzugte Bindungsstelle für Pin1 (Lu, P. J. et al., 1999b).

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit konnten wir gemeinsam mit der Gruppe um K. P. Lu (Boston) zeigen, dass Pin1 auch die Dephosphorylierung der Proteine Cdc25 und tau beeinflusst (Zhou et al., 2000). Die dualspezifische Phosphatase Cdc25 und das Mikrotubuli assoziierte Protein tau sind sowohl physiologisches Substrat der PP2A (Clarke et al., 1993; Karaiskou et al., 1999; Sontag et al., 1999) als auch physiologischer Bindungspartner von Pin1 (Shen et al., 1998; Lu, P. J. et al., 1999a). Die Dephosphorylierung von Cdc25 und tau durch die PP2A an prolingerichteten Phosphorylierungsstellen wurde in Gegenwart von katalytisch aktivem Pin1 beschleunigt. Weder katalytisch inaktive Mutanten noch die isolierte WW-Domäne von Pin1 zeigten diesen Effekt. Sowohl von Cdc25 als auch von tau ist bekannt, dass sie an mehreren prolinspezifischen Motiven phosphoryliert werden können

(Dunphy, 1994; Billingsley und Kincaid, 1997). Um zu untersuchen, ob der Einfluss von Pin1 auf die Dephosphorylierung an das Vorhandensein bestimmter pSer/pThr-Pro Motive gebunden ist, wurden Substratmutanten verwendet. Während die Doppelmutante Cdc25<sup>T48,67V</sup> mittels mitotischem Extrakt kaum noch phosphoryliert werden konnte und deshalb eine Untersuchung der Dephosphorylierung nicht möglich war, wurde bei der Dephosphorylierung von tau<sup>T231A</sup> kein Effekt von Pin1 auf die Dephosphorylierung detektiert. Diese Mutante ist noch an drei weiteren pro-linspezifischen Motiven phosphoryliert, bindet aber nicht mehr an Pin1 (Lu, P. J. et al., 1999a).

Diese Experimente lassen vermuten, dass die Dephosphorylierung des pThr<sup>231</sup>-Pro Motives von Pin1 reguliert wird. Die übrigen Motive sind entweder nicht für Pin1 zugänglich oder befinden sich bereits in *trans* Konformation und können auch ohne Pin1 effizient dephosphoryliert werden. Die Existenz verschiedener Konformere von tau wurde bereits nach Experimenten mit dem Antikörper AT100, der spezifisch PHF-tau erkennt, vermutet. Das Epitop für diesen Antikörper kann durch Phosphorylierung von tau mit verschiedenen Kinasen erzeugt werden, interessanterweise ist dabei die Reihenfolge wichtig. Das führte zu der Vermutung, dass bestimmte Phosphorylierungen Konformationsänderungen verursachen und dadurch nachfolgende Phosphorylierungen verhindern (Zheng-Fischhofer et al., 1998). In Untersuchungen mit dem Peptid tau<sup>224-240</sup> wurde für die Thr<sup>231</sup>-Pro Bindung ein *cis*-Gehalt von 4-5 % in wässriger Lösung bestimmt. Die Lage des Gleichgewichts war allerdings stark von der Umgebung abhängig, mit zunehmender Hydrophobizität erniedrigte sich der *cis*-Gehalt (Daly et al., 2000).

Weitere Hinweise auf eine Beteiligung von Pin1 an der Dephosphorylierung von Proteinen durch die PP2A *in vivo* wurden von der Gruppe um K. P. Lu in genetischen Experimenten gefunden. Sie konnten in Hefezellen zeigen, dass temperatursensitive PP2A-Mutanten durch Überexpression von Pin1 teilweise kompensiert werden und die Überexpression von PP2A temperatursensitive Mutanten des Pin1-homologen Proteins ESS1/PTF1 fast vollständig kompensiert (Zhou et al., 2000).

Kürzlich konnte eine weitere Gruppe eine konformationelle Änderung des phosphorylierten Cdc25 durch Pin1 feststellen. Cdc25 zeigte in Anwesenheit von Pin1 ein verändertes Spaltmuster beim Proteaseverdau des nativen Proteins sowie eine verstärkte Reaktivität gegenüber dem MPM-2 Antikörper, der analog zu Pin1 pSer/pThr-Pro Epitope erkennt. Außerdem beeinflusste Pin1 die Phosphataseaktivität von Cdc25. In Abhängigkeit vom Phosphorylierungsstatus erfolgte eine leichte Inhibierung oder eine fast zweifache Aktivierung (Stukenberg und Kirschner, 2001). Leider ist bisher die Proteinstruktur der N-

terminalen regulatorischen Domäne von Cdc25, in der die Mehrzahl der Ser/Thr-Pro Motive liegt, nicht gelöst. Möglicherweise verhindert eine flexible Konformation die Kristallisation, da die Strukturen der katalytischen Domänen zweier Isoenzyme bereits ermittelt wurden (Fauman et al., 1998; Reynolds et al., 1999).

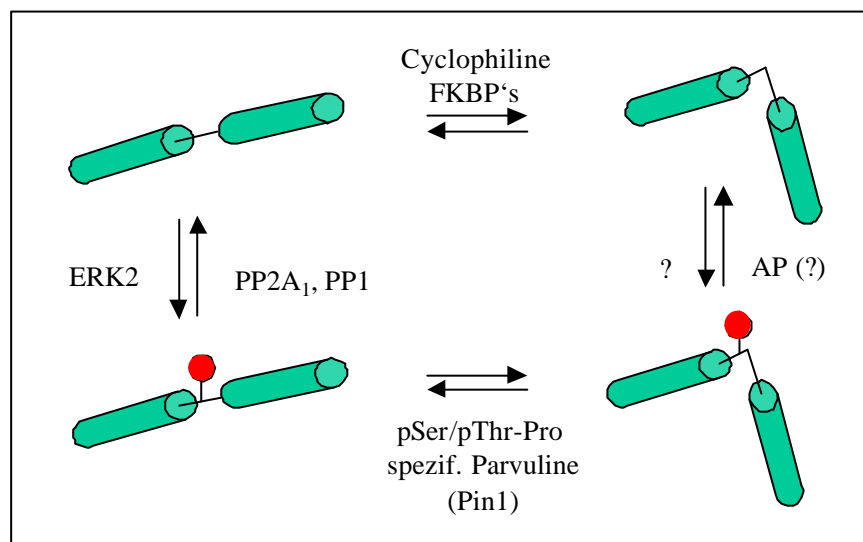
Im *Drosophila*-Ei bewirkt das Pin1-homologe Protein Dodo bei Signalkaskaden über den EGF-Rezeptor eine Konformationsänderung des Transkriptionsfaktors Cf2 nach der Phosphorylierung durch eine MAP Kinase. Wahrscheinlich ist diese Konformationsänderung (und nicht die initiale Modifikation durch einen Phosphatrest) das Signal für die Ubiquitylierung und den nachfolgenden Abbau von Cf2 (Hsu et al., 2001).

Zusammengenommen mehren sich die Hinweise, dass Pin1 in der Lage ist, pSer/pThr-Pro Bindungen in gefalteten Proteinen zu isomerisieren. Eine direkte Analyse der Konformationen von Prolylbindungen ist bisher nur mit strukturellen Methoden mit atomarer Auflösung möglich. Von allen existierenden Ser/Thr-Pro Motiven ist bisher nur ein Bruchteil in Proteinstrukturen vorhanden. Der aus thermodynamischen Daten und Datenbankanalysen geschätzte *cis*-Anteil dieses Motives liegt zwischen 5 und 20% (Reimer et al., 1998; Reimer et al., 1997; Zhou et al., 2000).

Die Konformerspezifität von Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen scheint weit verbreitet zu sein. Untersuchungen mit der PP1, einer der PP2A verwandten Phosphatase, führten zu ähnlichen Ergebnissen. Das *trans*-Konformer eines prolinhaltigen Peptids wird gegenüber dem *cis*-Konformer deutlich bevorzugt (Werner, unveröffentlichte Ergebnisse). Wahrscheinlich wird diese Übereinstimmung durch die hohe Homologie dieser Phosphatasen in der katalytischen Domäne und den ähnlichen Katalysemechanismus verursacht. Alle Aminosäuren, die in der Proteinstruktur der PP1 als wesentlich für die Komplexierung der Metallionen im aktiven Zentrum und den Katalyseprozess selbst identifiziert wurden, sind in der PP2A und PP2B (Calcineurin) streng konserviert (Goldberg, J. et al., 1995; Egloff et al., 1995; Griffith et al., 1995; Barford et al., 1998).

Die Alkalische Phosphatase, die vorrangig nicht die Funktion einer Proteinphosphatase besitzt, trotzdem aber zur Dephosphorylierung von Proteinen in der Lage ist (Chan und Stinson, 1986), akzeptiert *cis* und *trans* Konformer gleichermaßen als Substrat. Mögliche Ursache ist die sehr breite Substratspezifität und ein komplett anderer Katalysemechanismus über ein kovalentes Zwischenprodukt. Die Erkennung von Substraten durch die Alkalische Phosphatase beruht eher auf der Bindung des Phosphatrestes in der Seitenkette als auf Wechselwirkungen mit dem Peptidrückgrat (Coleman, 1992; Holtz und Kantrowitz, 1999).

Untersuchungen mit prolinpezifischen Kinasen zeigten, dass auch die Phosphorylierung vom Prolin abhängig von der Konformation des Peptidrückgrates ist. Sowohl für die MAP Kinase ERK2 (Weiwad et al., 2000) als auch die cyclinabhängige Kinase Cdc2 (M. Weiwad, persönliche Mitteilung) konnte eine strenge Bevorzugung des *trans* Isomers detektiert werden. Diese experimentell ermittelten Daten stimmen dabei sehr gut mit den veröffentlichten Kristallstrukturen überein. Im Komplex aus phosphorylierter Cdk2, Cyclin A und dem Substrat HHASPRK ist das Peptid in *trans* Konformation gebunden (Brown et al., 1999). Die Röntgenstruktur der voll aktivierten MAP Kinase ERK2 wurde zwar ohne Substrat gelöst, anhand des modellierten Tripeptides Thr-Pro-Ala konnte aber gezeigt werden, dass nur die *trans* Konformation gebunden werden kann (Canagarajah et al., 1997).



**Abb. 4.3** Modell zur Regulation der reversiblen Phosphorylierung prolinspezifischer Motive. Während Ser/Thr-Pro (bzw. pSer/pThr-Pro) Motive in *trans* Konformation sowohl von prolinspezifischen Proteinkinasen (ERK2) als auch von Proteinphosphatasen (PP2A<sub>1</sub>, PP1) erkannt werden, müssen Motive in *cis* Konformation durch spezifische PPIasen nach *trans* isomerisiert werden, bevor sie umgesetzt werden können. Die Existenz *cis*-spezifischer Proteinkinasen und -phosphatasen ist bisher nicht nachgewiesen. *In vitro* konnte zwar die Alkalische Phosphatase pSer/pThr-Pro Motive in *cis* Konformation dephosphorylieren, es existieren aber bisher keine Hinweise auf eine Beteiligung der Alkalischen Phosphatase an der Dephosphorylierung von pSer/pThr-Pro Motiven *in vivo*.

Die Ergebnisse dieser Arbeit schlagen einen neuen Kontrollmechanismus bei der Dephosphorylierung von prolingerichteten Phosphorylierungsstellen durch die PP2A vor, der möglicherweise auch für weitere Proteinphosphatasen und auch für die Phosphorylierung von Ser/Thr-Pro Motiven zutrifft (**Abb. 4.3**). Dieser Mechanismus beruht auf der Regulation der Phosphorylierung oder Dephosphorylierung durch eine vorangeschaltete Isomerisierung.

Bisher galt allein die Phosphorylierung oder Dephosphorylierung eines Proteins und die dadurch verursachte Strukturänderung als Auslöser einer Aktivierung oder Inaktivierung. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zumindest im Fall prolinspezifischer Motive die Dephosphorylierung an eine bestimmte Konformation des Peptidrückgrates gekoppelt ist und damit durch Isomerisierung reguliert werden kann. Es ist ein mindestens temporär gleichzeitiges Vorliegen von aktiver Phosphatase und phosphoryliertem Substrat (in *cis* Konformation) denkbar. Erst eine durch spezifische PPIasen katalysierte Konformationsänderung des Peptidrückgrates führt zur effektiven Dephosphorylierung des Substrates. Möglicherweise ist dies ein Mechanismus, der in den bisher entdeckten Komplexen aus Kinasen (CK2, CaM Kinase IV, PAK, p70 S6 Kinase) und PP2A ein gleichzeitiges Wirken von Kinase und Phosphatase und damit ein „Leerlaufen“ des Komplexes verhindert (Lebrin et al., 1999; Westphal et al., 1998; Westphal et al., 1999).

In diesem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, dass Cyclophiline in Pflanzen als Bindungspartner und Regulatoren von PP2A-homologen Phosphatasen identifiziert wurden (Jackson und Soll, 1999; Vener et al., 1999). Die Proteinphosphatase 5, eine zur PP2A verwandte Phosphatase, besitzt eine Region mit Homologie zur PPIase-Domäne des FKBP52, mit der es auch zur FK506-Bindung befähigt ist (Silverstein et al., 1997).

In der kürzlich gelösten Kristallstruktur von Pin1 mit dem an der WW-Domäne gebundenen Peptid Tyr-Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Thr-Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Ser, die sich leicht von der Struktur ohne Peptid unterscheidet, wurde gezeigt, dass beide phosphorylierten Ser-Pro Motive nur in *trans* Konformation binden können (Verdecia et al., 2000). Viel länger bekannt ist die Katalyse der *cis* nach *trans* Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl Bindungen durch die katalytische Domäne von Pin1 (Yaffe et al., 1997b). Die selektive Bindung von Phosphopeptiden durch die WW-Domäne von Pin1 in *trans* Konformation könnte einen Mechanismus zur Auswahl von Motiven zur nachfolgenden Isomerisierung oder auch zur Stabilisierung der zur Dephosphorylierung notwendigen Konformation darstellen.

Neben der Bedeutung der Konformerspezifität von Phosphatasen (und Kinasen) bei der Regulation von Proteinen ist eine Anwendung bei der Aufklärung von *native-state* Isomerisierungen vorstellbar. Viele native Proteine existieren in mehreren Konformationen mit möglicherweise unterschiedlichen Eigenschaften oder biologischen Funktionen. Zur Aufklärung solcher *native-state* Isomerisierungen werden hauptsächlich spektroskopische Methoden verwendet (Fluoreszenz, NMR, Röntgenstrukturanalyse). Die Anwendung dieser Techniken setzt voraus, dass entweder fluoreszierende Seitenketten an der

Konformationsänderung beteiligt sind, ausreichend hohe Anteile an allen Konformeren zur sicheren Detektion vorhanden sind, oder dass sich alle in Lösung vorhandenen Konformeren gleichermaßen gut kristallisieren lassen. Am Beispiel einer Acylphosphatase konnte kürzlich gezeigt werden, dass die *cis/trans* Umwandlung von Prolylbindungen, obwohl spektroskopisch unsichtbar und für die Gesamtstruktur unbedeutend, über Aktivität oder Inaktivität eines Proteins entscheiden kann (Chiti et al., 1999). Möglicherweise lassen sich durch die Verwendung konformerspezifischer Enzyme bei der Untersuchung von *native-state* Isomerisierungen leichter Aussagen über *cis/trans* Gleichgewichte oder Isomerisierungsgeschwindigkeiten in nativen Proteinen erzielen.

## V. Zusammenfassung

Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Serin- und Threoninresten N-terminal von Prolin (Ser/Thr-Pro Motiven) stellt einen zentralen Mechanismus bei der Regulation zellulärer Abläufe dar. Die prolinspezifischen Proteinkinasen, deren Vertreter in die cyclinabhängigen Kinasen und die MAP Kinasen unterteilt werden, sind Schlüsselenzyme bei der Kontrolle des Zellzyklus und bei der Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren nach Stress- oder Wachstumssignalen. Die Phosphorylierung von Substraten durch prolinspezifische Kinasen führt zu einzigartigen strukturellen Merkmalen, die an Phosphorylierungsstellen ohne Prolin nicht beobachtet werden. Es sollte untersucht werden, inwieweit die enzymkatalysierte Dephosphorylierung neben der bekannten Primär-, Sekundär- und Stereospezifität noch eine Spezifität hinsichtlich der Konformation um die reaktive pSer/pThr-Seitenkette aufweist.

- Hochaktive Proteinphosphatase 2A<sub>1</sub> wurde in der heterotrimeren Form Cα/βAαBα aus Schweinehirn isoliert und molekular charakterisiert. Hinsichtlich Inhibierbarkeit durch Okadasäure und Calyculin A, sowie des Einflusses von Histon H1 auf die Phosphataseaktivität zeigte die gereinigte Phosphatase die typischen Eigenschaften von PP2A-Holoenzymen. Durch Gelfiltration bei basischem pH-Wert und in Gegenwart zweiwertiger Metallionen und hoher Salzkonzentrationen konnte die katalytische Untereinheit von den beiden regulatorischen Untereinheiten separiert werden.
- Mit einer Serie von Peptiden der Sequenz Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Xaa-Phe-Gly-NH<sub>2</sub> (Xaa = alle proteinogenen Aminosäuren außer Cystein) erfolgte die erste systematische Untersuchung des Einflusses der C-terminal zur Phosphorylierungsstelle gelegenen Aminosäure auf die Dephosphorylierung von Substraten durch die PP2A. Es wurden  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte zwischen  $548.1 (\mu\text{M} \times \text{min})^{-1}$  (Xaa = Ile) und  $42.6 (\mu\text{M} \times \text{min})^{-1}$  (Xaa = Asp) für die trimere PP2A<sub>1</sub> bestimmt. Für die isolierte katalytische Untereinheit wurden  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte zwischen  $30.9 (\mu\text{M} \times \text{min})^{-1}$  (Xaa = Val) und  $3.1 (\mu\text{M} \times \text{min})^{-1}$  (Xaa = Asp) gemessen.
- Die Anwesenheit der regulatorischen Untereinheiten verbessert lediglich die Effizienz der Dephosphorylierung durch die PP2A, sie hat keinen wesentlichen Einfluss auf die Substratspezifität gegenüber den Peptiden. Die Bestimmung der kinetischen



Einzelkonstanten für einige ausgewählte Peptide zeigte klar, dass die effizientere Dephosphorylierung durch die trimere PP2A<sub>1</sub> das Ergebnis eines verbesserten  $k_{\text{cat}}$  und  $K_M$ -Wertes ist.

- Zur Untersuchung der Konformerspezifität der PP2A wurden das Peptid Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np und das von einer *in vivo* Phosphorylierungsstelle der an der Mitoseregulation beteiligten Phosphatase Cdc25 abgeleitete Peptid Pro-Leu-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np verwendet. Mittels isomerspezifischer Proteolyse durch Chymotrypsin bzw. Subtilisin wurden die reinen *cis*-Konformere aus einem equilibrierten Gemisch von *cis* und *trans* Isomer hergestellt. Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung  $k_{\text{obs}} = k_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}} + k_{\text{trans} \rightarrow \text{cis}}$  für die Wiedereinstellung des Gleichgewichtes für *cis*-Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np betrug  $(0.020 \pm 0.002) \text{ min}^{-1}$ .
- Durch Untersuchung der Phosphataseaktivität in Abhängigkeit von der Isomerenzusammensetzung der Substrate konnte eine nahezu absolute Spezifität der PP2A<sub>1</sub> für das *trans* Konformer bestimmt werden. Für eine Dephosphorylierung von Substraten, die in *cis* Konformation vorliegen, ist die *cis/trans* Isomerisierung geschwindigkeitsbestimmend.
- Die pSer/pThr-Pro-spezifische PPIase Pin1 katalysiert die *cis/trans* Isomerisierung der Phosphopeptide und ermöglicht dadurch die Dephosphorylierung von Substraten in *cis* Konformation durch die PP2A<sub>1</sub>. Die Verwendung katalytisch inaktiver Pin1-Mutanten, sowie eines nichtprolinhaltigen Substrates zeigte eindeutig, dass die Prolylisomerisierung durch Pin1 die Ursache für die erleichterte Dephosphorylierung von *cis*-Konformeren durch die PP2A<sub>1</sub> darstellt.
- Im Gegensatz zur PP2A<sub>1</sub> zeigte die Alkalische Phosphatase keine Spezifität hinsichtlich der Konformation des Substrates. Das *cis* und *trans* Konformer des Peptids Ala-Ala-Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro-Phe-NH-Np wurden mit gleicher Geschwindigkeit dephosphoryliert.
- Aufgrund der in dieser Arbeit erstmalig gezeigten Konformerspezifität der PP2A<sub>1</sub> kann ein neues Regulationsprinzip für Proteine mit prolinspezifischen Phosphorylierungsstellen postuliert werden. Das gleichzeitige Vorkommen und Aufeinandertreffen von aktiver Proteinkinase oder -phosphatase und Substratmolekül muss nicht zwangsläufig zu einer Umsetzung führen. Ein zumindest temporär gleichzeitiges Vorliegen von aktiver

Phosphatase und phosphoryliertem Substrat ist möglich. Die Dephosphorylierung des Substrates ist an eine bestimmte Konformation des Peptidrückgrates gebunden und kann durch von PPIasen katalysierte Isomerisierungsprozesse reguliert werden.

## VI. LITERATUR

- Adjadj E, Naudat V, Quiniou E, Wouters D, Sautiere P und Craescu CT** (1997) Solution Structure of Lqh-8/6, a Toxin-Like Peptide from a Scorpion Venom - Structural Heterogeneity Induced by Proline Cis/Trans Isomerization. *European Journal of Biochemistry* **246**, 218-227.
- Aghazadeh B und Rosen MK** (1999) Ligand recognition by SH3 and WW domains: the role of N-alkylation in PPII helices. *Chemistry & Biology* **6**, R241-R246.
- Agostinis P, Derua R, Sarno S, Goris J und Merlevede W** (1992) Specificity of the polycation-stimulated (type-2A) and ATP,Mg-dependent (type-1) protein phosphatases toward substrates phosphorylated by P34cdc2 kinase. *European Journal of Biochemistry* **205**, 241-248.
- Agostinis P, Goris J, Waelkens E, Pinna LA, Marchiori F und Merlevede W** (1987) Dephosphorylation of phosphoproteins and synthetic phosphopeptides - Study of the specificity of the polycation-stimulated and Mg-ATP-dependent phosphorylase-phosphatase. *The Journal of Biological Chemistry* **262**, 1060-1064.
- Aitken A** (1996) 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways. *Trends in Cell Biology* **6**, 341-347.
- Albert A, Lavoie S und Vincent M** (1999) A hyperphosphorylated form of RNA polymerase II is the major interphase antigen of the phosphoprotein antibody MPM-2 and interacts with the peptidyl-prolyl isomerase Pin1. *Journal of Cell Science* **112**, 2493-2500.
- Andjelkovic N, Zolnierowicz S, Vanhoof C, Goris J und Hemmings BA** (1996) The Catalytic Subunit of Protein Phosphatase 2a Associates with the Translation Termination Factor Erf1. *EMBO Journal* **15**, 7156-7167.
- Andrade MA und Bork P** (1995) Heat repeats in the huntingtons disease protein. *Nature Genetics* **11**, 115-116.
- Ansai T, Dupuy LC und Barik S** (1996) Interactions between a Minimal Protein Serine/Threonine Phosphatase and Its Phosphopeptide Substrate Sequence. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 24401-24407.
- Baere ID, Derua R, Janssens V, Hoof CV, Waelkens E, Merlevede W und Goris J** (1999) Purification of porcine brain protein phosphatase 2A leucine carboxyl methyltransferase and cloning of the human homologue. *Biochemistry* **38**, 16539-16547.
- Barford D** (1996) Molecular mechanisms of the protein serine threonine phosphatases [Review]. *Trends in Biochemical Sciences* **21**, 407-412.
- Barford D, Das AK und Egloff MP** (1998) The structure and mechanism of protein phosphatases - insights into catalysis and regulation [Review]. *Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure* **27**, 133-164.
- Bastians H, Topper LM, Gorbsky GL und Ruderman JV** (1999) Cell cycle-regulated proteolysis of mitotic target proteins. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 3927-3941.
- Begum N und Ragolia L** (1999) Role of Janus kinase-2 in insulin-mediated phosphorylation and inactivation of protein phosphatase-2A and its impact on upstream insulin signalling components. *Biochemical Journal* **344**, 895-901.
- Belec L, Slaninova J und Lubell WD** (2000) A study of the relationship between biological activity and prolyl amide isomer geometry in oxytocin using 5-tert-butylproline to augment the Cys(6)-Pro(7) amide cis-isomer population. *Journal of Medicinal Chemistry* **43**, 1448-1455.
- Bernhardt A** (1997) Untersuchungen zur Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerisierung von -Ser(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro- und -Thr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)-Pro- Peptidbindungen., Dissertation MLU Halle.
- Bialojan C und Takai A** (1988) Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochemical Journal* **256**, 283-290.

- Billingsley ML und Kincaid RL** (1997) Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein - effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration [Review]. *Biochemical Journal* **323**, 577-591.
- Blom N, Gammeltoft S und Brunak S** (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology* **294**, 1351-1362.
- Bosch M, Cayla X, Vanhoof C, Hemmings BA, Ozon R, Merlevede W und Goris J** (1995) The PR55 and PR65 Subunits of Protein Phosphatase 2a from *Xenopus Laevis* - Molecular Cloning and Developmental Regulation of Expression. *European Journal of Biochemistry* **230**, 1037-1045.
- Bouckaert J, Dewallef Y, Poortmans F, Wyns L und Loris R** (2000) The structural features of concanavalin A governing non-proline peptide isomerization. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 19778-19787.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Brandsch M, Thunecke F, Kullertz G, Schutkowski M, Fischer G und Neubert K** (1998) Evidence for the Absolute Conformational Specificity of the Intestinal H<sup>+</sup>/Peptide Symporter, Pept1. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 3861-3864.
- Brondello JM, Pouyssegur J und McKenzie FR** (1999) Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44(MAPK)-dependent phosphorylation. *Science* **286**, 2514-2517.
- Brown NR, Noble MEM, Endicott JA und Johnson LN** (1999) The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases. *Nature Cell Biology* **1**, 438-443.
- Bryant JC, Westphal RS und Wadzinski BE** (1999) Methylated C-terminal leucine residue of PP2A catalytic subunit is important for binding of regulatory B alpha subunit. *Biochemical Journal* **339**, 241-246.
- Cai L, Chu Y, Wilson SE und Schlender KK** (1995) A metal-dependent form of protein phosphatase 2A. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **208**, 274-279.
- Campbell KS, Auger KR, Hemmings BA, Roberts TM und Pallas DC** (1995) Identification of Regions in Polyomavirus Middle T and Small T Antigens Important for Association with Protein Phosphatase 2a. *Journal of Virology* **69**, 3721-3728.
- Canagarajah BJ, Khokhlatchev A, Cobb MH und Goldsmith EJ** (1997) Activation Mechanism of the Map Kinase Erk2 by Dual Phosphorylation. *Cell* **90**, 859-869.
- Cayla X, Goris J, Hermann J, Hendrix P, Ozon R und Merlevede W** (1990) Isolation and characterization of a tyrosyl phosphatase activator from rabbit skeletal muscle and *Xenopus laevis* oocytes. *Biochemistry* **29**, 658-67.
- Chan JR und Stinson RA** (1986) Dephosphorylation of phosphoproteins of human liver plasma membranes by endogenous and purified liver alkaline phosphatases. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 7635-7639.
- Charbonnier JB, Belin P, Moutiez M, Stura EA und Quemeneur E** (1999) On the role of the cis-proline residue in the active site of DsbA. *Protein Science* **8**, 96-105.
- Chazin WJ, Kordel J, Drakenberg T, Thulin E, Brodin P, Grundstrom T und Forsen S** (1989) Proline isomerism leads to multiple folded conformations of calbindin D9k: direct evidence from two-dimensional 1H NMR spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 2195-2198.
- Cheatham JC, Smith DM, Aoki KH, Stevenson JL, Hoeffel TJ, Syed RS, Egrie J und Harvey TS** (1998) Nmr Structure of Human Erythropoietin and a Comparison with Its Receptor Bound Conformation. *Nature Structural Biology* **5**, 861-866.
- Chen J, Martin BL und Brautigan DL** (1992) Regulation of Protein Serine-Threonine Phosphatase Type-2A by Tyrosine Phosphorylation. *Science* **257**, 1261-1264.

- Chen J, Parsons S und Brautigan DL** (1994) Tyrosine phosphorylation of protein phosphatase 2A in response to growth stimulation and v-src transformation of fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 7957-7962.
- Chen SC, Kramer G und Hardesty B** (1989) Isolation and partial characterization of an Mr 60,000 subunit of a type 2A phosphatase from rabbit reticulocytes. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 7267-7275.
- Chen YG, Liu F und Massague J** (1997) Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12. *EMBO Journal* **16**, 3866-3876.
- Chiti F, Taddei N, Giannoni E, Noland NAJv, Ramponi G und Dobson CM** (1999) Development of enzymatic activity during protein folding - Detection of a spectroscopically silent native-like intermediate of muscle acylphosphatase. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 20151-20158.
- Chung HY, Nairn AC, Murata K und Brautigan DL** (1999) Mutation of Tyr307 and Leu309 in the protein phosphatase 2A catalytic subunit favors association with the alpha 4 subunit which promotes dephosphorylation of elongation factor-2. *Biochemistry* **38**, 10371-10376.
- Clarke PR, Hoffmann I, Draetta G und Karsenti E** (1993) Dephosphorylation of Cdc25-C by a Type-2A Protein Phosphatase Specific Regulation During the Cell Cycle in Xenopus Egg Extracts. *Molecular Biology of the Cell* **4**, 397-411.
- Cohen P** (2000) The regulation of protein function by multisite phosphorylation - a 25 year update. *Trends in Biochemical Sciences* **25**, 596-601.
- Cohen P, Alemany S, Hemmings BA, Resink TJ, Stralfors P und Tung HY** (1988) Protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol* **159**, 390-408.
- Cohen P, Holmes CFB und Tsukitani Y** (1990) Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends in Biochemical Sciences* **15**, 98-102.
- Cohen PTW** (1997) Novel protein serine/threonine phosphatases - variety is the spice of life [Review]. *Trends in Biochemical Sciences* **22**, 245-251.
- Coleman JE** (1992) Structure and mechanism of Alkaline Phosphatase. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **21**, 441-483.
- Crenshaw DG, Yang J, Means AR und Kornbluth S** (1998) The Mitotic Peptidyl-Prolyl Isomerase, Pin1, Interacts with Cdc25 and Plx1. *EMBO Journal* **17**, 1315-1327.
- Csortos C, Zolnierowicz S, Bako E, Durbin SD und DePaoli-Roach AA** (1996) High Complexity in the Expression of the B' Subunit of Protein Phosphatase 2a(0) - Evidence for the Existence of at Least Seven Novel Isoforms. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 2578-2588.
- Cunningham DF und Oconnor B** (1997) Proline specific peptidases [Review]. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure & Molecular Enzymology* **1343**, 160-186.
- Dajani R, Fraser E, Roe SM, Young N, Good V, Dale TC und Pearl LH** (2001) Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell* **105**, 721-732.
- Daly NL, Hoffmann R, Otvos L und Craik DJ** (2000) Role of phosphorylation in the conformation of tau peptides implicated in Alzheimer's disease. *Biochemistry* **39**, 9039-9046.
- Damuni Z, Xiong H und Li M** (1994) Autophosphorylation-activated protein kinase inactivates the protein tyrosine phosphatase activity of protein phosphatase 2A. *FEBS Letters* **352**, 311-4.
- Dartigalongue C und 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 Journal* **17**, 3968-3980.
- Davis FM, Tsao TY, Fowler SK und Rao PN** (1983) Monoclonal antibodies to mitotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**, 2926-2930.

- Davis RJ** (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases [Review]. *Cell* **103**, 239-252.
- Dementieva DV, Bocharov EV und Arseniev AS** (1999) Two forms of cytotoxin II (cardiotoxin) from *Naja naja oxiana* in aqueous solution - Spatial structures with tightly bound water molecules. *European Journal of Biochemistry* **263**, 152-162.
- Deng XM, Ito T, Carr B, Mumby M und May WS** (1998) Reversible phosphorylation of Bcl2 following interleukin 3 or bryostatin 1 is mediated by direct interaction with protein phosphatase 2A. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 34157-34163.
- Denu JM, Lohse DL, Vijayalakshmi J, Saper MA und Dixon JE** (1996a) Visualization of Intermediate and Transition-State Structures in Protein-Tyrosine Phosphatase Catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 2493-2498.
- Denu JM, Stuckey JA, Saper MA und Dixon JE** (1996b) Form and function in protein dephosphorylation [Review]. *Cell* **87**, 361-364.
- Di Paolo G, Antonsson B, Kassel D, Riederer BM und Grenningloh G** (1997) Phosphorylation Regulates the Microtubule-Destabilizing Activity of Stathmin and Its Interaction with Tubulin. *FEBS Letters* **416**, 149-152.
- Dobrowsky RT, Kamibayashi C, Mumby MC und Hannun YA** (1993) Ceramide Activates Heterotrimeric Protein Phosphatase 2A. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 15523-15530.
- Donella-Deana A, Gowan CHM, Cohen P, Marchiori F, Meyer HE und Pinna LA** (1990) An Investigation of the Substrate Specificity of Protein Phosphatase 2C Using Synthetic Peptide Substrates; Comparison with Protein Phosphatase 2A. *Biochimica et Biophysica Acta* **1051**, 199-202.
- Donella-Deana A, Meyer HE und Pinna LA** (1991) The use of phosphopeptides to distinguish between protein phosphatase and acid/alkaline phosphatase activities: opposite specificity toward phosphoseryl/phosphothreonyl substrates. *Biochimica et Biophysica Acta* **1094**, 130-133.
- Drewes G, Mandelkow EM, Baumann K, Goris J, Merlevede W und Mandelkow E** (1993) Dephosphorylation of tau protein and Alzheimer paired helical filaments by calcineurin and phosphatase-2A. *FEBS Letters* **336**, 425-32.
- Drueckes P, Schinzel R und Palm D** (1995) Photometric Microtiter Assay of Inorganic Phosphate in the Presence of Acid-Labile Organic Phosphates. *Analytical Biochemistry* **230**, 173-177.
- Dunphy WG** (1994) The decision to enter mitosis (Review). *Trends in Cell Biology* **4**, 202-207.
- Durocher D, Taylor IA, Sarbassova D, Haire LF, Westcott SL, Jackson SP, Smerdon SJ und Yaffe MB** (2000) The molecular basis of FHA Domain : Phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms. *Molecular Cell* **6**, 1169-1182.
- Egloff MP, Cohen PTW, Reinemer P und Barford D** (1995) Crystal Structure of the Catalytic Subunit of Human Protein Phosphatase 1 and Its Complex with Tungstate. *Journal of Molecular Biology* **254**, 942-959.
- Evans DRH und Hemmings BA** (2000) Mutation of the C-terminal leucine residue of PP2Ac inhibits PR55/B subunit binding and confers supersensitivity to microtubule destabilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & General Genetics* **264**, 425-432.
- Evans PA, Dobson CM, Kautz RA, Hatfull G und Fox RO** (1987) Proline isomerism in staphylococcal nuclease characterized by NMR and site-directed mutagenesis. *Nature* **329**, 266-268.
- Evans TC und Nelsestuen GL** (1996) Importance of cis-proline 22 in the membrane-binding conformation of bovine prothrombin. *Biochemistry* **35**, 8210-8215.
- Fauman EB, Cogswell JP, Lovejoy B, Rocque WJ, Holmes W, Montana VG, Piwnicaworms H, Rink MJ und Saper MA** (1998) Crystal Structure of the Catalytic Domain of the Human Cell Cycle Control Phosphatase, Cdc25a. *Cell* **93**, 617-625.

- Favre B, Zolnierowicz S, Turowski P und Hemmings BA** (1994) The catalytic subunit of protein phosphatase 2A is carboxyl-methylated in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 16311-7.
- Feng YQ, Hood WF, Forgey RW, Abegg AL, Caparon MH, Thiele BR, Leimgruber RM und Mcwherter CA** (1997) Multiple Conformations of a Human Interleukin-3 Variant. *Protein Science* **6**, 1777-1782.
- Ferrell JE** (1996) Tripping the Switch Fantastic - How a Protein Kinase Cascade Can Convert Graded Inputs into Switch-Like Outputs. *Trends in Biochemical Sciences* **21**, 460-466.
- Ferrigno P, Langan TA und Cohen P** (1993) Protein phosphatase 2A1 is the major enzyme in vertebrate cell extracts that dephosphorylates several physiological substrates for cyclin-dependent protein kinases. *Molecular Biology of the Cell* **4**, 669-677.
- Fischer EH und Krebs EG** (1955) Conversion of phosphorylase-b to phosphorylase-a in muscle extracts. *Journal of Biological Chemistry* **216**, 121-132.
- Fischer G** (1994) Über Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen und ihre Effektoren. *Angewandte Chemie* **106**, 1479-1501.
- Fischer G** (2000) Chemical aspects of peptide bond isomerisation [Review]. *Chemical Society Reviews* **29**, 119-127.
- Fischer G, Bang H, Berger E und Schellenberger A** (1984a) Conformational specificity of chymotrypsin toward proline-containing substrates. *Biochimica et Biophysica Acta* **791**, 87-97.
- Fischer G, Bang H und Mech C** (1984b) Nachweis einer Enzymkatalyse für die cis-trans-Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden. *Biomed. Biochim. Acta* **43**, 1101-1111.
- Forood B, Feliciano EJ und Nambiar KP** (1993) Stabilization of alpha-helical structures in short peptides via end capping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 838-842.
- Frank R** (1999) Untersuchungen zur Synthese, den physikalisch-chemischen Eigenschaften und der biologischen Aktivität von Thiopeptiden., Dissertation MLU Halle.
- Franzoni L, Nicastro G, Pertinhez TA, Oliveira E, Nakaie CR, Paiva ACM, Schreier S und Spisni A** (1999) Structure of two fragments of the third cytoplasmic loop of the rat angiotensin II AT(1A) receptor. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 227-235.
- Fujimori F, Takahashi K, Uchida C und Uchida T** (1999) Mice lacking Pin1 develop normally, but are defective in entering cell cycle from G(0) arrest. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **265**, 658-663.
- Fulop V, Bocskei Z und Polgar L** (1998) Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis. *Cell* **94**, 161-170.
- Gabrielli BG, Clark JM, McCormack AK und Ellem KAO** (1997) Hyperphosphorylation of the N-Terminal Domain of Cdc25 Regulates Activity toward Cyclin B1/Cdc2 but Not Cyclin a/Cdk2. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 28607-28614.
- Galadari S, Kishikawa K, Kamibayashi C, Mumby MC und Hannun YA** (1998) Purification and Characterization of Ceramide-Activated Protein Phosphatases. *Biochemistry* **37**, 11232-11238.
- Galat A und Metcalfe SM** (1995) Peptidylproline cis/trans isomerases [Review]. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **63**, 67-118.
- Garrington TP und Johnson GL** (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways [Review]. *Current Opinion in Cell Biology* **11**, 211-218.
- Gerez L, Mohrmann K, Raak Mv, Jongeneelen M, Zhou XZ, Lu KP und Sluijs Pvd** (2000) Accumulation of rab4GTP in the cytoplasm and association with the peptidyl-prolyl Isomerase Pin1 during mitosis. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 2201-2211.

- Gitti RK, Lee BM, Walker J, Summers MF, Yoo S und Sundquist WI** (1996) Structure of the amino-terminal core domain of the HIV-1 capsid protein [Review]. *Science* **273**, 231-235.
- Godemann R, Biernat J, Mandelkow E und Mandelkow EM** (1999) Phosphorylation of tau protein by recombinant GSK-3 beta: pronounced phosphorylation at select Ser/Thr-Pro motifs but no phosphorylation at Ser262 in the repeat domain. *FEBS Letters* **454**, 157-164.
- Goedert M, Jakes R, Qi Z, Wang JH und Cohen P** (1995) Protein Phosphatase 2A Is the Major Enzyme in Brain That Dephosphorylates Tau Protein Phosphorylated by Proline-Directed Protein Kinases or Cyclic Amp-Dependent Protein Kinase. *Journal of Neurochemistry* **65**, 2804-2807.
- Goldberg J, Huang HB, Kwon YG, Greengard P, Nairn AC und Kuriyan J** (1995) Three-Dimensional Structure of the Catalytic Subunit of Protein Serine/Threonine Phosphatase-1. *Nature* **376**, 745-753.
- Goldberg Y** (1999) Protein phosphatase 2A: Who shall regulate the regulator? *Biochemical Pharmacology* **57**, 321-328.
- Goldstein A** (1944) *Journal of General Physiology* **27**, 529-580.
- Goris J, Pallen CJ, Parker PJ, Hermann J, Waterfield MD und Merlevede W** (1988) Conversion of a Phosphoserine/threonine phosphatase into a Phosphotyrosyl Phosphatase. *Biochemical Journal* **256**, 1029-1034.
- Gothel SF und Marahiel MA** (1999) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts [Review]. *Cellular & Molecular Life Sciences* **55**, 423-436.
- Gotz J, Probst A, Ehler E, Hemmings B und Kues W** (1998) Delayed Embryonic Lethality in Mice Lacking Protein Phosphatase 2a Catalytic Subunit C-Alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 12370-12375.
- Gotz J, Probst A, Mistl C, Nitsch RM und Ehler E** (2000) Distinct role of protein phosphatase 2A subunit C alpha in the regulation of E-cadherin and beta-catenin during development. *Mechanisms of Development* **93**, 83-93.
- Griffith JP, Kim JL, Kim EE, Sintchak MD, Thomson JA, Fitzgibbon MJ, Fleming MA, Caron PR, Hsiao K und Navia MA** (1995) X-Ray Structure of Calcineurin Inhibited by the Immunophilin Immunosuppressant Fkbp12-Fk506 Complex. *Cell* **82**, 507-522.
- Griswold-Prenner I, Kamibayashi C, Maruoka EM, Mumby MC und Derynck R** (1998) Physical and Functional Interactions between Type I Transforming Growth Factor Beta Receptors and B-Alpha, a WD-40 Repeat Subunit of Phosphatase 2A. *Molecular & Cellular Biology* **18**, 6595-6604.
- Grochulski P, Li Y, Schrag JD und Cygler M** (1994) Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Science* **3**, 82-91.
- Groves MR und Barford D** (1999) Topological characteristics of helical repeat proteins. *Current Opinion in Structural Biology* **9**, 383-389.
- Groves MR, Hanlon N, Turowski P, Hemmings BA und Barford D** (1999) The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. *Cell* **96**, 99-110.
- Gunasekaran K, Nagarajaram HA, Ramakrishnan C und Balaram P** (1998) Stereochemical Punctuation Marks in Protein Structures - Glycine and Proline Containing Helix Stop Signals. *Journal of Molecular Biology* **275**, 917-932.
- Guo H und Damuni Z** (1993) Autophosphorylation-Activated Protein Kinase Phosphorylates and Inactivates Protein Phosphatase 2a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 2500-2504.
- Guy GR, Philp R und Tan YH** (1995) Activation of protein kinases and the inactivation of protein phosphatase 2A in tumour necrosis factor and interleukin-1 signal-transduction pathways. *European Journal of Biochemistry* **229**, 503-511.



- Hani J, Schelbert B, Bernhardt A, Domdey H, Fischer G, Wiebauer K und Rahfeld JU** (1999) Mutations in a peptidylprolyl-cis/trans-isomerase gene lead to a defect in 3'-end formation of a pre-mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 108-116.
- Hani J, Stumpf G und Domdey H** (1995) PTF1 encodes an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae*, which shows strong homology with a new putative family of PPIases. *FEBS Letters* **365**, 198-202.
- Hartley BS und Kilby BA** (1954) The reaction of para-nitrophenyl esters with chymotrypsin and insulin. *Biochemical Journal* **56**, 288-297.
- Harwood AJ** (2001) Regulation of GSK-3: a cellular multiprocessor. (Review). *Cell* **105**, 821-824.
- Hemmings BA, Adams-Pearson C, Maurer F, Mueller P, Goris J, Merlevede W, Hofsteenge J und Stone SR** (1990) Alpha-Forms and Beta-Forms of the 65-Kda Subunit of Protein Phosphatase 2A Have a Similar 39 Amino Acid Repeating Structure. *Biochemistry* **29**, 3166-3173.
- Henderson PJF** (1972) A Linear equation that describes the steady-state kinetics of enzymes and subcellular particles interacting with tightly bound inhibitors. *Biochemical Journal* **127**, 321-333.
- Hendrix P, Mayer-Jaekel RE, Cron P, Goris J, Hofsteenge J, Merleved W und Hemmings BA** (1993a) Structure and Expression of a 72-Kda Regulatory Subunit of Protein Phosphatase 2a Evidence for Different Size Forms Produced by Alternative Splicing. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 15267-15276.
- Hendrix P, Turowski P, Mayer-Jaekel RE, Goris J, Hofsteenge J, Merlevede W und Hemmings BA** (1993b) Analysis of Subunit Isoforms in Protein Phosphatase 2a Holoenzymes from Rabbit and *Xenopus*. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 7330-7337.
- Hengge AC und Martin BL** (1997) Isotope Effect Studies on the Calcineurin Phosphoryl-Transfer Reaction - Transition State Structure and Effect of Calmodulin and Mn<sup>2+</sup>. *Biochemistry* **36**, 10185-10191.
- Hennig L, Christner C, Kipping M, Schelbert B, Rucknagel KP, Grabley S, Kullertz G und Fischer G** (1998) Selective Inactivation of Parvulin-Like Peptidyl-Prolyl Cis/Trans Isomerases by Juglone. *Biochemistry* **37**, 5953-5960.
- Heriche JK, Lebrin F, Rabilloud T, Leroy D, Chambaz EM und Goldberg Y** (1997) Regulation of Protein Phosphatase 2a by Direct Interaction with Casein Kinase 2-Alpha. *Science* **276**, 952-955.
- Hermann J, Cayla X, Dumortier K, Goris J, Ozon R und Merlevede W** (1988) Modulation of the Substrate Specificity of the Polycation-Stimulated Protein Phosphatase from *Xenopus-Laevis* Oocytes. *European Journal of Biochemistry* **173**, 17-26.
- Holtz KM und Kantrowitz ER** (1999) The mechanism of the alkaline phosphatase reaction: insights from NMR, crystallography and site-specific mutagenesis [Review]. *FEBS Letters* **462**, 7-11.
- Hoof CV, Cayla X, Bosch M, Merlevede W und Goris J** (1994) The phosphotyrosyl phosphatase activator of protein phosphatase 2A. A novel purification method, immunological and enzymic characterization. *European Journal of Biochemistry* **226**, 899-907.
- Hoof CV, Janssens V, Baere ID, Winde JHd, Winderickx J, Dumortier F, Thevelein JM, Merlevede W und Goris J** (2000) The *Saccharomyces cerevisiae* homologue YPA1 of the mammalian phosphotyrosyl phosphatase activator of protein phosphatase 2A controls progression through the G1 phase of the yeast cell cycle. *Journal of Molecular Biology* **302**, 103-119.
- Hrimech M, Yao XJ, Branton PE und Cohen EA** (2000) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr-mediated G(2) cell cycle arrest: Vpr interferes with cell cycle signaling cascades by interacting with the B subunit of serine/threonine protein phosphatase 2A. *EMBO Journal* **19**, 3956-3967.
- Hsu T, McRackan D, Vincent TS und de Couet HG** (2001) *Drosophila* Pin1 prolyl isomerase Dodo is a MAP kinase signal responder during oogenesis. *Nature Cell Biology* **3**, 538-543.
- Hunter T** (1998) Prolyl isomerases and nuclear function. (Review). *Cell* **92**, 141-143.

- Inoue R, Usui H, Tanabe O, Nishito Y, Shimizu M und Takeda M** (1999) Studies on functions of the 63-kDa A- and 74-kDa B '(delta)-regulatory subunits in human erythrocyte protein phosphatase 2A: Dissociation and reassociation of the subunits. *Journal of Biochemistry* **126**, 1127-1135.
- Ishihara H, Martin BL, Brautigan DL, Karaki H, Ozaki H, Kato Y, Fusetani N, Watabe S, Hashimoto K, Uemura D et al.** (1989) Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **159**, 871-877.
- Iverson TM, Arciero DM, Hooper AB und Rees DC** (2001) High-resolution structures of the oxidized and reduced states of cytochrome c554 from *Nitrosomonas europaea*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **6**, 390-397.
- Izumi T und Maller JL** (1993) Elimination of cdc2 phosphorylation sites in the cdc25 phosphatase blocks initiation of M-phase. *Molecular Biology of the Cell* **4**, 1337-50.
- Jabs A, Weiss MS und Hilgenfeld R** (1999) Non-proline cis peptide bonds in proteins. *Journal of Molecular Biology* **286**, 291-304.
- Jackson K und Soll D** (1999) Mutations in a new Arabidopsis cyclophilin disrupt its interaction with protein phosphatase 2A. *Molecular & General Genetics* **262**, 830-838.
- Jans DA** (1995) The regulation of protein transport to the nucleus by phosphorylation (Review). *Biochemical Journal* **311**, 705-16.
- Janssens V und Goris J** (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochemical Journal* **353**, 417-439.
- Kakalis LT und Armitage IM** (1994) Solution conformation of a cyclophilin-bound proline isomerase substrate. *Biochemistry* **33**, 1495-1501.
- Kamibayashi C, Estes R, Lickteig RL, Yang SI, Craft C und Mumby MC** (1994) Comparison of heterotrimeric protein phosphatase 2A containing different B subunits. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 20139-48.
- Kamibayashi C, Estes R, Slaughter C und Mumby. MC** (1991) Subunit interactions control protein phosphatase 2A. Effects of limited proteolysis, N-ethylmaleimide, and heparin on the interaction of the B subunit. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 13251-13260.
- Kamibayashi C, Lickteig RL, Estes R, Walter G und Mumby MC** (1992) Expression of the A subunit of protein phosphatase 2A and characterization of its interactions with the catalytic and regulatory subunits. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 21864-72.
- Kann M, Sodeik B, Vlachou A, Gerlich WH und Helenius A** (1999) Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *Journal of Cell Biology* **145**, 45-55.
- Karaiskou A, Jessus C, Brassac T und Ozon R** (1999) Phosphatase 2A and Polo kinase, two antagonistic regulators of Cdc25 activation and MPF auto-amplification. *Journal of Cell Science* **112**, 3747-3756.
- Katayose Y, Li M, Al-Murrani SWK, Shenolikar S und Damuni Z** (2000) Protein phosphatase 2A inhibitors, I-1(PP2A) and I-2(PP2A), associate with and modify the substrate specificity of protein phosphatase 1. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 9209-9214.
- Kawabe T, Muslin AJ und Korsmeyer SJ** (1997) Hox11 Interacts with Protein Phosphatases Pp2a and Pp1 and Disrupts a G2/M Cell-Cycle Checkpoint. *Nature* **385**, 454-458.
- Khew-Goodall Y und Hemmings BA** (1988) Tissue-specific expression of mRNAs encoding alpha- and beta-catalytic subunits of protein phosphatase 2A. *FEBS Letters* **238**, 265-8.
- Kim D, Su J und Cotman CW** (1999) Sequence of neurodegeneration and accumulation of phosphorylated tau in cultured neurons after okadaic acid treatment. *Brain Research* **839**, 253-262.

- Kinoshita N, Ohkura H und Yanagida M** (1990) Distinct, essential roles of type 1 and 2A protein phosphatases in the control of the fission yeast cell division cycle. *Cell* **63**, 405-415.
- Konno M, Ito M, Hayano T und Takahashi N** (1996) The substrate-binding site in Escherichia coli cyclophilin A preferably recognizes a cis-proline isomer or a highly distorted form of the trans isomer. *Journal of Molecular Biology* **256**, 897-908.
- Kontinen VP und Sarvas M**(1993) The PrsA lipoprotein is essential for protein secretion in Bacillus subtilis and sets a limit for high-level secretion. *Molecular Microbiology* **8**, 727-737.
- Kops O, Eckerskorn C, Hottenrott S, Fischer G, Mi HF und Tropschug M**(1998) Ssp1, a Site-Specific Parvulin Homolog from Neurospora Crassa Active in Protein Folding. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 31971-31976.
- Kreegipuu A, Blom N und Brunak S** (1999) PhosphoBase, a database of phosphorylation sites: release 2.0. *Nucleic Acids Research* **27**, 237-239.
- Kreegipuu A, Blom N, Brunak S und Jarv J** (1998) Statistical Analysis of Protein Kinase Specificity Determinants. *FEBS Letters* **430**, 45-50.
- Kremmer E, Ohst K, Kiefer J, Brewis N und Walter G** (1997) Separation of PP2A Core Enzyme and Holoenzyme with Monoclonal Antibodies against the Regulatory  $\alpha$  Subunit - Abundant Expression of Both Forms in Cells. *Molecular & Cellular Biology* **17**, 1692-1701.
- Kumagai A und Dunphy WG** (1992) Regulation of the Cdc25 Protein During the Cell Cycle in Xenopus Extracts. *Cell* **70**, 139-151.
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Landrieu I, Veylder LD, Fruchart JS, Odaert B, Casteels P, Portetelle D, Montagu MV, Inze D und Lippens G** (2000) The Arabidopsis thaliana PIN1At gene encodes a single-domain phosphorylation-dependent peptidyl prolyl cis/trans isomerase. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 10577-10581.
- Lang K, Schmid FX und Fischer G** (1987) Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature* **329**, 268-270.
- Law B und Rossie S** (1995) The Dimeric and Catalytic Subunit Forms of Protein Phosphatase 2A from Rat Brain Are Stimulated by C-2-Ceramide. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 12808-12813.
- Lazar SW und Kolter R** (1996) SurA assists the folding of Escherichia coli outer membrane proteins. *Journal of Bacteriology* **178**, 1770-1773.
- Lebrin F, Bianchini L, Rabilloud T, Chambaz EM und Goldberg Y** (1999) CK2  $\alpha$  - protein phosphatase 2A molecular complex: Possible interaction with the MAP kinase pathway. *Molecular & Cellular Biochemistry* **191**, 207-212.
- Lee J und Stock J** (1993) Protein Phosphatase 2a Catalytic Subunit Is Methyl-Esterified at Its Carboxyl Terminus by a Novel Methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 19192-19195.
- Li M, Guo H und Damuni Z** (1995) Purification and characterization of two potent heat-stable protein inhibitors of protein phosphatase 2A from bovine kidney. *Biochemistry* **34**, 1988-96.
- Liakopoulou-Kyriakides M und Galardy RE** (1979) s-Cis and s-trans isomerism of the His-Pro peptide bond in angiotensin and thyroliberin analogues. *Biochemistry* **18**, 1952-1957.
- Lin XH, Walter J, Scheidtmann K, Ohst K, Newport J und Walter G** (1998) Protein phosphatase 2A is required for the initiation of chromosomal DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 14693-14698.
- Liu W, Youn H, Zhou XZ, Lu KP und Liu JO** (2001) Binding and regulation of the transcription factor NFAT by the peptidyl prolyl cis-trans isomerase Pin1. *FEBS Letters* **496**, 105-108.

- Lopezilasaca M, Schiene C, Kullertz G, Tradler T, Fischer G und Wetzker R** (1998) Effects of FK506-Binding Protein 12 and FK506 on Autophosphorylation of Epidermal Growth Factor Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 9430-9434.
- Lu KP, Hanes SD und Hunter T** (1996) A Human Peptidyl-Prolyl Isomerase Essential for Regulation of Mitosis. *Nature* **380**, 544-547.
- Lu PJ, Wulf G, Zhou XZ, Davies P und Lu KP** (1999a) The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* **399**, 784-788.
- Lu PJ, Zhou XZ, Shen MH und Lu KP** (1999b) Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science* **283**, 1325-1328.
- MacArthur MW und Thornton JM** (1991) Influence of proline residues on protein conformation. *Journal of Molecular Biology* **218**, 397-412.
- MacKintosh CRW** (1994) Inhibitors of protein kinases and phosphatases. *Trends in Biochemical Sciences* **19**, 444-448.
- MacKintosh RW, Haycox G, Hardie DG und Cohen PT** (1990) Identification by molecular cloning of two cDNA sequences from the plant *Brassica napus* which are very similar to mammalian protein phosphatases-1 and -2A. *FEBS Letters* **276**, 156-160.
- Maleszka R, Hanes SD, Hackett RL, de Couet HG und Miklos GL** (1996) The *Drosophila melanogaster* dodo (dod) gene, conserved in humans, is functionally interchangeable with the *ESS1* cell division gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 447-451.
- Maucuer A, Caer JPL, Manceau V und Sobel A** (2000) Specific Ser-Pro phosphorylation by the RNA-recognition motif containing kinase KIS. *European Journal of Biochemistry* **267**, 4456-4464.
- Mayer RE, Hendrix P, Cron P, Matthies R, Stone SR, Goris J, Merleved W, Hofsteenge J und Hemmings BA** (1991) Structure of the 55kda Regulatory Subunit of Protein Phosphatase 2A: Evidence for a Neuronal-Specific Isoform. *Biochemistry* **30**, 3589-3597.
- Mayer-Jaekel RE und Hemmings BA** (1994) Protein phosphatase 2A: A 'menage a trois'. *Trends in Cell Biology* **4**, 287-291.
- Mayer-Jaekel RE, Ohkura H, Ferrigno P, Andjelkovic N, Shiomi K, Uemura T, Glover DM und Hemmings BA** (1994) *Drosophila* mutants in the 55 kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A show strongly reduced ability to dephosphorylate substrates of p34cdc2. *Journal of Cell Science* **107**, 2609-2616.
- Mayer-Jaekel RE, Ohkura H, Gomes R, Sunkel CE, Baumgartner S, Hemmings BA und Glover DM** (1993) The 55 Kd Regulatory Subunit of *Drosophila* Protein Phosphatase 2A Is Required for Anaphase. *Cell* **72**, 621-633.
- McCright B, Rivers AM, Audlin S und Virshup DM** (1996) The B56 Family of Protein Phosphatase 2a (Pp2a) Regulatory Subunits Encodes Differentiation-Induced Phosphoproteins That Target Pp2a to Both Nucleus and Cytoplasm. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 22081-22089.
- McCright B und Virshup DM** (1995) Identification of a New Family of Protein Phosphatase 2a Regulatory Subunits. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 26123-26128.
- Medrano FJ, Alonso J, Garcia JL, Romero A, Bode W und Gomisruth FX** (1998) Structure of Proline Iminopeptidase from *Xanthomonas Campestris* Pv. Citri - a Prototype for the Prolyl Oligopeptidase Family. *EMBO Journal* **17**, 1-9.
- Merker MP, Dawson CA, Bongard RD, Roerig DL, Haworth ST und Linehan JH** (1993) Angiotensin-converting enzyme preferentially hydrolyzes trans isomer of proline-containing substrate. *Journal of Applied Physiology* **75**, 1519-1524.

- Merrick SE, Trojanowski JQ und Lee VMY** (1997) Selective Destruction of Stable Microtubules and Axons by Inhibitors of Protein Serine/Threonine Phosphatases in Cultured Human Neurons (Nt2n Cells). *Journal of Neuroscience* **17**, 5726-5737.
- Metzner M, Stoller G, Rucknagel KP, Lu KP, Fischer G, Luckner M und Kullertz G** (2001) Functional replacement of the essential ESS1 in yeast by the plant parvulin D1Par13. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 13524-13529.
- Millward TA, Zolnierowicz S und Hemmings BA** (1999) Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A [Review]. *Trends in Biochemical Sciences* **24**, 186-191.
- Moreno CS, Park S, Nelson K, Ashby D, Hubalek F, Lane WS und Pallas DC** (2000) WD40 repeat proteins striatin and S/G(2) nuclear autoantigen are members of a novel family of calmodulin-binding proteins that associate with protein phosphatase 2A. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 5257-5263.
- Morgan DO** (1997) Cyclin-dependent kinases - engines, clocks and microprocessors [Review]. *Annual Review of Cell & Developmental Biology* **13**, 261-291.
- Morris DP, Phatnani HP und Greenleaf AL** (1999) Phospho-carboxyl-terminal domain binding and the role of a prolyl isomerase in pre-mRNA 3'-end formation. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 31583-31587.
- Mumby MC, Russell KL, Garrard LJ und Green DD** (1987) Cardiac contractile protein phosphatases. Purification of two enzyme forms and their characterization with subunit-specific antibodies. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 6257-65.
- Muranyi A, Evenas J, Stenberg Y, Stenflo J und Drakenberg T** (2000) Characterization of the EGF-like module pair 3-4 from vitamin K-dependent protein S using NMR spectroscopy reveals dynamics on three separate time scales and extensive effects from calcium binding. *Biochemistry* **39**, 15742-15756.
- Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R und Smith TF** (1994) The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature (London)* **371**, 297-300.
- Ng KKS und Weis WI** (1998) Coupling of prolyl peptide bond isomerization and Ca<sup>2+</sup> binding in a C-type mannose-binding protein. *Biochemistry* **37**, 17977-17989.
- Nishito Y, Usui H, Shinzawa-Itoh K, Inoue R, Tanabe O, Nagase T, Murakami T und Takeda M** (1999a) Direct metal analyses of Mn<sup>2+</sup>-dependent and -independent protein phosphatase 2A from human erythrocytes detect zinc and iron only in the Mn<sup>2+</sup>-independent one. *FEBS Letters* **447**, 29-33.
- Nishito Y, Usui H, Tanabe O, Shimizu M und Takeda M** (1999b) Interconversion of Mn<sup>2+</sup>-dependent and -independent protein phosphatase 2A from human erythrocytes: Role of Zn<sup>2+</sup> and Fe<sup>2+</sup> in protein phosphatase 2A. *Journal of Biochemistry* **126**, 632-638.
- Nishiwaki S, Fujiki H, Sukanuma M, Nishiwaki-Matsushima R und Sugimura T** (1991) Rapid purification of protein phosphatase 2A from mouse brain by microcystin-affinity chromatography. *FEBS Letters* **279**, 115-8.
- Norbury C und Nurse P** (1992) Animal cell cycles and their control. *Annual Review Biochemistry* **61**, 441-470.
- Nosworthy NJ, Peterkofsky A, Konig S, Seok YJ, Szczepanowski RH und Ginsburg A** (1998) Phosphorylation Destabilizes the Amino-Terminal Domain of Enzyme I of the Escherichia Coli Phosphoenolpyruvate-Sugar Phosphotransferase System. *Biochemistry* **37**, 6718-6726.
- Ogris E, Du XX, Nelson KC, Mak EK, Yu XX, Lane WS und Pallas DC** (1999) A protein phosphatase methyltransferase (PME-1) is one of several novel proteins stably associating with two inactive mutants of protein phosphatase 2A. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 14382-14391.
- Ogris E, Gibson DM und Pallas DC** (1997) Protein Phosphatase 2a Subunit Assembly - the Catalytic Subunit Carboxy Terminus Is Important for Binding Cellular B Subunit but Not Polyomavirus Middle Tumor Antigen. *Oncogene* **15**, 911-917.

- Okamura H, Aramburu J, Garcia-Rodriguez C, Viola JPB, Raghavan A, Tahiliani M, Zhang X, Qin J, Hogan PG und Rao A** (2000) Concerted Dephosphorylation of the Transcription Factor NFAT1 Induces a Conformational Switch that Regulates Transcriptional Activity. *Molecular Cell* **6**, 539-550
- O'Keefe MP, Nedelkov D, Bieber AL und Nieman RA** (1996) Evidence for Isomerization in Myotoxin a from the Prairie Rattlesnake (*Crotalus Viridis Viridis*). *Toxicon* **34**, 417-434.
- Orgad S, Brewis ND, Alphey L, Axton JM, Dudai Y und Cohen PT** (1990) The structure of protein phosphatase 2A is as highly conserved as that of protein phosphatase 1. *FEBS Letters* **275**, 44-48.
- Ottleben H, Haasemann M, Ramachandran R, Gorlach M, Muller-Esterl W und Brown LR** (1997) An NMR study of the interaction of <sup>15</sup>N-labelled bradykinin with an antibody mimic of the bradykinin B2 receptor. *European Journal of Biochemistry* **244**, 471-478.
- Pappenberger G, Aygun H, Engels JW, Reimer U, Fischer G und Kiefhaber T** (2001) Nonprolyl cis peptide bonds in unfolded proteins cause complex folding kinetics. *Nature Structural Biology* **8**, 452-458.
- Pelech S und Cohen P** (1985) The Protein Phosphatases Involved in Cellular Regulation 1. Modulation of Protein Phosphatases-1 and 2a Ec-3.1.3.16 by Histone H-1 Protamine Polylysine and Heparin. *European Journal of Biochemistry* **148**, 245-252.
- Perezcallegon E, Casamayor A, Pujol G, Camps M, Ferrer A und Arino J** (1998) Molecular Cloning and Characterization of Two Phosphatase 2a Catalytic Subunit Genes from *Arabidopsis Thaliana*. *Gene* **209**, 105-112.
- Perona JJ und Craik CS** (1995) Structural basis of substrate specificity in the serine proteases [Review]. *Protein Science* **4**, 337-360.
- Petersen BO, Lukas J, Sorensen CS, Bartek J und Helin K** (1999) Phosphorylation of mammalian CDC6 by Cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *EMBO Journal* **18**, 396-410.
- Pines J** (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view (Review). *Biochemical Journal* **308**, 697-711.
- Pinna LA und Donella-Deana A** (1994) Phosphorylated synthetic peptides as tools for studying protein phosphatases (Review). *Biochimica et Biophysica Acta* **1222**, 415-431.
- Pinna LA und Ruzzene M** (1996) How do protein kinases recognize their substrates? (Review). *Biochimica et Biophysica Acta* **1314**, 191-225.
- Price NE und Mumby MC** (1999) Brain protein serine threonine phosphatases. *Current Opinion in Neurobiology* **9**, 336-342.
- Pryde JG, Farmaki T und Lucocq JM** (1998) Okadaic Acid Induces Selective Arrest of Protein Transport in the Rough Endoplasmic Reticulum and Prevents Export into Copii-Coated Structures. *Molecular & Cellular Biology* **18**, 1125-1135.
- Rahfeld JU, Rucknagel KP, Schelbert B, Ludwig B, Hacker J, Mann K und Fischer G** (1994a) Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl cis/trans isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin. *FEBS Letters* **352**, 180-184.
- Rahfeld JU, Schierhorn A, Mann K und Fischer G** (1994b) A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **343**, 65-69.
- Ramelot TA und Nicholson LK** (2001) Phosphorylation-induced Structural Changes in the Amyloid Precursor Protein Cytoplasmic Tail Detected by NMR. *Journal of Molecular Biology* **307**, 871-884.
- Ranganathan R, Lu KP, Hunter T und Noel JP** (1997) Structural and Functional Analysis of the Mitotic Rotamase Pin1 Suggests Substrate Recognition Is Phosphorylation Dependent. *Cell* **89**, 875-886.
- Reimer U, Elmokdad N, Schutkowski M und Fischer G** (1997) Intramolecular Assistance of Cis/Trans Isomerization of the Histidine-Proline Moiety. *Biochemistry* **36**, 13802-13808.

- Reimer U, Scherer G, Drewello M, Kruber S, Schutkowski M und Fischer G** (1998) Side-Chain Effects on Peptidyl-Prolyl Cis/Trans Isomerisation. *Journal of Molecular Biology* **279**, 449-460.
- Reyes JG, Robayna IG, Delgado PS, Gonzalez IH, Aguiar JQ, Rosas FE, Fanjul LF und Degalarreta CMR** (1996) C-jun is a downstream target for ceramide-activated protein phosphatase in a431 cells. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 21375-21380.
- Reynolds RA, Yem AW, Wolfe CL, Deibel MR, Chidester CG und Watenpaugh KD** (1999) Crystal structure of the catalytic subunit of Cdc25B required for G(2)/M phase transition of the cell cycle. *Journal of Molecular Biology* **293**, 559-568.
- Rink H, Liersch M, Sieber P und Meyer F** (1984) A large fragment approach to DNA synthesis: total synthesis of a gene for the protease inhibitor eglin c from the leech *Hirudo medicinalis* and its expression in *E. coli*. *Nucleic Acids Research* **12**, 6369-6387.
- Rose GD, Gierasch LM und Smith JA** (1985) Turns in peptides and proteins. *Adv Protein Chem* **37**, 1-109.
- Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, Gabor Miklos GL, Nelson CR, Hariharan IK, Fortini ME, Li PW, Apweiler R, Fleischmann W et al.** (2000) Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* **287**, 2204-2215.
- Rundell K und Parakati R** (2001) The role of the SV40ST antigen in cell growth promotion and transformation. *Seminars in Cancer Biology* **11**, 5-13.
- Ruvolo PP, Deng XM, Ito T, Carr BK und May WS** (1999) Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 20296-20300.
- Saheki S, Takeda A und Shimazu T** (1985) Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity. *Analytical Biochemistry* **148**, 277-281.
- Saito T, Ishiguro K, Uchida T, Miyamoto E, Kishimoto T und Hisanaga S** (1995a) In Situ Dephosphorylation of Tau by Protein Phosphatase 2A and 2B in Fetal Rat Primary Cultured Neurons. *FEBS Letters* **376**, 238-242.
- Saito T, Shima H, Osawa Y, Nagao M, Hemmings BA, Kishimoto T und Hisanaga S** (1995b) Neurofilament-Associated Protein Phosphatase 2a - Its Possible Role in Preserving Neurofilaments in Filamentous States. *Biochemistry* **34**, 7376-7384.
- Sanchez C, Tompa P, Szucs K, Friedrich P und Avila J** (1996) Phosphorylation and Dephosphorylation in the Proline-Rich C-Terminal Domain of Microtubule-Associated Protein 2. *European Journal of Biochemistry* **241**, 765-771.
- Santoro MF, Annand RR, Robertson MM, Peng YW, Brady MJ, Mankovich JA, Hackett MC, Ghayur T, Walter G, Wong WW et al.** (1998) Regulation of Protein Phosphatase 2a Activity by Caspase-3 During Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 13119-13128.
- Schaeffer HJ und Weber MJ** (1999) Mitogen-activated protein kinases: Specific messages from ubiquitous messengers [Review]. *Molecular & Cellular Biology* **19**, 2435-2444.
- Schaffhausen B** (1995) SH2 domain structure and function [Review]. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* **1242**, 61-75.
- Schechter I und Berger A** (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **27**, 157-162.
- Schelbert B und Rahfeld JU** (2001) Phosphorylation-specific prolyl bond isomerization in eukaryotes: New insights in conformational regulation. *Recent Research Developments in Medicinal Chemistry*, akzeptiert
- Schiene C** (1999) Einfluß von Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen auf native Zustände von Proteinen., Dissertation MLU Halle.
- Schiene C und Fischer G** (2000) Enzymes that catalyse the restructuring of proteins [Review]. *Current Opinion in Structural Biology* **10**, 40-45.

- Schmid FX** (1993) Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **22**, 123-142.
- Schneider A, Biernat J, Bergen Mv, Mandelkow E und Mandelkow EM** (1999) Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* **38**, 3549-3558.
- Scholz C, Rahfeld J, Fischer G und Schmid FX** (1997) Catalysis of Protein Folding by Parvulin. *Journal of Molecular Biology* **273**, 752-762.
- Scholz C, Scherer G, Mayr LM, Schindler T, Fischer G und Schmid FX** (1998) Prolyl Isomerases Do Not Catalyze Isomerization of Non-Prolyl Peptide Bonds. *Biological Chemistry* **379**, 361-365.
- Schutzkowski M, Bernhardt A, Zhou XZ, Shen MH, Reimer U, Rahfeld JU, Lu KP und Fischer G** (1998) Role of phosphorylation in determining the backbone dynamics of the serine/threonine-proline motif and Pin1 substrate recognition [Review]. *Biochemistry* **37**, 5566-5575.
- Sekerina E, Rahfeld JU, Muller J, Fanghanel J, Rascher C, Fischer G und 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. *Journal of Molecular Biology* **301**, 1003-1017.
- Shen MH, Stukenberg PT, Kirschner MW und Lu KP** (1998) The Essential Mitotic Peptidyl-Prolyl Isomerase Pin1 Binds and Regulates Mitosis-Specific Phosphoproteins. *Genes & Development* **12**, 706-720.
- Sheng XR, Zhang HJ, Pan XM, Li XF und Zhou JM** (1997) Domain Movement in Rabbit Muscle Adenylate Kinase Might Involve Proline Isomerization. *FEBS Letters* **413**, 429-432.
- Shinde UP, Liu JJ und Inouye M** (1997) Protein Memory through Altered Folding Mediated by Intramolecular Chaperones. *Nature* **389**, 520-522.
- Shtrichman R, Sharf R, Barr H, Dobner T und Kleinberger T** (1999) Induction of apoptosis by adenovirus E4orf4 protein is specific to transformed cells and requires an interaction with protein phosphatase 2A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 10080-10085.
- Silverstein AM, Galigniana MD, Chen MS, Owensgrillo JK, Chinkers M und Pratt WB** (1997) Protein Phosphatase 5 Is a Major Component of Glucocorticoid Receptor Hsp90 Complexes with Properties of an FK506-Binding Immunophilin. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 16224-16230.
- Singh TJ, Grundke-Iqbal I und Iqbal K** (1996) Differential Phosphorylation of Human Tau Isoforms Containing Three Repeats by Several Protein Kinases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **328**, 43-50.
- Smith CM, Shindyalov IN, Veretnik S, Gribskov M, Taylor SS, Teneyck LF und Bourne PE** (1997) The Protein Kinase Resource. *Trends in Biochemical Sciences* **22**, 444-446.
- Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K und Neer EJ** (1999) The WD repeat: a common architecture for diverse functions [Review]. *Trends in Biochemical Sciences* **24**, 181-185.
- Sneddon AA, Cohen PT und Stark MJ** (1990) *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 2A performs an essential cellular function and is encoded by two genes. *EMBO Journal* **9**, 4339-4346.
- Sola MM, Langan T und Cohen P** (1991) p34cdc2 phosphorylation sites in histon H1 are dephosphorylated by protein phosphatase 2A1. *Biochimica et Biophysica Acta* **1094**, 211-216.
- Sonoda Y, Kasahara T, Yamaguchi Y, Kuno K, Matsushima K und Mukaida N** (1997) Stimulation of Interleukin-8 Production by Okadaic Acid and Vanadate in a Human Promyelocyte Cell Line, an HI-60 Subline - Possible Role of Mitogen-Activated Protein Kinase on the Okadaic Acid-Induced Nf-Kappa-B Activation. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 15366-15372.
- Sontag E** (2001) Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling. *Cellular Signalling* **13**, 7-16.
- Sontag E, Nunbhakdicraig V, Bloom GS und Mumby MC** (1995) A Novel Pool of Protein Phosphatase 2a Is Associated with Microtubules and Is Regulated During the Cell Cycle. *Journal of Cell Biology* **128**, 1131-1144.



- Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Lee G, Brandt R, Kamibayashi C, Kuret J, White CL, Mumby MC and Bloom GS** (1999) Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules - Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 25490-25498.
- Steegenga WT, Eb AJvd and Jochemsen AG** (1996) How phosphorylation regulates the activity of p53. *Journal of Molecular Biology* **263**, 103-113.
- Stein RL** (1993) Mechanism of enzymatic and nonenzymatic prolyl cis-trans isomerization. *Advances in Protein Chemistry* **44**, 1-24.
- Stewart DE, Sarkar A and Wampler JE** (1990) Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures. *Journal of Molecular Biology* **214**, 253-260.
- Stoddard BL and Pietrokovski S** (1998) Breaking up Is Hard to Do. *Nature Structural Biology* **5**, 3-5.
- Stone SR, Hofsteenge J and Hemmings BA** (1987) Molecular cloning of cDNAs encoding two isoforms of the catalytic subunit of Protein Phosphatase 2A. *Biochemistry* **26**, 7215-20.
- Strack S, Chang D, Zaucha JA, Colbran RJ and Wadzinski BE** (1999) Cloning and characterization of B delta, a novel regulatory subunit of protein phosphatase 2A. *FEBS Letters* **460**, 462-466.
- Strack S, Zaucha JA, Ebner FF, Colbran RJ and Wadzinski BE** (1998) Brain Protein Phosphatase 2A - Developmental Regulation and Distinct Cellular and Subcellular Localization by B Subunits. *Journal of Comparative Neurology* **392**, 515-527.
- Stukenberg PT and Kirschner MW** (2001) Pin1 acts catalytically to promote a conformational change in cdc25. *Molecular Cell* **7**, 1071-1083.
- Stukenberg PT, Lustig KD, McGarry TJ, King RW, Kuang J and Kirschner MW** (1997) Systematic Identification of Mitotic Phosphoproteins. *Current Biology* **7**, 338-348.
- Sudol M** (1996) The WW Module Competes with the SH3 Domain. *Trends in Biochemical Sciences* **21**, 161-163.
- Sudol M and Hunter T** (2000) New wrinkles for an old domain [Review]. *Cell* **103**, 1001-1004.
- Sugiura R, Toda T, Dhut S, Shuntoh H and Kuno T** (1999) The MAPK kinase Pekl acts as a phosphorylation-dependent molecular switch. *Nature* **399**, 479-483.
- Sutherland EW and Wosilait WD** (1955) Inactivation and activation of liver phosphorylase. *Nature* **175**, 169-170.
- Szilak L, Moitra J, Krylov D and Vinson C** (1997) Phosphorylation Destabilizes Alpha-Helices. *Nature Structural Biology* **4**, 112-114.
- Taborsky G** (1991) On the interaction of phosvitins with ferric ion: solubility of the Fe(III)-phosphoprotein complex under acidic conditions is a function of the iron/phosphate ratio and the degree of phosvitin phosphorylation. *J Inorg Biochem* **44**, 65-77.
- Takai A and Mieskes G** (1991) Inhibitory Effect of Okadaic Acid on the P-Nitrophenyl Phosphate Phosphatase Activity of Protein Phosphatases. *Biochemical Journal* **275**, 233-239.
- Takai A, Murata M, Torigoe K, Isobe M, Mieskes G and Yasumoto T** (1992) Inhibitory effect of okadaic acid derivatives on protein phosphatases. A study on structure-affinity relationship. *Biochemical Journal* **284**, 539-44.
- Tamura S, Kikuchi H, Kikuchi K, Hiraga A and Tsuiki S** (1980) Purification and subunit structure of a high-molecular-weight phosphoprotein phosphatase (phosphatase II) from rat liver. *European Journal of Biochemistry* **104**, 347-55.
- Tapia R, Pena F and Arias C** (1999) Neurotoxic and synaptic effects of okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases. *Neurochemical Research* **24**, 1423-1430.

- Tehrani MA, Mumby MC und Kamibayashi C** (1996) Identification of a Novel Protein Phosphatase 2a Regulatory Subunit Highly Expressed in Muscle. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 5164-5170.
- ter Haar E, Coll JT, Austen DA, Hsiao HM, Swenson L und Jain J** (2001) Structure of GSK3beta reveals a primed phosphorylation mechanism. *Nature Structural Biology* **8**, 593-596.
- Terada T, Shirouzu M, Fukumori Y, Fujimori F, Ito Y, Kigawa T, Yokoyama S und Uchida T** (2001) Solution structure of the human parvulin-like peptidyl prolyl cis/trans isomerase, hPar14. *Journal of Molecular Biology* **305**, 917-926.
- Tolstykh T, Lee J, Vafai S und Stock JB** (2000) Carboxyl methylation regulates phosphoprotein phosphatase 2A by controlling the association of regulatory B subunits. *EMBO Journal* **19**, 5682-5691.
- Tong YS, Olczak J, Zabrocki J, Gershengorn MC, Marshall GR und Moeller KD** (2000) Constrained peptidomimetics for TRH: cis-peptide bond analogs. *Tetrahedron* **56**, 9791-9800.
- Tung HY, Resink TJ, Hemmings BA, Shenolikar S und Cohen P** (1984) The catalytic subunits of protein phosphatase-1 and protein phosphatase 2A are distinct gene products. *European Journal of Biochemistry* **138**, 635-41.
- Tung HYL, Alemany S und Cohen P** (1985) The Protein Phosphatases Involved in Cellular Regulation 2. Purification Subunit Structure and Properties of Protein Phosphatases-2a-0 2a-1 and 2a-2 from Rabbit Skeletal Muscle. *European Journal of Biochemistry* **148**, 253-264.
- Turowski P, Favre B, Campbell KS, Lamb NJC und Hemmings BA** (1997) Modulation of the Enzymatic Properties of Protein Phosphatase 2a Catalytic Subunit by the Recombinant 65-Kda Regulatory Subunit Pr65-Alpha. *European Journal of Biochemistry* **248**, 200-208.
- Turowski P, Fernandez A, Favre B, Lamb NJC und Hemmings BA** (1995) Differential Methylation and Altered Conformation of Cytoplasmic and Nuclear Forms of Protein Phosphatase 2a During Cell Cycle Progression. *Journal of Cell Biology* **129**, 397-410.
- Turowski P, Myles T, Hemmings BA, Fernandez A und Lamb NJC** (1999) Vimentin dephosphorylation by protein phosphatase 2A is modulated by the targeting subunit B55. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 1997-2015.
- Uchida T, Fujimori F, Tradler T, Fischer G und Rahfeld JU** (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.
- Usui H, Imazu M, Maeta K, Tsukamoto H, Azuma K und Takeda M** (1988) Three distinct forms of type 2A protein phosphatase in human erythrocyte cytosol. *The Journal of Biological Chemistry* **263**, 3752-3761.
- Usui H, Inoue R, Tanabe O, Nishito Y, Shimizu M, Hayashi H, Kagamiyama H und Takeda M** (1998) Oactivation of Protein Phosphatase 2a by Camp-Dependent Protein Kinase-Catalyzed Phosphorylation of the 74-Kda B" (Delta) Regulatory Subunit in Vitro and Identification of the Phosphorylation Sites. *FEBS Letters* **430**, 312-316.
- Vance JE, Leblanc DA, Wingfield P und London RE** (1997) Conformational Selectivity of Hiv-1 Protease Cleavage of X-Pro Peptide Bonds and Its Implications. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 15603-15606.
- Vanhoof C, Aly MS, Garcia A, Cayla X, Cassiman JJ, Merlevede W und Goris J** (1995a) Structure and Chromosomal Localization of the Human Gene of the Phosphotyrosyl Phosphatase Activator (Ptpa) of Protein Phosphatase 2a. *Genomics* **28**, 261-272.
- Vanhoof C, Ingels F, Cayla X, Stevens I, Merlevede W und Goris J** (1995b) Molecular Cloning and Developmental Regulation Expression of Two Isoforms of the Catalytic Subunit of Protein Phosphatase 2a from *Xenopus Laevis*. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **215**, 666-673.
- Veeranna, Shetty KT, Link WT, Jaffe H, Wang J und Pant HC** (1995) Neuronal Cyclin-Dependent Kinase-5 Phosphorylation Sites in Neurofilament Protein (Nf-H) Are Dephosphorylated by Protein Phosphatase 2A. *Journal of Neurochemistry* **64**, 2681-2690.

- Vener AV, Rokka A, Fulgosi H, Andersson B und Herrmann RG** (1999) A cyclophilin-regulated PP2A-like protein phosphatase in thylakoid membranes of plant chloroplasts. *Biochemistry* **38**, 14955-14965.
- Verdecia MA, Bowman ME, Lu KP, Hunter T und Noel JP** (2000) Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IVWW domains. *Nature Structural Biology* **7**, 639-643.
- Virshup DM** (2000) Protein phosphatase 2A: a panoply of enzymes [Review]. *Current Opinion in Cell Biology* **12**, 180-185.
- Virshup DM und Kelly TJ** (1989) Purification of replication protein C, a cellular protein involved in the initial stages of simian virus 40 DNA replication in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 3584-3588.
- Voorhoeve PM, Hijmans EM und Bernards R** (1999) Functional interaction between a novel protein phosphatase 2A regulatory subunit, PR59, and the retinoblastoma-related p107 protein. *Oncogene* **18**, 515-524.
- Waelkens E, Goris J und Merlevede W** (1987) Purification and Properties of Polycation-Stimulated Phosphorylase Phosphatases from Rabbit Skeletal Muscle. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 1049-1059.
- Wang SS, Esplin ED, Li JL, Huang LY, Gazdar A, Minna J und Evans GA** (1998) Alterations of the Ppp2r1b Gene in Human Lung and Colon Cancer. *Science* **282**, 284-287.
- Wang YC und Burke DJ** (1997) Cdc55p, the B-Type Regulatory Subunit of Protein Phosphatase 2A, Has Multiple Functions in Mitosis and Is Required for the Kinetochores/Spindle Checkpoint in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Molecular & Cellular Biology* **17**, 620-626.
- Wei HJ, Ashby DG, Moreno CS, Ogris E, Yeong FM, Corbett AH und Pallas DC** (2001) Carboxymethylation of the PP2A catalytic subunit in *Saccharomyces cerevisiae* is required for efficient interaction with the B-type subunits CDC55p and RTS1p. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 1570-1577.
- Weiss MS, Jabs A und Hilgenfeld R** (1998) Peptide Bonds Revisited. *Nature Structural Biology* **5**, 676.
- Weiwad M, Kullertz G, Schutkowski M und Fischer G** (2000) Evidence that the substrate backbone conformation is critical to phosphorylation by p42 MAP kinase. *FEBS Letters* **478**, 39-42.
- Wera S und Hemmings BA** (1995) Serine threonine protein phosphatases [Review]. *Biochemical Journal* **311**, 17-29.
- Werner A** (1996) Isolierung und Charakterisierung von prolinspezifischen Phosphatasen aus Schweinehirn., Diplomarbeit MLU Halle.
- Westphal RS, Anderson KA, Means AR und Wadzinski BE** (1998) A Signaling Complex of Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-Dependent Protein Kinase IV and Protein Phosphatase 2A. *Science* **280**, 1258-1261.
- Westphal RS, Coffee RL, Marotta A, Pelech SL und Wadzinski BE** (1999) Identification of kinase-phosphatase signaling modules composed of p70 S6 kinase-protein phosphatase 2A (PP2A) and p21-activated kinase-PP2A. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 687-692.
- Williams DD, Marin O, Pinna LA und Proud CG** (1999) Phosphorylated seryl and threonyl, but not tyrosyl, residues are efficient specificity determinants for GSK-3 beta and Shaggy. *FEBS Letters* **448**, 86-90.
- Winkler KE, Swenson KI, Kornbluth S und Means AR** (2000) Requirement of the prolyl isomerase Pin1 for the replication checkpoint. *Science* **287**, 1644-1647.
- Wittelsberger A, Keller M, Scarpellino L, Patiny L, Acha-Orbea H und Mutter M** (2000) Pseudoproline: Induktion einer biologisch relevanten cis-Peptidbindung in Mimetika der V3-Schleife des HIV-1 Proteins gp120. *Angewandte Chemie* **112**, 1153-1156.
- Wolff RA, Dobrowsky RT, Bielawska A, Obeid LM und Hannun YA** (1994) Role of ceramide-activated protein phosphatase in ceramide-mediated signal transduction. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 19605-9.

- Wu J, Tolstykh T, Lee J, Boyd K, Stock JB und Broach JR** (2000) Carboxyl methylation of the phosphoprotein phosphatase 2A catalytic subunit promotes its functional association with regulatory subunits in vivo. *EMBO Journal* **19**, 5672-5681.
- Wulf GM, Ryo A, Wulf GG, Lee SW, Niu T, Petkova V und Lu KP** (2001) Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1. *EMBO Journal* **20**, 3459-3472.
- Xie H und Clarke S** (1994) Protein phosphatase 2A is reversibly modified by methyl esterification at its C-terminal leucine residue in bovine brain. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 1981-1984.
- Xu Z und Williams BRG** (2000) The B56 alpha regulatory subunit of protein phosphatase 2A is a target for regulation by double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *Molecular & Cellular Biology* **20**, 5285-5299.
- Yaffe MB und Cantley LC** (1999) Signal transduction - Grabbing phosphoproteins. *Nature* **402**, 30-31.
- Yaffe MB und Elia AEH** (2001) Phosphoserine/threonine-binding domains. *Current Opinion in Cell Biology* **13**, 131-138.
- Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, Caron PR, Aitken A, Leffers H, Gamblin SJ, Smerdon SJ und Cantley LC** (1997a) The Structural Basis for 14-3-3-Phosphopeptide Binding Specificity. *Cell* **91**, 961-971.
- Yaffe MB, Schutkowski M, Shen MH, Zhou XZ, Stukenberg PT, Rahfeld JU, Xu J, Kuang J, Kirschner MW, Fischer G et al.** (1997b) Sequence-Specific and Phosphorylation-Dependent Proline Isomerization - a Potential Mitotic Regulatory Mechanism. *Science* **278**, 1957-1960.
- Yaffe MB und Smerdon SJ** (2001) Phosphoserine/threonine binding domains: You can't pSERious? *Structure* **9**, R33-R38.
- Yamamoto H, Hasegawa M, Ono T, Tashima K, Ihara Y und Miyamoto E** (1995) Dephosphorylation of Fetal-Tau and Paired Helical Filaments-Tau by Protein Phosphatases 1 and 2A and Calcineurin. *Journal of Biochemistry* **118**, 1224-1231.
- Yamazaki T, Ro S, Goodman M, Chung NN und Schiller PW** (1993) A topochemical approach to explain morphiceptin bioactivity. *Journal of Medicinal Chemistry* **36**, 708-719.
- Yan Z, Fedorov SA, Mumby MC und Williams RS** (2000) PR48, a novel regulatory subunit of protein phosphatase 2A, interacts with Cdc6 and modulates DNA replication in human cells. *Molecular & Cellular Biology* **20**, 1021-1029.
- Yang J und Kornbluth S** (1999) All aboard the cyclin train: subcellular trafficking of cyclins and their CDK partners. *Trends in Cell Biology* **9**, 207-210.
- Yao JL, Kops O, Lu PJ und Lu KP** (2001) Functional conservation of phosphorylation-specific prolyl isomerases in plants. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 13517-13523.
- Yaron A und Naider F** (1993) Proline-Dependent Structural and Biological Properties of Peptides and Proteins. *Critical Reviews in Biochemistry & Molecular Biology* **28**, 31-81.
- Yu H, Chen JK, Feng S, Dalgarno DC, Brauer AW und Schreiber SL** (1994) Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* **76**, 933-945.
- Yu JS** (1998) Activation of Protein Phosphatase 2A by the Fe<sup>2+</sup>/Ascorbate System. *Journal of Biochemistry* **124**, 225-230.
- Yu XX, Du XX, Moreno CS, Green RE, Ogris E, Feng Q, Chou L, McQuoid MJ und Pallas DC** (2001) Methylation of the protein phosphatase 2A catalytic subunit is essential for association of B alpha regulatory subunit but not SG2NA, striatin, or polyomavirus middle tumor antigen. *Molecular Biology of the Cell* **12**, 185-199.

- Yuan XM, Werner JM, Knott V, Handford PA, Campbell ID und Downing AK** (1998) Effects of Proline Cis-Trans Isomerization on TB Domain Secondary Structure. *Protein Science* **7**, 2127-2135.
- Zarrinpar A und Lim WA** (2000) Converging on proline: the mechanism of WW domain peptide recognition. *Nature Structural Biology* **7**, 611-613.
- Zhang J, Zhang Z, Brew K und Lee EYC** (1996) Mutational Analysis of the Catalytic Subunit of Muscle Protein Phosphatase-1. *Biochemistry* **35**, 6276-6282.
- Zhao Y, Chen Y, Schutkowski M, Fischer G und Ke H** (1997) Cyclophilin A complexed with a fragment of HIV-1 gag protein: insights into HIV-1 infectious activity. *Structure* **5**, 139-146.
- Zhao YD und Ke HM** (1996) Crystal Structure Implies That Cyclophilin Predominantly Catalyzes the Trans to Cis Isomerization. *Biochemistry* **35**, 7356-7361.
- Zheng-Fischhofer QY, Biernat J, Mandelkow EM, Illenberger S, Godemann R und Mandelkow E** (1998) Sequential Phosphorylation of Tau by Glycogen Synthase Kinase-3-Beta and Protein Kinase a at Thr212 and Ser214 Generates the Alzheimer-Specific Epitope of Antibody At100 and Requires a Paired-Helical-Filament-Like Conformation. *European Journal of Biochemistry* **252**, 542-552.
- Zhou XZ, Kops O, Werner A, Lu PJ, Shen MH, Stoller G, Kullertz G, Stark M, Fischer G und Lu KP** (2000) Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Molecular Cell* **6**, 873-883.
- Zhou XZ, Lu PJ, Wulf G und Lu KP** (1999) Phosphorylation-dependent prolyl isomerization: a novel signaling regulatory mechanism [Review]. *Cellular & Molecular Life Sciences* **56**, 788-806.
- Zhu T, Matsuzawa S, Mizuno Y, Kamibayashi C, Mumby MC, Andjelkovic N, Hemmings BA, Onoe K und Kikuchi K** (1997) The Interconversion of Protein Phosphatase 2A between PP2A(1) and PP2A(0) During Retinoic Acid-Induced Granulocytic Differentiation and a Modification on the Catalytic Subunit in S Phase of HL-60 Cells. *Archives of Biochemistry & Biophysics* **339**, 210-217.
- Zolnierowicz S** (2000) Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. *Biochemical Pharmacology* **60**, 1225-1235.
- Zolnierowicz S und Bollen M** (2000) EMBO conference report: Protein phosphorylation and protein phosphatases, De Panne, Belgium, September 19-24, 1999. *EMBO Journal* **19**, 483-488.
- Zolnierowicz S, Csontos C, Bondor J, Verin A, Mumby MC und DePaoli-Roach AA** (1994) Diversity in the regulatory B-subunits of protein phosphatase 2A: identification of a novel isoform highly expressed in brain. *Biochemistry* **33**, 11858-67.
- Zolnierowicz S, Vanhoof C, Andjelkovic N, Cron P, Stevens I, Merlevede W, Goris J und Hemmings BA** (1996) The Variable Subunit Associated with Protein Phosphatase 2A(0) Defines a Novel Multimember Family of Regulatory Subunits. *Biochemical Journal* **317**, 187-194.

*Diese Arbeit entstand in der Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft.*

*Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern der Gruppe, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.*

*Herrn Professor Gunter Fischer danke ich herzlich für die Überlassung des spannenden Themas, das damit verbundene Vertrauen, sowie sein Interesse am Fortgang der Arbeit.*

*Bei Gerd Küllertz bedanke ich mich herzlich für die ständige Unterstützung in allen Situationen, besonders nach misslungenen Experimenten, und die vielen kleinen Denkanstöße. Ein ganz dickes Dankeschön geht an alle Mitarbeiter der peptidchemischen Arbeitsgruppe unter Leitung von Mike Schutkowski und Frank Bordusa, allen voran Dirk Wildemann und Mario Drewello, für die Synthese zahlreicher Peptide.*

*Großer Dank gebührt Peter Rücknagel für seine Einführung in die Möglichkeiten und Tücken der HPLC. Seinen kleinen Geheimnissen ist es außerdem zu verdanken, dass die Identifizierung der Phosphatase-Untereinheiten nach vielen Fehlschlägen doch gelang und damit eine lange Durststrecke ein gutes Ende fand.*

*Bei den Mitarbeitern der Massenspektrometrie Angelika Schierhorn, Thomas Pfeifer und Marc Kipping bedanke ich mich für die Aufnahme zahlreicher Massenspektren.*

*Großen Spaß hat mir die jahrelange Zusammenarbeit mit der Laborstammbesetzung Matthias Weiwad, Frank Erdmann, Martin Metzner, Claudia Christner, Jana Reißmann und Frau Ungar gemacht. Geteiltes Leid ist eben halbes Leid.*

*Die Arbeit erleichterten mir Jens Rahfeld, Gerlind Stoller und die Arbeitsgruppe von Kun Ping Lu (Boston), indem sie mir humanes Pin1 und einige Pin1-Mutanten zur Verfügung stellten. Dankeschön dafür.*

*Bei Ria Baumgrass und Frau Heidler bedanke ich mich herzlich für ihre Unterstützung bei einigen Zellkulturexperimenten.*

*Sehr herzlich danke ich allen früheren und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für eine angenehme Arbeitsatmosphäre, die vielen kleinen alltäglichen Hilfen und die gemeinsamen Erlebnisse auch nach der Arbeit.*

*Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und Antje für ihre ständige Unterstützung in allen Lebenslagen.*

## Lebenslauf

**Persönliche Angaben**    Name: Andreas Werner  
geboren: am 05. 06. 1971 in Karl-Marx-Stadt (heute Chemnitz)  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

Sept. 1978 – Juni 1988    Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule in Burgstädt  
Sept. 1988 – Juni 1990    Erweiterte Oberschule in Limbach-Oberfrohna  
Juni 1990                    Abitur

### Zivildienst

Okt. 1990 – Okt. 1991    Kreiskrankenhaus Burgstädt

### Ausbildung

Okt. 1991 – Sept. 1996    Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Diplomarbeit: „Isolierung und Charakterisierung von prolin-spezifischen Phosphatasen aus Schweinehirn“  
angefertigt in der Arbeitsgruppe „Enzymologie der Peptidbindung“ der Max-Planck-Gesellschaft

seit Okt. 1996              Anfertigung einer Promotion in der Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft  
seit Jan. 2001 angestellt bei BioService Halle GmbH

Halle, den 15.10.01

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Halle, den 15.10.01