

Untersuchungen zur Konformerspezifität prolinspezifischer Proteinkinasen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

vorgelegt der

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

von

Matthias Weiwad

geb. 21.11.1973 in Halle/Saale

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. U. Hahn
Institut für Biochemie, Universität Leipzig

Halle (Salle), Juli 2002

verteidigt am 27. 06. 200

urn:nbn:de:gbv:3-000003579

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003579>]

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Prolin und prolinspezifische Enzyme	1
1.1.1. Peptidyl-Prolylbindungen	1
1.1.2. Prolinspezifische Reaktionen	2
1.1.3. Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerasen	3
1.1.4. <i>Native-state</i> Isomerisierung und isomerspezifische Reaktionen	5
1.2. Phosphorylierung von Proteinen	6
1.2.1. Prolinspezifische Phosphorylierung	8
1.2.2. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen	9
1.2.3. Cyclinabhängige Proteinkinasen	13
1.3. Die Ribonuklease T1	15
1.4. Zielstellung der Arbeit	18
2. MATERIAL UND METHODEN	19
2.1. Verzeichnis der verwendeten Materialien	19
2.1.1. Verwendete Chemikalien	19
2.1.2. Verwendete Proteine	20
2.1.3. Radiochemikalien	20
2.2. Proteinchemische Analyse	20
2.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	20
2.2.2. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	20
2.2.3. Bestimmung der Proteinkonzentration	21
2.3. Untersuchung der Isomerspezifität von Proteinkinasen an Peptidsubstraten	21
2.3.1. Herstellung von <i>cis</i> -Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np	21
2.3.2. Untersuchung der Isomerspezifität der ERK2	22
2.3.3. Untersuchung eines disulfidverbrückten Peptidsubstrats	23
2.3.4. Untersuchung der Isomerspezifität der Ser/Thr-Kinase Cdc2/Cyclin B	24
2.4. Untersuchung des Modellproteins RNase T1	24
2.4.1. Präparation der rekombinanten RNase T1-Varianten	24
2.4.2. Reduktion und S-Carboxymethylierung	25
2.4.3. Rückfaltung der S-carboxymethylierten RNase T1	25
2.4.4. Phosphorylierung der RNase T1 durch ERK2	26
2.4.5. Phosphorylierung der RCM-T1-Varianten in Abhängigkeit vom Grad der Faltung	27
2.5. Identifizierung der Phosphorylierungsstellen	27
2.5.1. Anionenaustausch-Chromatographie des Phosphorylierungsansatzes	27
2.5.2. RP-HPLC	27
2.5.3. Bestimmung des Molekulargewichts mittels MALDI-TOF-MS	28
2.5.4. ESI- Massenspektrometrie	28
2.6. Messung der Phosphorylierung von Peptidsubstraten durch RP-HPLC	28
2.7. Bestimmung der RNase T1-Aktivität	29

3. ERGEBNISSE	30
3.1. Untersuchung der <i>cis/trans</i> Isomerspezifität prolinspezifischer Proteinkinasen	30
3.1.1. Isomerspezifität der MAP-Kinase ERK2	30
3.1.2. Einfluss der PPIase hFKBP12 auf die Phosphorylierung	32
3.1.3. Isomerspezifität der Ser/Thr-Kinase Cdc2/Cyclin B	34
3.1.4. Einfluss von Cyclophilin18 auf die Phosphorylierung des Peptidsubstrates	37
3.2. Untersuchungen zur Phosphorylierung der Ribonuklease T1	38
3.2.1. RNase T1 als Modellprotein zur Untersuchung der Isomerspezifität	38
3.2.2. Nachweis der ERK2-katalysierten Phosphorylierung der RNase T1	40
3.2.3. Einfluss der Disulfidbrücken auf die Phosphorylierung der RNase T1	40
3.2.4. Untersuchungen zur Phosphorylierungsstöchiometrie der RNase T1	43
3.2.5. Kinetische Charakterisierung der RNase T1-Phosphorylierung	45
3.2.5.1. Untersuchungen zur Phosphorylierung der RNase T1-Varianten	45
3.2.5.2. Bestimmung der kinetischen Konstanten der Phosphorylierung	46
3.2.5.3. Einfluss der Sekundärbindestellen auf die Aktivität der ERK2	47
3.3. Untersuchungen zur <i>native-state</i> Isomerisierung der RNase T1	49
3.3.1. Phosphorylierungsgeschwindigkeit ist durch Prolylisomerisierung limitiert	49
3.3.2. PPIasen beschleunigen die Phosphorylierung der RNase T1	52
3.3.2.1. Einfluss von Cyclophilin18 auf die Phosphorylierung der RNase T1-wt	52
3.3.2.2. Einfluss von Cyclophilin18 auf die Phosphorylierung der RNase T1-Varianten	54
3.3.2.3. Einfluss weiterer PPIasen auf die Phosphorylierung	56
3.2.6.4. Konzentrationsabhängige Beschleunigung der Phosphorylierung	57
3.2.6.5. Effekte verschiedener FKBP25-Varianten	58
3.2.6.6. Einfluss von Cyclophilin18 auf die Phosphorylierung der RCM-wt-T1	59
3.3.3. Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten der <i>native-state</i> Isomerisierung	61
3.3.4. Phosphorylierung der RNase T1 in Abhängigkeit vom Grad der Rückfaltung	64
4. DISKUSSION	67
4.1. Isomerspezifität prolinspezifischer Proteinkinasen	67
4.2. RNase T1 als Modellprotein zur Untersuchung der <i>cis/trans</i> -Isomerspezifität	70
4.3. Konformationelle Heterogenität der nativen RNase T1	74
4.4. Detektion von <i>native-state</i> Isomerisierungen durch isomerspezifische Kinasen	79
4.5. Isomerspezifität als Regulationsprinzip prolinspezifischer Phosphorylierung	83
5. ZUSAMMENFASSUNG	86
6. LITERATUR	89

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abz	2-Aminobenzoessäurerest
Ac	Acetylrest
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Zirkulardichroismus
Cdc	<i>Cell division cycle</i>
Cdk	<i>Cyclin dependent kinase</i> , Cyclinabhängige Kinase
CsA	Cyclosporin A
Cyp	Cyclophilin
DTT	Dithiothreitol
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
ERK2	<i>Extracellular-signal regulated kinase 2</i>
FKBP	FK506-bindendes Protein
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
k	Geschwindigkeitskonstante
k_{cat}	Katalysekonstante
K_M	Michaeliskonstante
MAP Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
-NH-Np	4-Nitroanilidrest
-Nty-NH ₂	Nitrotyrosinrest
P+1 Position	der Phosphorylierungsstelle C-terminal benachbarte Aminosäure
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
Pin1	<i>Protein interacting with NIMA</i>
PP1	Proteinphosphatase-1
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
pSer/pThr	phosphorylierter Threonin- bzw. Serinrest
RCM	S-carboxymethylierte RNase T1
RNase	Ribonuklease
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie
S	Substratkonzentration
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH	<i>Src Homology</i>
TCA	Trichloressigsäure
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TEMED	N, N, N', N' -Tetramethyl-Ethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Thr(PO ₃ H ₂)/Ser(PO ₃ H ₂)	phosphorylierter Threonin- bzw. Serinrest
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
v	Geschwindigkeit einer Enzymreaktion
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion
wt	Wildtyp
Xaa	beliebiger Aminosäurerest
Yaa	beliebiger Aminosäurerest

1. Einleitung

1.1. Prolin und prolinspezifische Enzyme

1.1.1. Peptidyl-Prolylbindungen

Proteine stehen im Mittelpunkt der meisten biologischen Prozesse. Die jeweiligen Eigenschaften und Funktionen der Proteine werden im wesentlichen durch ihre dreidimensionale Struktur bestimmt. Die Ausbildung dieser räumlichen Struktur wird durch die Sequenz der Aminosäurereste festgelegt, deren kovalente Verknüpfung zu einer Polypeptidkette durch Peptidbindungen erfolgt. Diese Bindungen weisen aufgrund ihrer Resonanzstabilisierung einen partiellen Doppelbindungscharakter auf und stellen deshalb nahezu planare Struktureinheiten dar. Der Torsionswinkel ω um die C_{α} -N-Bindung kann zwei stabile Konformationen (*cis*: $\omega=0^{\circ}$, *trans*: $\omega=180^{\circ}$) einnehmen, wobei das um 10-13 kJ/mol energieärmere *trans*-Isomer, aufgrund sterischer Hinderungen in der *cis*-Konformation, deutlich bevorzugt wird (Li et al., 1997; Manea et al., 1997; Radzicka et al., 1988; Scherer et al., 1998; Yu et al., 1991). Der Anteil der Peptidbindungen, die in der *cis*-Konformation vorliegen, beträgt in Proteinen 0.03-0.05 % (Stewart et al., 1990).

Prolin nimmt als einzige Iminosäure unter den 20 proteinogenen Aminosäuren eine Sonderstellung ein. Da das Stickstoffatom der Prolylbindung gleichzeitig Teil eines relativ starren Pyrrolidinringes ist, kann es nicht als Wasserstoffbrückendonor dienen (**Abb. 1.1**).

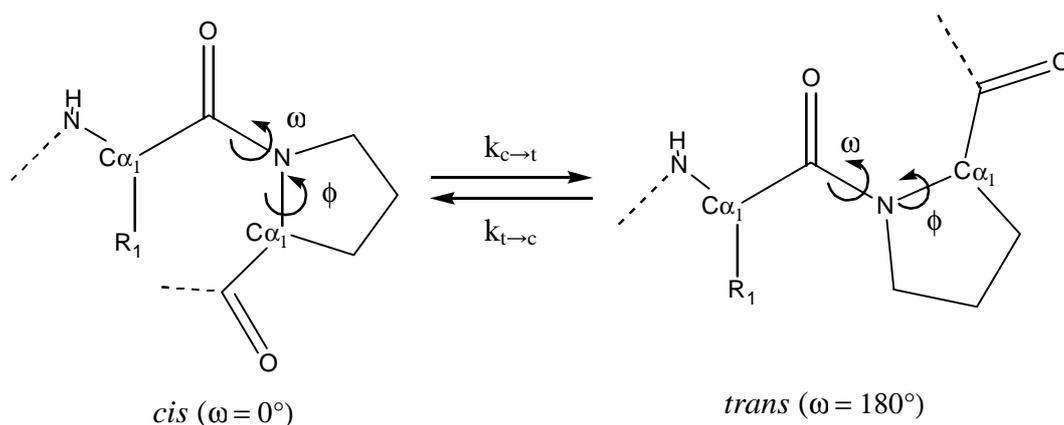


Abb. 1.1 *cis/trans*-Isomerisierung der Prolylpeptidbindung

Weiterhin ist die freie Drehbarkeit der N-C α -Bindung um den Winkel ϕ stark eingeschränkt. Durch eine daraus resultierende vergleichbare sterische Hinderung der Isomeren ist die Energiedifferenz zwischen dem *cis*- und dem *trans*-Isomer der Prolylbindung auf etwa 3-8 kJ/mol erniedrigt. Dieses führt im Vergleich zu den normalen Peptidbindungen zum Auftreten eines deutlich höheren Anteils an *cis*-Isomer (Drakenberg, 1972; Hetzel & Wüthrich, 1979). So beträgt die Häufigkeit von *cis*-X $_{aa}$ -Pro-Bindungen in Proteinen etwa 4.8-5.7 % (Macarthur & Thornton, 1991; Reimer et al., 1998). In kurzen Peptiden konnte sogar ein Anteil von 6-38 % beobachtet werden (Cheng & Bovey, 1977; Grathwohl et al., 1981; Grathwohl & Wüthrich, 1976a; Grathwohl & Wüthrich, 1976b).

Aufgrund seiner einzigartigen Eigenschaften ist Prolin maßgeblich an der Strukturierung von Proteinen beteiligt. Es wird häufig als N-terminale Begrenzung von α -Helices (Forood et al., 1993), als Helixbrecher (Gunasekaran et al., 1998) oder in β -Schleifen (Rose et al., 1985) gefunden. Ein großer Teil der β -Schleifen befindet sich von Lösungsmittel umgeben auf der Oberfläche von Proteinen, so dass man nicht nur von einer strukturgebenden Funktion ausgehen kann, sondern auch eine funktionelle Bedeutung wahrscheinlich ist (Kuntz, 1972).

1.1.2. Prolinspezifische Reaktionen

Die besonderen strukturellen Eigenschaften der Prolinreste bedingen vermutlich selektive konformationelle Ansprüche an enzymatische Reaktionen und Protein-Ligand-Erkennungen. Dieses hat zur Folge, dass prolinhaltige Substrate von Enzymen oft nicht oder nur mit geringer Effizienz umgesetzt werden können. So kann die Anwesenheit eines Prolinrestes innerhalb einer Polypeptidkette den proteolytischen Abbau durch die meisten Peptidasen und Proteasen verhindern (Perona & Craik, 1995; Yaron & Naider, 1993). Die Hydrolyse dieser prolinhaltigen Sequenzen wird durch eine begrenzte Anzahl prolinspezifischer Exo- und Endopeptidasen katalysiert. Die prolinspezifischen Enzyme können die Peptidbindungen ihrer Substrate sowohl N-terminal (z.B. Prolidase, Aminopeptidase P, HIV-Protease) als auch C-terminal vom Prolin (z.B. Prolinase, Prolin-Imino-peptidase, Prolyl-Oligopeptidase, Carboxypeptidase P) hydrolysieren (Cunningham & Oconnor, 1997; Medrano et al., 1998; Yaron & Naider, 1993).

Die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten N-terminal zum Prolin, die von den meisten Protein-Serin/Threonin-Kinasen nicht katalysiert werden kann (Pinna & Ruzzene, 1996), ist ein weiteres gut untersuchtes Beispiel für Enzyme, die sich auf die Erkennung und Umsetzung prolinhaltiger Substrate spezialisiert haben. Die Vertreter dieser

prolinspezifischen Kinasen werden in die cyclinabhängigen Proteinkinasen und die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP Kinasen) eingeteilt.

Die Vermittlung von Protein-Protein-Wechselwirkungen durch spezifische Bindung von Proteindomänen an hochkonservierte prolinreiche Sequenzen ist eine weitere wichtige funktionelle Eigenschaft des Prolins (Mahoney et al., 1997; Niebuhr et al., 1997; Staub & Rotin, 1996; Williamson, 1994). Beispiele für solche Domänen sind die nach ihren zwei hochkonservierten Tryptophanresten benannte WW-Domäne mit der Erkennungssequenz xPPxY (Pirozzi et al., 1997; Sudol, 1996) und die in verschiedenen intrazellulären Signalproteinen vorkommende Src-Homologie-3-Domäne (SH3) mit einem Bindemotiv der allgemeinen Form PxxP (Yu et al., 1994).

1.1.3. Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen

Aufgrund einer gegenüber anderen Peptidbindungen erhöhten Enthalpiebarriere der Rotation von 80-90 kJ/mol ist die *cis/trans*-Isomerisierung der Prolylbindungen ein relativ langsamer Prozess (Stein, 1993). Dieser kann durch die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) beschleunigt werden (Fischer et al., 1984b). Die Einteilung der PPIasen in die Familien der Cyclophiline, der FK506 bindenden Proteine (FKBP) (Fischer, 1994; Hamilton & Steiner, 1998; Schiene & Fischer, 2000) und der Parvuline (Rahfeld et al., 1994b) erfolgt nach ihrer Sequenzhomologie, Substratspezifität und der Sensitivität gegenüber Inhibitoren. Dabei wird die PPIase-Aktivität der Cyclophiline spezifisch durch das zyklische Undecapeptid Cyclosporin A (Fischer et al., 1989; Handschumacher et al., 1984) und die der FKBP durch die Makrolide FK506 und Rapamycin inhibiert (Harding et al., 1989; Siekierka et al., 1989). Die Aktivität der Parvuline wird durch Juglon inhibiert (Hennig et al., 1998).

Die ubiquitäre Verbreitung, hohe phylogenetische Konservierung und intrazelluläre Konzentration der PPIasen (Fischer, 1994; Galat & Metcalfe, 1995; Trandinh et al., 1992) lassen für die PPIasen eine Schlüsselrolle bei wesentlichen zellulären Prozessen vermuten. So wurde aufgrund von Mutageneseexperimenten (Colley et al., 1991) sowie durch Inhibitionsstudien mit CsA eine Beteiligung der PPIasen an der Proteinfaltung postuliert (Helekar & Patrick, 1997; Imparl et al., 1995; Lodish & Kong, 1991; Steinmann et al., 1991). Weitere Beispiele für biologische Funktionen sind die für die HIV-Replikation essentielle Interaktion von cytosolischem Cyclophilin18 des Wirtes mit dem Gag-Polyprotein des Virus (Franke et al., 1994; Luban, 1996) sowie die vermutete Beteiligung von FKBP12 am Nervenwachstum (Lyons et al., 1995; Steiner et al., 1997). Darüber hinaus konnte sowohl

eine Bindung von FKBP12 an den EGF-Rezeptor (Lopez-Illasaca et al., 1998) als auch an den TGF β -Typ1-Rezeptor (Wang et al., 1994; Wang et al., 1996) nachgewiesen werden. Weiterhin wurden FKBP als Bindepartner von Ca²⁺-Kanälen (Brillantes et al., 1994; Cameron et al., 1997; Shou et al., 1998) sowie als Bestandteil von nichtaktivierten heterooligomeren Steroidrezeptorkomplexen identifiziert (Yem et al., 1992).

Aus *Escherichia coli* (*E. coli*) konnte der Triggerfaktor, eine PPIase, die mit der 50S-Untereinheit des Ribosoms assoziiert ist, isoliert werden. Das Vorhandensein dieser mit Ribosomen assoziierten PPIase deutet auf eine Beteiligung von PPIasen an der *de novo*-Proteinbiosynthese hin (Stoller et al., 1995). Einige bakterielle FKBP sind wesentlich an der Ausbildung der Virulenz pathogener Mikroorganismen beteiligt. Ein Beispiel ist das als „*Macrophage infectivity potentiator*“ (Mip) bekannte FKBP25 aus dem Erreger der Legionärskrankheit *Legionella pneumophila* (Hacker & Fischer, 1993; Ludwig et al., 1994).

Während die Deletion der Cyclophiline und FKBP nur unter Stressbedingungen zu phänotypischen Änderungen führt (Dolinski et al., 1997; Gothel et al., 1998), sind einige PPIasen der Parvulinfamilie, wie z.B. das Ptf1 aus *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), essentiell für die Vitalität des Organismus (Hani et al., 1995). Die Deletion des Ptf1 in Hefezellen führt zu einem mitotischen Arrest sowie zur Fragmentierung der Zellkerne in deren Folge es zum Absterben der Zelle kommt.

Mitglieder der Parvulinfamilie konnten inzwischen sowohl aus Prokaryoten als auch aus Eukaryoten isoliert werden. Neben dem namensgebenden Parvulin10 aus *E. coli* wurden aus Prokaryoten mehrere homologe Proteine mit unterschiedlicher Lokalisation und Funktion beschrieben (Dartigalongue & Raina, 1998; Rahfeld et al., 1994a; Rahfeld et al., 1994b).

Ein Vertreter der eukaryotischen Parvuline ist das Pin1, welches ursprünglich als Bindungspartner der NIMA Kinase aus *Aspergillus nidulans* identifiziert wurde (Lu et al., 1996). Pin1 interagiert mit einer Vielzahl regulatorischer Proteine, die an Serin- und Threoninresten N-terminal zum Prolin phosphoryliert vorliegen, wie z.B. Cdc25, Wee1, Myt1, Plk1 (Shen et al., 1998), rab4 (Gerez et al., 2000), RNA-Polymerase II (Albert et al., 1999) und dem Transkriptionsfaktor NFAT (Liu et al., 2001). In humanem Tumorgewebe konnte eine Überexpression von Pin1 gezeigt werden (Wulf et al., 2001). Die Überexpression von Pin1 in HeLa-Zellen und Extrakten aus Oocyten von *Xenopus laevis* bewirkt eine Inaktivierung der Phosphatase Cdc25 und verhindert damit den Eintritt in die Mitose (Lu et al., 1996; Shen et al., 1998). Die Depletionen des Pin1 in HeLa-Zellen führt zu einem Arrest in der Mitose (Lu et al., 1996).

1.1.4. *Native-state* Isomerisierung und isomerspezifische Reaktionen

Proteine können sich unter nativen Bedingungen in mehreren Konformationen befinden. Diese strukturelle Heterogenität ist öfters nur durch die Konformationsänderung einer Prolylbindung gekennzeichnet. Das Auftreten eines durch *cis/trans*-Isomerisierung hervorgerufenen Konformationsgleichgewichts von Peptidbindungen eines Proteins in seinem nativen Zustand, wird auch als *native-state* Isomerisierung bezeichnet.

Solche Konformationsänderungen besitzen hauptsächlich für Proteine, die eine hohe Flexibilität für die Bindung von Liganden benötigen, eine große funktionelle Bedeutung. So wird bei der Staphylokokken-Nuklease durch Zugabe von Ca^{2+} -Ionen und des im aktiven Zentrum bindenden Inhibitors Thymidin-3',5'-diphosphat (pdTp) das Konformerengleichgewicht an der Lys-Pro¹¹⁷-Bindung zugunsten des *cis*-Isomers verschoben (Evans et al., 1989; Loh et al., 1991). Auch der *cis*-Anteil der Peptidbindung Glu-Pro¹⁹¹ des Mannosebindenden-Proteins wird durch die Bindung von Ca^{2+} -Ionen erhöht (Bouckaert et al., 2000; Ng & Weis, 1998). Einige weitere Beispiele für *cis/trans*-Gleichgewichte von Peptidbindungen in nativ gefalteten Polypeptiden sind das Calcium-bindende Protein Calbindin D_{9k} (Chazin et al., 1989), das Myotoxin (Okeefe et al., 1996), das Skorpion-Toxin (Adjadj et al., 1997; Dementieva et al., 1999), das HIV-1 p24-Fragment (Gitti et al., 1996), das Zytokin Interleukin-3 (Feng et al., 1997), der Gerinnungsfaktor Prothrombin (Evans & Nelsestuen, 1996), die Adenylatkinase (Sheng et al., 1997), der Angiotensin II AT_{1A} Rezeptor (Franzoni et al., 1999), die TB- (*transforming growth factor β binding protein-like*) Domäne (Yuan et al., 1998) und das Vitamin K-abhängige Protein S (Muranyi et al., 2000).

Die durch eine Rotationsbarriere von 85 kJ/mol getrennten *cis*- und *trans*-Konformere können in vielen enzymatischen Reaktionen und physiologischen Prozessen unterschiedlich reagieren. Eine solche Isomerspezifität wurde vor allem für die Hydrolyse von Peptidbindungen durch Proteasen gefunden (Yaron & Naider, 1993). So bevorzugen die prolinspezifischen Exo- und Endopeptidasen, die Peptidbindungen direkt N-terminal oder C-terminal von Prolinresten hydrolysieren, z.B. Prolidase, Aminopeptidase P, HIV-Protease, Prolylendopeptidase (Lin & Brandts, 1979a; Lin & Brandts, 1979b; Lin & Brandts, 1983; Vance et al., 1997b) und DP IV (Fischer et al., 1983) die *trans*-Konformation. Für die Endoproteasen Chymotrypsin, Trypsin (Fischer et al., 1984b; Lin & Brandts, 1985) und Pepsin (Vance et al., 1997a), die Prolin nur in Sekundärbindungsstellen ihrer aktiven Zentren erkennen, konnte ebenfalls eine Selektivität für das *trans*-Isomer nachgewiesen werden.

Für den intestinalen H^+ /Peptid-Symporter PEPT1 in Caco-2-Zellen konnte gezeigt werden, dass er selektiv nur das *trans*-Konformer von Dipeptiden bindet und in die Zellen transportiert

(Brandsch et al., 1998). Ein weiteres Beispiel für isomerspezifische Reaktionen ist die Bindung von bestimmten Peptiden an ihre Rezeptoren. Als biologisch aktive Formen der Peptide wurden sowohl das *cis*- (Liakopoulou-Kyriakides & Galardy, 1979; Yamazaki et al., 1993) als auch das *trans*-Isomer identifiziert (Ottleben et al., 1997). Am Oxytocin-Rezeptor bindet das Peptidhormon wahrscheinlich in beiden Konformationen. Dabei wirkt das *trans*-Isomer als Agonist und das *cis*-Isomer als Antagonist (Belec et al., 2000). Vor kurzem gelang auch der Nachweis, dass Antikörper zwischen den *cis*- und *trans*-Konformeren von Xaa-Pro-Bindungen in linearen und zyklischen Peptiden unterscheiden können (Wittelsberger et al., 2000).

Durch das Auftreten von isomerspezifischen Reaktionen könnte die bereits beschriebene *native-state* Isomerisierung eine wichtige biologische Bedeutung besitzen. Dieses kann aber nur der Fall sein, wenn die isomerspezifische Reaktion deutlich schneller als die *cis/trans*-Isomerisierung der Peptidyl-Prolyl-Bindung abläuft und es zu einer vorübergehenden Abweichung vom thermodynamischen *cis/trans*-Gleichgewichts kommt. Somit würde die *cis/trans*-Isomerisierung als molekularer Schalter dienen, durch den die Bereitstellung der biologisch aktiven Konformere gesteuert wird (Fischer, 1994). Für das Mannose-bindende-Protein und die Adenylatkinase konnte gezeigt werden, dass PPIasen die *cis/trans*-Isomerisierung von Prolylpeptidbindungen in nativen Proteinen katalysieren können (Ng & Weis, 1998; Sheng et al., 1997).

So kann die Beeinflussung der strukturellen und enzymatischen Eigenschaften von Proteinen durch katalytisch aktive PPIasen indirekte Hinweise auf isomerspezifische Reaktionen liefern. Solche Effekte durch PPIasen konnten zum Beispiel für den EGF- und den TGF β -Typ1-Rezeptor gefunden werden. Dabei wurde bei Verwendung katalytisch inaktiver FKBP12-Mutanten oder in Anwesenheit der beiden spezifischen FKBP12-Inhibitoren FK506 und Rapamycin kein Einfluss durch PPIasen beobachtet (Chen et al., 1997; Lopez-Illasaca et al., 1998).

1.2. Phosphorylierung von Proteinen

Die posttranslationale Modifikation durch Phosphorylierung ist ein ubiquitär verbreiteter Regulationsmechanismus im Organismenreich. Die reversible Phosphorylierung ist wesentlich an der Kontrolle von intrazellulären Prozessen in Eukaryoten, wie Stoffwechsel,

Transkription und Translation, Zellteilung und Zellwachstum sowie Membrantransport und Signalübertragung beteiligt. Der Phosphorylierungsgrad der Proteine wird sowohl durch Proteinkinasen, welche die Übertragung des γ -Phosphatrestes von einem Phosphatgruppendor auf eine Akzeptoraminosäure katalysieren, als auch durch Proteinphosphatasen, welche die Phosphorsäureester-Bindungen hydrolysieren, bestimmt. Eine Störung dieses fein regulierten Gleichgewichts wird bei vielen Krankheiten, wie Alzheimer, Krebs, Diabetes oder rheumatischer Arthritis beobachtet (Cohen, 2000).

Die herausragende Stellung der Proteinkinasen wird auch durch ihre große Anzahl in eukaryotischen Genomen verdeutlicht. Das humane Genom enthält 575 Proteinkinasegene, die etwa 2 % des gesamten Genoms darstellen (Lander, 2001; Rubin et al., 2000). Diese Vielzahl von Kinasen führt zur Phosphorylierung von etwa 30-40 % der zellulären Proteine in Eukaryoten.

Die gebundenen Phosphatreste induzieren durch die Einführung von negativen Ladungen Veränderungen in der Konformation der Polypeptidkette und beeinflussen somit die Eigenschaften der Proteine (Johnson, 1994; Johnson & Richard, 2001). So kann häufig eine Erhöhung oder Verminderung der enzymatischen Aktivität von Proteinen durch Phosphorylierung beobachtet werden (Johnson & Barford, 1991; Johnson et al., 1996; Steinberg et al., 1993). Des Weiteren kann die Fähigkeit zur Interaktion mit anderen Proteinen (Faux & Scott, 1996; Hubbard & Cohen, 1993; Muslin et al., 1996) und DNA (Brunet et al., 1999) sowie die Lokalisation von Proteinen in der Zelle beeinflusst werden (Beals et al., 1997).

Die Klassifikation der Proteinkinasen kann nach ihrer Akzeptoraminosäure in die Serin/Threonin-, Tyrosin-, Histidin/Arginin/Lysin-, Cystein- und in die Aspartat/Glutamat-Kinasen erfolgen. Während in Prokaryoten die Phosphorylierung an Histidinresten überwiegt, werden in Eukaryoten fast ausschließlich Serin/Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierungen beobachtet. Als Phosphatgruppendor dient meistens Adenosin- und nur in seltenen Fällen Guanosintriphosphat.

Durch die Untersuchung der Aminosäuresequenzen verschiedener eukaryotischer Proteinkinasen konnte eine Vielzahl von hochkonservierten Resten innerhalb der katalytischen Domänen identifiziert werden (Hanks & Hunter, 1995). Wie durch eine Analyse der bis jetzt bekannten 28 Kinasestrukturen gezeigt werden konnte, führen diese Sequenzmotive zu einer fast identischen Faltung aller untersuchten katalytischen Domänen (Johnson & Richard, 2001).

1.2.1. Prolinspezifische Phosphorylierung

Durch ihre Beteiligung an wichtigen biologischen Prozessen wie der Regulation des Zellzyklus und der intrazellulären Signalübertragung sind die prolinspezifischen Proteinkinasen in letzter Zeit in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gelangt.

Sie katalysieren ausschließlich die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten, die sich unmittelbar N-terminal zu einem Prolinrest befinden. Die Vertreter der prolinspezifischen Kinasen werden in die Familien der cyclinabhängigen Kinasen (Cyclin-dependent kinases, CDK) und die der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) eingeteilt. Die MAP-Kinasen besitzen eine entscheidende Rolle in Signalkaskaden, die für die Weiterleitung extrazellulärer Informationen zum Zellkern verantwortlich sind (Chang & Karin, 2001; Cobb, 1999; Garrington & Johnson, 1999). Die cyclinabhängigen Kinasen sind vor allem an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt (Dunphy, 1994; King et al., 1994; Morgan, 1997; Nurse, 1997; Nurse, 1999).

Aus der Literatur sind noch zwei weitere Proteinkinasen bekannt, die in der Lage sind N-terminal zum Prolin gelegene Serin- und Threoninreste zu phosphorylieren. So konnte eine durch die Glykogensynthese-Kinase-3 β (GSK-3 β) katalysierte Phosphorylierung von Ser/Thr-Pro-Sequenzen am Mikrotubuli-assoziierten Protein 2 und dem Transkriptionsfaktor NFAT (Beals et al., 1997) nachgewiesen werden. (Godemann et al., 1999; Sanchez et al., 1996). Die GSK-3 β phosphoryliert im Gegensatz zu den bereits beschriebenen prolinspezifischen Kinasen auch an Serin- und Threoninresten, die nicht in Nachbarschaft zu einem Prolin stehen. Von größerer Bedeutung für die durch GSK-3 β katalysierte Phosphorylierung scheint ein bereits phosphorylierter Rest in P+4 Position zur Phosphorylierungsstelle zu sein (ter Haar et al., 2001).

Vor kurzem konnte für die Kinase KIS (*kinase interacting with stathmin*) durch Untersuchungen an Oligopeptidsubstraten eine deutlich bevorzugte Phosphorylierung von Ser/Thr-Pro-Motiven beobachtet werden (Maucuer et al., 2000). Diese Kinase zeigt keine Verwandtschaft zu einer der beiden bekannten Familien prolinspezifischer Kinasen.

Die molekularen Ursachen für die hohe Substratspezifität der prolinspezifischen Kinasen wurden vor kurzem anhand der Röntgenkristallstruktur der durch Phosphorylierung aktivierten CDK2/Cyclin A mit dem Peptidsubstrat HHASPRK aufgeklärt (Brown et al., 1999). Dabei zeigte sich, dass der zur Substratbindungstasche gehörende Valin¹⁶⁴-Rest in der aktivierten CDK2 eine ungewöhnliche Konformation annimmt, welche durch eine entgegengesetzte Orientierung des Carbonylsauerstoffs zum Substrat gekennzeichnet ist. Diese Konformation wird zusätzlich durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen des

Sauerstoffatoms zu dem Arginin¹⁶⁹-Rest stabilisiert. Somit ist die Bindung eines anderen Restes außer Prolin in P+1-Position wegen einer nichtkompensierten Wasserstoffbrücke vom Stickstoff im Peptidrückgrat nachteilig.

Die Modellierung der Struktur der aktivierten ERK2 mit dem CDK2-Substrat sowie dem Dipeptid Thr-Pro weist auf einen ähnlichen Mechanismus zur Bildung der Prolinbindungstasche hin (Canagarajah et al., 1997; Johnson & Richard, 2001).

1.2.2. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

In Säugerzellen existieren mindestens fünf unterschiedliche, phylogenetisch hochkonservierte MAP-Kinase-Signalkaskaden (Garrington & Johnson, 1999). Diese versetzen die Zellen in die Lage, auf Änderungen in der extrazellulären Umgebung zu reagieren. Dabei führt die Bindung der Signalmoleküle an membranständige Rezeptoren zu deren Konformationsänderung, wodurch das Signal über die intrazellulären Domänen in das Zellinnere gelangt.

Die anschließende Signalübertragung zum Zellkern erfolgt typischerweise über eine dreistufige Phosphorylierungskaskade (Gutkind, 1998; Su & Karin, 1996; Widmann et al., 1999). Dabei phosphoryliert eine Ser/Thr-Proteinkinase (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*, MAPKKK) eine nachfolgende dualspezifische Kinase (MAPKK), die wiederum eine MAP-Kinase aktiviert. Dabei kommt es nur zu einer Aktivierung der MAP-Kinase wenn sowohl das Threonin als auch das Tyrosin in der Konsensussequenz Thr-Xaa-Tyr durch die MAPKK phosphoryliert wird (Ferrell & Bhatt, 1997). Für einige Vertreter der MAP Kinasen konnte nach Aktivierung eine sich anschließende Translokation in den Zellkern nachgewiesen werden (Khokhlatchev et al., 1998).

Die Regulation der MAPKKK ist dagegen deutlich komplexer und bis jetzt weniger verstanden, da sie eine große Anzahl von regulatorischen Motiven wie z.B. Pleckstrin-Homologie-Domänen (Erkennungsmotive für SH-3 Domänen), Bindestellen für GTP-bindende Proteine, Leuzin-Zipper-Sequenzen zur Dimerisierung sowie Ser/Thr- und Tyr-Phosphorylierungsstellen besitzen, die durch eine Vielzahl von verschiedenen Wechselwirkungspartnern gebunden werden können (Garrington & Johnson, 1999).

Die bis jetzt bekannten 12 Vertreter der MAP-Kinase-Familie in Säugern werden in die fünf Gruppen (**Abb. 1.2**) der ERK1/2 (*extracellular signal regulated kinase*), der JNK/SAPK (*c-Jun N-terminal kinase, stress-activated protein kinase*), der p38 Proteine sowie in die der ERK3 und ERK5 eingeteilt (Chang & Karin, 2001; Garrington & Johnson, 1999).

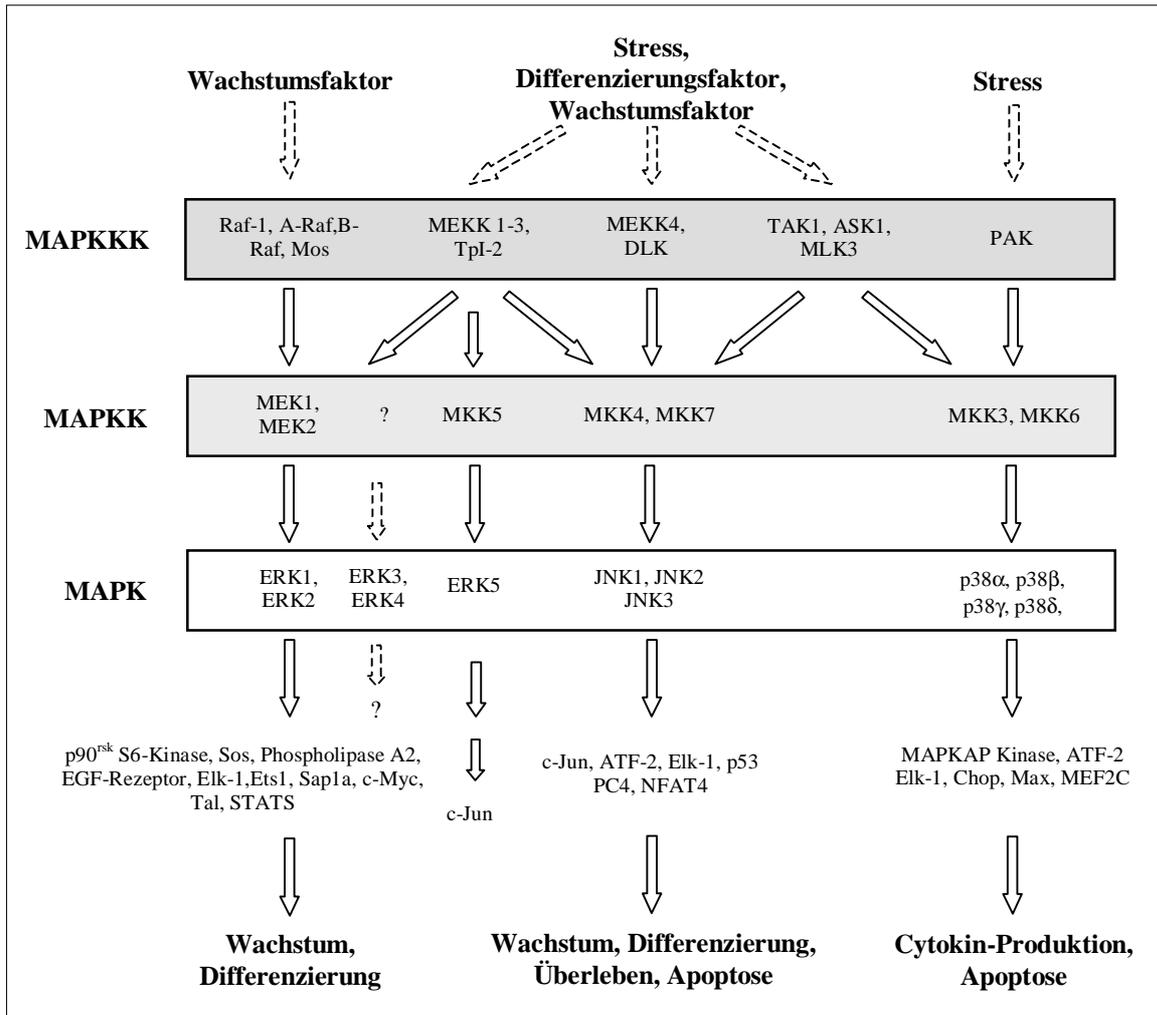


Abb. 1.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinasekaskaden

Die verschiedenen MAP-Kinasekaskaden sind spezifisch für die Antwort auf unterschiedliche Stimuli. So erfolgt die Aktivierung der ERK1/2 hauptsächlich durch Signale, die Wachstum und Differenzierung der Zellen auslösen (Cobb & Goldsmith, 1995; Seger & Krebs, 1995). Dagegen werden die p38 und JNK vor allem durch Stressinduktoren z.B. ultraviolettes Licht und osmotischen Schock sowie durch proinflammatorische Zytokine wie den Tumornekrose-Faktor α und das Interleukin-1 stimuliert (Davis, 2000; Kyriakis & Avruch, 2001; Kyriakis et al., 1994). Für die ERK5 konnte eine Aktivierung durch oxidativen Stress, osmotischen Schock (Zhou et al., 1995) sowie durch Wachstumsfaktoren (English et al., 1999) nachgewiesen werden. Eine Steigerung der Effizienz und Selektivität der Signalübertragung wird in einigen Fällen durch die Bindung der drei Glieder der MAP-Kinasekaskaden an ein gemeinsames Gerüstprotein erreicht (Faux & Scott, 1996; Pawson & Scott, 1997; Whitmarsh et al., 1998). Ein gut untersuchtes Beispiel für einen solchen Regulator von Signalkaskaden stellt das Ste5-Protein aus *S. cerevisiae* dar, welches

gleichzeitig die MAPKKK Ste11, die MAPKK Ste7 und die MAPK Fus3 bindet (Whitmarsh & Davis, 1998).

Die physiologischen Substrate der MAP-Kinasen sind vor allem Transkriptionsfaktoren (Whitmarsh & Davis, 1996; Whitmarsh & Davis, 2000; Yang et al., 1998), andere Kinasen (Gavin & Nebreda, 1999), Rezeptoren (Morrison et al., 1993) und regulatorische Enzyme (Van Putten et al., 2001).

Die Regulation der ERK2 erfolgt über eine hochkonservierte Mitogen-aktivierte Proteinkinasekaskade (**Abb. 1.3**). Die Signalkaskade wird durch die Bindung von Wachstumsfaktoren wie z. B. EGF (*epidermal growth factor*) an die komplementäre Rezeptortyrosinkinase (RTK) initiiert. Dieses Ereignis führt zu einer Oligomerisierung und anschließender Autophosphorylierung der RTK (Hunter, 1995). Die dadurch entstehenden Phosphotyrosine dienen als Bindestelle für die SH2-Domäne (*Src-homology*) des Adapterproteins Grb2, welches wiederum über seine SH3-Domäne an prolinreiche Sequenzen des GDP-Austauschfaktors Sos (*son of sevenless*) bindet. Sos interagiert mit Ras, das durch den Sos-katalysierten Guanin-nukleotidaustausch aktiviert wird (Corbalangarcia et al., 1996; Downward et al., 1990; Hunter, 1995; Schlessinger, 1993). Die GTP-gebundene Form von Ras kann nun die MAPKKK Raf binden (Avruch et al., 1994). Dadurch kommt es zu einer Translokation von Raf an die Plasmamembran (Stokoe et al., 1994). Die nachfolgende Aktivierung von Ras kann auf mehreren Signalwegen erfolgen. So hydrolysiert die Phospholipase γ das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in die *second messengers* Inositol-1,4,5-triphosphat und Diacylglycerol, welches zu einer gesteigerten Phosphorylierung von Raf durch die Protein Kinase C führt (Cai et al., 1997). Die Aktivierung von Raf kann aber auch über einen Protein Kinase C unabhängigen Mechanismus durch Proteine der 14-3-3 Familie oder auch durch Tyrosinkinasen erfolgen (Crespo et al., 1994; Morrison et al., 1989). Die Phosphorylierung durch Proteinkinase A führt dagegen zu einer Inaktivierung von Raf (Wu et al., 1993).

Die aktivierte Ser/Thr-Kinase Raf phosphoryliert die dualspezifische Kinase MEK (Seger & Krebs, 1995). Diese wiederum phosphoryliert die MAP-Kinase ERK2 sowohl am Threonin¹⁸³ als auch am Tyrosin¹⁸⁵. Dadurch kommt es zu einem etwa 1000fachen Anstieg der enzymatischen Aktivität der ERK2 (Widmann et al., 1999).

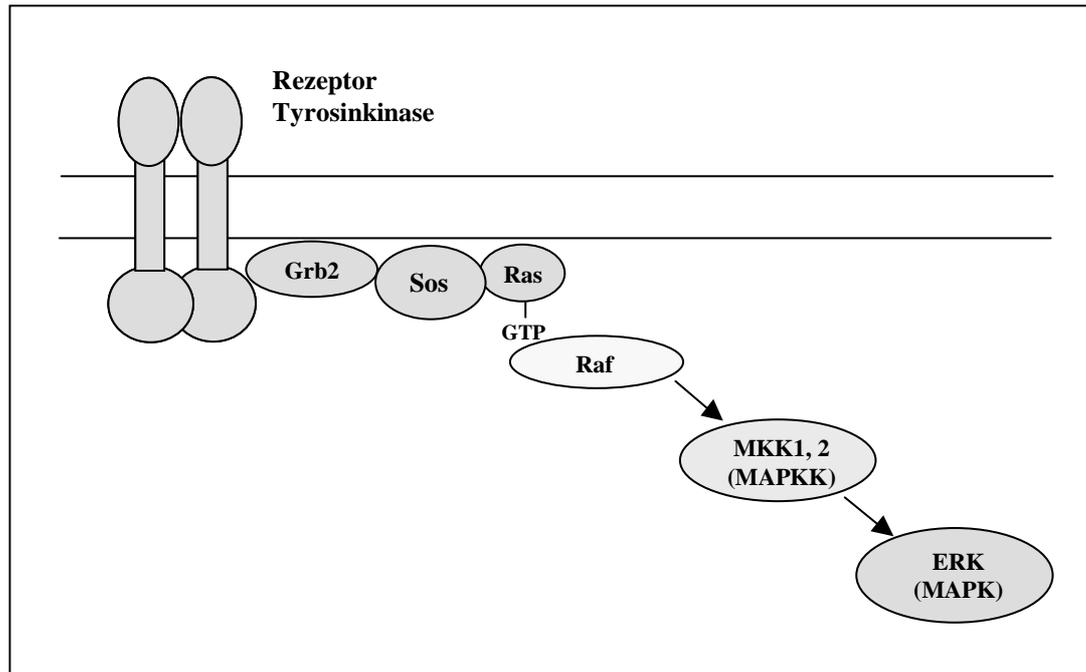


Abb. 1.3 Die mitogene Raf-MEK-ERK-Kinasekaskade

Als Folge der Phosphorylierung wird eine Dimerisierung der ERK2 und eine anschließende Translokation in den Zellkern beobachtet. Dabei sinkt die Dissoziationskonstante des Dimers von 20 μM für die unphosphorylierte auf 7.5 nM für die phosphorylierte Form (Cobb & Goldsmith, 2000). Eine Beeinflussung der enzymatischen Aktivität durch die Dimerisierung konnte jedoch nicht festgestellt werden (Prowse et al., 2000). Die Inaktivierung der MAP-Kinasen erfolgt hauptsächlich durch dualspezifische Proteinphosphatasen. In Säugern sind bis jetzt 10 Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Phosphatasen (MKP) beschrieben worden, wobei die MKP1 und MKP3 spezifisch die Dephosphorylierung der ERK katalysieren (Chu et al., 1996; Franklin & Kraft, 1997; Muda et al., 1998).

Mittlerweile konnten für die ERK eine Vielzahl von Substraten identifiziert werden. Zu ihren Zielproteinen gehören u.a. die RSK2/3 (*ribosomal S6 kinase*) und die MAPKAP Kinase 1 (Richards et al., 1999), die Transkriptionsfaktoren Elk-1, c-Myc, Ets-1 und 2 (Yang et al., 1998) sowie die Phospholipase A₂ (Van Putten et al., 2001) und der EGF-Rezeptor (Morrison et al., 1993).

1.2.3. Cyclinabhängige Proteinkinasen

Die Reproduktion in Eukaryoten verläuft als ein zyklischer Prozess in mehreren Phasen (**Abb. 1.4**). Dabei werden aufgrund biochemischer und morphologischer Merkmale die Phasen der chromosomalen Replikation (S-Phase), der Segregation und Zellteilung (M-Phase) sowie die G1- und G2-Phase, die sich zwischen der S- und der M-Phase befinden, unterschieden (Nurse, 2000).

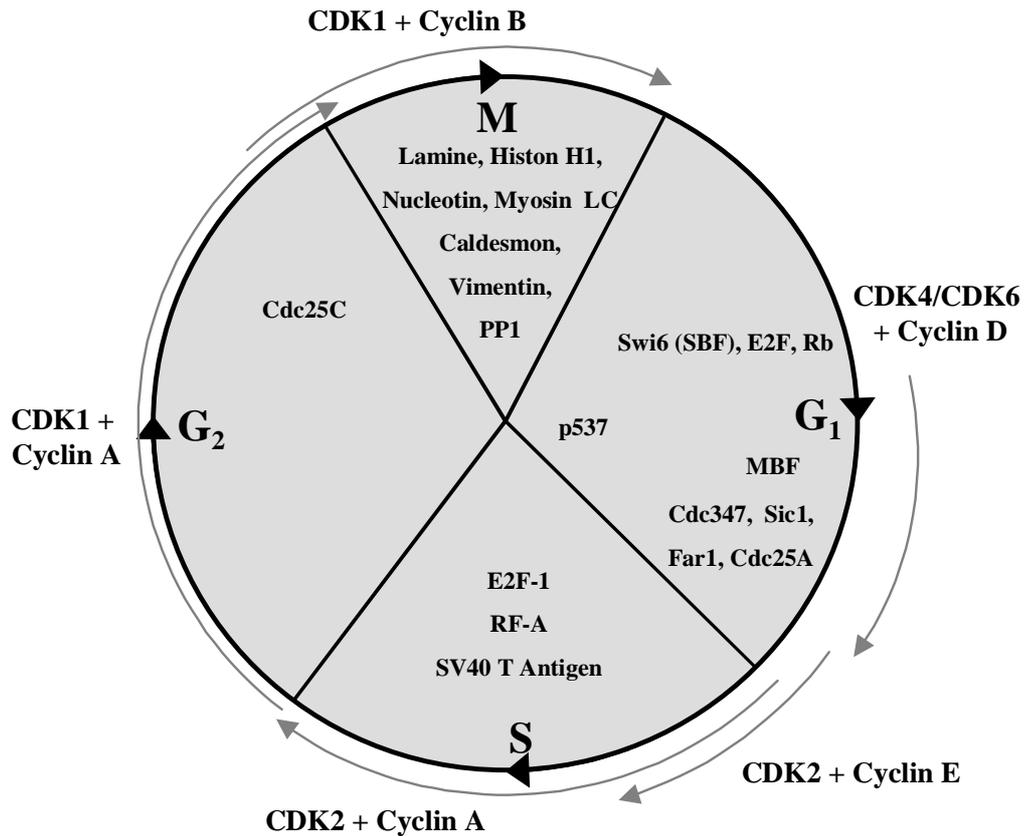


Abb. 1.4 Der eukaryotische Zellzyklus

Es sind die während der Phasen des eukaryotischen Zellzyklus aktivierten CDK/Cyclin-Komplexe mit ihren Substraten dargestellt.

Die Familie der hochkonservierten cyclinabhängigen Proteinkinasen besitzt bei der Kontrolle des Zellzyklus eine Schlüsselrolle (Morgan, 1997; Nurse, 1997). In Säugern existieren mindestens acht verschiedene CDK (Grana & Reddy, 1995). Jede dieser katalytischen Untereinheiten bildet durch Assoziation mit einem bestimmten regulatorischen Cyclin einen in seinen Eigenschaften und Funktionen sich unterscheidenden CDK/Cyclin-Komplex (Yang & Kornbluth, 1999). Bis jetzt sind acht verschiedene Gruppen von Cyclinen (A-H) beschrieben worden. So konnte gezeigt werden, dass die Cycline D1 bis 3 und E die CDK4,CDK6 und CDK2 aktivieren, während die Cycline A und B eine Rolle bei der Aktivierung der CDK1

besitzen. Die Funktion einiger dieser Heterodimere während der Zellzyklus-Übergänge ist schon gut charakterisiert. So sind die CDK4 und CDK6/Cyclin D-Komplexe am G₁/S-Übergang, die CDK2/Cyclin A und E-Komplexe an der Initiation sowie dem Fortschreiten der DNA-Replikation und die CDK1/Cyclin A/B-Komplexe an der Einleitung der Mitose beteiligt (Nasmyth, 1996; Sherr, 1996; Stillman, 1996). Im Verlauf des Zellzyklus bleibt die Konzentration der CDK weitgehend konstant, während die der Cycline einem charakteristischen Auf- und Abbau unterworfen ist (Zachariae, 1999). Ein weiterer wichtiger Mechanismus zur Regulation der CDK ist die Bindung von Inhibitoren. So werden z.B. die CDK4 und 6 durch die Proteine p15 bis 19 der INK4-Familie inhibiert (Ekholm & Reed, 2000; Endicott et al., 1999; Jeffrey et al., 2000).

Die Ser/Thr-Kinase Cdc2 (*cell division cycle 2*), auch CDK1 bezeichnet, gehört zu den Schlüsselenzymen des Zellzyklus. Die Funktion der Cdc2 besteht vor allem in der Regulation der Mitose und des G₂/M-Übergangs (King et al., 1994; Nurse, 1997). Zusätzlich konnte aber auch eine Beteiligung an der S-Phase-Initiation nachgewiesen werden (Fisher & Nurse, 1996). Die vollständige Aktivierung der Cdc2 am G₂/M-Übergang erfordert nicht nur die Synthese und Bindung von Cyclin B (**Abb. 1.5**) sondern auch eine Phosphorylierung des Threonins¹⁶¹ durch die CAK (*Cdc2 activating kinase*). Die CAK besteht aus der CDK7 und einem assoziierten Cyclin H (Solomon, 1994). Durch die Phosphorylierung kommt es zu einer Konformationsänderung, in deren Folge die Substratbindungstasche zugänglich wird (Brown et al., 1999). Die Inaktivierung der Cdc2 während der G₂-Phase erfolgt durch wee1- und myk1-katalysierte Phosphorylierung an den Seitenketten des Threonins¹⁴ und des Tyrosins¹⁵. Durch die Bindung der Phosphatreste kommt es wahrscheinlich zu einer Beeinträchtigung der Substratanlagerung (Booher et al., 1997; Lundgren et al., 1991; Mueller, 1995). Erst die Dephosphorylierung der Cdc2 durch die dualspezifische Phosphatase Cdc25C ermöglicht die Initiation des G₂/M-Übergangs (Strausfeld et al., 1991). Die Regulation der Cdc25C ist wiederum abhängig von einer Vielzahl von Phosphorylierungen (Furnari et al., 1999; Russell, 1998). Für den Cdc2/Cyclin B-Komplex konnten noch keine spezifischen Inhibitoren beschrieben werden.

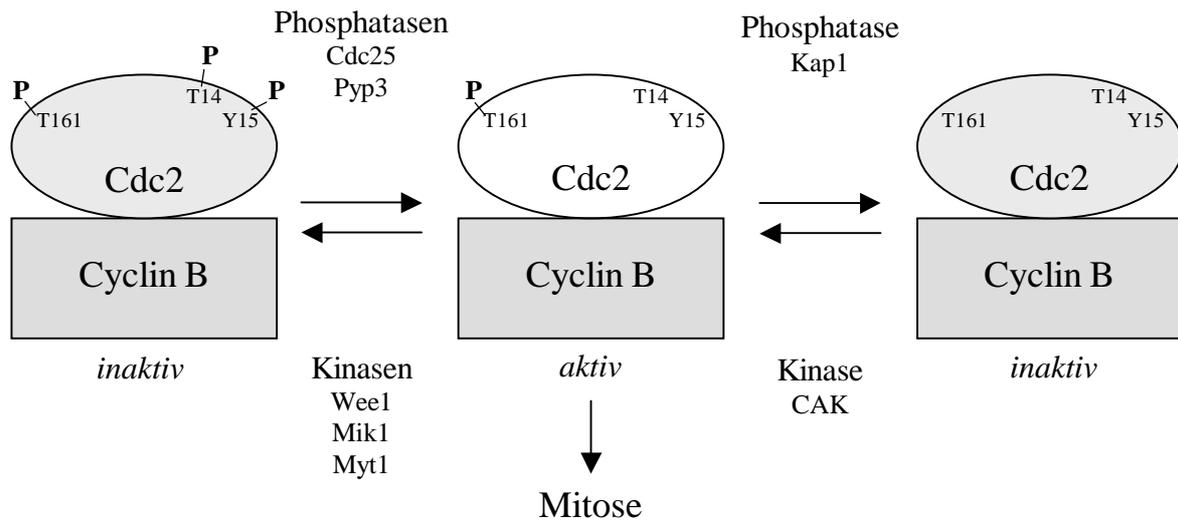


Abb. 1.5 Regulation der cyclinabhängigen Proteinkinase Cdc2/Cyclin B

In der Literatur sind schon einige Substrate für die Cdc2/Cyclin B beschrieben worden. Zu ihnen gehören u.a. Histon H1, Caldesmon, Vimentin, Nucleolin, Kernlamine, Numatrin, Casein Kinase 2, DNA-Polymerase α sowie die Protein Phosphatase 1 (Pines, 1995; Sarcevic et al., 1997).

1.3. Die Ribonuklease T1

Die Ribonuklease T1 (RNase T1) wurde in dieser Arbeit als Modellprotein zur Untersuchung der Isomerspezifität prolinspezifischer Kinasen verwendet, da im Gegensatz zu den bis jetzt bekannten natürlichen Kinasesubstraten die Konformation ihrer Ser/Thr-Pro-Bindungen bereits aufgeklärt ist.

Die ursprünglich aus Takadiastase, einer aus dem Kulturmedium des Schimmelpilzes *Aspergillus oryzae* gewonnenen Fraktion, in zwei Isoformen (Gln oder Lys an Position 25) isolierte Guanin-spezifische RNase T1 gehört zu den am besten untersuchten mikrobiellen Enzymen (Pace et al., 1991). Es existieren eine Reihe von Kristallstrukturen, die bei Auflösungen von 1.5-3.2 Å bestimmt worden sind und in denen die Substratbindungsstelle frei oder gebunden an Derivate des Guanosins vorliegt (Arni et al., 1988; Heinemann & Saenger, 1982; Koepke et al., 1989; Martinez-Oyanedel et al., 1991). Die RNase T1 ist ein kleines globuläres Protein aus 104 Aminosäuren ($M_r = 11085$ Da). Das gefaltete Protein enthält ein kurzes doppelsträngiges, antiparalleles Faltblatt, auf das eine viereinhalb Windungen lange α -Helix folgt. Daran schließt sich ein aus fünf Strängen zusammengesetztes antiparalleles β -Faltblatt an (Abb. 1.6).

Das Protein wird durch zwei Disulfidbrücken, welche im nativen Protein eng benachbart liegen, stabilisiert. Die Cys²-Cys¹⁰-Bindung ist dem Lösungsmittel zu etwa 90% zugänglich, während die Cys⁶-Cys¹⁰³-Bindung vollständig im Inneren verborgen ist. Daher ist es durch selektive Reduktion möglich, ein Derivat der RNase T1 zu gewinnen, in dem nur die Cys²-Cys¹⁰-Disulfidbrücke gespalten vorliegt (Pace & Creighton, 1986; Pace et al., 1988).

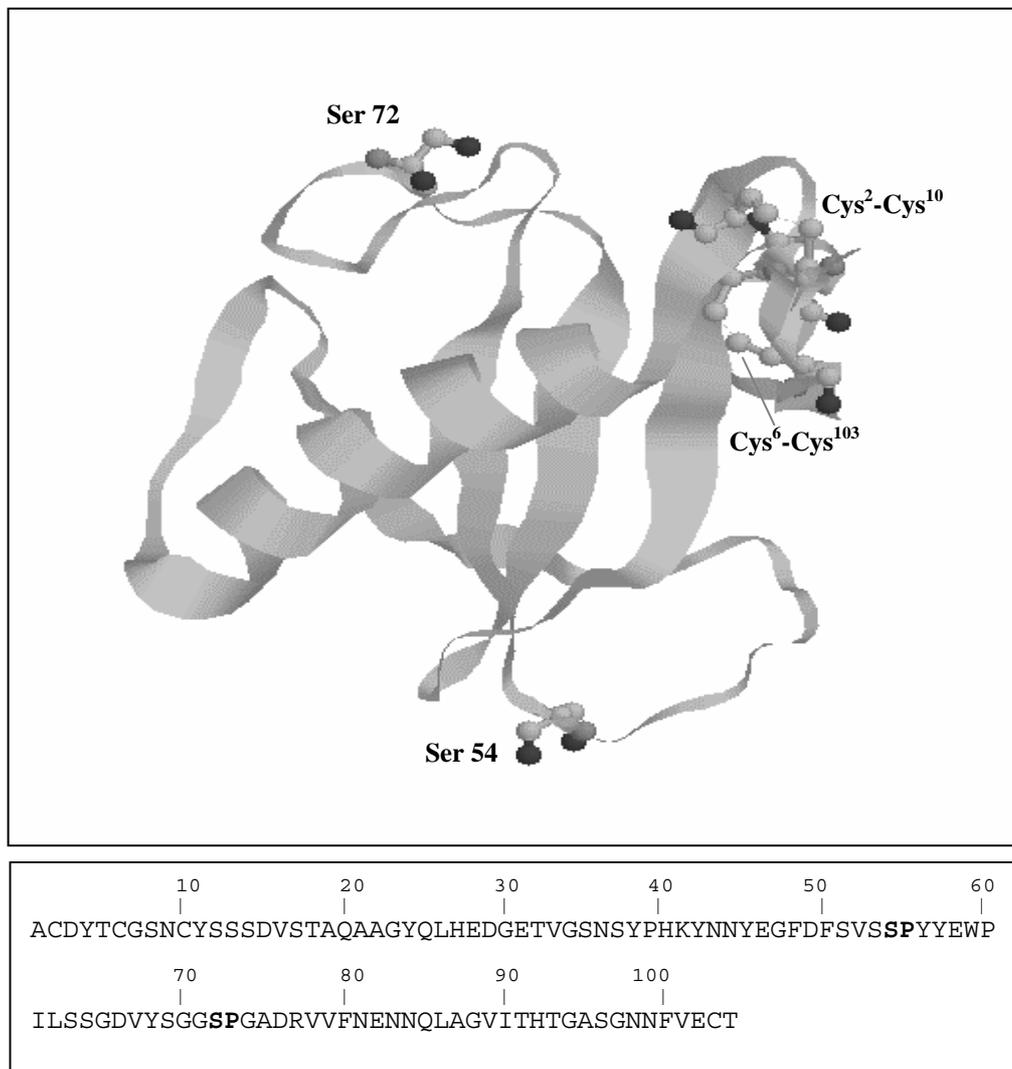


Abb. 1.6 Struktur der Ribonuklease T1 aus *Aspergillus oryzae*

Durch das Öffnen der 2-10-Disulfidbrücke wird die Konformationsstabilität der RNase T1 um etwa 3 kcal/mol erniedrigt.

Aufgrund ihrer elektrophoretischen Eigenschaften und mittels Fluoreszenzuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die teilweise reduzierte RNase T1 in einer ähnlichen Konformation wie das Wildtyp-Protein gefaltet bleibt (Pace & Creighton, 1986). Auch die Untersuchungen der C2S/C10N-Variante durch CD-Spektroskopie und 2D-NMR ergaben,

dass die Sekundärstruktur und die Konformation der Prolylbindungen nicht verändert waren (Mayr et al., 1994). Diese Variante zeigte eine beinahe unveränderte enzymatische Aktivität. Die RNase T1 besitzt zwei potentielle Phosphorylierungsstellen für prolinspezifische Proteinkinasen: die Serin⁵⁴-Prolin⁵⁵-Bindung in der *cis*-Konformation und die Serin⁷²-Prolin⁷³-Bindung in der *trans*-Konformation (**Abb. 1.6**). Aus der Literatur gibt es bisher keine Hinweise, dass die RNase T1 *in vivo* phosphoryliert vorliegt.

Darüber hinaus enthält die RNase T1 noch zwei weitere durch prolinspezifische Kinasen nicht phosphorylierbare Prolylbindungen: die Tyrosin³⁸-Prolin³⁹-Bindung in der *cis*-Konformation und die Tryptophan⁵⁹-Prolin⁶⁰-Bindung in der *trans*-Konformation (Arni et al., 1988; Martinez-Oyanedel et al., 1991). Der Tyrosin³⁸-Rest befindet sich im aktiven Zentrum des Enzyms. Diese Region ist in allen homologen eukaryotischen RNasen konserviert (Heinemann & Hahn, 1989). Im Gegensatz dazu befindet sich die Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung in einer flexiblen Region auf der Oberfläche des Proteins, die nur wenige Kontakte zu anderen Bereichen der Polypeptidkette aufweist. In der verwandten RNase C2 aus *Aspergillus clavatus* ist die *cis*-Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung durch eine *trans*-Gly⁵⁴-Asn⁵⁵-Bindung ausgetauscht. Auch die Gly⁵⁴-Asn⁵⁵-Bindung der RNase T1-S54G/P55N-Mutante, in welcher die *cis*-Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung ersetzt worden ist, befindet sich ebenfalls in der *trans*-Konformation. Diese Variante besitzt im Vergleich zum Wildtyp-Protein eine nahezu unveränderte Struktur und thermodynamische Stabilität (Kiefhaber et al., 1990a).

Untersuchungen an der RNase T1 haben einen bedeutenden Beitrag zum Verständnis der Faltung von Proteinen geleistet. Die Rückfaltung der RNase-T1 verläuft in drei Phasen, einer schnellen, die weniger als eine Sekunde andauert, und zwei sehr langsamen, die erst im Minuten- bzw. Stundenbereich beendet sind. Die beiden langsamen Phasen können durch die *trans* nach *cis* Isomerisierungen der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung sowie der Tyr³⁸-Pro³⁹-Bindung erklärt werden (Kiefhaber et al., 1990b; Kiefhaber et al., 1990c). Die erste langsame Phase wird bei der Rückfaltung der RNase T1-S54G/P55N-Variante nicht mehr beobachtet. Die Rückfaltung dieser Variante ist nur noch von der *trans* nach *cis* Isomerisierung der Tyr³⁸-Pro³⁹-Bindung abhängig.

1.4. Zielstellung der Arbeit

Die Phosphorylierung von Ser/Thr-Pro-Motiven wird durch prolinspezifische Proteinkinasen katalysiert. Diese haben aufgrund ihrer Beteiligung an wichtigen zellulären Prozessen, wie der Regulation des Zellzyklus und der intrazellulären Signalübertragung, in letzter Zeit großes wissenschaftliches Interesse erlangt. Zu ihnen gehören die Familien der cyclinabhängigen- und der Mitogen-aktivierten Kinasen. Alle Vertreter dieser Familien phosphorylieren ihre Substrate ausschließlich an Serin- oder Threoninresten, die sich N-terminal zu einem Prolinrest befinden.

Durch die einzigartigen Eigenschaften des Prolins bilden die Peptidyl-Prolylbindungen *cis*- und *trans*-Isomere von vergleichbarer thermodynamischer Stabilität. Diese sich ineinander umwandelnden Isomere von Proteinen oder Oligopeptiden können durch Enzyme unterschiedlich stark gebunden werden. Am Beispiel von Proteasen konnte bereits gezeigt werden, dass Enzyme zwischen den beiden Konformeren der Prolin enthaltenden Polypeptidkette unterscheiden können. Zu untersuchen, ob auch prolinspezifische Proteinkinasen zwischen dem *cis*- und dem *trans*-Isomer der Ser/Thr-Pro-Bindung unterscheiden können, war ein hauptsächliches Ziel dieser Arbeit. Die Isomerspezifität sollte zuerst anhand von Oligopeptidsubstraten nachgewiesen und anschließend an Proteinsubstraten bestätigt werden.

Wenn die Phosphorylierung von Proteinsubstraten isomerspezifisch verläuft, sollte der Einfluss von verschiedenen Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen auf die Katalyse untersucht werden. Dabei könnten die PPIasen zu einer beschleunigten Bereitstellung des phosphorylierbaren Konformers der Ser/Thr-Pro-Bindung beitragen. Sollte dieses der Fall sein, könnte die PPIase-Aktivität, durch eine Beeinflussung der Phosphorylierungsgeschwindigkeit, als Sonde zur Detektion von *native-state* Isomerisierungen in nativen Proteinen dienen. Eine Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung von Prolylbindungen in gefalteten Proteinen durch PPIasen konnte bereits für einige Beispiele nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, durch isomerspezifische Phosphorylierung die Konstanten der Prolylisomerisierung in Proteinen zu bestimmen. Eine weitere Anwendung isomerspezifischer Kinasen könnte ihr Einsatz zur Aufklärung der Konformation von Ser/Thr-Pro-Motiven in Proteinen sein. Darüber hinaus wäre es auch interessant zu untersuchen, ob die isomerspezifische Phosphorylierung im Zusammenspiel mit PPIasen ein neuartiges Regulationsprinzip von Proteinen darstellt.

2. Material und Methoden

2.1. Verzeichnis der verwendeten Materialien

2.1.1. Verwendete Chemikalien

Adenosintriphosphat (ATP)	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Acetonitril	Fluka (Deisenhofen)
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumsulfat	Merck (Darmstadt)
Ampicillin	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Coomassie Brilliantblau R250	Serva (Heidelberg)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (Deisenhofen)
Dithiothreitol	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Formaldehyd (37 %ig)	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Guanidiniumhydrochlorid	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Kieselgel 60 _{F254} (Schichtdicke 0.2 mM)	Merck (Darmstadt)
Magnesiumchlorid	Sigma (Deisenhofen)
2-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Natriumcarbonat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumthiosulfat	Merck (Darmstadt)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg)
Silbernitrat	Merck (Darmstadt)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
Trifluoressigsäure (TFA)	Roth (Karlsruhe)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Serva (Heidelberg)

2.1.2. Verwendete Proteine

Cdc2/Cyclin B	New England Biolabs (Beverly, USA)
α -Chymotrypsin	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Eglin C	Sigma (Deisenhofen)
ERK2	New England Biolabs (Beverly, USA)
Markermix 4 und 5	Serva (Heidelberg)
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva (Heidelberg)

2.1.3. Radiochemikalien

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (4500 Ci/mmol)	ICN (Eschwege)
$[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ (3000 Ci/mmol)	ICN (Eschwege)

Von Dr. J. Rahfeld, Dr. B. König und Dr. G. Stoller (MPG, Halle) wurden die in dieser Arbeit verwendeten PPIasen freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Klone für die in dieser Arbeit untersuchten RNase T1-Varianten stammten aus den Arbeitsgruppen von Prof. F.X. Schmid (Universität Bayreuth) und Prof. U. Hahn (Universität Leipzig).

Die verwendeten Peptide Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np, Abz-Cys-Ser-Pro-Arg-Cys-Nty-NH₂ und ihre phosphorylierten Derivate wurden von der Arbeitsgruppe Dr. M. Schutkowski/Dr. F. Bordusa (MPG, Halle) synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

2.2. Proteinchemische Analyse

2.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Die jeweilig verwendeten Acrylamidkonzentrationen sind den Abbildungsbeschreibungen zu entnehmen. Die Anfärbung der Gele erfolgte durch Silberfärbung.

2.2.2. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die verwendeten Lösungen und Puffer entsprachen bis auf den SDS- und Mercaptoethanol-Zusatz der Methode nach Laemmli. Im Gegensatz zu Abschnitt 2.2.1. wurden die Proben nicht vor dem Auftragen erhitzt. Die Durchführung der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte mit 12.5 %igen Gelen bei einer konstanten Stromstärke von 12 mA. Um eine Denaturierung der Proteine während des Laufes zu verhindern, wurde die

Elektrophorese-Apparatur auf 4 °C gekühlt. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Coomassie-Blau Färbung (Fairbanks et al., 1971).

2.2.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Gemischen erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) mit BSA als Standard. Die Ermittlung der Konzentration gereinigter Proteine mit bekannten Extinktionskoeffizienten erfolgte spektrophotometrisch.

Die Konzentration des katalytisch aktiven α -Chymotrypsins wurde durch Titration mit 4-Nitrophenylacetat bestimmt (Werner, 2001).

2.3. Untersuchung der Isomerspezifität von Proteinkinasen an Peptidsubstraten

2.3.1. Herstellung von *cis*-Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np

Die Herstellung von *cis*-Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np erfolgte mittels isomerspezifischer Proteolyse (Fischer et al., 1984a) durch α -Chymotrypsin. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer ausschließlichen Hydrolyse des *trans*-Isomers prolinhaltiger Peptide. Durch Zugabe von α -Chymotrypsin (170 μ M) zu einer äquilibrierten Mischung aus *cis*- und *trans*-Konformer des Peptids Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np (1.7 mM in 50 mM Tris/HCl pH 7.5) wurde die Reaktion gestartet. Nach einer Reaktionszeit von einer Minute war das *trans*-Isomer vollständig an der 4-Nitroanilidbindung hydrolysiert. Anschließend wurde das Chymotrypsin mit einem 1.4fachen molaren Überschuss an Eglin C (Stammlösung 1.16 mM in 0.5 mM HCl) inaktiviert. Das verbleibende *cis*-Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np isomerisiert nach einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung bis zur Wiedereinstellung des *cis/trans*-Gleichgewichtes. Zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstante k_{obs} der *cis/trans*-Isomerisierung wurden nach verschiedenen Zeiten Aliquote entnommen und der Anteil des *trans*-Isomers mittels isomerspezifischer Proteolyse bestimmt. Dazu wurde ein 3.5facher molarer Überschuss von Chymotrypsin gegenüber dem im Ansatz vorhandenen Eglin C zugegeben. Die Messung des freigesetzten 4-Nitroanilids erfolgte bei 390 nm am Diodenarray-Photospektrometer HP8452. Alle Reaktionen wurden bei 0 °C in einem Wasser/Eis-Bad durchgeführt.

2.3.2. Untersuchung der Isomerspezifität der ERK2

Zur Untersuchung der Isomerspezifität diente das Pentapeptid Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np als Substrat (**Abb. 2.1**). *Cis*-Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np wurde durch isomerspezifische Proteolyse, wie in Punkt 2.3.1 beschrieben, hergestellt. Während der anschließenden Einstellung des *cis/trans*-Gleichgewichtes wurden nach verschiedenen Zeiten Aliquote entnommen und mit ERK2 (80 nM) in Anwesenheit von 100 μ M radioaktiven [γ - 33 P]ATP (60 Ci/mmol) inkubiert. Die beschriebenen Reaktionen wurden alle in 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM DTT, 10 mM MgCl₂ bei 0 °C durchgeführt. Nach dreiminütiger Phosphorylierung wurden die Kinasereaktionen durch Zugabe von Trifluoressigsäure abgestoppt. In einigen Experimenten wurde zur Beschleunigung der *cis/trans*-Isomerisierung vor Entnahme (0.5 min) der Aliquote humanes FKBP12 (0.5 μ M) zugesetzt. Zur spezifischen Inhibition des hFKBP12 wurde 20 μ M FK506 zugegeben.

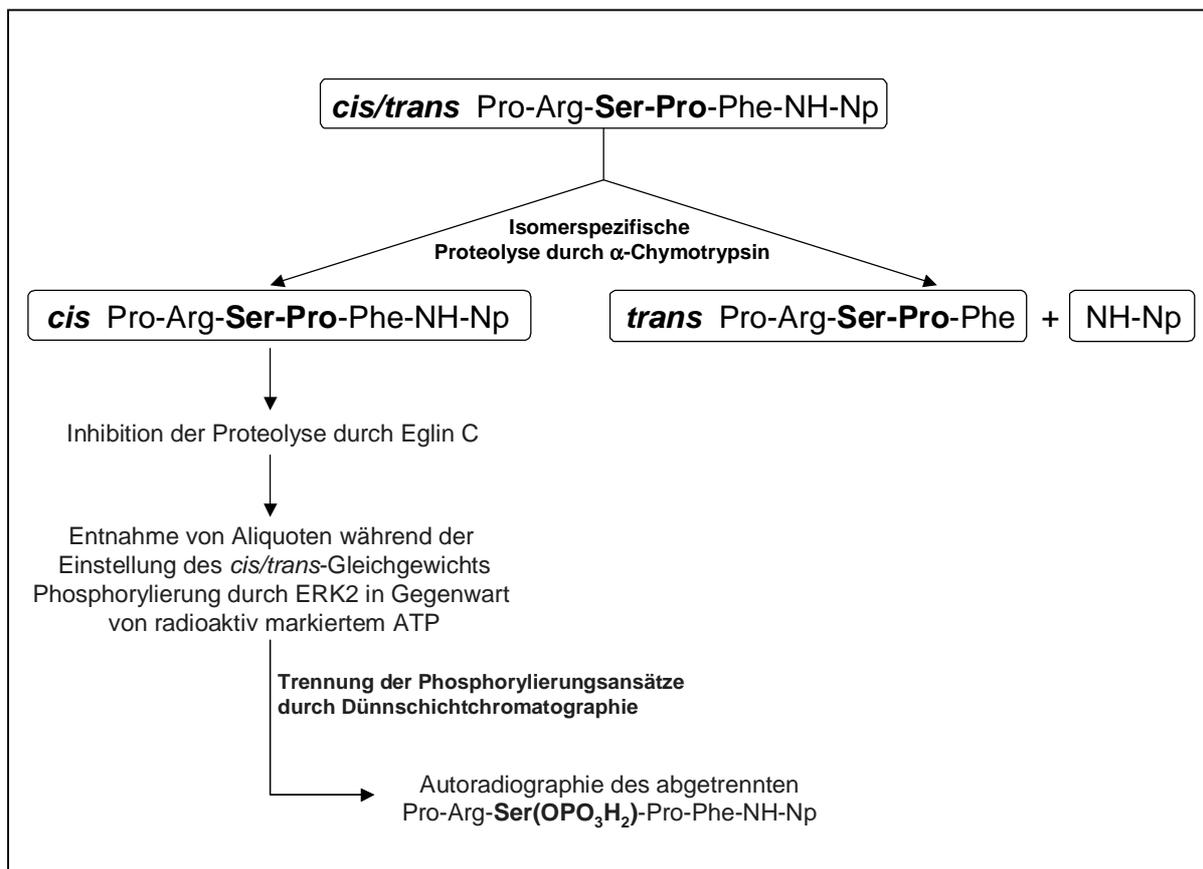


Abb. 2.1 Prinzip des angewandten Tests zur Untersuchung der Isomerspezifität der ERK2

Die Phosphorylierungsansätze wurden durch Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von Kieselgel 60_{F254}-Fertigplatten (Schichtdicke 0.2 mm) und dem Laufmittelsystem Butanol/Wasser/Essigsäure/Ethanol (2:4:1:1, v/v) getrennt. Anschließend wurde die Matrix

einer Autoradiographie mittels *Intensifying Screen* unterzogen. Die Quantifizierung der Autoradiographie erfolgte mit dem Fujifilm BAS 2500 der Firma Raytest (Straubenhardt). Das chemisch phosphorylierte Peptid Pro-Arg-Ser(OPO₃H₂)-Pro-Phe-NH-Np diente als Referenz für die dünnschichtchromatographische Trennung.

2.3.3. Untersuchung eines disulfidverbrückten Peptidsubstrats

Für weitere Untersuchungen zur Aufklärung der Isomerspezifität von Proteinkinasen wurde das disulfidverbrückte Peptidsubstrat Abz-Cys-Ser-Pro-Arg-Cys-Nty-NH₂ verwendet. Bei Peptiden der allgemeinen Form -Cys-Xaa-Pro-Xaa-Cys- liegt die Xaa-Pro-Bindung zu fast 100 % in der *cis*-Konformation vor. Nach Spaltung der Disulfidbrücke mittels DTT stellt sich ein Isomerengleichgewicht aus *cis*- und *trans*-Isomer ein (**Abb. 2.2**). Das eingesetzte intern gequenchte Peptidsubstrat besitzt am N-Terminus einen 2-Aminobenzoessäure-Rest als Fluorophor und am C-Terminus dient ein 3-Nitrotyrosin-Rest als fluoreszenzlöschende Gruppe (Quencher). Dabei wird durch einen intramolekularen Energieübertragungsmechanismus (strahlungsloser Resonanzenergietransfer) die Fluoreszenzausbeute der fluorogenen Gruppe deutlich verringert. Durch Spaltung der Disulfidbindung und anschließender Prolylisomerisierung kommt es zu einer Vergrößerung des räumlichen Abstands zwischen Fluorophor und Quencher und damit zum Wegfall des fluoreszenzlöschenden Effekts. Die so erzielte Signaländerung wurde zur Messung der Geschwindigkeitskonstante k_{obs} der *cis/trans*-Isomerisierung ausgenutzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer 1 mM Stammlösung des Peptids Abz-Cys-Ser-Pro-Arg-Cys-Nty-NH₂ zu einer Dithiothreitol-Lösung (0.5 bis 10 mM in sterilfiltriertem 25 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.5) gestartet. Die Peptidkonzentration im Ansatz betrug 10 μM . Nach erfolgter Anregung bei 320 nm wurde die Fluoreszenzänderung bei 420 nm an einem F3010-Fluoreszenzspektrometer (Hitachi, Japan) detektiert. Die Anregungs- und Emissionsbandbreite betrug jeweils 5 nm. Die Messungen wurden bei 2 °C durchgeführt.

In einigen Fällen wurde vor dem Start der Reaktion humanes Cyclophilin18 (1 μM) zugegeben. Als Kontrolle diente Cyclophilin18 (1 μM), das mit seinem spezifischen Inhibitor Cyclosporin A (40 μM) vorinkubiert wurde.

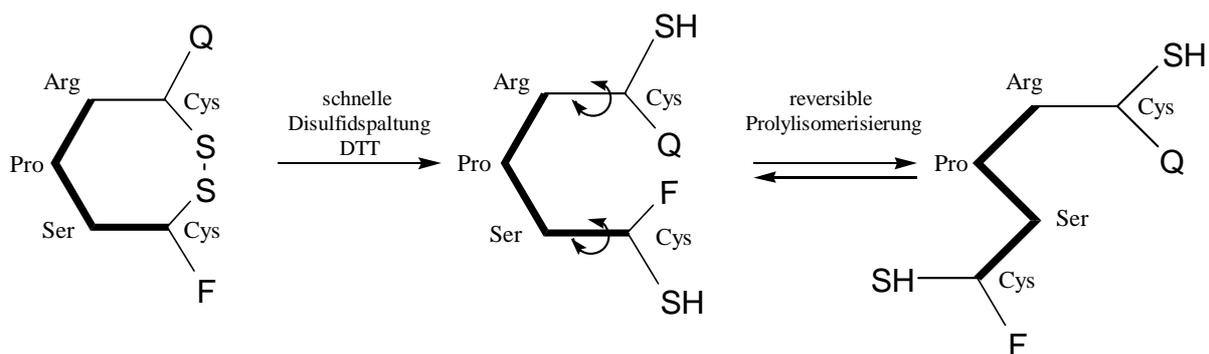


Abb. 2.2 Reversible *cis/trans*-Isomerisierung intern gequenchter Fluoreszenzsubstrate nach Aufspaltung der Disulfidbrücke.

Die sich vollständig in *cis*-Konformation befindende Xaa-Pro-Bindung isomerisiert nach Aufspaltung der Disulfidbindung mittels reduzierender Agenzien (DTT, TCEP) in ein Isomerengemisch von *cis* und *trans*. Das Peptid besitzt an seinen Termini einen Fluorophor (F) und einen Quencher (Q). Durch Verschiebung des *cis/trans*-Gleichgewichts und der damit verbundenen größeren räumlichen Entfernung zwischen Fluorophor und Quencher beim *trans*-Isomer kommt es zu einer deutlichen Signalerhöhung.

2.3.4. Untersuchung der Isomerspezifität der Ser/Thr-Kinase Cdc2/Cyclin B

Die Untersuchung der Isomerspezifität der prolinspezifischen Ser/Thr-Kinase Cdc2/Cyclin B erfolgte mit dem disulfidverbrückten, intern gequenchten fluorogenen Peptidsubstrat $\text{Abz-Cys-Ser-Pro-Arg-Cys-Nty-NH}_2$. Zum Start der Reaktion wurde eine Peptidstammlösung von 10 mM zehnfach in einer 100 mM Dithiothreitol-Lösung (in 50 mM Tris/HCl pH 7.5) verdünnt. Während der anschließenden *cis/trans*-Isomerisierung des geöffneten Peptids wurden zu verschiedenen Zeiten Aliquote entnommen und mit Cdc2/Cyclin B inkubiert. Die Phosphorylierungsansätze enthielten jeweils 200 μM Peptid, 20 nM Cdc2-Kinase und 100 μM radioaktiv markiertes $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (50 Ci/mmol). Alle Reaktionen erfolgten in 50 mM Tris/HCl, 20 mM DTT, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA pH 7.5 bei 2 °C. Die Phosphorylierungsansätze wurden durch Zugabe von Trifluoressigsäure (1 %) nach 4 min abgestoppt und anschließend, wie im Abs. 2.3.2 beschrieben, dünnschichtchromatographisch getrennt und ausgewertet. Das chemisch phosphorylierte Peptid $\text{Abz-Cys-Ser(OPO}_3\text{H}_2\text{)-Pro-Arg-Cys-Nty-NH}_2$ diente als Referenz in der dünnschichtchromatographischen Trennung.

2.4. Untersuchung des Modellproteins RNase T1

2.4.1. Präparation der rekombinanten RNase T1-Varianten

Zur Präparation der periplasmatisch sezernierten RNase T1-Varianten (P73V, S54G/P55N, Wildtyp) wurde 1 Liter LB-Medium (100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin enthaltend) mit 50 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen einer $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.5$ bei 37 °C geschüttelt.

Nach Induktion mit 1mM IPTG wurden die Kulturen weitere 20 Stunden (P73V-Variante nur 5 h) bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (15 min, 4°C, 6000 × g) in einer J2-HC Beckman-Zentrifuge (Palo Alto, USA) geerntet. Zum Aufschluss des Periplasmas wurden die Zellpellets in Puffer (20 mM Piperazin pH 6.0, 5 mM EDTA, 30 % Saccharose) resuspendiert und 45 min bei 4 °C kräftig geschüttelt. Der Periplasmaaufschluss wurde in 6 Volumen PE-Puffer (20 mM Piperazin pH 6.0, 5 mM EDTA) aufgenommen und anschließend zentrifugiert (15 min, 4°C, 6000 × g). Der Überstand wurde auf eine Anionenaustauscher-Säule (Fractogel EMD-DEAE 650(M)) aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit 400 ml PE-Puffer wurden die gebundenen Proteine mit einem Salzgradienten von 0 - 400 mM NaCl, (500 ml) bei einer Flussrate von 2 ml/min eluiert. Die RNase T1 enthaltenden Fraktionen (Nachweis durch SDS-PAGE) wurden vereinigt, über Nacht in Spectrapor 3000-Schläuchen dialysiert und anschließend in einer Filtron-Zelle (Omegacell, 3 kDa Ausschlussvolumen) auf 2.5 ml eingengt und auf eine Fractogel TSK HW-55(S)-Gelfiltrationssäule (95 × 1.6 cm, äquilibriert mit PE-Puffer) mit 0.5 ml/min aufgetragen.

2.4.2. Reduktion und S-Carboxymethylierung

Die Expression und Reinigung der RNase T1-Varianten erfolgte wie im Abschnitt 2.4.1. beschrieben. Das gereinigte, disulfidverbrückte Protein (5 mg/ml) wurde für 60 min in 200 mM Tris/HCl, 7M GdmCl, 200 mM DTT pH 8.7 reduziert und entfaltet. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit Iodacetat (100 mM) 5 min im Dunkeln inkubiert. Die S-carboxymethylierte RNase T1 wurde danach über eine „Fast Desalting“- Säule am Smart-System (Pharmacia, Uppsala, Schweden) entsalzt und in 100 mM Tris/HCl pH 8.0 umgepuffert.

2.4.3. Rückfaltung der S-carboxymethylierten RNase T1

Für die Rückfaltungsexperimente wurde die S-carboxymethylierte RNase T1 (RCM-T1), die unter Niedrigsalzbedingungen (100 mM Tris/HCl pH 8.0) vollständig entfaltet vorliegt, verwendet. Die Rückfaltung der RCM-T1 wurde durch eine 50fache Verdünnung der entfalteten Form in einen 2M NaCl enthaltenden Messansatz initiiert. Die Messungen erfolgten unter kontinuierlichem Rühren des Ansatzes mit einem F3010-Fluoreszenzspektrometer (Hitachi, Japan) bei 6 °C. Als Messsignal diente die Fluoreszenzänderung bei 320 nm (Spaltbreite 5 nm) nach einer Anregung bei 268 nm (Spaltbreite 1.5 nm). Die Endkonzentration der RCM-T1 in der Küvette betrug 2 µM.

2.4.4. Phosphorylierung der RNase T1 durch ERK2

Zur Untersuchung der Isomerspezifität der durch die ERK2 katalysierten prolinspezifischen Phosphorylierung an Proteinsubstraten wurde die RNase T1 verwendet. Die Ribonuklease T1 wurde als Modellprotein gewählt, da im Gegensatz zu den meisten bis jetzt bekannten natürlichen MAP-Kinase-Substraten die Konformationen der putativen Phosphorylierungsstellen bereits bekannt sind.

Alle beschriebenen Phosphorylierungen der RNase T1-Varianten wurden mit einer kommerziell erhältlichen ERK2 (New England Biolabs, Beverly, USA) durchgeführt. Sofern nicht anders vermerkt, enthielten die Phosphorylierungsansätze 25 μM RNase T1, 50 nM Kinase, 300 μM [γ - ^{32}P] ATP (10 Ci/mmol), 10 % (v/v) Glycerin, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 2 mM DTT und 50 mM Tris/HCl pH 7.5. Die Phosphorylierungen wurden unter kontinuierlichem Schütteln bei 30 °C durchgeführt. Die Ansätze wurden nach 10 bis 90 min mit SDS-Probenpuffer abgestoppt und 3 min bei 95 °C inkubiert. Um einen linearen Zusammenhang zu gewährleisten, wurden die Phosphorylierungszeiten so gewählt, dass nicht mehr als 5 % des Substrates phosphoryliert werden konnten. Zur Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten wurden mindestens nach zwei verschiedenen Zeiten Aliquote entnommen. Die Trennung der Phosphorylierungsansätze erfolgte durch 17.5 %ige SDS-PAGE. Anschließend wurde das SDS-Polyacrylamidgel einer Autoradiographie mittels eines *Intensifying Screen* unterzogen. Die Detektion der Radioaktivität erfolgte mit dem Fujifilm BAS 2500 der Firma Raytest (Straubenhardt). Die Bestimmung der Konzentration der phosphorylierten RNase T1 erfolgte durch Quantifizierung der Radioaktivität mit Hilfe eines jeweils zum Gel mitgeführten [γ - ^{32}P] ATP-Standards.

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten K_M und V_{max} wurden die Phosphorylierungsgeschwindigkeiten bei sechs Substratkonzentrationen im Bereich von 0.5 bis 250 μM gemessen. Die kinetischen Konstanten wurden aus einer Lineweaver-Burk-Darstellung durch Regression ermittelt. Die Effekte der verschiedenen PPIasen auf die Phosphorylierung der RNase T1 wurden in einem Konzentrationsbereich von 0.05 bis 50 μM der jeweiligen PPIase untersucht. Die Abhängigkeit der Initialgeschwindigkeit der Phosphorylierung von der ERK2 Konzentration wurde zwischen 20 und 140 nM gemessen. Die Auswertung der Messdaten sowie die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Softwareprogramm SigmaPlot 4.0 (Jandel Corp., Chicago USA). Für die Berechnung der kinetischen Konstanten der *cis/trans*-Isomerisierung aus den Auftragungen der Anfangsphosphorylierungsgeschwindigkeiten gegen die Substrat- sowie Kinasekonzentration wurde das Softwareprogramm Dynafit (Kuzmic, 1996) verwendet.

2.4.5. Phosphorylierung der RCM-T1-Varianten in Abhängigkeit vom Grad der Faltung

In weiteren Untersuchungen wurde die Abhängigkeit der Phosphorylierungsgeschwindigkeit vom Rückfaltungsgrad der carboxymethylierten RNase T1-Varianten (RCM-T1-wt, RCM-T1-S54G/P55N) untersucht. Die Rückfaltung der RCM-T1-Varianten wurde wie im Abschnitt 2.4.3 beschrieben mit 2 M Natriumchlorid gestartet und durch Fluoreszenzänderung bei 320 nm verfolgt. Während der Rückfaltung wurden zu verschiedenen Zeiten Aliquote entnommen und für 10 Minuten mit ERK2 (50 nM) in Anwesenheit von 100 μM [γ - ^{32}P]ATP (50 Ci/mmol) phosphoryliert. Die Endkonzentration der carboxymethylierten RNase T1 im Ansatz betrug 20 μM . Die beschriebenen Reaktionen wurden alle bei 6 °C durchgeführt.

2.5. Identifizierung der Phosphorylierungsstellen

2.5.1. Anionenaustausch-Chromatographie des Phosphorylierungsansatzes

Die Trennung der Phosphorylierungsansätze wurde mittels Anionenaustauschchromatographie an einer MonoQ-Säule am SMART-System von Pharmacia Biotech (Freiburg) durchgeführt. Die Elution der RNase T1 erfolgte mit einem linearen Natriumchlorid-Gradienten (0 bis 400 mM, 2ml, 50 min) bei 10 °C. Es wurden Fraktionen von 50 μl gesammelt. Die RNase T1 enthaltenden Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung sowie durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert.

2.5.2. RP-HPLC

Zur Vorbereitung der massenspektrometrischen Untersuchungen wurden die RNase T1-Phosphorylierungsansätze durch RP-HPLC entsalzt und die ERK2 sowie das ATP abgetrennt. Die RP-HPLC wurde mit einer Nucleosil 500-5C₃-PPN Säule (125 × 2 mm) von Macherey-Nagel (Düren, BRD) durchgeführt. Die Säule wurde mit 0.09 % TFA in 1 % Acetonitril (v/v) äquilibriert. Die Proteine wurden mit einem linearen Gradienten von 20-50 % Acetonitril in 0.08 % wässriger TFA bei 40 °C und einer Flussrate von 0.2 ml/min in 30 min eluiert. Die abgetrennte RNase T1 wurde 3 Stunden in 100 mM Ammoniumcarbonat pH 8.5 mit Trypsin (Endkonzentration 250 $\mu\text{g/ml}$) verdaut. Das erhaltene Peptid, welches die beiden Phosphorylierungsstellen enthielt, wurde einer weiteren Proteolyse durch α -Chymotrypsin unterzogen. Die Spaltprodukte wurden mittels RP-HPLC aufgetrennt und durch massenspektrometrische Fragmentierung untersucht. Die phosphorylierten Peptide wurden weiterhin mit einem 476A Gasphasensequenzier der Firma Applied Biosystems (Foster City,

USA) sequenziert. Die Aminosäuresequenzierung wurde freundlicherweise von P. Rücknagel (MPG, Halle) durchgeführt. Das Molekulargewicht der nach tryptischem Verdau erhaltenen Peptide wurde mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestimmt.

2.5.3. Bestimmung des Molekulargewichts mittels MALDI-TOF-MS

Die massenspektrometrischen Analysen wurden freundlicherweise von Dr. A. Schierhorn (MPG, Halle) durchgeführt. Die MALDI-TOF Massenspektren wurden an einem Reflex Massenspektrometer der Firma Bruker (Bremen, BRD), ausgestattet mit einem N₂-UV Laser (337 nm), im linearen Modus durchgeführt. PSD-Spektren (*post source decay*) zur Sequenzierung einzelner Peptide wurden im Reflektormodus aufgenommen. Als Matrix diente eine gesättigte Lösung Sinapinsäure in einem Acetonitril/Methanol/Wasser-Gemisch im Verhältnis 3:2:5 (v/v/v).

2.5.4. ESI- Massenspektrometrie

Die ESI-Massenspektren der phosphorylierten Peptide wurden an einem VG BIO-Q Tripel-Quadrupol Spektrometer der Firma Fisons Instruments (Manchester, GB) aufgenommen.

2.6. Messung der Phosphorylierung von Peptidsubstraten durch RP-HPLC

Die Bestimmung der katalytischen Konstanten für die Phosphorylierung der Peptide Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np, Ac-Val-Ser-Ser-Pro-Tyr-Tyr-NH₂ und Ac-Gly-Gly-Ser-Pro-Gly-Ala-NH₂ durch ERK2 erfolgte mittels RP-HPLC. Die Phosphorylierung wurde durch Zugabe von ERK2 (24 nM) zu einer Peptidlösung von 0.1 bis 20 mM gestartet. Nach 30, 60, 90 min wurden Aliquote entnommen, durch Zugabe von 25 %iger (v/v) TFA abgestoppt und mittels RP-HPLC an einem LC-10A HPLC System der Firma Shimadzu (Kyoto, Japan) analysiert. Die mit der eingesetzten Kinasekonzentration erzielten Phosphorylierungsumsätze von maximal 10 % gewährleisteten über den gesamten Inkubationszeitraum eine lineare Abhängigkeit. Die Puffer und Substrate wurden im Wasserbad bei 30 °C temperiert.

Die Trennung der phosphorylierten Peptide erfolgte an einer Nucleosil 300-5 C₁₈ Säule (125 × 3 mm) der Firma Macherey-Nagel (Düren, BRD) mit einem 30minütigen linearen Gradienten von 1 bis 30 % Acetonitril in 0.08 %iger wässriger TFA. Die Flussrate betrug 0.5 ml/min. Die Detektion der Peptide erfolgte bei 215 nm. Die Quantifizierung der Umsätze erfolgte durch Integration der Peakflächen mittels der HPLC-Software von Shimadzu. Durch Vorversuche

konnte ein linearer Zusammenhang zwischen eingespritzter Peptidmenge und beobachteter Peakfläche im untersuchten Bereich sichergestellt werden.

Die Berechnung der Konzentration des durch die Kinase phosphorylierten Peptides erfolgt anschließend durch Multiplikation der im Ansatz eingesetzten Substratkonzentration mit dem Verhältnis der Peakfläche des phosphorylierten Peptides zur Summe der Peakflächen aus phosphorylierten und unphosphorylierten Peptid. Die Kinaseaktivität wurde aus der linearen Auftragung der Konzentration an phosphoryliertem Peptid gegen die Inkubationszeit bestimmt. Zur Ermittlung der kinetischen Konstanten K_M und V_{max} wurden die Phosphorylierungsgeschwindigkeiten mit Peptidkonzentrationen im Bereich zwischen 0.05 bis 15 mM bestimmt.

2.7. Bestimmung der RNase T1-Aktivität

Zur Messung der RNase T1-Aktivität wurde hochmolekulare RNA (3 mg/ml) aus Hefe (Worthington Biochemical Corp.) verwendet. Dazu wurden 10 nM RNase T1 mit einer RNA-Lösung (3 mg/ml in 50 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA pH 7.5) 15 min bei 37 °C inkubiert. Die noch vorhandene hochmolekulare RNA und das Enzym wurden anschließend mit eiskalter Perchlorsäure (6 %)/Lanthannitrat (0.5 %)-Mischung ausgefällt und 20 min bei 0 °C inkubiert. Die nach der Zentrifugation der Proben (13000 rpm, 10 min) verbleibenden, durch RNase T1 freigesetzten säurelöslichen Oligonukleotide, wurden mit einem Specord S10 Spektrometer (Carl Zeiss Jena) bei 260 nm detektiert.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchung der *cis/trans*-Isomerspezifität prolinspezifischer Proteinkinasen

3.1.1. Isomerspezifität der MAP-Kinase ERK2

Wie bis jetzt an einigen Beispielen gezeigt wurde, können sich die *cis*- und die *trans*-Isomere der Peptidyl-Prolylbindung in enzymatischen Reaktionen unterschiedlich verhalten.

Die Frage, ob auch die prolinspezifische Proteinkinase ERK2 zwischen den *cis*- und den *trans*-Isomer der Ser/Thr-Pro-Bindung unterscheiden kann, wurde mit dem Pentapeptid Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np, welches die Konsensussequenz (Pro-Xaa-Ser/Thr-Pro) für die Erkennung durch ERK2 enthält, untersucht. Mit diesem Peptid war es möglich, genügend hohe Phosphorylierungsausbeuten nach kurzen Inkubationszeiten zu erreichen. Die Bestimmung der katalytischen Konstanten für die Phosphorylierung durch ERK2 ergab einen k_{cat} -Wert von $1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und einen K_{m} -Wert von $690 \text{ }\mu\text{M}$ bei $0 \text{ }^\circ\text{C}$. In wässriger Lösung bei pH 7.5 liegt das verwendete Substrat als ein Gemisch aus beiden Konformeren vor. Der durch isomerspezifische Proteolyse ermittelte *cis*-Gehalt betrug $16.5 \pm 0.2 \text{ } \%$.

Zur Untersuchung der *cis/trans*-Isomerspezifität der ERK2 wurde das *cis*-Isomer des Peptidsubstrats durch isomerspezifische Proteolyse mittels α -Chymotrypsin hergestellt. Diese Methode beruht darauf, dass α -Chymotrypsin das Peptid nur an der 4-Nitroanilidbindung hydrolysieren kann, wenn die Ser-Pro-Bindung in der *trans*-Konformation vorliegt (Fischer et al., 1984a). Anschließend wurde die Proteasereaktion durch Zugabe eines 1.4fachen molaren Überschusses an Eglin C schnell abgestoppt. Das verbleibende Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np, in welchem die Ser-Pro-Bindung in der *cis*-Konformation vorliegt, isomerisiert nach einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung bis zur Wiedereinstellung des *cis/trans*-Gleichgewichtes. Um die Geschwindigkeit der *cis/trans*-Isomerisierung zu senken, wurden alle Experimente bei $0 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Bei dieser Temperatur betrug die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung für die *cis/trans*-Isomerisierung des Peptids $2.08 \pm 0.08 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Zur Bestimmung dieser Konstante wurden die *cis*-Gehalte nach definierten Zeiten der Gleichgewichtseinstellung, durch erneute isomerspezifische Proteolyse ermittelt und die erhaltenen Ergebnisse nach einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung angepasst.

Um zu untersuchen, ob die Konformation der Ser-Pro-Bindung im Substrat einen Einfluss auf die durch ERK2 katalysierte Phosphorylierung hat, wurde das *cis*-Isomer des Peptids Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np wie oben beschrieben hergestellt. Nach verschiedenen Zeiten der *cis/trans*-Isomerisierung wurden Aliquote entnommen und mit ERK2 in Gegenwart von radioaktiv markiertem ATP inkubiert.

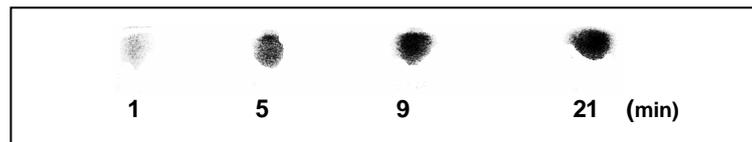


Abb. 3.1 Autoradiographie des durch Dünnschichtchromatographie abgetrennten Phosphorylierungsprodukts Pro-Arg-Ser(OPO₃H₂)-Pro-Phe-NH-Np

Cis-Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np wurde durch isomerspezifische Hydrolyse hergestellt. Während der Einstellung des *cis/trans*-Gleichgewichts wurden Aliquote nach 1, 5, 9, 21 min entnommen und für 3 min mit ERK2 in Gegenwart von [γ -³³P] radioaktiv markiertem ATP phosphoryliert und anschließend durch Autoradiographie analysiert (Abs. 2.3.2.).

Die phosphorylierten Aliquote wurden anschließend mittels Dünnschichtchromatographie getrennt und autoradiographisch analysiert (**Abb. 3.1**). Der einzige Unterschied, der zwischen den entnommenen Proben bestand, war die veränderte Isomerenzusammensetzung des Peptids infolge der Gleichgewichtseinstellung. Wenn die *cis*- und die *trans*-Konformere unterschiedliche Substrateigenschaften besitzen, sollte es zu einer Veränderung der Phosphorylierungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der *cis/trans*-Isomerisierung kommen.

Wie in **Abb. 3.2** dargestellt, erhöht sich die Anfangsgeschwindigkeit der Phosphorylierung mit zunehmender Isomerisierungszeit. Während dieser Zeit steigt der Anteil des *trans*-Isomers von 0 auf 83.5 %. Die Anpassung der gemessenen Enzymaktivitäten nach einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung ergab eine Geschwindigkeitskonstante von $1.95 \pm 0.13 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, welche nahezu identisch mit der direkt gemessenen Konstante für die *cis/trans*-Isomerisierung war. Diese Ergebnisse weisen auf eine absolute Isomerspezifität der ERK2 für das *trans*-Isomer der Ser-Pro-Bindung hin.

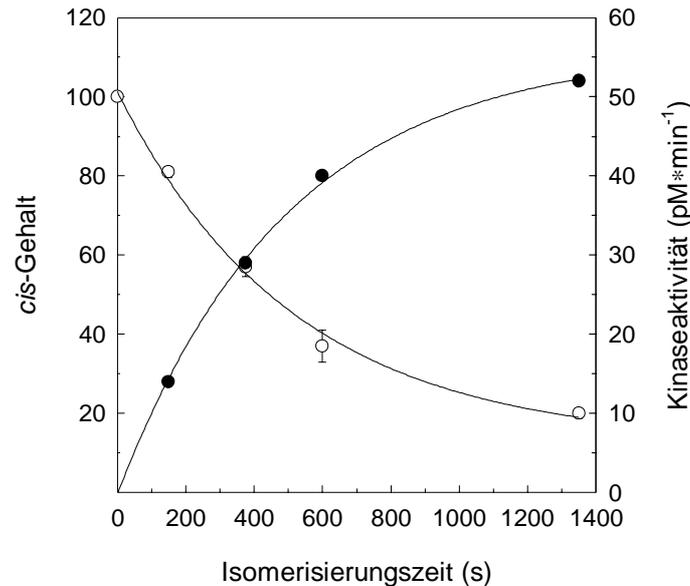


Abb. 3.2 Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der Phosphorylierung von der Isomerenzusammensetzung

Cis-Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np isomerisiert bei 0 °C bis zur Einstellung des *cis/trans*-Gleichgewichtes. Während der Isomerisierung wurden zu verschiedenen Zeiten Aliquote entnommen und für 3 min mit ERK2 (80 nM) in Anwesenheit von 100 µM radioaktiven [γ -³³P]ATP (50 Ci/mmol) inkubiert (●). Nach dem Abstoppen der Reaktion mit TFA wurden die Phosphorylierungsansätze mittels Dünnschichtchromatographie getrennt. Die Quantifizierung der anschließenden Autoradiographie erfolgte mit dem Fujifilm BAS 2500.

Die Bestimmung der *cis*-Gehalte (○) erfolgte mittels isomerspezifischer Proteolyse durch Zugabe eines 3.5fachen molaren Überschusses an α -Chymotrypsin gegenüber dem vorhandenen Eglin C. Die Freisetzung des 4-Nitroanilids wurde spektrophotometrisch verfolgt.

3.1.2. Einfluss der PPIase hFKBP12 auf die Phosphorylierung

PPIasen katalysieren die *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen in Peptiden und Proteinen. Durch die beschleunigte Einstellung des *cis/trans* Gleichgewichts könnten die PPIasen die Phosphorylierung des Peptids beeinflussen.

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss der humanen PPIase FKBP12 (hFKBP12) untersucht. Die PPIase zeigt eine Spezifitätskonstante von $k_{\text{cat}}/K_m = 2.9 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ für das verwendete Peptidsubstrat. Dies erlaubte schon den Einsatz katalytischer Mengen an hFKBP12 (Substrat/hFKBP12-Verhältnis = 500), um die Einstellung des *cis/trans*-Gleichgewichtes stark zu beschleunigen.

Unmittelbar nach dem Abstoppen der isomerspezifischen Proteolyse wurde das reine *cis*-Peptidsubstrat 30 Sekunden in Gegenwart der PPIase vorinkubiert und wie oben beschrieben phosphoryliert. In Anwesenheit des hFKBP12s ist die Anfangsgeschwindigkeit der Phosphorylierung im Vergleich zur isomerasefreien Kontrolle um das 4.5fache erhöht (**Abb.**

3.3 A). Bei Zugabe von hFKBP12 wird das *cis/trans*-Gleichgewicht schon während der Vorinkubation eingestellt, d.h. durch hFKBP12 werden 100 % *cis*-Isomer sehr schnell in ein Gemisch aus 83,5 % *trans*- und 16,5 % *cis*-Isomer umgewandelt. Dabei gleicht die Phosphorylierungsgeschwindigkeit in Gegenwart der PPIase derjenigen Geschwindigkeit, die mit einem Ansatz nach vollständiger Gleichgewichtseinstellung erreicht wird.

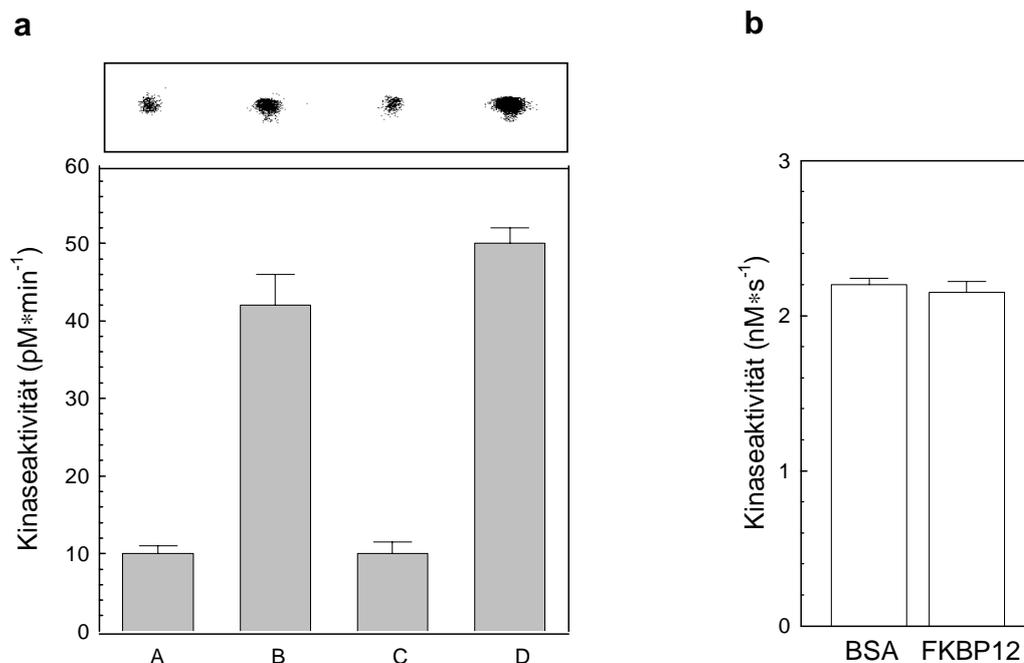


Abb. 3.3 Einfluss der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase hFKBP12 auf die ERK2-katalysierte Phosphorylierung des Peptids Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np

(a) Das *cis*-Isomer des Peptids Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np wurde mit 80 nM ERK2 (A) in Abwesenheit, (B) in Gegenwart der PPIase und (C) in Anwesenheit von hFKBP12 und seinen spezifischen Inhibitor FK506 phosphoryliert. (D) Die Phosphorylierungsgeschwindigkeit wurde mit einem, nach 30minütiger Inkubation bei 0 °C, vollständig äquilibrierten Ansatz gemessen.

(b) 1 mM Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np wurden in 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.5 mM ATP, 2 mM DTT, 10 mM MgCl₂ bei 30 °C in Gegenwart von 500 nM BSA oder hFKBP12 mit 24 nM ERK2 inkubiert. Nach drei verschiedenen Zeiten wurden Aliquote abgestoppt und mittels HPLC analysiert. Die Auswertung erfolgte wie unter Abs. 2.6. beschrieben.

Der beobachtete Effekt des hFKBP12 wird durch den spezifischen Inhibitor FK506 vollständig verhindert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen bestätigen die eindeutige Bevorzugung des *trans*-Isomers durch die ERK2.

Um zu überprüfen, ob der Einfluss des hFKBP12 auf die Phosphorylierung ausschließlich auf die Isomerisierung des Substrats und damit auf die Bereitstellung einer höheren Substratkonzentration zurückzuführen ist und nicht auf einer direkten Aktivierung der ERK2 beruht, wurde die Kinaseaktivität in Gegenwart der PPIase gegenüber dem äquilibrierten

Peptid Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np gemessen. Da die Phosphorylierungsgeschwindigkeiten in An- und Abwesenheit des hFKBP12s etwa gleich groß waren (**Abb. 3.3 B**), kann eine Beeinflussung der ERK2 durch die PPIase ausgeschlossen werden.

3.1.3. Isomerspezifität der Serin/Threonin-Kinase Cdc2/Cyclin B

Zur Aufklärung der Isomerspezifität der prolinspezifischen Ser/Thr-Kinase Cdc2/Cyclin B wurde ein neuer Test unter Verwendung des disulfidverbrückten, intern gequenchten fluorogenen Peptidsubstrats $\text{Abz-Cys-Ser-Pro-Arg-Cys-Nty-NH}_2$ entwickelt. Da bei diesem disulfidverbrückten Peptid der allgemeinen Form $\text{-Cys-Xaa-Pro-Xaa-Cys-}$ die Ser-Pro-Bindung zu annähernd 100 % in der *cis*-Konformation vorliegt, existieren für die Untersuchungen der Isomerspezifität jeweils einheitliche Ausgangsbedingungen. Nach Spaltung der Disulfidbrücke mittels DTT isomerisiert das Peptid bis zur Einstellung des *cis/trans*-Gleichgewichts. Dabei konnte eine Abhängigkeit der Isomerisierungsgeschwindigkeit von der verwendeten DTT-Konzentration beobachtet werden (**Abb. 3.4**). Für die nachfolgenden Untersuchungen der Isomerspezifität wurde ein 100facher Überschuss an DTT gegenüber dem Substrat eingesetzt, da höhere Konzentrationen an Reduktionsmittel zu einer teilweisen Inhibierung der Cdc2/Cyclin B führten.

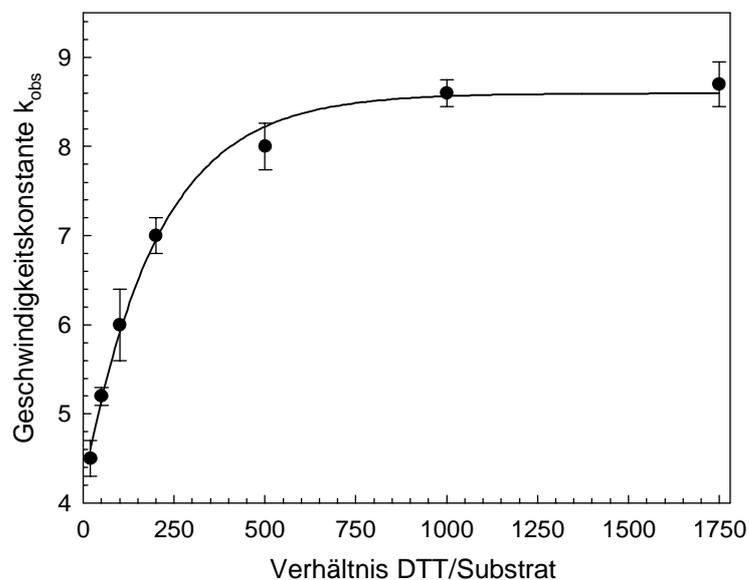


Abb. 3.4 Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante k_{obs} der *cis/trans*-Isomerisierung vom eingesetzten DTT/Substrat-Verhältnis.

Das DTT wurde in einem 50-2000fachen Überschuss gegenüber dem Substrat eingesetzt. Die Experimente wurden wie im Abs. 2.3.3. beschrieben bei 10 °C durchgeführt. Die Konstanten wurden durch Anpassung der Messkurven nach einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung bestimmt.

Die Messung der Geschwindigkeitskonstante k_{obs} der *cis/trans*-Isomerisierung wurde über die Änderung der Fluoreszenz bei 420 nm nach einer Anregung bei 320 nm verfolgt (**Abb. 3.5**), da das eingesetzte intern gequenchte Peptidsubstrat am N-Terminus einen 2-Aminobenzoesäure-Rest als Fluorophor und am C-Terminus ein 3-Nitrotyrosin-Rest als fluoreszenzlöschende Gruppe (Quencher) besitzt. Somit ist die Fluoreszenzausbeute im geschlossenen Zustand der Disulfidbindung deutlich verringert. Nach Spaltung der Disulfidbindung und anschließender Prolylisomerisierung kommt es durch den Wegfall des fluoreszenzlöschenden Effekts zu einer deutlichen Signalerhöhung als Folge der Vergrößerung des räumlichen Abstands zwischen Fluorophor und Quencher beim *trans*-Isomer. Die Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} der *cis/trans*-Isomerisierung ergab bei einem 100fachen Überschuss des DTT gegenüber dem Substrat und 2 °C einen Wert von $3.75 \pm 0.2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

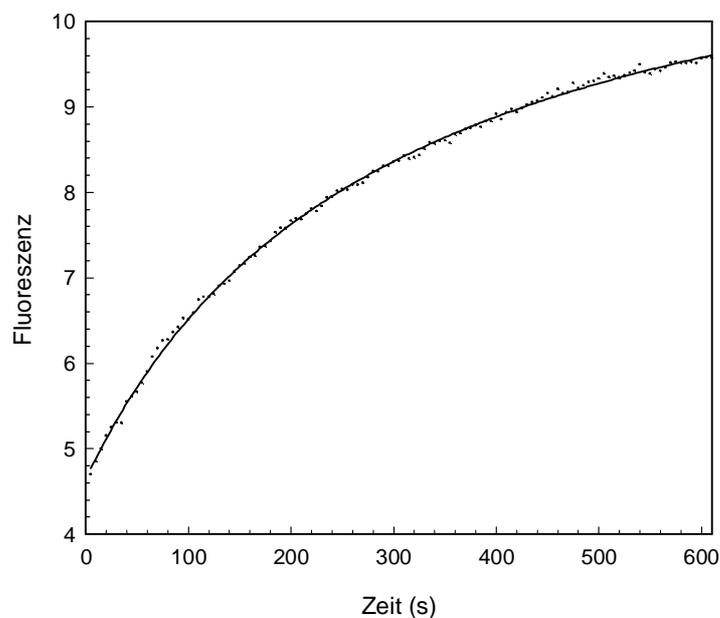


Abb. 3.5 Prolylisomerisierung des intern gequenchten Fluoreszenzsubstrates Abz-Cys-Ser-Pro-Arg-Cys-Nty-NH₂ nach Aufspaltung der Disulfidbrücke bei 2 °C.

Die Reaktion wurde durch Zugabe einer 10 mM Stammlösung des Peptids zu einer Dithiothreitol-Lösung (10 mM in sterilfiltriertem 25 mM Tris/HCl-Puffer) gestartet. Die Peptidkonzentration im Ansatz betrug 100 µM. Nach Anregung bei 320 nm wurde die Fluoreszenzänderung bei 420 nm an einem F3010-Fluoreszenzspektrometer detektiert.

Zur Untersuchung der Isomerspezifität der prolinspezifischen Ser/Thr Kinase Cdc2/Cyclin B wurde das intern gequenchte fluorogene Peptidsubstrat Abz-Cys-Ser-Pro-Arg-Cys-Nty-NH₂ verwendet. Obwohl dieses Peptid nicht die optimale Konsensussequenz (-Ser/Thr-Pro-Xaa-Lys/Arg-) für die Erkennung durch die Cdc2 Kinase enthält, konnten genügend hohe

Phosphorylungsausbeuten erzielt werden. Die Bestimmung der katalytischen Konstanten für die Phosphorylierung ergab einen k_{cat} -Wert von $0.5 \pm 0.05 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und einen K_M -Wert von $200 \pm 10 \text{ } \mu\text{M}$ bei 2°C .

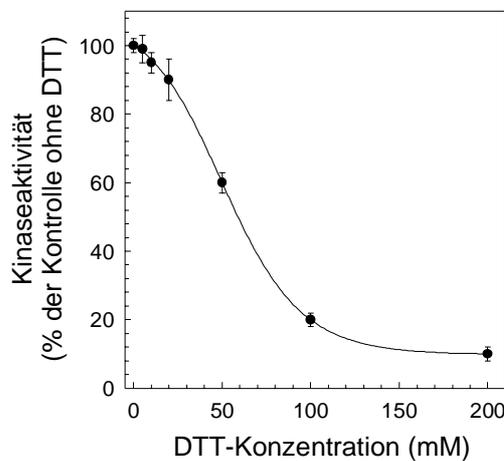


Abb. 3.6 Untersuchung der Abhängigkeit der Enzymaktivität der Cdc2/Cyclin B von der eingesetzten DTT-Konzentration

Histon H1 ($50 \text{ } \mu\text{M}$) wurde in 50 mM Tris/HCl pH 7.5, $1\text{-}200 \text{ mM}$ DTT, $500 \text{ } \mu\text{M}$ [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] ATP (1 Ci/mmol), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA mit 10 nM Cdc2/Cyclin B bei 30°C 10 min phosphoryliert. Die Ansätze wurden mittels SDS-Page getrennt. Die Detektion des phosphorylierten Histons erfolgte durch Autoradiographie.

Um die Isomerisierungsgeschwindigkeit so weit wie möglich zu verlangsamen, erfolgten alle Experimente zur Untersuchung der *cis/trans*-Isomerspezifität der Cdc2/Cyclin B bei 2°C . Die Reaktion wurde durch Spaltung der Disulfidbrücke des Peptids mittels eines 100fachen Überschusses von DTT gestartet. Die Peptidkonzentration wurde so gewählt, dass die DTT-Konzentration im Phosphorylierungsansatz 20 mM nicht übersteigt. Höhere Konzentration von DTT führten zu einer deutlichen Inhibierung der Kinaseaktivität (**Abb. 3.6**).

Während der *cis/trans*-Isomerisierung des geöffneten Peptids wurden zu verschiedenen Zeiten Aliquote entnommen und mit Cdc2/Cyclin B in Anwesenheit von radioaktiv markiertem ATP phosphoryliert. Die Phosphorylierungsansätze wurden wie im Abs. 2.3.2. beschrieben dünn-schichtchromatographisch getrennt und ausgewertet. Dabei konnte eine Zunahme der Phosphorylierungsgeschwindigkeiten im Verlauf der *cis/trans*-Isomerisierung (**Abb. 3.7**), das heißt mit steigendem *trans*-Isomeranteil des Peptids, beobachtet werden. Die Auftragung der gemessenen Enzymaktivitäten gegen die Isomerisierungszeit wurde nach einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung angepasst. Die berechnete Geschwindigkeitskonstante von $3.8 \pm 0.2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ist identisch zur direkt gemessenen Konstante für die *cis/trans*-Isomerisierung. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen weisen auf eine Spezifität der Cdc2/Cyclin B Kinase für das *trans*-Isomer hin.

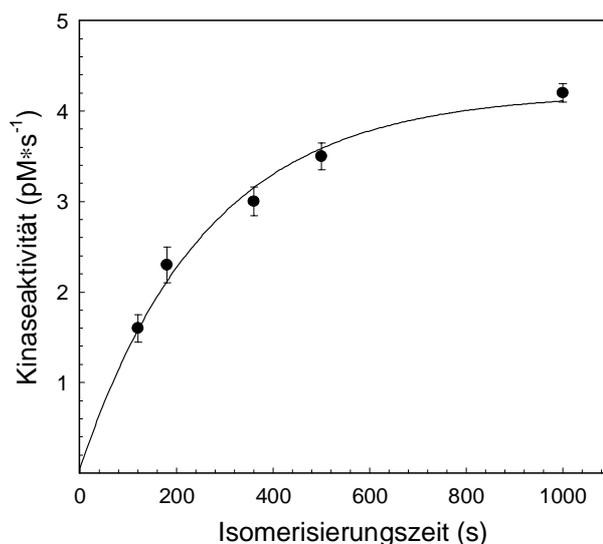


Abb. 3.7 Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der Phosphorylierung von der Isomerenzusammensetzung des Peptidsubstrates Abz-Cys-Ser-Pro-Arg-Cys-Nty-NH₂.

Die Disulfidbrücke des Peptidsubstrats wurde durch einen 100fachen Überschuss an DTT geöffnet. Während der folgenden Einstellung des *cis/trans*-Gleichgewichts wurden zu verschiedenen Zeiten Aliquote entnommen und mit der Ser/Thr-Kinase Cdc2/Cyclin B bei 2 °C phosphoryliert. Die Ansätze wurden wie im Abs. 2.3.2. beschrieben dünn-schichtchromatographisch getrennt und ausgewertet. Die Messwerte wurden nach einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung angepasst.

3.1.5. Einfluss von Cyclophilin18 auf die Phosphorylierung des Peptidsubstrates

Die Einstellung des *cis/trans*-Gleichgewichts des Peptidsubstrates Abz-Cys-Ser-Pro-Arg-Cys-Nty-NH₂ wurde durch die humane PPIase Cyclophilin18 (Cyp18) am effektivsten beschleunigt.

Um den Einfluss der PPIase-Katalyse auf die Phosphorylierung zu untersuchen, wurde das Peptid nach Öffnung der Disulfidbrücke mittels DTT 1 min mit Cyp18 vorinkubiert und anschließend in Gegenwart von [γ -³²P]ATP für 4 min phosphoryliert. Wie in der **Abb. 3.8** dargestellt, ist die Phosphorylierungsgeschwindigkeit in Gegenwart der Isomerase im Vergleich zum Kontrollversuch ohne Cyp18 deutlich erhöht. Durch 30minütige Vorinkubation des Cyp18 mit dem spezifischen Inhibitor Cyclosporin A (CsA) wird der Effekt vollständig unterdrückt.

Da die PPIase zu einer beschleunigten Einstellung des *cis/trans*-Gleichgewichts und damit zu einem erhöhten *trans*-Isomeranteil führt, ist die Steigerung der enzymatischen Aktivität der Cdc2/Cyclin B in Gegenwart des Cyp18 ausschließlich auf eine Bevorzugung des *trans*-Isomers zurückzuführen.

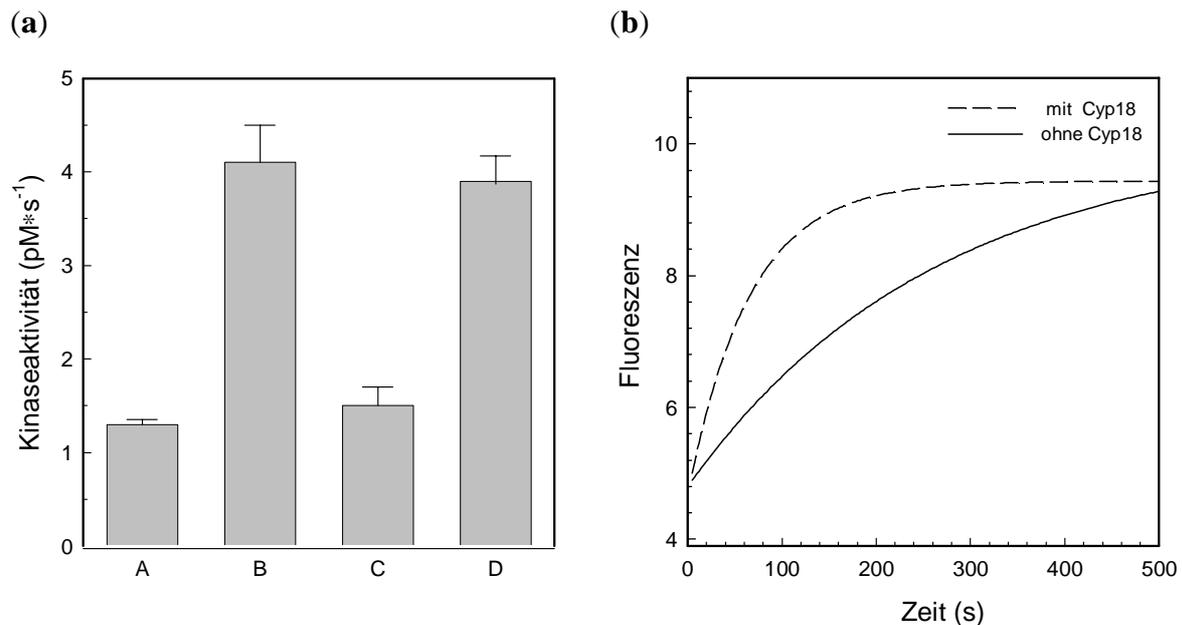


Abb. 3.8 Einfluss der humanen Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase Cyclophilin18 auf die Phosphorylierung des Peptids Abz-Cys-Ser-Pro-Arg-Cys-Nty-NH₂ nach erfolgter Öffnung der Disulfidbrücke

(a) Das Peptidsubstrat wurde unmittelbar nach Öffnung der Disulfidbrücke (A) in Abwesenheit, (B) in Gegenwart der PPIase (1 μ M) und (C) mit Cyp18 und dem spezifischen Inhibitor CsA (40 μ M) phosphoryliert. Als Kontrolle diente ein Phosphorylierungsansatz mit vollständig äquilibrierten Peptid (D).

(b) Beschleunigung der *cis/trans*-Isomerisierung von Abz-Cys-Ser-Pro-Arg-Cys-Nty-NH₂ durch 1 μ M Cyp18. Die Messung erfolgte wie unter 2.3.3. beschrieben bei 2 °C.

3.2. Untersuchungen zur Phosphorylierung der Ribonuklease T1

3.2.1. RNase T1 als Modellprotein zur Untersuchung der Isomerspezifität

Durch Untersuchungen mit dem Oligopeptidsubstrat Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np konnte, wie in Abs. 3.1 beschrieben, eine Selektivität der Mitogen-aktivierten Proteinkinase ERK2 für das *trans*-Isomer nachgewiesen werden.

In Proteinen wird ein relativ hoher Anteil (>5 %) von Ser/Thr-Pro-Bindungen in der *cis*-Konformation gefunden (Reimer et al., 1997). Deshalb wurde in weiteren Experimenten überprüft, ob die mit Peptiden gefundene Isomerspezifität auch für die Phosphorylierung von Proteinsubstraten gilt. Des weiteren wurde der Einfluss von PPIasen auf die Phosphorylierung von Proteinen untersucht.

Da für die meisten der zur Zeit bekannten natürlichen MAP-Kinase-Substrate die Konformation der Phosphorylierungsstellen nicht bekannt ist, wurde eine Strukturdatenbanksuche nach Proteinen, die Serin/Threonin-Prolin-Bindungen in der *cis*-Konformation enthalten, durchgeführt. Zu den etwa 100 Treffern der Suche gehörten u.a. die Ribonuklease T1, die Reverse Transkriptase aus HIV, die Carboanhydrase II, das Insulin sowie das Cholera- und das Cobratoxin. Für keines der gefundenen 100 Proteine wurde bis jetzt eine Phosphorylierung durch Proteinkinasen untersucht oder in der Literatur beschrieben.

Da die RNase T1 und einige ihrer Varianten in der Arbeitsgruppe vorhanden waren, wurde sie als Modellprotein für weitere Untersuchungen verwendet.

Die ursprünglich aus Takadiastase, einer aus dem Kulturfiltrat des *Aspergillus oryzae* gewonnenen Fraktion, isolierte RNase T1 ist ein kleines globuläres Protein aus 104 Aminosäuren ($M_r = 11085$ Da). Sie besitzt zwei potentielle Phosphorylierungsstellen für prolinspezifische Proteinkinasen: die Serin⁵⁴-Prolin⁵⁵-Bindung in der *cis*-Konformation und die Serin⁷²-Prolin⁷³-Bindung in der *trans*-Konformation.

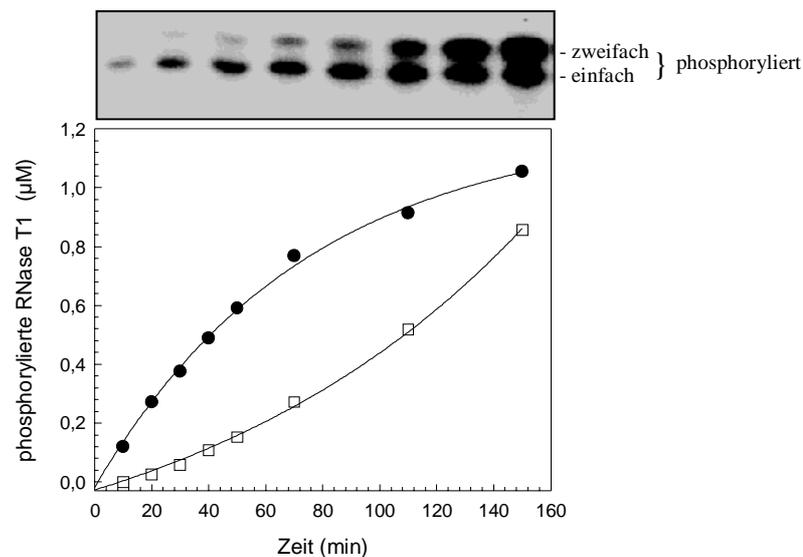


Abb. 3.9 Zeitverlauf der ERK2-katalysierten Phosphorylierung der RNase T1

25 µM RNase wurden bei 30 °C in Gegenwart von 50 nM ERK2, 300 µM [γ -³²P] ATP (10 Ci/mmol) phosphoryliert. Nach mehreren Zeiten wurden Proben entnommen und mit SDS-Probenpuffer abgestoppt und wie in Abs.2.4.4. beschrieben getrennt und analysiert.

Es ist die einfach (●) und zweifach (□) phosphorylierte RNase T1 dargestellt. Oben ist die Autoradiographie des SDS-Gels dargestellt. Die untere Bande entspricht der einfach und die obere Bande der zweifach phosphorylierten RNase T1.

3.2.2. Nachweis der ERK2-katalysierten Phosphorylierung der RNase T1

Schon die ersten Vorversuche zeigten, dass die RNase T1 durch die MAP-Kinase ERK2 phosphoryliert werden kann. Die Autoradiographie der Trennung der Phosphorylierungsansätze mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigte zwei radioaktiv markierte RNase T1-Banden (**Abb. 3.9**). Beide Banden waren zu einem jeweils höheren Molekulargewicht gegenüber der unphosphorylierten RNase T1, die mittels Silberfärbung sichtbar gemacht wurde, verschoben. Dabei entspricht die untere Bande der einfach phosphorylierten und die obere Bande der zweifach phosphorylierten RNase T1.

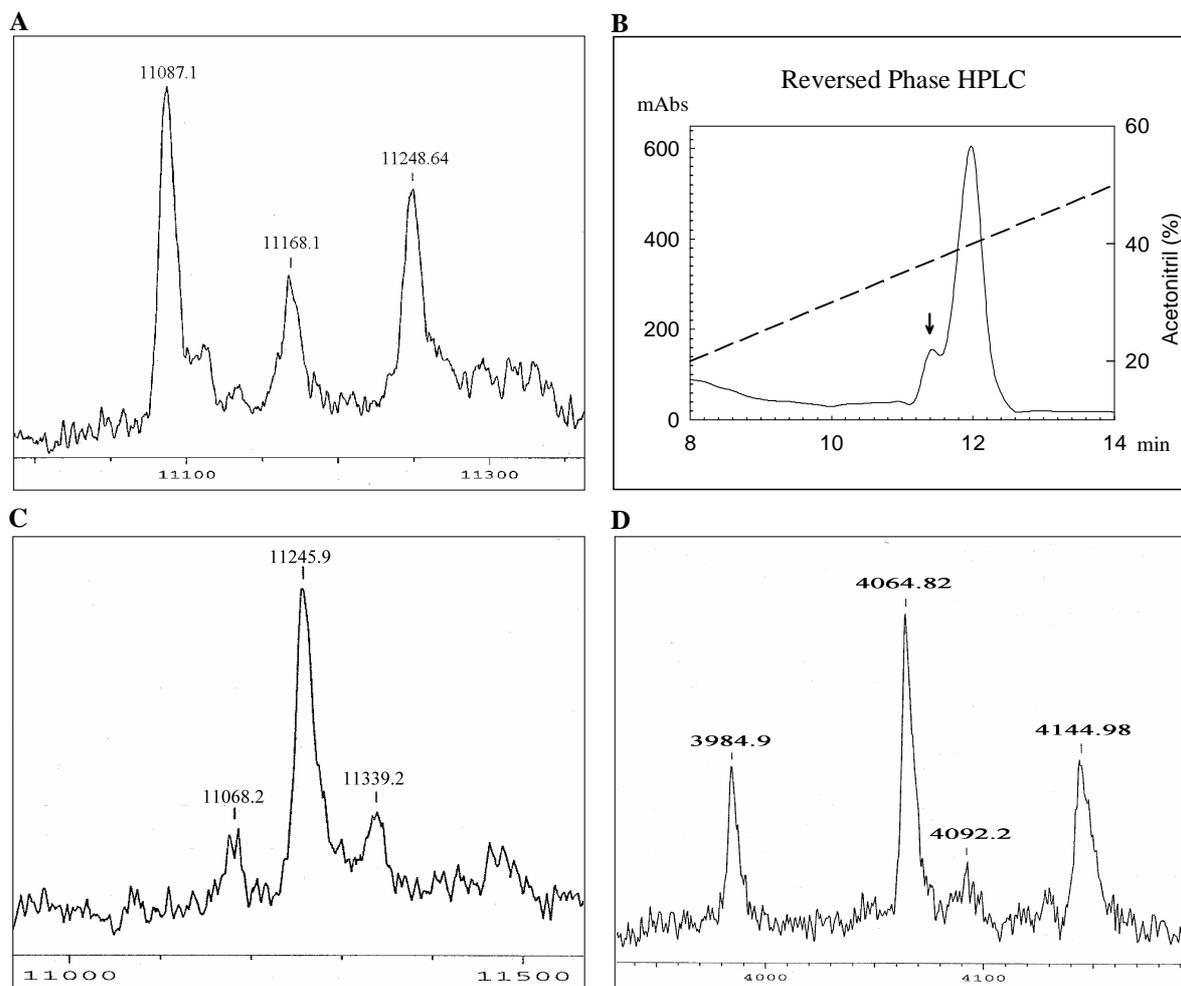


Abb. 3.10 Identifizierung der Phosphorylierungsstellen

(A) MALDI-Massenspektrum eines Phosphorylierungsansatz (500 μ M RNase T1 mit 500 nM ERK2 in 50 mM Tris/HCl pH 7.5 6h bei 30 $^{\circ}$ C phosphoryliert)

(B) Trennung des Phosphorylierungsansatzes mittels HPLC wie unter 2.4.3 beschrieben. (Die phosphorylierte RNase T1 ist mit einem Pfeil markiert)

(C) MALDI-Massenspektrum der abgetrennten hauptsächlich zweifach phosphorylierten RNase T1.

(D) Tryptischer Verdau der abgetrennten phosphorylierten RNase T1. Die molaren Massen 4086, 4166 und 4246 entsprechen den unphosphorylierten sowie den einfach und zweifach phosphorylierten Peptid YNNYEGFDFSVSSPYIEWPILSSGDVYSGGSPGADR

Zur genauen Identifizierung der Phosphorylierungsstellen wurden die Phosphorylierungsansätze durch RP-HPLC entsalzt und nachfolgend einem tryptischen Verdau unterzogen. Das erhaltene zweifach phosphorylierte Hydrolyse-Produkt YNNYEGFDFSVSSPYYEWPISSGDVYSSGGSPGADR wurde durch RP-HPLC isoliert und anschließend mittels α -Chymotrypsin proteolytisch verdaut (**Abb. 3.10**). Die beiden entstandenen Peptide YNNYEGFDFSVSSPYYEWPISSGDVY und SGGSPGADR wurden mittels RP-HPLC getrennt und durch massenspektrometrische Fragmentierung untersucht.

Die massenspektrometrische Analyse ergab, dass die RNase T1 an beiden Erkennungssequenzen für prolinspezifische Kinasen phosphoryliert vorliegt. Das heißt, die RNase T1 wurde sowohl an der Serin⁵⁴-Prolin⁵⁵-Bindung in der *cis*-Konformation als auch an der Serin⁷²-Prolin⁷³-Bindung in der *trans*-Konformation durch die ERK2 phosphoryliert.

3.2.3. Einfluss der Disulfidbrücken auf die Phosphorylierung der RNase T1

Zur Optimierung der Phosphorylierung wurden verschiedene Reaktionsbedingungen getestet. Dabei konnte festgestellt werden, dass in Gegenwart der reduzierenden Verbindung DTT (20 mM) die Phosphorylierungsgeschwindigkeit um einen Faktor von 20 erhöht ist (**Abb. 3.11**).

Die RNase T1 besitzt zwei Disulfidbrücken, welche im gefalteten Protein eng benachbart sind. Die Cys²-Cys¹⁰-Bindung ist dem Lösungsmittel zu etwa 90% zugänglich, während die Cys⁶-Cys¹⁰³-Bindung vollständig im Inneren verborgen liegt. Das DTT bewirkt wahrscheinlich eine Reduktion der Cys²-Cys¹⁰-Bindung, in deren Folge die Flexibilität der RNase T1 zunimmt und sich damit auch die Zugänglichkeit der Phosphorylierungsstellen für die Kinase verbessert. Der Einfluss der Disulfidbrücken auf die Substrateigenschaften wurde auch für die carboxymethylierte RNase T1-wt (RCM-wt-T1) untersucht.

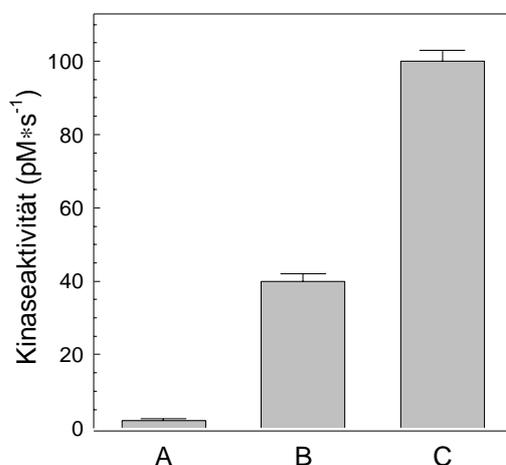


Abb. 3.11 Einfluss von DTT und S-Carboxymethylierung auf die Phosphorylierung der RNase T1

Die Phosphorylierung wurde mit 25 μ M RNase T1 (A) in Abwesenheit, (B) in Gegenwart von 20 mM DTT sowie (C) mit 25 μ M zurückgefalteter carboxymethylierter RNase T1 wie unter Abs. 2.4.4. beschrieben durchgeführt. Es wurde jeweils die Bande der einfach phosphorylierten RNase ausgewertet.

Die S-carboxymethylierte Form liegt unter Niedrigsalzbedingungen (100 mM Tris/HCl pH 8.0) vollständig entfaltet vor. Durch Zugabe von 2M NaCl kann die RCM-wt-T1 zurückgefaltet werden. Die Phosphorylierungsgeschwindigkeit mit der zurückgefalteten RCM-wt-T1 als Substrat war um etwa das 50fache gegenüber der unbehandelten RNase T1 gesteigert (**Abb. 3.11**).

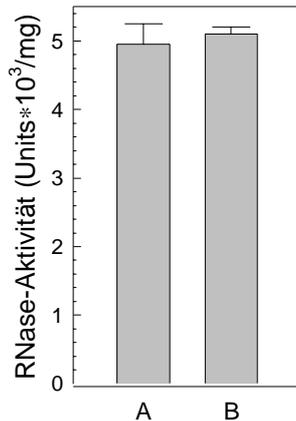


Abb. 3.12 Bestimmung der RNase-Aktivität in An- und Abwesenheit von DTT

Die Messung der RNase-Aktivität erfolgte (A) in Abwesenheit und (B) in Gegenwart von 25 mM DTT wie unter Abs. 2.7. beschrieben.

Um Hinweise auf mögliche strukturelle Veränderungen der mit DTT behandelten RNase T1 zu erhalten, wurde in den folgenden Untersuchungen getestet, ob die Laufeigenschaften in der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese sowie die Aktivität der RNase T1 durch die Zugabe von DTT verändert werden können. Die gegenüber hochmolekularer Hefe-RNA gemessene RNase T1-Aktivität wurde durch DTT-Konzentrationen bis zu 25 mM nicht beeinflusst (**Abb. 3.12**).

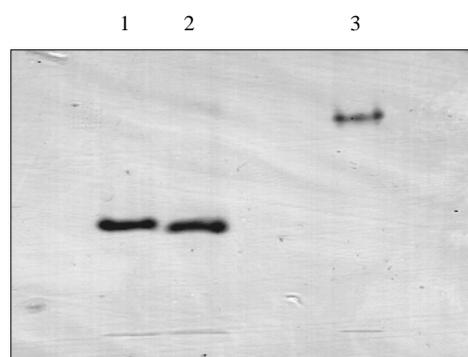


Abb. 3.13 Einfluss von DTT auf die Laufeigenschaften der RNase T1 im nativen Gel.

Die native Gelelektrophorese wurde wie unter 2.2.2. beschrieben mit einem 12.5 %-igen Gel bei einer konstanten Stromstärke von 12 mA durchgeführt. Die RNase T1 (5 µg) wurde vor dem Auftragen auf das Gel in An- und Abwesenheit (Bahn 2 bzw. 1) von 20 mM DTT für 15 min bei 30 °C inkubiert. Die Bahn 3 enthielt entfaltete S-carboxymethylierte RNase T1 (2 µg). Die Detektion der Proteine erfolgte durch Coomassie-Blau Färbung.

Die Laufeigenschaften der mit DTT behandelten RNase T1 im nativen Polyacrylamid-Gel waren im Vergleich zu einer unbehandelten Probe unverändert. Die vollständig entfaltet vorliegende S-carboxymethylierte RNase T1 läuft dagegen bei einem deutlich höheren Molekulargewicht (**Abb. 3.13**).

Alle weiteren Untersuchungen zur Phosphorylierung der RNase T1 wurden in Gegenwart von 20 mM DTT vorgenommen.

Zur Bestimmung der Stöchiometrie der Phosphorylierungsreaktion wurde die RNase T1 10 Stunden unter kontinuierlichem Schütteln bei 30 °C mit der ERK2 in Anwesenheit von radioaktiv markiertem ATP inkubiert. Um eine Enzymaktivierung sowie eine Autohydrolyse des ATP während der langen Inkubationszeit ausschließen zu können, wurde jeweils nach 5 und 10 Stunden neue Kinase bzw. neues ATP zugegeben. Nach etwa 10 Stunden konnte keine zusätzliche Phosphorylierung mehr erzielt werden.

Die ermittelte Phosphorylierungsstöchiometrie betrug etwa 0.4 mol Phosphat je mol RNase T1. Das entspricht einem Phosphorylierungsgrad von ca. 20 % bezogen auf beide Phosphorylierungsstellen.

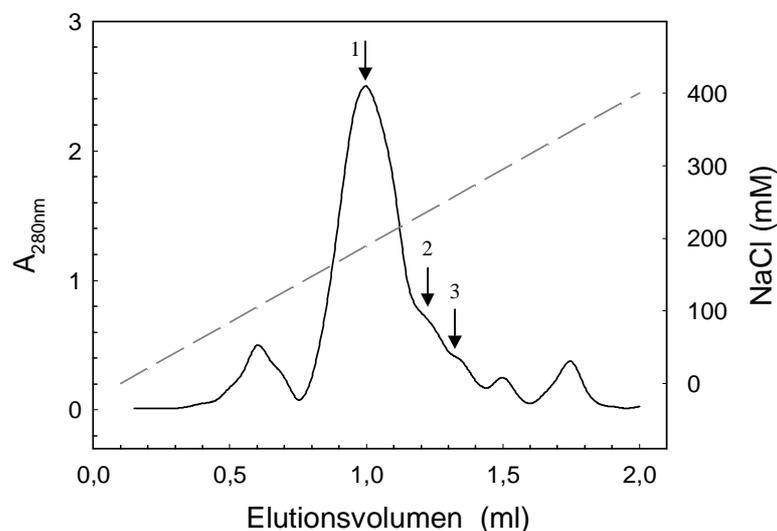


Abb. 3.14 Elutionsprofil der Trennung eines RNase T1-Phosphorylierungsansatzes mittels Anionenaustausch-Chromatographie.

Die Elution der RNase T1 erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten (0-400 mM NaCl, 2ml, 50 min) bei 10 °C. Die eingezeichneten Pfeile entsprechen den Elutionsvolumina der unphosphorylierten (1), der einfach (2) und der zweifach (3) phosphorylierten RNase T1-wt. Die Detektion der Proteine erfolgte durch 17.5 %ige SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung.

Um zu untersuchen, ob der geringe Phosphorylierungsgrad auf einer Produkthemmung oder auf einer nicht phosphorylierbaren Form der RNase T1 beruht, wurde der über 10 Stunden phosphorylierte Ansatz mittels Anionenaustausch-Chromatographie an einer MonoQ-Säule

am SMART-System getrennt. Dabei konnte die unphosphorylierte RNase T1 von der einfach und zweifach phosphorylierten abgetrennt werden (**Abb. 3.14**).

Die abgetrennte unphosphorylierte RNase T1 konnte mit ERK2 phosphoryliert werden (**Abb. 3.15**). Die Phosphorylierungsgeschwindigkeit mit der durch Anionenaustausch-Chromatographie getrennten RNase T1 als Substrat sowie die Ribonuklease-Aktivität waren um etwa 25 % gegenüber einer noch unbehandelten RNase-Probe vermindert. Untersuchungen mit reiner phosphorylierter RNase T1 konnten nicht durchgeführt werden, da diese Fraktionen noch einen 50 %igen Anteil an unphosphoryliertem Protein enthielten.

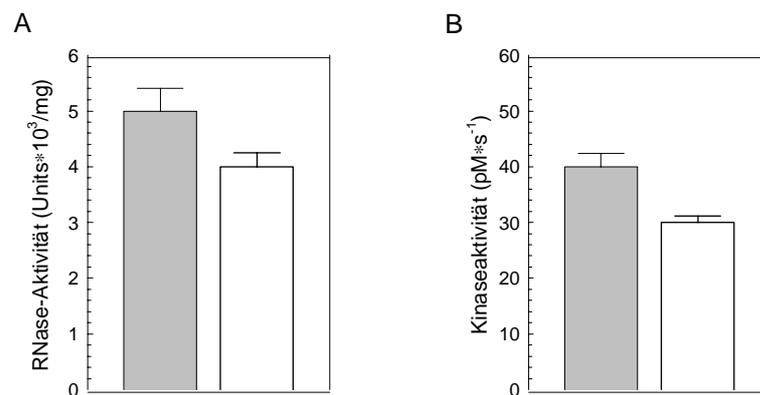


Abb. 3.15 Vergleich der RNase T1-Ausgangsprobe (graue Balken) mit der aus dem Phosphorylierungsansatz abgetrennten unphosphorylierten RNase T1 (weiße Balken).

(A) Vergleich der RNase-Aktivität. Die Aktivität der RNase T1 wurde wie unter Abs. 2.7. beschrieben bestimmt. Die Konzentration der RNase T1 im Messansatz betrug jeweils 10 nM.

(B) Vergleich der ERK2-katalysierten Phosphorylierung der beiden RNase T1-Proben. Die Kinaseaktivität wurde bei einer RNase T1-Konzentration von jeweils 1 µM bestimmt.

In weiteren Experimenten wurde die Abhängigkeit des Phosphorylierungsgrads von der eingesetzten RNase T1-Konzentration untersucht. Dazu wurde die RNase T1 wie oben beschrieben 10 Stunden mit der MAP-Kinase ERK2 phosphoryliert.

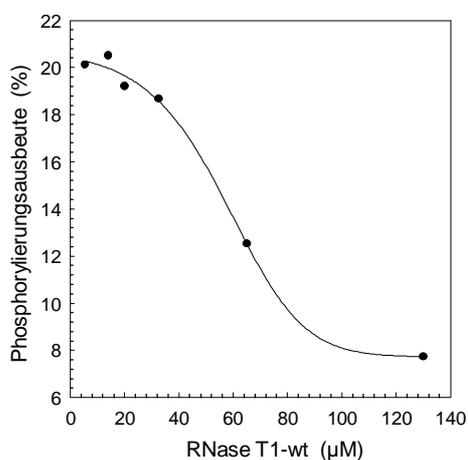


Abb. 3.16 Abhängigkeit der maximal erreichbaren Phosphorylierung von der eingesetzten Substratkonzentration

Die RNase T1 wurde 10 Stunden bei 30 °C mit ERK2 phosphoryliert. Nach dieser Zeitdauer wurde keine zusätzliche Phosphorylierung mehr erreicht. Zur Auswertung wurde der Gesamt-Phosphat einbau aus der Summe der beiden RNase T1-Banden berechnet.

Wie in **Abb. 3.16** zu sehen ist, nimmt die Phosphorylierungsausbeute mit steigender RNase T1-Ausgangskonzentration ab. Während bei dem Einsatz von 5 μM Substrat noch ein Phosphorylierungsgrad von über 20 % beobachtet wird, kann mit 130 μM RNase T1 nur noch eine Ausbeute von 8 % erreicht werden.

Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass der geringe Phosphorylierungsgrad auf eine Produkthemmung zurückzuführen ist.

3.2.5. Kinetische Charakterisierung der RNase T1-Phosphorylierung

3.2.5.1. Untersuchungen zur Phosphorylierung der RNase T1-Varianten

Die RNase T1-wt wird an den beiden Phosphorylierungsstellen für prolinspezifische Proteinkinasen phosphoryliert (Abs.3.2.2.). In der gefalteten RNase T1-wt befindet sich die Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung in der *cis*-Konformation und die Ser⁷²-Pro⁷³-Bindung in der *trans*-Konformation (Pace et al., 1991). Zur weiteren Charakterisierung der durch die MAP-Kinase katalysierten RNase T1-Phosphorylierung wurden auch die Varianten untersucht, in denen jeweils eine Phosphorylierungsstelle eliminiert worden ist.

In der S54G/P55N-Variante ist das Serin durch ein Glycin und das Prolin durch ein Asparagin ausgetauscht worden. Diese Mutante besitzt nur noch die Ser⁷²-Pro⁷³-Bindung in der *trans*-Konformation. Die Struktur und Stabilität dieser Variante sind fast identisch mit der RNase T1-wt (Kiefhaber et al., 1990a). Die zweite Mutante P73V, in der das Prolin⁷³ gegen ein Valin ersetzt worden ist, kann nur noch an der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung in der *cis*-Konformation phosphoryliert werden, da an der Serin⁷²-Phosphorylierungsstelle die minimale Konsensussequenz für prolinspezifische Kinasen (-Ser-Pro-) nicht mehr besteht.. Diese Variante ist um etwa 8.5 kJ/mol destabilisiert und zeigt eine um 60 % reduzierte RNase T1-Aktivität gegenüber Hefe-RNA (Schindler et al., 1996).

Beide Varianten werden nur noch einfach durch die ERK2 phosphoryliert. Die Autoradiographie des SDS-Gels zeigt jeweils nur eine phosphorylierte Bande (**Abb. 3.17**). Die beiden einfach phosphorylierten Formen laufen im SDS-Gel bei gleichem Molekulargewicht und können im Fall der RNase T1-Wildtyp nicht unterschieden werden. Auch durch Massenspektrometrie konnten nur einfach phosphorylierte Formen detektiert werden.

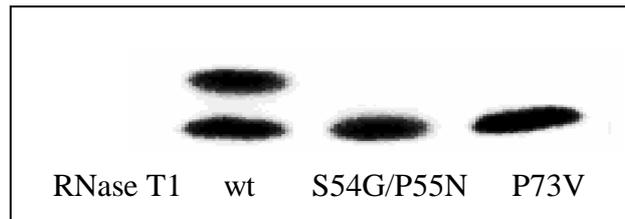


Abb. 3.17 Autoradiographie eines SDS-Gels mit den drei phosphorylierten RNase T1-Varianten. Die RNase T1-wt wird an den Resten Ser⁵⁴ und Ser⁷² phosphoryliert. Die untere Bande entspricht der einfach phosphorylierten und die obere der zweifach phosphorylierten Form. Die S54G/P55N- und die P73V-Variante werden durch die ERK2 nur noch einfach phosphoryliert. Die beiden einfach phosphorylierten Formen laufen im SDS-Gel auf einer Höhe und können im Fall des Wildtyp-Proteins nicht unterschieden werden.

3.2.5.2. Bestimmung der kinetischen Konstanten der Phosphorylierung

Sowohl für die drei RNase T1-Varianten als auch für die S-carboxymethylierte RNase T1-wt (RCM-wt-T1) wurden die katalytischen Konstanten der Phosphorylierung ermittelt. Die RCM-wt-T1 liegt unter den verwendeten Phosphorylierungsbedingungen vollständig entfaltet vor.

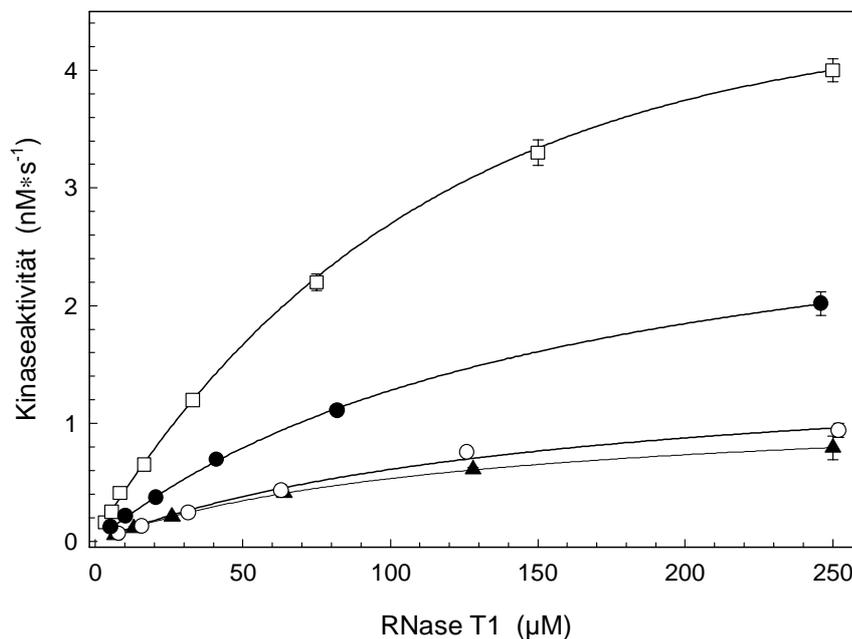


Abb. 3.18 v/S Charakteristiken für verschiedene RNase T1-Varianten

Die Phosphorylierung wurde mit 50 nM ERK2 wie im Abs. 2.4.4. beschrieben durchgeführt und anschließend detektiert. Die Kinaseaktivität der ERK2 wurde gegenüber der S-carboxymethylierten RNase T1-wt (RCM-wt-T1) (□), der RNase T1-P73V-Variante (●), der RNase T1-S54G/P55N-Variante (○) und der RNase T1-wt (▲) bestimmt. Es wurden jeweils die Banden der einfach phosphorylierten Formen ausgewertet.

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten K_M und V_{max} wurden die Phosphorylierungsgeschwindigkeiten bei mindestens sechs RNase T1-Konzentrationen im Bereich von 0.5 bis 250 μM gemessen. Die Anfangsanstiege wurden durch lineare Regression ermittelt. Um einen linearen Zusammenhang zu gewährleisten, wurden die Phosphorylierungszeiten so gewählt, dass nicht mehr als 5 % des Substrates phosphoryliert werden konnten. Die kinetischen Konstanten wurden anschließend mittels Lineweaver-Burk-Darstellung durch lineare Regression ermittelt.

Wie in **Abb. 3.18** und **Tab. 1** gezeigt wird, stellt die ungefaltete S-carboxymethylierte RNase T1 das beste Substrat für die prolinspezifische MAP-Kinase ERK2 dar. Sie wird mit einer 5fach höheren katalytischen Effizienz (k_{cat}/K_M) als die native RNase T1-Wildtyp phosphoryliert. Die mit der RNase T1-S54G/P55N-Variante und dem Wildtyp-Protein gemessenen k_{cat}/K_M -Werte waren in vergleichbarer Größe. Dagegen war die katalytische Effizienz der MAP-Kinase gegenüber der RNase T1-P73V-Variante, die nur noch die Phosphorylierungsstelle in der *cis*-Konformation besitzt, 2.5fach erhöht im Vergleich zum Wildtyp und der S54G/P55N-Variante.

Tabelle 1: Vergleich der kinetischen Konstanten der Phosphorylierung durch ERK2 für verschiedene RNase-T1-Varianten als Substrat

Substrat	K_M (M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
RCM-wt-T1	$7,75 \cdot 10^{-5}$	$1,96 \cdot 10^{-1}$	2530
RNase T1-P73V	$8,29 \cdot 10^{-5}$	$1,02 \cdot 10^{-1}$	1228
RNase T1-S54G/P55N	$2,59 \cdot 10^{-4}$	$1,10 \cdot 10^{-1}$	425
RNase T1-wt	$1,31 \cdot 10^{-4}$	$6,19 \cdot 10^{-2}$	471

Diese Ergebnisse stehen im scheinbaren Widerspruch zu der gezeigten *trans*-Isomerspezifität der ERK2, da die S54G/P55N-Variante mit der verbleibenden Phosphorylierungsstelle in der *trans*-Konformation deutlich schlechter durch die ERK2 phosphoryliert wird.

3.2.5.3. Einfluss der Sekundärbindestellen auf die Aktivität der ERK2

Für Proteinkinasen ist bekannt, dass die Aminosäurereste in unmittelbarer Nähe zur Phosphorylierungsstelle eine große Bedeutung für die Erkennung der Substrate besitzen. Weitere Experimente sollten klären, ob die höhere katalytische Effizienz der ERK2 gegenüber der P73V-Variante durch eine bessere Zugänglichkeit der Phosphorylierungsstelle für die

Kinase aufgrund sterischer Hinderungen oder durch eine Bevorzugung der Aminosäurereste an den Sekundärbindestellen zustande kommt.

Zur Untersuchung des Einflusses der zur Phosphorylierungsstelle benachbarten Aminosäurereste auf die Kinaseaktivität wurden für die aus der RNase T1 abgeleiteten Oligopeptide Ac-Val-Ser-Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Tyr-Tyr-NH₂ und Ac-Gly-Gly-Ser⁷²-Pro⁷³-Gly-Ala-NH₂ die $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte der Phosphorylierung bestimmt. Dazu wurden die Peptidsubstrate bei 30 °C mit ERK2 inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Aliquote entnommen, durch Ansäuern abgestoppt und mittels RP-HPLC analysiert. Die Kinaseaktivitäten wurden aus den Peakflächen berechnet.

Da in dem gemessenen Konzentrationsbereich (0.5-15 mM) keine Substratsättigung erreicht werden konnte, war eine Bestimmung der katalytischen Konstanten V_{max} und K_{M} allerdings nicht möglich. Der Einsatz höherer Substratkonzentration wurde durch die Löslichkeit der Peptide limitiert. Dadurch konnten nur die Spezifitätskonstanten $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ zum Vergleich der Peptidsubstrate herangezogen werden, die bei Verwendung kleiner Substratkonzentrationen ($S \ll K_{\text{M}}$) direkt aus den gemessenen Initialgeschwindigkeiten berechnet werden können.

Tab. 2: Vergleich der beiden aus den Phosphorylierungsstellen der RNase T1-wt abgeleiteten Peptidsubstrate.

Peptid	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
Ac-Val-Ser-Ser-Pro-Tyr-Tyr-NH ₂	253.6 ± 10
Ac-Gly-Gly-Ser-Pro-Gly-Ala-NH ₂	29.3 ± 1.5

Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen (**Tab. 2**) zeigten eine deutliche Bevorzugung des Peptidsubstrats Ac-Val-Ser-Ser-Pro-Tyr-Tyr-NH₂ durch die ERK2. Die Sequenz dieses Peptids entspricht der verbleibenden Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Phosphorylierungsstelle der RNase T1-P73V-Variante. Die Spezifitätskonstante war im Vergleich zu dem Substrat Ac-Gly-Gly-Ser-Pro-Gly-Ala-NH₂, welches aus der Ser⁷²-Phosphorylierungsstelle abgeleitet wurde, um etwa das Neunfache erhöht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen könnten eine Erklärung für die bevorzugte Phosphorylierung der RNase T1-P73V-Variante liefern.

3.3. Untersuchungen zur *native-state* Isomerisierung der RNase T1

3.3.1. Phosphorylierungsgeschwindigkeit ist durch Prolylisomerisierung limitiert

Die Analyse der Phosphorylierungsstellen und die Untersuchungen der RNase T1-Varianten haben gezeigt, dass die RNase T1 an den beiden Erkennungssequenzen für prolylspezifische Kinasen phosphoryliert werden kann. Das heißt, die RNase T1-wt wird sowohl an der Serin⁵⁴-Prolin⁵⁵-Bindung in der *cis*-Konformation als auch an der Serin⁷²-Prolin⁷³-Bindung in der *trans*-Konformation durch die ERK2 phosphoryliert. Dabei war die katalytische Effizienz der ERK2 gegenüber der RNase T1-P73V-Variante, die nur noch die Phosphorylierungsstelle in der *cis*-Konformation enthielt, deutlich höher im Vergleich zu der S54G/P55N-Variante. Diese im Widerspruch zu der absoluten *trans*-Isomerspezifität der ERK2 stehenden Resultate deuten darauf hin, dass entweder die Phosphorylierung der RNase T1 nicht vollständig isomerspezifisch verläuft oder dass die *cis*-Serin⁵⁴-Prolin⁵⁵-Bindung auch einen kleinen *trans*-Isomeranteil besitzt.

Um zu klären, ob die Serin⁵⁴-Prolin⁵⁵-Phosphorylierungsstelle sich in einem konformationellen Gleichgewicht befindet, wurde die Abhängigkeit der Initialgeschwindigkeit der Phosphorylierung von der eingesetzten Kinasekonzentration untersucht. Die Kinaseaktivitäten wurden bei einer konstanten RNase T1-Konzentration von 10 μ M gemessen. Um einen linearen Zusammenhang zu gewährleisten, wurden die Phosphorylierungszeiten so gewählt, dass nicht mehr als 5 % des Substrates phosphoryliert werden konnten. Zur Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten wurden nach zwei verschiedenen Zeiten Aliquote entnommen. Die Kinase wurde im Konzentrationsbereich von 20 bis 140 nM variiert.

Die Auftragung der Initialgeschwindigkeiten gegen die Kinasekonzentrationen zeigte für die RNase T1-wt und die RNase T1-P73V-Variante einen hyperbolen Verlauf (**Abb. 3.19**). Dieses Verhalten weicht von den für Enzymreaktionen normalerweise zu erwartenden ab, da keine direkte Proportionalität zwischen der Geschwindigkeit des Substratumsatzes und der Zahl der Enzymmoleküle besteht. Solche Abweichungen haben ihre Ursache öfters in einer konzentrationsbedingten Assoziation bzw. Dissoziation des Enzyms. Für die aktive MAP-Kinase ERK2 ist bekannt, dass sie bei Konzentrationen von über 20 nM in einer dimeren Form vorliegt.

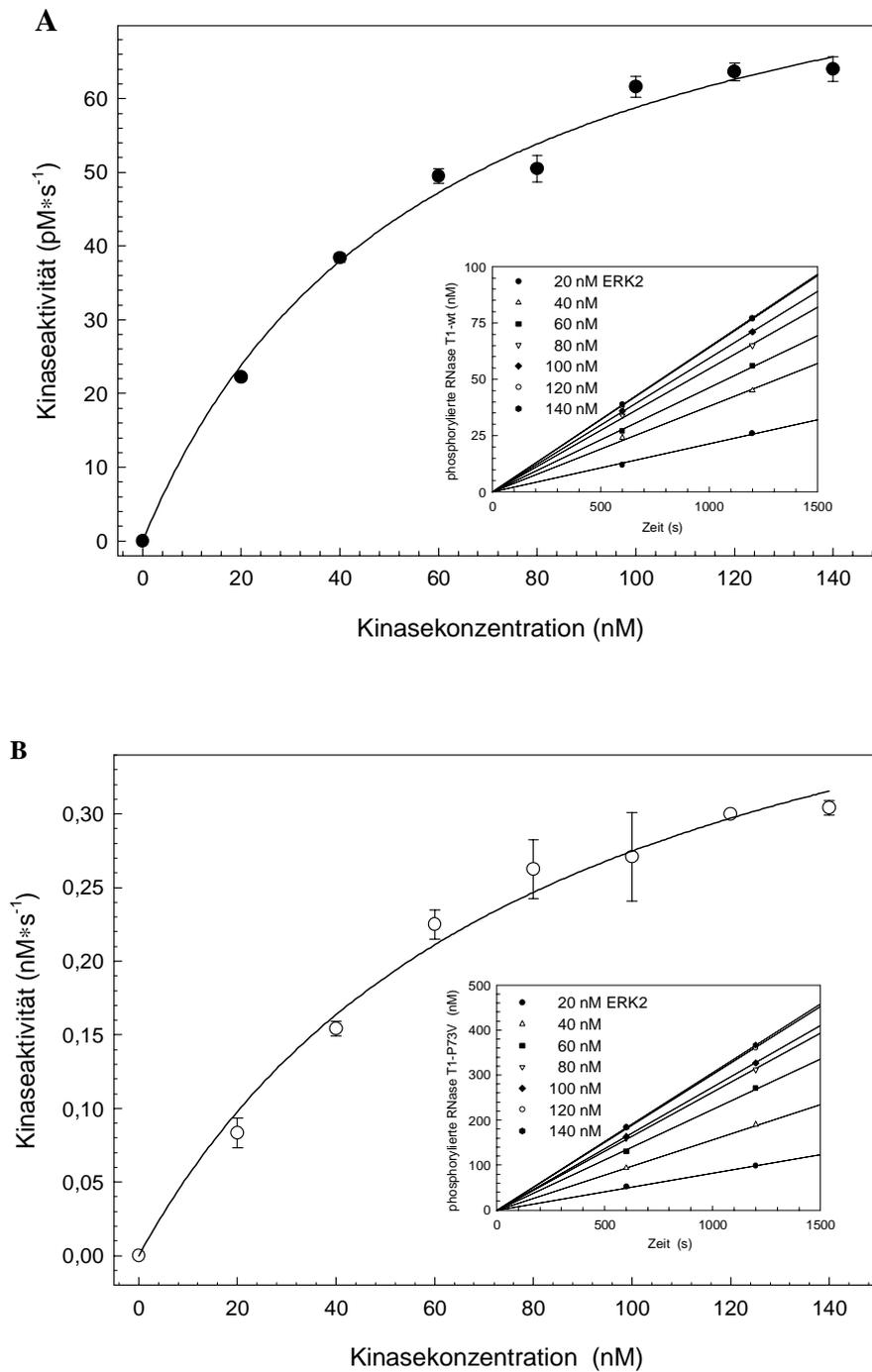


Abb. 3.19 Abhängigkeit der Initialgeschwindigkeit der Phosphorylierung von der eingesetzten ERK2-Konzentration

Die Kinaseaktivität wurde durch lineare Regression aus der Auftragung der Konzentration an phosphorylierter RNase T1 gegen die Inkubationszeit ermittelt. Die Phosphorylierung wurde mit $10\ \mu\text{M}$ RNase T1-wt (A) bzw. RNase T1-P73V (B) wie im Abschnitt 2.4.4. beschrieben durchgeführt. Für die Bestimmung der Aktivität gegenüber der RNase T1-Wildtyp wurde die Einfach-Phosphorylierung ausgewertet.

Um zu untersuchen, ob eine Beeinflussung der Phosphorylierungsgeschwindigkeit aufgrund einer Dimerisierung der ERK2 vorliegt oder ob das abweichende Verhalten substratbedingt ist, wurde die Abhängigkeit von der Kinasekonzentration auch mit dem Oligopeptid Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np gemessen. Dabei zeigt die Auftragung der Initialgeschwindigkeiten gegen die eingesetzten Enzymkonzentrationen den erwarteten linearen Verlauf (**Abb. 3.20**)

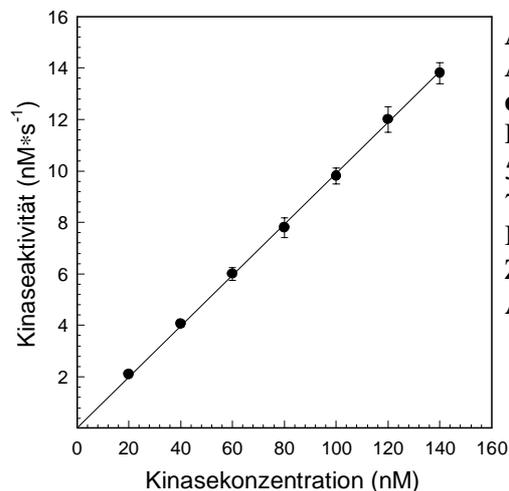


Abb. 3.20 Phosphorylierung des Peptidsubstrats Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np in Abhängigkeit von der eingesetzten ERK2-Konzentration

Die Phosphorylierung wurde bei 30 °C mit 1 mM Peptid, 500 μ M [γ -³²P] ATP (5 mCi/mmol) in 50 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl₂ durchgeführt. Zur Bestimmung der Initialgeschwindigkeit wurden zu zwei verschiedenen Zeiten Aliquote entnommen. Die Trennung und Auswertung erfolgten wie in Abs. 2.4.4. beschrieben.

Auch für die S54G/P55N-Variante konnte ein linearer Verlauf ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die beobachtete Abweichung vom linearen Verhalten bei der Untersuchung der Kinaseabhängigkeit nicht durch eine Oligomerisierung der ERK2 zustande kommt, sondern substratbedingt ist.

Das abweichende Verhalten im Fall der RNase T1-wt und der P73V-Variante kann möglicherweise durch eine der Phosphorylierungsreaktion vorgelagerte, geschwindigkeitsbestimmende *cis/trans*-Isomerisierung erklärt werden.

Da auch die Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung durch die *trans*-isomerspezifische ERK2 phosphoryliert werden kann, liegt diese Bindung wahrscheinlich zu einem kleinen Anteil in der *trans*-Konformation vor. Bei hohen Kinasekonzentrationen wird das phosphorylierbare *trans*-Isomer der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung sehr schnell verbraucht und muss somit ständig durch *cis/trans*-Isomerisierung erneuert werden. Wenn die isomerspezifische Phosphorylierung deutlich schneller abläuft als die Prolylisomerisierung, kommt es zu einer vorübergehenden Abweichung vom *cis/trans*-Gleichgewicht, in deren Folge die Nachlieferung des phosphorylierbaren *trans*-Isomers geschwindigkeitsbestimmend wird. Dieses hätte zur Folge, dass die Phosphorylierungsgeschwindigkeit ab einer bestimmten ERK2-Konzentration direkt von der *cis/trans*-Isomerisierung der *cis*-Ser-Pro-Bindung abhängig sein würde.

3.3.2. PPIasen beschleunigen die Phosphorylierung der RNase T1

3.3.2.1 Einfluss von Cyclophilin18 auf die Phosphorylierung der RNase T1-wt

Die Untersuchung der Abhängigkeit der Initialgeschwindigkeiten der Phosphorylierung von der Kinasekonzentration zeigte für die RNase T1-wt und die RNase T1-P73V-Variante eine Abweichung vom normalerweise für Enzymreaktionen zu erwartenden linearen Verhalten. Da durch Untersuchungen mit dem Peptidsubstrat Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np eine absolute Spezifität der ERK2 für das *trans*-Isomer der Serin-Prolin-Peptidbindung nachgewiesen werden konnte (Abs. 3.3.1.), ist der für die Phosphorylierung der RNase T1-P73V-Variante beobachtete hyperbole Verlauf wahrscheinlich auf eine vorgelagerte, geschwindigkeitsbestimmende *cis* nach *trans* Isomerisierung der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung zurückzuführen.

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde der Einfluss von PPIasen auf die Phosphorylierung der RNase T1 untersucht. PPIasen katalysieren die *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen. Wenn die *cis* nach *trans* Isomerisierung der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung im nativ gefalteten Protein geschwindigkeitsbestimmend für die Kinasereaktion ist, könnten die PPIasen die Phosphorylierung der RNase T1 beeinflussen.

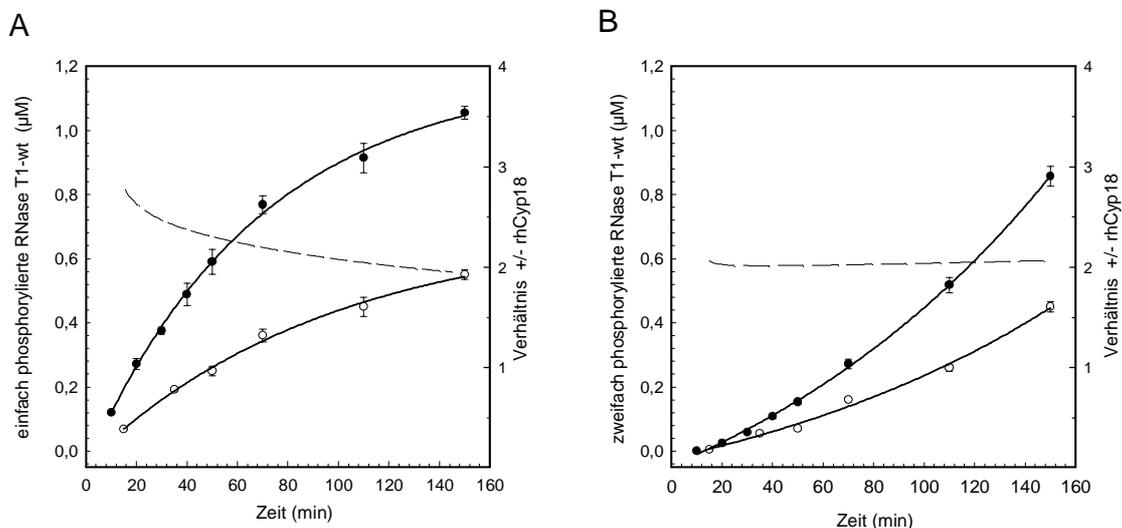


Abb. 3.21 Zeitverlauf der Phosphorylierung in An- und Abwesenheit von 500 nM Cyp18

Die Phosphorylierung wurde mit 25 μ M RNase T1-wt und 50 nM Kinase wie im Abs. 2.4.4 beschrieben durchgeführt; (●) mit Cyp18- (○) ohne Cyp18-Zusatz. Die gestrichelte Linie stellt das Verhältnis der Aktivitäten mit/ohne Cyp18-Zugabe dar. Nach verschiedenen Zeiten wurden Aliquote entnommen, mit Probenpuffer abgestoppt und durch SDS-PAGE getrennt. Die Detektion der phosphorylierten RNase T1-Banden erfolgte durch Autoradiographie. Für die Abbildung 3.19 A wurde die Bande der einfach phosphorylierten und für die Abb. 3.19 B die Bande der zweifach phosphorylierten RNase T1-wt ausgewertet.

In den folgenden Untersuchungen wurde der Einfluss der rekombinanten humanen PPIase Cyp18 auf die Phosphorylierung untersucht. Dazu wurde vor dem Start der Kinasereaktion, der durch Zugabe des radioaktiv markierten ATP erfolgte, der Phosphorylierungsansatz mit Cyp18 drei Minuten lang vorinkubiert. Die Phosphorylierung wurde wie im Abs. 2.4.4. beschrieben bei 30 °C durchgeführt.

Der Einfluss der PPIase Cyp18 ist in **Abb. 3.21** dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass die Phosphorylierungsgeschwindigkeit durch 0,5 μM Cyp18 sowohl in der ersten als auch in der zweiten Phosphorylierungsstufe etwa auf das Doppelte erhöht wird. Der Effekt des Cyclophilins wurde durch den spezifischen Inhibitor Cyclosporin A aufgehoben. Auch die Experimente mit der katalytisch inaktiven Cyclophilin18-F113A-Variante, welche keinen Einfluss auf die Phosphorylierung zeigte, bestätigten die absolute Abhängigkeit der beobachteten Effekte von der katalytischen Aktivität der PPIase (Daten nicht gezeigt).

Wie bereits beschrieben wurde, konnte die Kinaseaktivität gegenüber der RNase T1 in Anwesenheit von DTT auf etwa das 20fache gesteigert werden. Um einen genügend hohen Phosphorylierungsumsatz zu erreichen, wurden daraufhin alle Versuche in Gegenwart von 20 mM DTT durchgeführt. Um zu untersuchen, ob die Beschleunigung der Phosphorylierung durch Cyp18 von der verwendeten DTT-Konzentration abhängig ist, wurden die Phosphorylierungsgeschwindigkeiten in An- und Abwesenheit der PPIase bei zwei verschiedenen DTT-Konzentrationen gemessen.

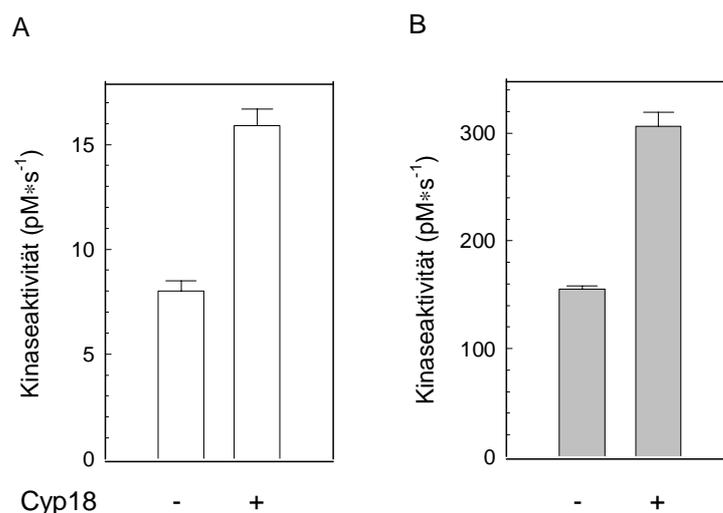


Abb. 3.22 Beschleunigung der Phosphorylierung durch Cyp18

Die Phosphorylierung wurde mit 25 μM RNase T1-wt als Substrat wie im Abs. 2.4.4. beschrieben (**A**) in Anwesenheit von 1 mM DTT und (**B**) von 20 mM DTT durchgeführt. Die Konzentration der PPIase betrug 500 nM.

Dabei konnte kein Einfluss des Dithiothreitol auf die Cyp18 vermittelte Beschleunigung der Phosphorylierung beobachtet werden. Die Phosphorylierungsgeschwindigkeit in Gegenwart des Cyclophilins war im Vergleich zur PPIase-freien Kontrolle sowohl bei 1mM DTT als auch bei 20 mM DTT im Ansatz auf jeweils das Doppelte erhöht (**Abb. 3.22**).

3.3.2.2. Einfluss von Cyclophilin18 auf die Phosphorylierung der RNase T1-Varianten

In weiteren Untersuchungen sollte geklärt werden, welche der beiden Phosphorylierungsstellen der RNase T1-wt in Gegenwart von Cyp18 beschleunigt phosphoryliert wird. Dazu wurden die Effekte des Cyclophilins auf die Phosphorylierung der beiden Varianten, die jeweils nur noch eine Phosphorylierungsstelle enthielten, untersucht.

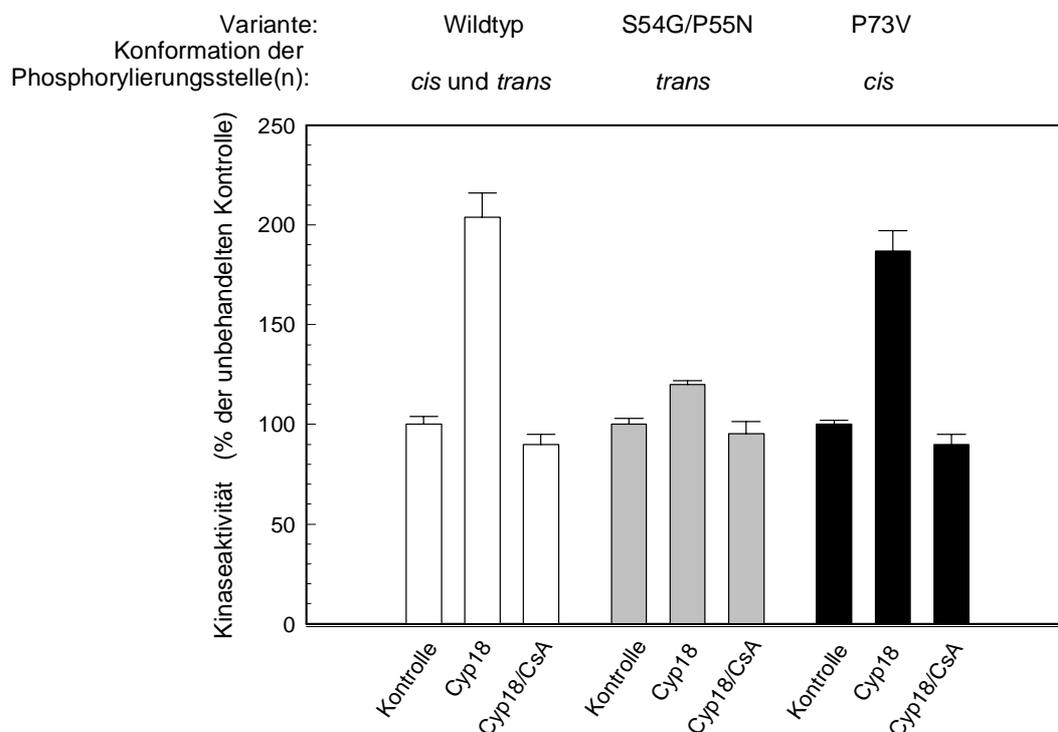


Abb. 3.23 Einfluss von Cyp18 auf die ERK2-Aktivität gegenüber verschiedenen Varianten der RNase T1.

Die Phosphorylierung wurde bei 30 °C wie im Abs. 2.4.4. beschrieben durchgeführt. Die Konzentrationen der RNase T1-Varianten betragen jeweils 25 µM. Unmittelbar vor dem Start der Phosphorylierungen wurden 500 nM Cyp18 zugegeben. 100 % entsprechen der Kinaseaktivität ohne Cyp18-Zusatz gegenüber der jeweiligen RNase Variante. Im Fall der RNase T1-wt wurde die Bande der einfach phosphorylierten Form ausgewertet.

Die Phosphorylierung der RNase T1-Varianten wurde wie im Abs. 2.4.4. beschrieben durchgeführt. Dabei erfolgte die Zugabe des Cyclophilins unmittelbar vor dem Start der Reaktion. Um zu kontrollieren, ob die katalytische Aktivität der PPIase für die

Beschleunigung der Phosphorylierung notwendig ist, wurde der spezifische Inhibitor Cyclosporin A (CsA) eingesetzt. Dazu wurde das Cyclophilin 30 Minuten mit einem 50fachen Überschuss an CsA vorinkubiert. Zur Ermittlung der Initialgeschwindigkeiten wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten Aliquote entnommen.

Die Aktivität der ERK2 gegenüber der P73V-Variante (verbliebene Phosphorylierungsstelle in der *cis*-Konformation) ist in Gegenwart des Cyp18 auf etwa das Doppelte erhöht (**Abb. 3.23**). Die mit der RNase T1-wt als Substrat gemessene Beschleunigung der Phosphorylierung in Anwesenheit der PPIase ist vergleichbar hoch. Dagegen wird die Phosphorylierungsgeschwindigkeit mit der RNase T1-S54G/P55N-Variante als Substrat (verbliebene Phosphorylierungsstelle in der *trans*-Konformation) durch Cyp18 nur um 20 % beschleunigt. Die Effekte der PPIase wurden durch den spezifischen Inhibitor Cyclosporin A vollständig aufgehoben. Das Cyclosporin A allein hatte keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Erhöhung der Phosphorylierungsgeschwindigkeit in Gegenwart von Cyp18 hauptsächlich auf die beschleunigte *cis* nach *trans* Isomerisierung der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung zurückzuführen sein könnte, welche nachfolgend durch ERK2 phosphoryliert werden kann.

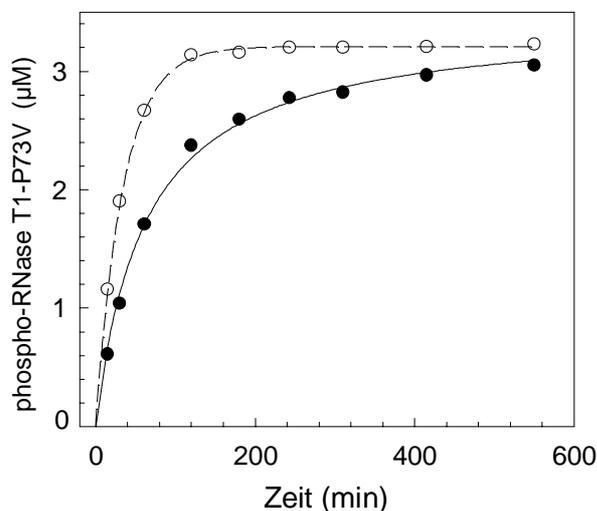


Abb. 3.24 Vergleich der Phosphorylierung der RNase T1-P73V in An- und Abwesenheit von Cyclophilin18

Die Phosphorylierung wurde mit 20 µM RNase T1 in Abwesenheit (●) und Gegenwart (○) von 500 nM Cyp18 wie im Abs. 2.4.4 beschrieben durchgeführt.

Der Zeitverlauf der Phosphorylierung der RNase T1-P73V-Variante in Gegenwart von Cyp18 ist in **Abb. 3.24** dargestellt. In Anwesenheit der PPIase wurde eine deutliche Beschleunigung der Phosphorylierungsreaktion beobachtet. Während bei Zugabe von Cyp18 schon nach 120 min die maximal mögliche Phosphorylierung erreicht wird, kommt es mit dem PPIase-freien Ansatz erst nach etwa zehn Stunden zur Beendigung der Reaktion.

Dabei bewirkt das Cyp18 jedoch keine Erhöhung des Phosphoryierungsgrads. Die maximale Phosphorylerungsausbeute betrug sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit der PPIase 16 %.

Der Einfluss des Cyp18 auf die in Abs. 3.3.1. untersuchte Abhängigkeit der Anfangs-phosphorylierungsgeschwindigkeit von der Kinasekonzentration wurde in weiteren Experimenten bestimmt. Dabei konnte sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit der PPIase ein hyperboler Verlauf beobachtet werden (**Abb. 3.25**). Das Verhältnis zwischen den Kinaseaktivitäten in An- und Abwesenheit des Cyclophilins nimmt mit steigenden ERK2-Konzentrationen zu. Während bei einer ERK2-Konzentration von 50 nM die Phosphorylierung durch Cyp18 um den Faktor 2.4 beschleunigt ist, wird bei einer Kinasekonzentration von 5 nM nur eine 1.3fache Beschleunigung beobachtet.

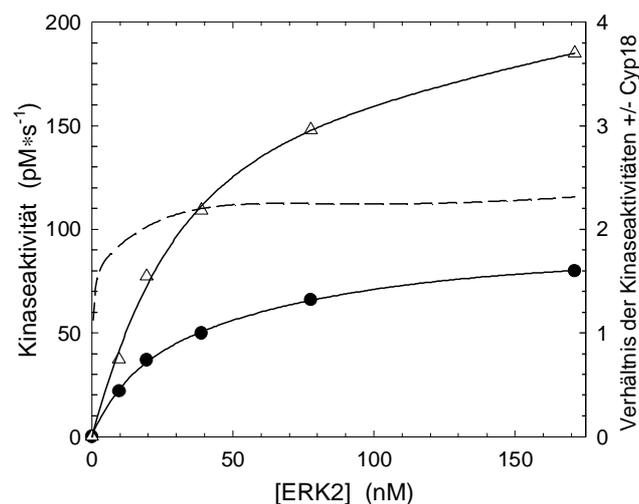


Abb. 3.25 Abhängigkeit der Initialgeschwindigkeit der Phosphorylierung von der eingesetzten ERK2-Konzentration in An- und Abwesenheit der PPIase Cyp18.

Die Kinaseaktivität wurde durch lineare Regression aus der Auftragung der Konzentration an phosphorylierter RNase T1 gegen die Inkubationszeit ermittelt. Die Phosphorylierung wurde mit 10 μ M RNase T1-wt in An (Δ)- bzw. Abwesenheit (\bullet) von 500 nM Cyp18 wie im Abschnitt 2.4.4. beschrieben durchgeführt. Für die Bestimmung der Aktivität wurde die Einfach-Phosphorylierung der RNase T1-wt ausgewertet. Die gestrichelte Linie stellt das Verhältnis der beiden Kurven dar.

3.3.2.3. Einfluss weiterer PPIasen auf die Phosphorylierung

Der Einfluss anderer PPIasen auf die Phosphorylierung der RNase T1 wurde in weiteren Untersuchungen getestet. Dazu wurde die Phosphorylierung in Gegenwart von 1 μ M der jeweils zu untersuchenden PPIase wie in Abs.2.4.4. beschrieben gemessen. In diesen Experimenten wurde die RNase T1-wt als Substrat verwendet.

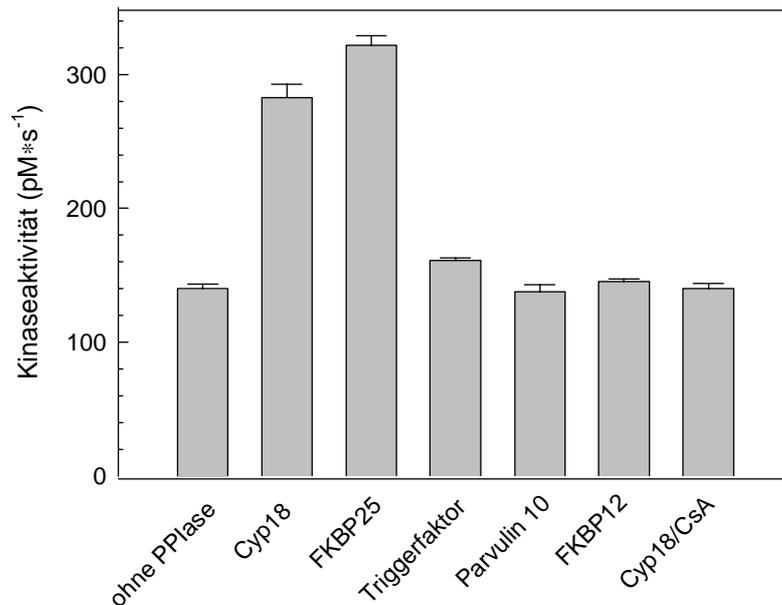


Abb. 3.26 Einfluss verschiedener PPIasen auf die ERK2-katalysierte RNase T1-wt-Phosphorylierung.

Die Phosphorylierung wurde in Gegenwart von 1 μM PPIase wie in Abs. 2.4.4. beschrieben durchgeführt. Die verwendete RNase T1-wt-Konzentration betrug 25 μM . Es wurde jeweils die einfach phosphorylierte Bande der RNase T1-wt zur Auswertung verwendet.

Die ERK2-Aktivität gegenüber der RNase T1-wt wird durch das FK506-bindende Protein 25 aus *Legionella pneumophila* (FKBP25) um etwa das Zweifache erhöht. Der Effekt durch des FKBP25 ist vergleichbar mit der Beschleunigung der Phosphorylierung, die in Gegenwart von Cyp18 beobachtet wird. In Anwesenheit des Triggerfaktors aus *E. coli* konnte nur ein geringer Effekt auf die Phosphorylierung der RNase T1 detektiert werden. Keinen Einfluss auf die Phosphorylierung hatten bei einer eingesetzten Konzentration von jeweils 1 μM das *E. coli* Parvulin 10 und das humane FKBP12 (**Abb. 3.26**).

3.2.6.4. Konzentrationsabhängige Beschleunigung der Phosphorylierung

Die Abhängigkeit der Beschleunigung der RNase T1-Phosphorylierung von der Cyp18- und FKBP25-Konzentration zeigt, dass die Kinaseaktivität bereits durch katalytische Mengen der PPIasen deutlich erhöht wird (**Abb. 3.27**). So kann schon eine 35 %ige Erhöhung der Phosphorylierungsgeschwindigkeit bei einem RNase T1/PPIase-Verhältnis von 500 beobachtet werden. Durch den Einsatz von PPIase-Konzentrationen über 2 μM konnte kein zusätzlicher Effekt auf die Phosphorylierung mehr erreicht werden.

Bei den verwendeten Versuchsbedingungen wurde mit dem FKBP25 ein maximaler Beschleunigungsfaktor von 2.8 beobachtet. In Gegenwart des Cyp18 konnte die Phosphorylierungsgeschwindigkeit um das 2.5fache beschleunigt werden.

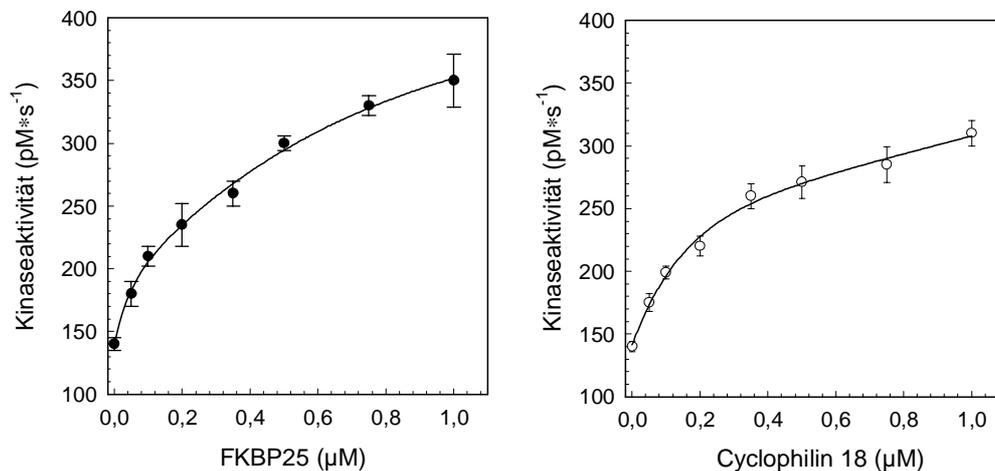


Abb. 3.27 Konzentrationsabhängige Beschleunigung der RNase T1-wt-Phosphorylierung durch Cyp18 und FKBP25

Die Phosphorylierung wurde in Gegenwart von 50 nM – 1000 nM FKBP25 (A) bzw. Cyp18 (B) wie in Abs. 2.4.4. beschrieben durchgeführt. Die verwendete RNase T1-wt-Konzentration betrug 25 µM.

3.3.2.5. Effekte verschiedener FKBP25-Varianten

Mit dem *Legionella pneumophila* FKBP25 konnten innerhalb der untersuchten PPIasen die größten Effekte auf die Phosphorylierung der RNase T1 erreicht werden. In weiteren Experimenten wurde daraufhin der Einfluss verschiedener FKBP25-Varianten untersucht (Abb. 3.28). Dabei wurde mit der Wildtyp-Isomerase die Kinaseaktivität gegenüber der RNase T1-wt am effektivsten erhöht, während die katalytisch inaktive FKBP25-Tyr185Ala-Variante keinen Einfluss auf die Phosphorylierung zeigte. In den Bakterienzellen liegt die aktive Form des FKBP25 als Dimer vor. Mit der in einer monomeren Form vorliegenden FKBP25-M38,42E-Variante wurde ein deutlich geringerer Effekt im Vergleich zum FKBP25-wt beobachtet. Auch die Beschleunigung der Phosphorylierung durch das katalytische Fragment des FKBP25 (Aminosäuresequenzbereich 77 bis 213) war um etwa 30 % gegenüber dem Wildtyp-FKBP25 verringert.

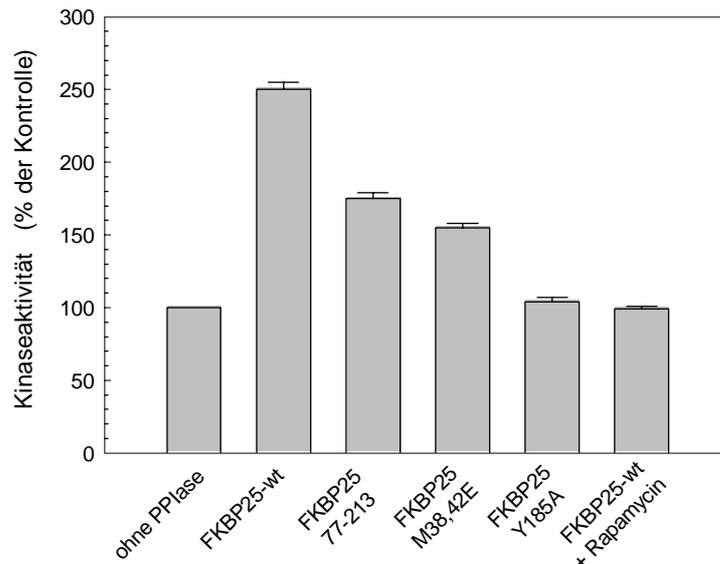


Abb. 3.28 Einfluss verschiedener FKBP25-Varianten auf die Phosphorylierung der RNase T1-wt.

Die Phosphorylierung wurde in Gegenwart von 500 nM der FKBP25-Varianten wie in Abs. 2.4.4. beschrieben durchgeführt. Die verwendete RNase T1-wt-Konzentration betrug 25 μ M. Es wurde jeweils die einfach phosphorylierte Bande der RNase T1-wt ausgewertet. 100 % Aktivität entsprechen der Phosphorylierungsgeschwindigkeit ohne FKBP25-Zusatz.

Für einen Kontrollversuch wurde das FKBP25-wt 30 Minuten mit einem 50fachen Überschuss des spezifischen FKBP-Inhibitors Rapamycin vorinkubiert. Wie in **Abb. 3.28** gezeigt, wird der Effekt des FKBP in Anwesenheit des Inhibitors vollständig aufgehoben. Dieses Ergebnis weist ebenfalls darauf hin, dass die katalytische Aktivität der PPIase essentiell für die Aktivierung der Phosphorylierung ist.

3.2.6.6. Einfluss von Cyclophilin18 auf die Phosphorylierung der RCM-wt-T1

Unter Niedrigsalzbedingungen (50 mM Tris-HCl pH 7.5) liegt die S-carboxymethylierte RNase T1-wt (RCM-T1-wt) vollständig entfaltet vor. In der entfalteten Form befinden sich die vier Prolylbindungen fast ausschließlich in der *trans*-Konformation. In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob auch die Kinaseaktivität gegenüber der RCM-T1-wt durch die PPIase Cyp18 beschleunigt werden kann. Dabei wurde die ERK2-Aktivität sowohl gegenüber der entfalteten als auch gegenüber der zurückgefalteten RNase T1 gemessen (**Abb. 3.29**).

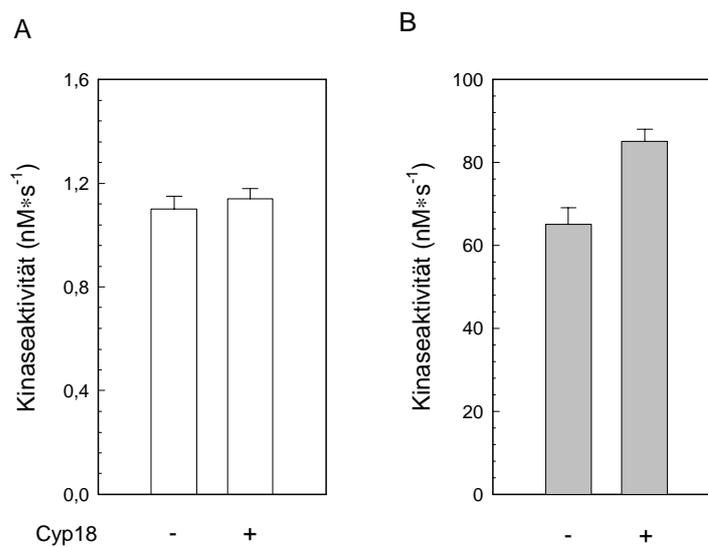


Abb. 3.29 Einfluss von Cyclophilin18 auf die Phosphorylierung der entfaltetten und der mit 2 M NaCl zurückgefalteten carboxymethylierten RNase T1-wt.

Die Phosphorylierung wurde mit 25 μ M (A) entfalteteter carboxymethylierter und (B) zurückgefalteter RNase T1-wt bei 30 °C wie unter Abs. 2.4.4. beschrieben durchgeführt. Die Kinaseaktivität gegenüber der zurückgefalteten RNase T1 wurde in Gegenwart von 1 M NaCl gemessen. Die Cyclophilin-Konzentration im Ansatz betrug 5 μ M.

Die Rückfaltung der RCM-wt-T1 erfolgte bei 30 °C durch Zugabe von 2 M Natriumchlorid. Die Phosphorylierung der zurückgefalteten RCM-wt-T1 wurde bei einer NaCl-Endkonzentration von 1 M durchgeführt. Bei dieser Konzentration ist die gegenüber dem ERK2-Standardsubstrat MBP (*Myelin Basic Protein*) gemessene Kinaseaktivität um etwa 50 % verringert (Daten nicht gezeigt).

Die Kinaseaktivität gegenüber der entfaltetten RCM-wt-T1 konnte durch die Zugabe von Cyclophilinkonzentrationen bis zu 5 μ M nicht beeinflusst werden (Abb. 3.29). Im Gegensatz dazu wurde die Phosphorylierungsgeschwindigkeit mit der zurückgefalteten RCM-T1-wt als Substrat durch 5 μ M Cyp18 um ungefähr 30 % im Vergleich zum PPIase-freien Ansatz beschleunigt.

Keinen Einfluss hatte das Cyclophilin auf die Phosphorylierung der carboxymethylierten RNase T1-S54G/P55N-Variante, in welcher die Phosphorylierungsstelle in der *cis*-Konformation eliminiert ist. So wurde sowohl mit der vollständig entfaltetten als auch mit der zurückgefalteten carboxymethylierten S54G/P55N-Variante keine Erhöhung der Kinaseaktivität in Gegenwart der PPIase detektiert (Daten nicht gezeigt).

3.3.3. Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten der *native-state* Isomerisierung

Die ERK2-Aktivität gegenüber der RNase T1-wt konnte, wie im Abs. 3.3.2. beschrieben, durch katalytische Konzentrationen der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen Cyp18 und FKBP25 um annähernd das Dreifache erhöht werden. Durch Untersuchungen der Varianten mit nur einer Phosphorylierungsstelle wurde gezeigt, dass die Steigerung der ERK2-Aktivität in Gegenwart der PPIasen auf eine beschleunigte Phosphorylierung der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung, die in der gefalteten RNase T1 in der *cis*-Konformation vorliegt, zurückzuführen ist. Da mit dem Oligopeptidsubstrat Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np eine absolute Selektivität der ERK2 für das *trans*-Isomer nachgewiesen werden konnte, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die *cis*-Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Phosphorylierungsstelle in einem konformationellen Gleichgewicht mit einem kleinen *trans*-Isomeranteil steht.

Die ausschließliche Phosphorylierung des *trans*-Konformers der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung führt zu einer vorübergehenden Abweichung vom thermodynamischen *cis/trans*-Gleichgewicht. Die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen katalysierten die Einstellung dieses Gleichgewichts und tragen damit wahrscheinlich zu einer beschleunigten Bereitstellung des phosphorylierbaren *trans*-Isomers der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung bei. Der Einfluss der PPIasen auf die Phosphorylierung der RNase T1 weist darauf hin, dass die *cis* nach *trans* Isomerisierung der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Phosphorylierungsstelle geschwindigkeitsbestimmend für die nachfolgende Kinasereaktion ist.

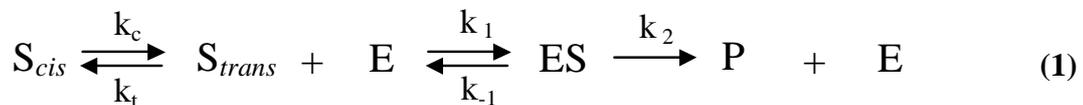
Auch die Untersuchungen zur Abhängigkeit der Initialgeschwindigkeit von der eingesetzten Kinasekonzentration (Abs. 3.3.1) deuten darauf hin, dass die Phosphorylierungsgeschwindigkeit durch eine vorangeschaltete, *cis/trans*-Isomerisierung der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung bestimmt wird. Somit sollte es möglich sein, die Geschwindigkeitskonstanten der Prolylisomerisierung direkt aus der gemessenen Kinasereaktion zu ermitteln.

Die Berechnung der kinetischen Konstanten der *cis/trans*-Isomerisierung für die Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Peptidbindung erfolgte mit Hilfe des Software-Programms Dynafit (Kuzmic, 1996) nach dem Reaktionsschema (1). Zur Bestimmung der Konstanten wurden die Phosphorylierungsexperimente mit der RNase T1-P73V-Variante ausgewertet (**Abb. 3.18 und 3.19 B**), da diese Variante nur noch die Phosphorylierungsstelle in der *cis*-Konformation besitzt.

Zuerst wurde die Abhängigkeit der Initialgeschwindigkeit von der ERK2-Konzentration nach Gleichung (1) angepasst. Die durch das Programm ermittelten Geschwindigkeitskonstanten wurden anschließend als Startbedingungen für die Anpassung der Abhängigkeit der Initialgeschwindigkeit von der RNase T1-Konzentration verwendet.

Die Konstante k_2 wurde für die beiden Anpassungen als Startbedingung vorausgesetzt und nicht durch Dynafit berechnet. Sie entspricht den Quotienten aus V_{\max} (Maximalgeschwindigkeit) und der verwendeten Enzymkonzentration und ist deshalb nicht von der *cis/trans*-Isomerisierung der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Phosphorylierungsstelle abhängig.

Die berechneten kinetischen Konstanten, die für beide Abhängigkeiten gute Anpassungen ergaben, sind in Tabelle 3 dargestellt. Mit Hilfe dieser vier berechneten Konstanten wurden anschließend die Kurven der v/S -Charakteristik sowie die der ERK2-Konzentrationsabhängigkeit durch Dynafit simuliert. Wie die **Abb. 3.30 A** und **B** zeigen, ergeben die beiden durch Simulation erhaltenen Kurven eine gute Korrelation mit den gemessenen Werten.



Gleichung 1: Phosphorylierung der RNase T1-P73V-Variante

Die Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Phosphorylierungsstelle befindet sich im Gleichgewicht hauptsächlich in der *cis*-Konformation. Da die ERK2 ausschließlich die Phosphorylierung des *trans*-Konformers katalysiert, muss der *trans*-Isomeranteil ständig durch *cis/trans*-Isomerisierung nachgeliefert werden. Wenn die isomerspezifische Kinasereaktion deutlich schneller abläuft als die Prolylisomerisierung, kommt es zu einer vorübergehenden Abweichung vom *cis/trans*-Gleichgewicht, in deren Folge die Nachlieferung des phosphorylierbaren *trans*-Isomers geschwindigkeitsbestimmend wird.

S_{cis} bzw. S_{trans} entsprechen der Konzentration des Substrates mit der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Phosphorylierungsstelle in der *cis*- bzw. *trans*-Konformation, E – der ERK2-Konzentration und P- der phosphorylierten RNase T1-P73V.

Tab. 3: Kinetische Konstanten für die *cis/trans*-Isomerisierung und Phosphorylierung der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Peptidbindung.

Die Geschwindigkeitskonstanten wurden durch das Software-Programm Dynafit aus der Abhängigkeit der Initialgeschwindigkeit von der ERK2-Konzentration sowie aus der v/S -Charakteristik der P73V-Variante nach Gleichung (1) ermittelt.

Konstante	$k_{c \rightarrow t}$	$k_{t \rightarrow c}$	k_1	k_{-1}	k_2
	$1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$5.8 \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$	$0.265 \text{ nM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	5.3 s^{-1}	0.062 s^{-1}

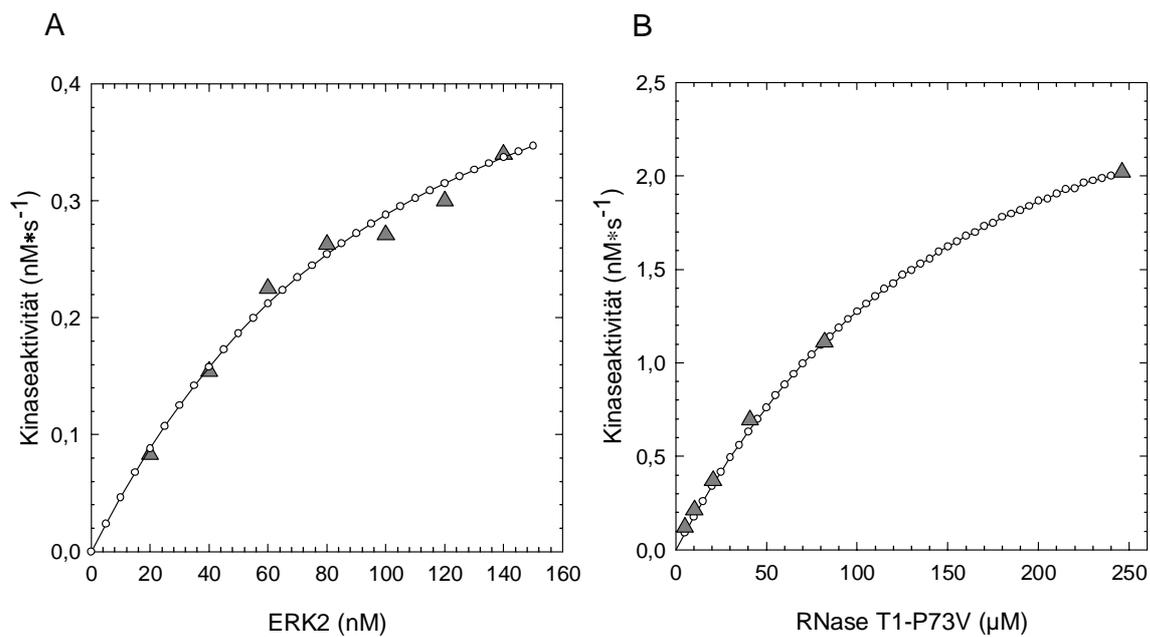


Abb. 3.30 Vergleich der experimentell bestimmten Phosphorylierungsgeschwindigkeiten mit den durch das Programm Dynafit berechneten theoretischen Werten.

Die Kurven wurden gemäß der Reaktionsgleichung (1) unter Verwendung der in Tabelle (3) dargestellten Konstanten durch das Programm Dynafit für die Abhängigkeit der Initialgeschwindigkeit von der ERK2-Konzentration (A) und für die Abhängigkeit der Initialgeschwindigkeit von der Konzentration der RNase T1-P73V-Variante berechnet (B). (A) wurde bei einer konstanten Substratkonzentration von 10 µM und (B) bei einer festen ERK2-Konzentration von 50 nM gemessen. Die (○) entsprechen den Werten die durch Simulation aus den kinetischen Konstanten berechnet worden sind und die (▲) den gemessenen Werten.

Mit Hilfe der durch das Dynafit-Programm berechneten kinetischen Konstanten der *cis/trans*-Isomerisierung $k_{c \rightarrow t}$ und $k_{t \rightarrow c}$ konnten die Isomerenanteile der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung nach Gleichung (2) ermittelt werden.

$$\begin{aligned}
 S_{cis} \cdot k_{cis \rightarrow trans} &= S_{trans} \cdot k_{trans \rightarrow cis} \\
 S_{ges} &= S_{cis} + S_{trans} \\
 K &= \frac{k_{trans \rightarrow cis}}{k_{cis \rightarrow trans}} \\
 P_{trans} [\%] &= \frac{S_{trans}}{S_{gesamt}} \cdot 100 = \frac{100}{1 + K} \tag{2}
 \end{aligned}$$

Der mittels Gleichung (2) berechnete *trans*-Isomeranteil der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Phosphorylierungsstelle der RNase T1-P73V-Variante beträgt 0,017 %.

3.3.4. Phosphorylierung der RNase T1 in Abhängigkeit vom Grad der Rückfaltung

Die RNase T1 wird im gefalteten Zustand durch zwei Disulfidbrücken stabilisiert. Zur Untersuchung der Abhängigkeit der ERK2-Aktivität vom Faltungsgrad des Substrats wurden die S-carboxymethylierten Formen der RNase T1-wt (RCM-wt-T1) und der RNase T1-S54G/P55N (RCM-(Pro55)-T1) verwendet. Diese Varianten liegen unter nativen Bedingungen (50 mM Tris/HCl pH 8.0) vollständig entfaltet vor.

Die Rückfaltung der carboxymethylierten RNase T1-Varianten wurde durch Änderung des Salzgehaltes von 0 auf 1 M NaCl induziert. Die Detektion der Faltung erfolgte durch Messung der Fluoreszenzänderung bei 320 nm nach Anregung bei 268 nm.

Die Rückfaltung der RCM-wt-T1 verläuft in drei Phasen, einer schnellen, die in der Mischzeit beendet ist, und zwei sehr langsamen, die 10 bzw. 50 min (bei 8 °C) andauern.

Die RNase T1 besitzt vier Peptidyl-Prolylbindungen, von denen zwei in der *cis*-Konformation (Tyr³⁸-Pro³⁹-, Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung) und zwei in der *trans*-Konformation (Ser⁷²-Pro⁷³-, Try⁵⁹-Pro⁶⁰) vorliegen.

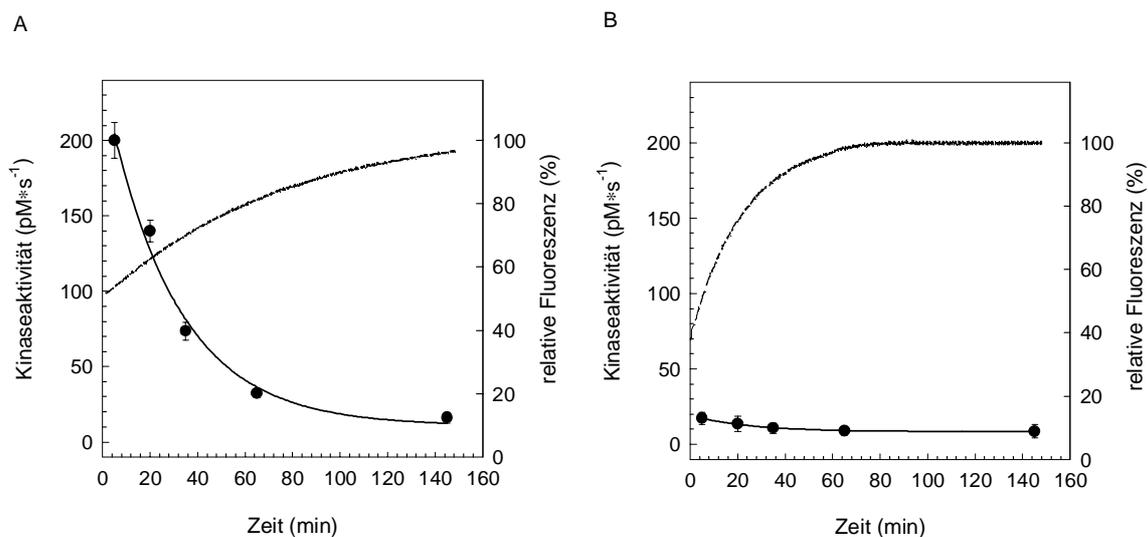


Abb. 3.31 Abhängigkeit der Kinaseaktivität vom Faltungsgrad der S-carboxymethylierten Formen der RNase T1-wt (A) und der RNase T1-S54G/P55N-Variante (B)

Die Detektion der salzinduzierten Rückfaltung der RNase T1-Varianten erfolgte nach Abs. 2.4.3. durch Messung der Fluoreszenzänderung bei 320 nm nach Anregung bei 268 nm. Die Fluoreszenz der nativen Form entspricht 100 % und die der denaturierten 0 %.

Während der Rückfaltung wurden zu verschiedenen Zeiten Aliquote entnommen und mit 50 nM ERK2 phosphoryliert. Die Phosphorylierung wurde wie im Abs. 2.4.5 beschrieben durchgeführt. Die Konzentration der RNase T1-Varianten im Ansatz betrug jeweils 20 µM. Die Kinaseaktivität (●) gegenüber dem Wildtyp (A) nimmt während der Rückfaltung um 180 pM · s⁻¹ ab. Dagegen verringert sich die Aktivität gegenüber der P55N-Variante (B) nur um 10 pM · s⁻¹. Alle hier beschriebenen Experimente erfolgten bei einer Temperatur von 6 °C.

Die beiden langsamen Phasen werden durch die *trans* nach *cis* Isomerisierungen der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung sowie der Tyr³⁸-Pro³⁹-Bindung bestimmt. Die erste langsame Phase wird bei der Rückfaltung der RCM-(Pro55)-T1-Variante nicht mehr beobachtet. Die Rückfaltung dieser Variante ist nur noch von der *trans* nach *cis* Isomerisierung der Tyr³⁸-Pro³⁹-Bindung abhängig. In diesem Fall kann die Geschwindigkeitskonstante der *cis/trans*-Isomerisierung der Tyr³⁸-Pro³⁹-Bindung direkt aus der langsamen Faltungsphase durch Messung der Fluoreszenzänderung bei 320 nm und anschließender Anpassung an ein Reaktionsmodell erster Ordnung ermittelt werden. Der unterschiedliche Verlauf der langsamen Rückfaltungsphasen der beiden Varianten ist aus den Abbildungen **3.31 A** und **B** deutlich zu erkennen.

Um zu untersuchen, ob die Kinaseaktivität vom Faltungszustand der RNase T1 abhängig ist, wurden während der salzinduzierten Rückfaltung zu verschiedenen Zeiten Aliquote entnommen und 10 Minuten mit ERK2 phosphoryliert. Sowohl die Rückfaltung als auch die Phosphorylierung wurden bei 6 °C durchgeführt.

Die **Abb. 3.30** zeigt, dass die Kinaseaktivität gegenüber der S-carboxymethylierten RNase T1-Wildtyp mit zunehmender Rückfaltung deutlich abnimmt. Dabei betrug die Aktivität der ERK2 mit der zurückgefalteten RCM-wt-T1 nur noch 8 % der Kinaseaktivität, die mit der vollständig ungefalteten RNase gemessen wurde.

Um zu klären, welchen Anteil die einzelnen Phosphorylierungsstellen (Ser⁵⁴ und Ser⁷²) an der Verringerung der Kinaseaktivität während der Rückfaltung haben, wurde auch die RCM-(Pro55)-T1-Variante untersucht. Diese Variante enthält nur noch die Ser⁷²-Pro⁷³-Phosphorylierungsstelle, die sich sowohl im gefalteten als auch entfalteten Protein hauptsächlich in der *trans*-Konformation befindet.

Auch mit dieser Variante wurde eine Abnahme der Phosphorylierungsgeschwindigkeit in Korrelation zur Rückfaltung festgestellt. Diese Resultate deuten daraufhin, dass die Zugänglichkeit der Ser⁷²-Pro⁷³-Phosphorylierungsstelle für die ERK2 mit zunehmender Rückfaltung schlechter wird. Während die Kinaseaktivität mit der carboxymethylierten RNase T1-Wildtyp um 92 % im Verlauf der Rückfaltung abnimmt, verringert sich die Aktivität gegenüber der RCM-Pro55-T1-Variante nur um etwa 50 %.

Der Vergleich der Kinaseaktivitäten gegenüber den beiden RNase-T1-Varianten im entfalteten und zurückgefalteten Zustand zeigt, dass der Anteil der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Phosphorylierung in der entfalteten RNase T1 fast 90 % beträgt, während er nach erfolgter Rückfaltung nur noch 50 % ausmacht. Die deutliche Abnahme der Kinaseaktivität gegenüber der S-carboxymethylierten Wildtyp-RNase T1 im Verlauf der Rückfaltung ist somit fast

ausschließlich auf eine verminderte Phosphorylierung der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung zurückzuführen.

Ob diese deutliche Verringerung der Kinaseaktivität gegenüber der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Phosphorylierungsstelle in der gefalteten RNase T1-wt ausschließlich durch die *trans* nach *cis* Isomerisierung dieser Bindung zustande kommt oder ob eine stärkere Behinderung der Zugänglichkeit im Vergleich zur Ser⁷²-Pro⁷³-Bindung vorliegt, kann anhand dieser Ergebnisse nicht ausgesagt werden.

4. Diskussion

4.1. Isomerspezifität prolinspezifischer Proteinkinasen

Die einzigartigen Eigenschaften der Aminosäure Prolin führen zum gleichzeitigen Auftreten von *cis*- und *trans*-Isomeren der Peptidyl-Prolyl-Bindung sowohl in nativen Proteinen als auch in Oligopeptiden und partiell gefalteten Polypeptiden (Adjadj et al., 1997; Cheetham et al., 1998; Evans et al., 1987; Gitti et al., 1996; Ng et al., 1998). Diese beiden koexistierenden Konformere können in biochemischen Reaktionen unterschiedlich reagieren. Solche isomerspezifischen Prozesse wurden bis jetzt vor allem für Proteasereaktionen und Protein-Ligand-Interaktionen gefunden (Brandsch et al., 1998; Charbonnier et al., 1999; Stoddard & Pietrokovski, 1998; Yaron & Naider, 1993). Auch die Beeinflussung der Signalübertragung von Transmembranrezeptoren durch katalytisch aktive PPIasen lieferte indirekte Hinweise auf isomerspezifische Reaktionen (Chen et al., 1997; Lopez-Illasaca et al., 1998).

Im Verlauf dieser Arbeit wurde unter Verwendung eines Oligopeptidsubstrates erstmals gezeigt, dass die Phosphorylierung von Ser/Thr-Pro Motiven durch prolinspezifische Kinasen isomerspezifisch verläuft. Zur Untersuchung der Isomerspezifität der MAP-Kinase ERK2 wurde das Pentapeptid Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np als Substrat verwendet. Mit diesem Peptid wurden nach kurzen Inkubationszeiten sowohl ausreichend hohe Phosphorylierungsausbeuten als auch eine genügend schnelle isomerspezifische Proteolyse durch α -Chymotrypsin erzielt.

Da die Protease ausschließlich das *trans*-Konformer des Substrats hydrolysiert, war es möglich, während der nach dem Stopp der Proteolyse folgenden Einstellung des *cis/trans*-Gleichgewichts die Initialgeschwindigkeiten der Phosphorylierung in Abhängigkeit von der Isomerenzusammensetzung zu untersuchen. Um die Isomerisierungsgeschwindigkeit so weit wie möglich zu verlangsamen, wurden alle Experimente bei 0 °C durchgeführt.

Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der ERK2 gegenüber dem Peptidsubstrat mit fortschreitender *cis* nach *trans* Isomerisierung zunimmt. Dabei erreichte die Kinaseaktivität mit der vollständigen Einstellung des *cis/trans*-Gleichgewichts eine Sättigung. Die aus den Phosphorylierungsgeschwindigkeiten berechnete Konstante der *cis/trans*-Isomerisierung korreliert sehr gut mit dem direkt gemessenen Wert.

Da der einzige Unterschied zwischen den Phosphorylierungsansätzen in der veränderten Isomerenzusammensetzung des Peptidsubstrats bestand, sollte keine Abhängigkeit der Phosphorylierungsgeschwindigkeit von der Prolylisomerisierung beobachtet werden, wenn

die Kinase nicht in der Lage ist, zwischen dem *cis*- und dem *trans*-Konformer der Peptidyl-Prolyl-Bindung zu unterscheiden.

Die Isomerspezifität der ERK2 wurde unter Verwendung der PPIase hFKBP12 weiter untersucht. Durch die Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung wurde das Peptid schon während der Mischzeit wieder vollständig äquilibriert. Unter diesen Bedingungen gleicht die Phosphorylierungsgeschwindigkeit in Gegenwart der PPIase derjenigen Geschwindigkeit, die mit einem Ansatz nach vollständiger Gleichgewichtseinstellung erreicht wird. Die Inhibition des FKBP12 durch das FK506 verdeutlichte die Notwendigkeit einer katalytisch aktiven PPIase für die auf die Initialgeschwindigkeiten der Phosphorylierung gezeigten Effekte. Die Ergebnisse der Untersuchungen mit dem Peptidsubstrat Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np deuten auf eine absolute Isomerspezifität der MAP-Kinase ERK2 für das *trans*-Isomer der Ser-Pro-Bindung hin.

In weiteren Untersuchungen konnte auch die Isomerspezifität der cyclinabhängigen Proteinkinase Cdc2/Cyclin B aufgeklärt werden. Da die Phosphorylierungsausbeuten mit dem für die ERK2 eingesetzten Substrat zu gering waren, wurde ein neuer Test unter Verwendung des disulfidverbrückten, intern gequenchten fluorogenen Peptidsubstrats Abz-Cys-Ser-Pro-Arg-Cys-Nty-NH₂ entwickelt. Da bei diesem disulfidverbrückten Peptid die Ser-Pro-Bindung zu fast 100 % in der *cis*-Konformation vorliegt, existieren für die Untersuchung der Isomerspezifität jeweils einheitliche Ausgangsbedingungen. Ein weiterer Vorteil dieser Methode besteht in dem Einsatz von höheren Peptidkonzentrationen, da die substratlimitierende isomerspezifische Proteolyse entfällt. Auch die *cis/trans*-Isomerisierung nach Spaltung der Disulfidbrücke mittels DTT kann über die Änderung der Fluoreszenz bei 420 nm nach einer Anregung bei 320 nm leicht verfolgt werden. Der Nachteil des Tests liegt in der Verwendung von hohen Konzentrationen an Reduktionsmittel, die zu einer Beeinflussung der katalytischen Aktivität der Proteinkinasen führen können.

Mit dieser Methode konnte auch für die prolinspezifische Kinase Cdc2/Cyclin B eine absolute Selektivität für das *trans*-Isomer der Ser/Thr-Pro-Bindung nachgewiesen werden. Dabei war die aus den Phosphorylierungsexperimenten berechnete Geschwindigkeitskonstante beinahe identisch mit der durch Fluoreszenzmessungen direkt bestimmten Konstante für die *cis/trans*-Isomerisierung.

Die Untersuchungen zur *cis/trans*-Isomerspezifität der ERK2 und der Cdc2/Cyclin B weisen darauf hin, dass nicht nur die Primärsequenz und die Zugänglichkeit der Phosphorylierungsstelle, sondern auch die Konformation der Ser/Thr-Pro-Bindung entscheidend für die Erkennung durch prolinspezifische Kinasen ist.

Auch die während der Anfertigung dieser Arbeit publizierte Röntgenkristallstruktur der phosphorylierten CDK2 im Komplex mit der regulatorischen Untereinheit Cyclin A und dem Peptidsubstrat HHASPRK weist auf eine selektive Bindung des *trans*-Isomers durch die prolinspezifische Kinase hin (Brown et al., 1999). Für die MAP-Kinase ERK2 existieren noch keine substratgebundenen Strukturen. Durch Modellierung der durch Phosphorylierung aktivierten ERK2-Struktur mit dem Peptid Thr-Pro-Ala konnte jedoch gezeigt werden, dass die Kinase nur das *trans*-Konformer binden sollte (Canagarajah et al., 1997). Diese Daten bestätigen die an dem Peptidsubstrat Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np experimentell nachgewiesene *trans*-Isomerspezifität der Proteinkinase.

Die Isomerspezifität der prolinspezifischen Proteinkinasen scheint ein weit verbreitetes Prinzip zu sein. Sowohl die Untersuchungen mit den beiden verschiedenen cyclinabhängigen Proteinkinasen als auch die Experimente mit der MAP-Kinase ERK2 zeigten jeweils eine Bevorzugung des *trans*-Konformer prolinhaltiger Peptide. Diese Übereinstimmung kann möglicherweise durch die ähnlichen Katalysemechanismen der prolinspezifischen Kinasen und durch die hohe phylogenetische Konservierung der Proteinstrukturen erklärt werden.

Isomerspezifische Enzymreaktionen wurden bis jetzt ausschließlich für Proteasen beschrieben (Yaron & Naider, 1993). Vor kurzem konnte mit Proteinphosphatasen gezeigt werden, dass auch die Dephosphorylierung an phosphorylierten Ser/Thr-Pro-Motiven abhängig von der Konformation des Peptidrückgrates ist. Dabei konnte sowohl für die Protein Phosphatase 1 als auch für die Protein Phosphatase 2A eine absolute Bevorzugung des *trans*-Isomers nachgewiesen werden (Werner, 2001). Die Alkalische Phosphatase, deren hauptsächliche physiologische Funktion nicht in der Dephosphorylierung von Proteinen besteht, ist auch in der Lage, Phosphatreste an Proteinsubstraten zu hydrolysieren (Chan & Stinson, 1986). Im Unterschied zu den beiden untersuchten Proteinphosphatasen akzeptiert die Alkalische Phosphatase sowohl die *cis*- als auch die *trans*-Konformation der phosphorylierten Ser/Thr-Pro-Bindung in einem Peptidsubstrat (Zhou et al., 2000). Mögliche Erklärungen dafür könnten die sehr breite Substratspezifität und ein Katalysemechanismus, der im Gegensatz zu den Proteinphosphatasen über ein kovalentes Zwischenprodukt abläuft, sein. Die Substraterkennung durch die Alkalische Phosphatase hängt wahrscheinlich nicht von den Wechselwirkungen mit dem Rückgrat der Polypeptidkette, sondern hauptsächlich von der Erkennung des Phosphatrestes an der Seitenkette ab (Coleman, 1992; Holtz & Kantrowitz, 1999).

4.2. RNase T1 als Modellprotein zur Untersuchung der *cis/trans*-Isomerspezifität

Die Peptidbindungen liegen wegen ihres partiellen Doppelbindungscharakters entweder in der *cis*- oder der *trans*-Konformation vor. Dabei wird eine deutliche Bevorzugung des *trans*-Isomers gefunden. Nur die beiden Konformere der Peptidyl-Prolyl-Bindung sind durch eine relative Stabilisierung des *cis*-Isomers von vergleichbarer Energie. Im Vergleich zu den normalen Peptidbindungen wird deshalb neben der energetisch günstigeren *trans*-Konformation auch ein merklicher Anteil der entsprechenden *cis*-Konformation im Gleichgewicht beobachtet.

In kurzen prolinhaltigen Peptiden konnten bis zu 50 % *cis*-Konformer gefunden werden (Fischer, 2000). Die Analyse von Proteinstrukturen ergab, dass zwischen 5.2 % und 6.5 % aller Peptidyl-Prolyl-Bindungen in der *cis*-Konformation vorliegen. Dagegen befinden sich die nicht prolinhaltigen Peptidbindungen nur zu einem Anteil von 0.03 % bis 0.05 % in der *cis*-Konformation (Jabs et al., 1999; Macarthur & Thornton, 1991; Stewart et al., 1990).

Die Konformationen der Ser/Thr-Pro-Motive der natürlichen Substrate von prolinspezifischen Kinasen sind größtenteils noch nicht bekannt. Der durch Datenbankanalysen und aus thermodynamischen Daten geschätzte *cis*-Anteil dieser Motive liegt zwischen 5 und 20 % (Reimer et al., 1997; Reimer et al., 1998; Zhou et al., 2000).

Die Frage, ob auch diese *cis*-Ser/Thr-Pro-Bindungen phosphoryliert werden können, wurde anhand des Modellproteins RNase T1 untersucht. Die Identifizierung der Phosphorylierungsstellen durch tryptischem Verdau und anschließende massenspektrometrische Analyse sowie die Untersuchungen zur Phosphorylierung der RNase T1-Varianten haben gezeigt, dass die RNase T1 an beiden Erkennungssequenzen für prolinspezifische Kinasen durch ERK2 phosphoryliert werden kann.

Dabei wird die Ribonuklease sowohl an der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung, die in der gefalteten RNase T1 in der *cis*-Konformation vorliegt, als auch an der Ser⁷²-Pro⁷³-Bindung, die sich in der *trans*-Konformation befindet, phosphoryliert.

Für eine mögliche physiologische Bedeutung der RNase T1-Phosphorylierung liegen aus der Literatur noch keine Hinweise vor. Bis jetzt existieren jedoch einige Beispiele für eine durch Phosphorylierung vermittelte Regulation von Enzymen, die an der Synthese, Prozessierung und dem Abbau von RNA beteiligt sind. So wird die *E. coli* RNase III nach einer Infektion durch den Bakteriophagen T7 an mehreren Serinresten phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führt zu einem vierfachen Ansteigen der RNase-Aktivität (Mayr & Schweiger, 1983; Nicholson, 1999).

Ein gut untersuchtes Beispiel ist auch die Phosphorylierung der C-terminalen Domäne (CTD) der großen RNA-Polymerase II-Untereinheit. Die durch die prolinspezifische Kinase CDK7/Cyclin H katalysierte Phosphorylierung bewirkt wahrscheinlich den Übergang aus der Initiationsphase in die Elongationsphase der Transkription (Fisher & Morgan, 1994).

Die Kinaseaktivität der ERK2 gegenüber der RNase T1 konnte in Anwesenheit der reduzierenden Agens Dithiothreitol deutlich erhöht werden. Die Ribonuklease T1 wird durch zwei Disulfidbrücken, welche im gefalteten Protein in unmittelbarer räumlicher Nähe liegen, stabilisiert. Die Cys²-Cys¹⁰-Disulfidbindung ist dem Lösungsmittel zu etwa 90% zugänglich, während die Cys⁶-Cys¹⁰³-Bindung vollständig im Inneren verborgen ist. So konnte durch selektive Reduktion mit 25 mM DTT ein Derivat der RNase T1 gewonnen werden, in dem nur die Cys²-Cys¹⁰-Disulfidbrücke gespalten vorlag (Pace & Creighton, 1986; Pace et al., 1988).

Eine mögliche Erklärung für die Effekte des DTTs auf die Phosphorylierung könnte die Entstehung eines solchen RNase T1-Derivats sein. Durch die Spaltung der Cys²-Cys¹⁰-Bindung kommt es wahrscheinlich zu einer Erhöhung der Flexibilität der RNase T1, in deren Folge die Zugänglichkeit für die MAP-Kinase deutlich verbessert wird. Die Konformationsstabilität der RNase T1 nimmt durch das Öffnen der Cys²-Cys¹⁰-Disulfidbrücke um etwa 3 kcal/mol ab (Pace et al., 1991). Das Laufverhalten der mit 20 mM DTT behandelten RNase T1 zeigte während der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese keinen Unterschied zu einer unbehandelten Probe. Auch die RNase T1-Aktivität des mit DTT reduzierten Proteins war annähernd unverändert.

Diese Ergebnisse werden auch durch die Untersuchungen von Pace et al. bestätigt. Dabei konnte anhand der Laufeigenschaften in der Gelelektrophorese sowie durch Fluoreszenzmessungen gezeigt werden, dass die teilweise reduzierte RNase T1 in einer ähnlichen Konformation wie das Wildtyp-Protein gefaltet bleibt (Pace & Creighton, 1986).

Auch die Untersuchungen der RNase T1-C2S/C10N-Variante mittels CD- und 2D-NMR-Spektroskopie ergaben, dass die Sekundärstruktur sowie die Konformation der Peptidyl-Prolyl-Bindungen in Abwesenheit der Cys²-Cys¹⁰-Disulfidbrücke unverändert waren (Mayr et al., 1994). Diese Variante zeigte eine um etwa 20 % verminderte RNase T1-Aktivität.

Die an den vier Cysteinresten S-carboxymethylierte RNase T1 liegt dagegen unter scheinbar nativen Bedingungen (0.1 M Tris/HCl pH 7.5) vollständig entfaltet vor. Im Gegensatz zu der teilweise reduzierten RNase T1 war diese Variante in der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese zu einem deutlich höheren Molekulargewicht verschoben.

Die RNase T1 konnte an beiden Erkennungssequenzen für prolinspezifische Proteinkinasen durch ERK2 phosphoryliert werden. Die ermittelte Phosphorylierungsstöchiometrie nach beendeter Kinaseaktion betrug etwa 0.4 mol Phosphat je mol RNase T1. Das entspricht einem Phosphorylierungsgrad von etwa 20 % bezogen auf beide Phosphorylierungsstellen. Dieser geringe Phosphorylierungsgrad beruht hauptsächlich auf einer Hemmung durch das Phosphorylierungsprodukt. Das Vorhandensein einer nicht phosphorylierbaren RNase T1-Form kann wahrscheinlich ausgeschlossen werden. So konnte die von einem ausreagierten Phosphorylierungsansatz mittels Anionenaustausch-Chromatographie abgetrennte unphosphorylierte RNase T1 anschließend erneut durch die MAP-Kinase phosphoryliert werden. Dabei war die Kinaseaktivität gegenüber der abgetrennten RNase T1 im Vergleich zu einer noch unbehandelten RNase Probe um etwa 25 % vermindert. Auch die RNase T1-Aktivität war um etwa den gleichen Betrag verringert. Diese Tatsache kann wahrscheinlich durch eine teilweise Denaturierung der RNase T1 während der Reinigung erklärt werden. Auch die Ergebnisse der Untersuchung der Abhängigkeit des Phosphorylierungsgrads von der eingesetzten RNase T1-Konzentration deuten auf eine Produkthemmung hin. Dabei wurde eine Abnahme der Phosphorylierungsausbeute mit steigender RNase T1-Ausgangskonzentration beobachtet.

In der Literatur sind ebenfalls Beispiele für eine Inhibition der MAP-Kinase durch Produkthemmung beschrieben worden. So beträgt die Stöchiometrie der Phosphorylierung des Myelin Basic Proteins durch ERK2 weniger als 0.4 mol gebundenes Phosphat je mol Protein. Die Phosphorylierung des Myelin Basic Proteins gehört dabei zu den am effektivsten katalysierten Reaktionen der ERK2 (Erickson et al., 1990; Jacobs et al., 1999).

Die RNase T1-wt wird durch die prolinspezifische Kinase sowohl am Serin⁵⁴ als auch am Serin⁷² phosphoryliert. Durch die Untersuchungen zur Phosphorylierung der RNase T1-Varianten, die jeweils nur noch eine Phosphorylierungsstelle enthielten, konnte die Katalyse der ERK2 gegenüber den beiden Ser-Pro-Bindungen verglichen werden.

Die Kinaseaktivität gegenüber der RNase T1-P73V-Variante war deutlich erhöht im Vergleich zum Wildtyp (**Tab. 1**). Die katalytische Effizienz gegenüber der S54G/P55N-Variante und der RNase T1-wt war in vergleichbarer Höhe. Diese Ergebnisse scheinen im Widerspruch zu der an dem Peptidsubstrat Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np gefundenen absoluten Spezifität der ERK2 für das *trans*-Konformer der Ser/Thr-Pro-Bindung zu stehen, da die RNase T1-P73V-Variante, die nur noch die sich größtenteils in der *cis*-Konformation befindende Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung besitzt, deutlich effektiver phosphoryliert wird als die

S54G/P55N-Variante, die nur noch die Phosphorylierungsstelle in der *trans*-Konformation aufweist.

Die niedrigere katalytische Effizienz gegenüber der S54G/P55N-Variante könnte durch eine vergleichsweise schlechtere Zugänglichkeit der *trans*-Ser⁷²-Pro⁷³-Phosphorylierungsstelle für die Kinase, aufgrund sterischer Hinderungen, erklärt werden. Auch die deutlich erhöhte Aktivität der ERK2 gegenüber der vollständig entfaltet vorliegenden S-carboxymethylierten RNase T1-wt weist auf eine gehinderte Zugänglichkeit der Phosphorylierungsstellen im gefalteten Protein hin.

Eine weitere Ursache für die Bevorzugung der RNase T1-P73V-Variante könnte eine durch den Aminosäureaustausch hervorgerufene Änderung der Eigenschaften des Proteins darstellen. So ist die Konformationsstabilität der P73V-Variante im Vergleich zum Wildtyp und zu der S54G/P55N-Variante um etwa 8.5 KJ/mol vermindert. Die Destabilisierung der RNase T1-Variante könnte zu einer erhöhten Flexibilität des Proteinerückgrates und damit zu einer verbesserten Zugänglichkeit der Phosphorylierungsstelle führen. Auch die RNase T1-Aktivität gegenüber Hefe-RNA war um 60% reduziert. Dagegen konnte mittels CD-Messungen im Fern- und Nah-UV-Bereich gezeigt werden, dass die Sekundär- und Tertiärstruktur der P73V-Variante fast unverändert ist. Auch die Fluoreszenzspektren des Wildtyps und der P73V-Variante sind beinahe identisch (Schindler et al., 1996).

Eine weitere Erklärung für eine bevorzugte Phosphorylierung der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung könnte eine unterschiedlich gute Erkennung der Sekundärbindestellen durch die Kinase liefern. Dazu wurden die Kinaseaktivitäten gegenüber den Oligopeptidsubstraten, die von den beiden RNase T1-Phosphorylierungsstellen abgeleitet worden sind, gemessen. Der Vergleich der Aktivitätsmessungen zeigte eine deutliche Bevorzugung des Peptidsubstrats Ac-Val-Ser-Ser-Pro-Tyr-Tyr-NH₂ durch die MAP Kinase. Die Sequenz dieses Peptids entspricht der verbleibenden Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Phosphorylierungsstelle der RNase T1-P73V-Variante. Die Spezifitätskonstante war im Vergleich zu dem Substrat Ac-Gly-Gly-Ser-Pro-Gly-Ala-NH₂, welches aus der Ser⁷²-Phosphorylierungsstelle abgeleitet wurde, um etwa das Neunfache erhöht. Die Kinaseaktivitäten gegenüber den beiden RNase T1-Varianten unterschieden sich etwa um den Faktor drei. Diese Übereinstimmung der Ergebnisse deutet darauf hin, dass die effizientere Phosphorylierung der P73V-Variante durch die Proteinkinase ERK2 hauptsächlich durch eine bessere Erkennung der Sekundärbindestellen erklärt werden kann.

Die katalytische Effizienz der Kinase gegenüber den kurzen Peptiden war deutlich niedriger als die, die mit den RNase T1-Varianten beobachtet worden ist. Diese Resultate korrelieren mit Untersuchungen, die eine deutlich effizientere Phosphorylierung von Proteinsubstraten

verglichen zu Peptiden durch die ERK2 gezeigt haben. So wird das aus der Myelin Basic Protein-Aminosäuresequenz abgeleitete Peptid ATGPLSPGPFGR mit einer 600fach niedrigeren Geschwindigkeit phosphoryliert als das Myelin Basic Protein. Die Ursachen dafür liegen vor allem in einem drastisch höheren K_M -Wert für das Peptidsubstrat.

Die katalytische Effizienz der Phosphorylierung des Myelin Basic Proteins ist mit einem k_{cat}/K_M -Wert von $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ eine der höchsten beschriebenen für Substrate der ERK2 und Proteinkinasen im allgemeinen (Prowse et al., 2000). Im Vergleich dazu wird die RNase T1-wt mit einer 2000fach niedrigeren Effizienz phosphoryliert.

4.3. Konformationelle Heterogenität der nativen RNase T1

Im Widerspruch zu der an einem Peptidsubstrat nachgewiesenen *trans*-Isomerspezifität der ERK2 wird die RNase T1-wt sowohl an der *trans*-Serin⁷²-Prolin⁷³-Bindung als auch an der Serin⁵⁴-Prolin⁵⁵-Bindung, die im gefalteten Protein in der *cis*-Konformation vorliegt, durch die MAP-Kinase phosphoryliert. Eine Erklärung für diese Tatsache ist, dass die sich hauptsächlich in der *cis*-Konformation befindende Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung auch einen geringen *trans*-Isomeranteil besitzt. Die Untersuchung der Abhängigkeit der Initialgeschwindigkeit der Phosphorylierung von der eingesetzten Kinasekonzentration unterstützt diese Hypothese.

Die Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die ERK2-Konzentrationen zeigte für die RNase T1-wt und die P73V-Variante einen hyperbolen Verlauf. Normalerweise wird für Enzymreaktionen eine direkte Proportionalität zwischen der Geschwindigkeit des Substratumsatzes und der Zahl der Enzymmoleküle beobachtet.

Solche Abweichungen von der Linearität haben ihre Ursache öfters in einer konzentrationsbedingten Assoziation des Enzyms. So ist beschrieben, dass die MAP-Kinase ERK2 nach erfolgter Aktivierung durch Phosphorylierung in eine dimere Form übergeht. Dabei sinkt die Dissoziationskonstante für das Dimer von 20 μM für die nichtaktivierte auf 7.5 nM für die aktivierte Form der ERK2 (Cobb & Goldsmith, 2000). Als Folge der Dimerisierung der ERK2 wird eine anschließende Translokation in den Zellkern beschrieben. Dabei besitzt die Dimerisierung wahrscheinlich auch eine Funktion bei der Kontrolle der Phosphorylierung der ebenfalls meist als Dimer vorliegenden Transkriptionsfaktoren (Canagarajah et al.). Eine Beeinflussung der katalytischen Konstanten durch die Dimerisierung konnte jedoch nicht festgestellt werden (Prowse et al., 2000).

Da die eingesetzten Kinasekonzentrationen (20-140 nM) in den Experimenten mit den RNase T1-Varianten deutlich über der Dissoziationskonstante des Dimers (7.5 nM) lagen, sollte die ERK2 in allen durchgeführten Versuchen in dimerer Form vorgelegen haben. Auch die

Abhängigkeit der Phosphorylierungsgeschwindigkeit von der Kinasekonzentration mit dem Peptidsubstrat Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np zeigte den erwarteten linearen Verlauf. Diese Tatsachen deuten darauf hin, dass die Abweichungen von der Proportionalität mit der RNase T1-wt und der P73V-Variante als Substrat nicht auf einer Assoziation bzw. Dissoziation der Kinase beruhen, sondern substratbedingt sind.

Die beobachtete Abweichung der Kinaseabhängigkeit von der Proportionalität kann durch die mit Peptidsubstraten nachgewiesene *cis/trans*-Isomerspezifität erklärt werden. So wird bei hohen Kinasekonzentrationen infolge der ausschließlichen Phosphorylierung des *trans*-Konformers durch die isomerspezifische ERK2 der kleine *trans*-Isomeranteil der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung schnell verbraucht. Dadurch kommt es zu einer vorübergehenden Abweichung vom thermodynamischen *cis/trans*-Gleichgewicht. Dieses hätte zur Folge, dass die Kinaseaktivität ab einer bestimmten ERK2-Konzentration direkt von der Nachlieferung des *trans*-Konformers und damit von der *cis/trans*-Isomerisierung der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung abhängig sein würde.

Die Beschleunigung der Phosphorylierung der RNase T1-wt in Gegenwart von katalytischen Konzentrationen der PPIase Cyp18 ist ein weiteres wichtiges Indiz zur Bestätigung dieser Hypothese. Durch Untersuchungen der RNase T1-Varianten, die nur noch eine Phosphorylierungsstelle enthielten, wurde gezeigt, dass die PPIase hauptsächlich die Phosphorylierung der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung beeinflusst. Dabei sollte eine Beschleunigung der Phosphorylierung der RNase T1 durch Cyp18 nur in dem Fall beobachtet werden können, wenn die Prolylisomerisierung geschwindigkeitsbestimmend für die isomerspezifische Phosphorylierungsreaktion ist. Der Einfluss von PPIasen auf die Phosphorylierung kann somit wahrscheinlich durch eine beschleunigte Einstellung des *cis/trans*-Gleichgewichts erklärt werden. Dadurch kommt es zu einer schnelleren Bereitstellung des phosphorylierbaren *trans*-Isomers der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung und somit zu einer Erhöhung der Kinaseaktivität.

Die Frage, ob eine katalytisch aktive PPIase für die Beschleunigung der RNase T1-Phosphorylierung essentiell ist, konnte durch Inhibitionsstudien und Untersuchungen mit einer katalytisch inaktiven Cyclophilin18-Variante geklärt werden. So konnte der Einfluss des Cyclophilin18 auf die Phosphorylierungsgeschwindigkeit durch die Zugabe des spezifischen Inhibitors Cyclosporin A vollständig aufgehoben werden. Auch die Experimente mit der katalytisch inaktiven Cyclophilin18-F113A-Variante, welche keinen Einfluss auf die Phosphorylierung zeigte, bestätigten die absolute Abhängigkeit der beobachteten Effekte von der katalytischen Aktivität der PPIase.

Eine Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidyl-Prolylbindungen in nativen Proteinen durch Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen konnte bereits für das Mannose-bindende Protein und die Adenylatkinase nachgewiesen werden (Ng & Weis, 1998; Sheng et al., 1997).

Ein weiteres gut untersuchtes Beispiel stellt die durch die Proteinphosphatase 2A (PP2A) katalysierte Dephosphorylierung der dualspezifischen Phosphatase Cdc25 dar. Die Cdc25c besitzt eine entscheidende Rolle beim G₂/M-Übergang des Zellzyklus. Sie wird durch eine Vielzahl von Phosphorylierungen reguliert. Durch Lu et al. konnte gezeigt werden, dass die Dephosphorylierung des Thr⁴⁸ in Gegenwart der PPIase Pin1, die eine Bevorzugung von phosphorylierten Serin- bzw. Threoninresten N-terminal vom Prolin aufweist, deutlich beschleunigt wird. Weder katalytisch inaktive Varianten noch die isolierte WW-Domäne von Pin1 zeigten einen Effekt auf die Dephosphorylierung (Zhou et al., 2000). Weitere Hinweise für eine Beteiligung der PPIase an der Regulation des Phosphorylierungsgrads von Cdc25c konnten durch Überexpression von Pin1 in HeLa-Zellen und Extrakten von *Xenopus Laevis* gewonnen werden. Dabei bewirkt Pin1 eine Inaktivierung der Phosphatase Cdc25c und verhindert damit den Eintritt in die Mitose (Lu et al., 1996; Shen et al., 1998).

Auch die teilweise Kompensation von temperatursensitiven PP2A-Mutanten in Hefezellen durch Überexpression von Pin1 weist auf ein mögliches Zusammenspiel der PPIase mit der PP2A hin. Ebenso werden temperatursensitive Mutanten des Pin1-homologen Proteins ESS1/PTF1 durch Überexpression von PP2A fast vollständig kompensiert (Zhou et al., 2000). Die Dephosphorylierung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins tau durch die PP2A wird ebenfalls in Gegenwart von katalytisch aktivem Pin1 beschleunigt. Das tau-Protein wird an mehreren Ser/Thr-Pro-Motiven phosphoryliert. Dabei konnte durch Untersuchungen von verschiedenen tau-Varianten gezeigt werden, dass die PPIase Pin1 nur die Dephosphorylierung eines bestimmten pSer-Pro-Motives reguliert (Lu et al., 1999; Zhou et al., 2000). Ob diese phosphorylierte Ser-Pro-Bindung hauptsächlich in der *cis*-Konformation vorliegt und deshalb durch die *trans* isomerspezifische Phosphatase in Gegenwart von Pin1 beschleunigt dephosphoryliert wird, ist noch nicht bekannt.

Die Phosphorylierung der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung konnte durch katalytische Konzentrationen an Cyclophilin18 beschleunigt werden. Die Untersuchung des Einflusses anderer PPIasen auf die Phosphorylierung zeigte, dass das *Legionella pneumophila* FKBP25 die Kinaseaktivität gegenüber der RNase T1-wt in vergleichbarer Größe beschleunigte. Dagegen wird in Anwesenheit des *E. coli* Triggerfaktors nur ein geringer Einfluss auf die Phosphorylierung der

RNase T1 beobachtet. Mit dem *E. coli* Parvulin 10 sowie mit dem humanen FKBP12 konnte die Phosphorylierungsgeschwindigkeit nicht beeinflusst werden.

Im Gegensatz zu der geringen Beschleunigung der Phosphorylierung katalysiert der *E. coli* Triggerfaktor die langsame Phase der Rückfaltung der S-carboxymethylierten RNase T1-P55N-Variante (RCM-P55N-T1) um den Faktor 22 effizienter als das Cyclophilin18 (Scholz et al., 1997; Zarnt et al., 1997). Die langsame Phase der Rückfaltung der RCM-P55N-T1 wird durch die *trans* nach *cis* Isomerisierung der Tyr³⁸-Pro³⁹-Peptidbindung bestimmt. Die gefundenen Unterschiede könnten einen weiteren Hinweis liefern, dass die Effekte der PPIasen auf die Phosphorylierung auf eine Beeinflussung der *cis/trans*-Isomerisierung der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung zurückzuführen sind und nicht auf einer Änderung der Konformation der zweiten *cis*-Peptidbindung beruhen, die möglicherweise zu einer verbesserten Zugänglichkeit der Phosphorylierungsstelle für die Kinase führen würde.

Die Unterschiede in der Fähigkeit der PPIasen, die Phosphorylierung zu beeinflussen, könnten sowohl durch eine unterschiedliche Zugänglichkeit der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung als auch durch eine verschiedenartige Substratspezifität der PPIasen erklärt werden. So werden mit den beiden PPIasen Parvulin10 und FKBP12, die das kleinste Molekulargewicht besitzen, die geringsten Effekte erzielt. Dagegen konnte mit dem relativ großen, als Dimer vorliegenden, FKBP25 die größten Effekte auf die Phosphorylierung erzielt werden. Mit der in monomerer Form vorliegenden FKBP25-M38,42E-Variante wurde ein deutlich geringerer Effekt im Vergleich zum Wildtyp beobachtet. Diese Ergebnisse könnten daraufhin deuten, dass für eine effiziente Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Phosphorylierungsstelle zusätzliche Wechselwirkungen mit der RNase T1 notwendig sind. Dabei ist die katalytische Aktivität der PPIase für die Beschleunigung der Phosphorylierung absolut notwendig. So wurden die Effekte des FKBP25 in Gegenwart des spezifischen Inhibitors Rapamycin vollständig aufgehoben. Auch mit der katalytisch inaktiven FKBP25-Tyr185Ala-Variante konnte kein Einfluss auf die Phosphorylierung festgestellt werden.

Die Untersuchungen zur Substratspezifität der PPIasen anhand von Oligopeptiden der allgemeinen Form Suc-Ala-X_{aa}-Pro-Phe-pNA zeigten, dass die FK506-bindenden Proteine eine starke Präferenz für hydrophobe Reste (Leu, Phe, Ile) N-terminal zum Prolin besitzen. Die Cyclophiline zeigen dagegen eine relativ gering ausgeprägte Substratspezifität. Dabei werden Peptide mit X_{aa} = Ala bzw. Val um den Faktor 5-9 besser erkannt und umgesetzt als jene mit X_{aa} = His bzw. Trp. (Harrison & Stein, 1990; Harrison & Stein, 1992). Für Peptide mit X_{aa} = Ser bzw. Thr liegen aus der Literatur leider noch keine systematischen Vergleiche zwischen den PPIasen vor.

Die Beschleunigung der ERK2-katalysierten RNase T1-Phosphorylierung zeigte eine Abhängigkeit von der eingesetzten PPIase Konzentration. Die Phosphorylierungsgeschwindigkeit wurde bereits durch katalytische Mengen von Cyp18 und *L. pneumophila* FKBP25 deutlich erhöht. Durch die Zugabe von PPIase-Konzentrationen über 2 μ M konnte nur noch ein geringer zusätzlicher Effekt auf die Phosphorylierung erreicht werden. Der maximal erzielbare Beschleunigungsfaktor mit den sechs untersuchten PPIasen lag bei den verwendeten Versuchsbedingungen jeweils in dem Bereich von 2.5 bis 3. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass bei höheren PPIase-Konzentrationen die *cis/trans*-Isomerisierung und damit die Nachlieferung des phosphorylierbaren *trans*-Substrates nicht mehr geschwindigkeitsbestimmend für die Phosphorylierungsreaktion ist.

Der Einfluss des Cyclophilins auf die Phosphorylierung der S-carboxymethylierten RNase T1 war deutlich geringer im Vergleich zu den Effekten, die mit der unmodifizierten RNase T1 beobachtet wurden. So konnte mit der durch Zugabe von 2 M Natriumchlorid zurückgefalteten RCM-T1-wt nur eine maximale Beschleunigung um den Faktor 1.3 gezeigt werden. Mögliche Ursachen für die geringere Beeinflussung der Phosphorylierung könnten ein erhöhter *trans*-Isomeranteil der Phosphorylierungsstelle sowie eine größere Flexibilität der S-carboxymethylierten RNase T1 sein. Dadurch kann wahrscheinlich das für die Kinase phosphorylierbare *trans*-Isomer der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung auch ohne PPIase-Katalyse in ausreichender Konzentration und genügend hoher Geschwindigkeit nachgeliefert werden.

Da das Cyclophilin18 unter ähnlichen Salzbedingungen in der Lage ist, die Rückfaltung der RCM-T1-wt zu katalysieren (Schmid et al., 1996; Stoller et al., 1995), beruht die vergleichsweise geringere Beschleunigung der Phosphorylierung vermutlich nicht auf einer Inhibierung der PPIase durch die hohe Salzkonzentration.

Auf die Phosphorylierung der unter Niedrigsalzbedingungen entfaltet vorliegenden RCM-wt-T1 wurde kein Einfluss durch PPIasen beobachtet. In der entfalteten S-carboxymethylierten RNase T1-wt liegt die Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Phosphorylierungsstelle zu etwa 80 % in der *trans*-Konformation vor (Kiefhaber et al., 1990a). Durch die ausschließliche Phosphorylierung des *trans*-Konformers kommt es nur zu einer sehr geringen Verschiebung des *cis/trans*-Gleichgewichts und dadurch zu keinem messbaren Effekt der PPIasen auf seine Einstellung.

Die katalytische Effizienz der MAP-Kinase ERK2 gegenüber der entfalteten RCM-T1-wt war im Vergleich zur unmodifizierten nativen RNase T1-wt um den Faktor 5 erhöht. Die Untersuchung der Abhängigkeit der Kinaseaktivität vom Faltungszustand der RCM-wt-T1 zeigte, dass die Abnahme der Phosphorylierungsgeschwindigkeit mit der Zunahme der Fluoreszenz bei 320 nm während der langsamen Phase der Rückfaltung korreliert. Die

langsame Phase wird durch die *trans* nach *cis* Isomerisierungen der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung sowie der Tyr³⁸-Pro³⁹-Bindung bestimmt (Kiefhaber et al., 1990a; Kiefhaber et al., 1990c). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die deutlich geringere Kinaseaktivität gegenüber der gefalteten RNase T1-wt hauptsächlich auf die *trans* nach *cis* Isomerisierung der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Phosphorylierungsstelle zurückzuführen ist. Um zu klären, ob auch die Phosphorylierung der *trans*-Ser⁷²-Pro⁷³-Phosphorylierungsstelle während der Rückfaltung einer Veränderung unterliegt, wurde auch die S-carboxymethylierte RNase T1-S54G/P55N-Variante untersucht. Mit dieser Variante, die nur noch die Phosphorylierungsstelle in der *trans*-Konformation enthält, wurde eine wesentlich geringere Abnahme der Phosphorylierungsgeschwindigkeit in Korrelation zur langsamen Phase der Rückfaltung festgestellt. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf einer veränderten Zugänglichkeit der Ser⁷²-Pro⁷³-Bindung für die ERK2. Der Vergleich der Kinaseaktivitäten gegenüber den beiden entfalteten S-carboxymethylierten RNase-T1-Varianten zeigt, dass die Phosphorylierung der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung um das Zehnfache effizienter katalysiert wird als die der Ser⁷²-Pro⁷³-Bindung. Nach erfolgter Rückfaltung werden beide Phosphorylierungsstellen mit nahezu gleicher Geschwindigkeit phosphoryliert.

Ob diese deutliche Verringerung der Kinaseaktivität gegenüber der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Phosphorylierungsstelle in der gefalteten RNase T1-wt ausschließlich durch die *cis/trans*-Isomerisierung dieser Bindung zustande kommt oder ob auch eine Behinderung der Zugänglichkeit vorliegt, kann anhand dieser Ergebnisse nicht ausgesagt werden.

4.4. Detektion von *native-state* Isomerisierungen durch isomerspezifische Kinasen

Die Resultate der Untersuchungen zur Abhängigkeit der Initialgeschwindigkeit der Phosphorylierung von der Kinasekonzentration sowie die Experimente zur Beschleunigung der Phosphorylierungsgeschwindigkeit durch PPIasen deuten darauf hin, dass die Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung der nativen RNase T1 sich in einem konformationellen Gleichgewicht befindet. Solche durch *cis/trans*-Isomerisierung hervorgerufenen konformationellen Gleichgewichte von Peptidbindungen in nativen Proteinen sind für eine Vielzahl von Beispielen beschrieben worden. So erfolgt durch die Bindung von Ca²⁺-Ionen an das Mannose-bindende-Protein und verschiedenen anderen Lectinen des C-Typs (Bouckaert et al., 2000; Ng & Weis, 1998) eine Verschiebung des Isomerengleichgewichts der Glu¹⁹⁰-Pro¹⁹¹-Peptidbindung in Richtung des *cis*-Isomers. Auch bei der Staphylokokken-Nuklease wird durch Zugabe von Ca²⁺-Ionen und des im aktiven Zentrum bindenden Inhibitors pdTp (deoxyThymidin-3',5'-diphosphat) das

Isomerengleichgewicht an der Lys¹¹⁶-Pro¹¹⁷-Bindung zugunsten des *cis*-Isomers verschoben (Evans et al., 1989; Loh et al., 1991).

Das Auftreten von solchen *native-state* Isomerisierungen kann durch verschiedene spektroskopische Methoden detektiert werden. So können mittels NMR-Spektroskopie Hinweise über das parallele Vorliegen der beiden Isomere gewonnen werden (Adjadj et al., 1997). Auch das Auftreten von zwei verschiedenen Röntgenkristallstrukturen eines Proteins deutet auf das Vorhandensein einer *native-state* Isomerisierung hin (Ng et al., 1998). Durch HPLC konnten ebenfalls die nebeneinander vorliegenden *cis*- und *trans*-Isomere der Prolin enthaltenden Polypeptidkette getrennt werden (Okeefe et al., 1996). Diese Methoden erfordern jedoch, dass die Anteile beider Isomere genügend hoch sind bzw. dass sich die verschiedenen in Lösung vorhandenen Isomere gleichermaßen gut kristallisieren lassen. Weiterhin können *cis/trans*-Isomerisierungen in nativen Proteinen aufgrund von Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften verfolgt werden (Ng & Weis, 1998). Eine Voraussetzung dafür ist, dass fluoreszierende Seitenketten an den Konformationsänderungen beteiligt sind. Eine weitere Möglichkeit zur Verfolgung von *native-state* Isomerisierungen besteht in der Messung von Enzymaktivitäten. So konnte am Beispiel der Acylphosphatase gezeigt werden, dass die *cis/trans*-Isomerisierung einer Prolylbindung, welche die Gesamtstruktur des Proteins nicht beeinflusst, wesentlich zur Aktivität des Enzyms beiträgt (Chiti et al., 1999). Auch die Beeinflussung von strukturellen und enzymatischen Eigenschaften von Proteinen durch katalytisch aktive PPIasen kann indirekte Hinweise auf *native-state* Isomerisierungen liefern (Lopez-Illasaca et al., 1998).

Die beiden sich langsam ineinander umwandelnden Prolylisomere können zu unterschiedlichen biologischen Eigenschaften und Funktionen der nativen Proteine führen. Dies beinhaltet vor allem die Bindung an Liganden sowie die Veränderung der Substrateigenschaften von Proteinen in isomerspezifischen Enzymreaktionen (Phosphorylierungen). Aus diesen unterschiedlichen Reaktivitäten der isomerspezifischen Enzyme (prolinspezifischen Proteinkinasen) gegenüber den beiden Isomeren der Peptidyl-Prolyl-Bindung ergibt sich eine weitere Möglichkeit zur Aufklärung von *native-state* Isomerisierungen.

Die Untersuchung der Abhängigkeit der Initialgeschwindigkeiten von den eingesetzten Kinasekonzentrationen zeigte, dass die *cis/trans*-Isomerisierung der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung für die Phosphorylierung geschwindigkeitsbestimmend ist. Dadurch war eine Voraussetzung erfüllt, um die Geschwindigkeitskonstanten der Prolylisomerisierung direkt aus der

gemessenen Kinasereaktion zu ermitteln. Die Anteile der beiden Isomeren wurden anschließend aus den ermittelten Geschwindigkeitskonstanten berechnet.

Die Berechnung der kinetischen Konstanten der *cis/trans*-Isomerisierung für die Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Peptidbindung der RNase T1-P73V-Variante erfolgte mit Hilfe des Software-Programms Dynafit (Kuzmic, 1996). Dazu wurden sowohl die Abhängigkeit der Initialgeschwindigkeit von der ERK2-Konzentration als auch die Abhängigkeit der Initialgeschwindigkeit von der RNase T1-Konzentration nach dem gleichen Reaktionsmodell angepasst. Durch das Programm konnten kinetische Konstanten berechnet werden, die für beide Abhängigkeiten eine gute Übereinstimmung zeigten. So ergaben die durch Simulation aus den Geschwindigkeitskonstanten berechneten Kurven eine gute Korrelation mit den gemessenen Werten.

Die bei einer Temperatur von 30 °C ermittelten Konstanten der *native-state* Isomerisierung der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Peptidbindung betragen für die *cis*→*trans* Isomerisierung $1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und für die *trans*→*cis* Isomerisierung $5.8 \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$.

In der Literatur sind für kurze unstrukturierte Peptide eine Reihe von Geschwindigkeitskonstanten der Prolylisomerisierung beschrieben worden. Dabei variierten die ermittelten Konstanten der *cis*→*trans* Isomerisierung in Abhängigkeit von der N-terminal zum Prolin benachbarten Aminosäure um weniger als eine Größenordnung (Fischer, 2000). Die mit dem Oligopeptid Ac-Ala-Ser-Pro-Lys-NH₂ gemessenen und für 30 °C berechneten Geschwindigkeitskonstanten der *cis/trans*-Isomerisierung der Ser-Pro-Bindung betragen $2 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ bzw. $3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Reimer et al., 1998). Im Vergleich zu diesen Werten, ist die Geschwindigkeitskonstante der *cis* nach *trans* Isomerisierung der RNase T1-Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Peptidbindung um zwei Größenordnungen niedriger, während der Wert der *trans* nach *cis* Isomerisierung um den gleichen Faktor erhöht ist. Dagegen wird in vielen Fällen die Stabilisierung des *cis*-Isomers nur durch eine Senkung der Geschwindigkeitskonstante der *cis*→*trans* Isomerisierung erreicht (Ng & Weis, 1998).

Konstanten für die Prolylisomerisierung in Proteinen konnten vor allem durch Untersuchungen zur Rückfaltung von denaturierten Proteinen erhalten werden. In den meisten Fällen sind die ermittelten Geschwindigkeiten der *cis/trans*-Isomerisierung vergleichbar zu denen, die mit kurzen Modellpeptiden gemessen worden sind. So stimmen die Konstanten der *cis/trans*-Isomerisierung der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung, die durch Rückfaltung der RNase T1 ermittelt worden sind, gut mit den für das Peptid Ac-Ala-Ser-Pro-Lys-NH₂ beschriebenen Werten überein (Mayr et al., 1996). Auch die Isomerisierungsgeschwindigkeiten der Tyr⁹²-Pro⁹³-Bindung der RNase A sind vergleichbar mit den an Oligopeptiden gefundenen (Houry

& Scheraga, 1996). Im Gegensatz dazu ist die *trans* nach *cis* Isomerisierung der Lys¹¹⁶-Pro¹¹⁷-Bindung während der Rückfaltung der Staphylokokken-Nuklease um drei Größenordnungen schneller als die Isomerisierung dieser Bindung in Peptidderivaten (Kautz & Fox, 1993).

Für die Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten der *cis/trans*-Isomerisierung in nativen Proteinen liegen in der Literatur dagegen bis jetzt nur wenige Beispiele vor. So wurde für die *cis*→*trans* Isomerisierung der Ser⁷⁰-Pro⁷¹-Bindung der humanen Muskel-Acylphosphatase ein Wert von $2.7 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ bei 28 °C ermittelt (Chiti et al., 1999). Auch für die *native-state* Isomerisierung der Glu¹⁹⁰-Pro¹⁹¹-Bindung des Mannose-bindenden Proteins konnten die Geschwindigkeitskonstanten bestimmt werden. Dabei betragen die bei 36 °C gemessenen Isomerisierungskonstanten $k_{c \rightarrow t} = 5.1 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ und $k_{t \rightarrow c} = 1.1 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. In Gegenwart von Ca²⁺-Ionen sinkt die Geschwindigkeitskonstante der *cis*→*trans* Isomerisierung $k_{c \rightarrow t}$ auf $2.6 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, während $k_{t \rightarrow c}$ mit $0.7 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ nahezu konstant bleibt. Dies entspricht einem Ca²⁺-induzierten Anstieg des *cis*-Gehalts der Glu¹⁹⁰-Pro¹⁹¹-Bindung von 20 auf 96.4 % (Ng & Weis, 1998). Ein weiteres Beispiel stellt die Isomerisierung der Gla²¹-Pro²²-Bindung des Prothrombins nach erfolgter Kalziumzugabe dar. Die durch Fluoreszenzmessungen ermittelte Geschwindigkeitskonstante der *trans*→*cis* Isomerisierung betrug $4.3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Evans & Nelsestuen, 1996).

Eine im Vergleich zu kurzen Peptidderivaten deutlich höhere Geschwindigkeitskonstante der Prolylisomerisierung konnte durch NMR-Spektroskopie für die *cis*→*trans* Isomerisierung ($k_{c \rightarrow t} = 4.8 \text{ s}^{-1}$, 48 °C, pH 11) der His-Pro-Bindung des Peptidhormons Angiotensin III gemessen werden. Die beobachtete Konstante konnte mit einer intramolekularen Katalyse durch die protonierte Seitenkette des Histidins erklärt werden (Reimer et al., 1997).

Die Geschwindigkeiten der *cis/trans*-Isomerisierung der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Peptidbindung sind nur bedingt mit den in der Literatur vorhandenen Werten vergleichbar. Die an nativen Proteinen, kurzen Oligopeptiden sowie während der prolinlimitierten Rückfaltung gemessenen Geschwindigkeitskonstanten der Prolylisomerisierung unterscheiden sich teilweise um mehrere Größenordnungen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Seitenkette der Aminosäure N-terminal vom Prolin einen Einfluss auf die Isomerisierung in Oligopeptiden besitzt (Fischer, 2000; Reimer et al., 1998). Dagegen spielen bei Proteinen wahrscheinlich sterische Zwänge der Struktur sowie die Katalyse durch benachbarte Aminosäureseitenketten eine ebenso wichtige Rolle für die Geschwindigkeit der *cis/trans*-Isomerisierung. So konnte für die Dihydrofolat-Reduktase aus *E. coli* eine Beteiligung des Arg⁴⁴ an der Isomerisierung der Gln⁶⁵-Pro⁶⁶-Bindung gezeigt werden (Texter et al., 1992).

Aus den Geschwindigkeitskonstanten $k_{c \rightarrow t}$ und $k_{t \rightarrow c}$ der *native-state* Isomerisierung konnten die Isomerenanteile der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Peptidbindung berechnet werden. Dabei betrug der Anteil des *trans*-Isomers 0,017 %. Aus der Literatur lagen noch keine Hinweise für eine konformationelle Heterogenität der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung der RNase T1 vor, da solche geringen Anteile eines Isomers bis jetzt mit den verwendeten Methoden zur Strukturauflösung nicht detektiert werden konnten.

Obwohl die Aufklärung der Konformationen von Peptidyl-Prolylbindungen in Proteinen durch isomerspezifische Kinasen auf phosphorylierbare Ser/Thr-Pro-Motive begrenzt ist, besitzt sie einige Vorteile gegenüber den bis jetzt angewandten Methoden, wie NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallstrukturanalyse. So erfordern diese Methoden genügend hohe Konzentrationen beider Isomere, eine gleichermaßen gute Kristallisierbarkeit sowie eine ausreichend hohe Auflösung der Proteinstruktur. Aufgrund dieser Voraussetzungen sind wahrscheinlich eine Vielzahl von *cis*-Xaa-Pro-Bindungen in Proteinen bisher unentdeckt geblieben. So konnte gezeigt werden, dass in Strukturen mit einer Auflösung unter 2 Å der *cis*-Anteil von Peptidyl-Prolylbindungen doppelt und von normalen Peptidbindungen dreimal so hoch war wie in Strukturen mit einer Auflösung über 2.5 Å (Weiss et al., 1998).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente zur Phosphorylierung der RNase T1 beschreiben eine neue, sehr empfindliche Methode zur Aufklärung der Konformation von Peptidbindungen sowie zur Bestimmung von Isomerisierungsgeschwindigkeiten in nativen Proteinen unter Verwendung isomerspezifischer Enzyme.

4.5. Isomerspezifität als Regulationsprinzip prolinspezifischer Phosphorylierung

Anhand von Untersuchungen an Oligopeptidsubstraten und dem Modellprotein RNase T1 konnte in dieser Arbeit eine absolute Bevorzugung des *trans*-Konformers von Ser/Thr-Pro-Motiven durch die prolinspezifischen Proteinkinasen ERK2 und Cdc2/Cyclin B nachgewiesen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die PPIasen Cyp18 und FKBP25 in der Lage sind, die Phosphorylierung der RNase T1 zu beeinflussen. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis auf eine Katalyse von *cis/trans*-Isomerisierungen in nativen Proteinen durch PPIasen. Die Untersuchungen der Dephosphorylierung von prolingerichteten Motiven in Oligopeptiden und Proteinen haben ebenfalls eine deutliche Bevorzugung des *trans*-Konformers durch die Proteinphosphatasen 1 und 2A gezeigt. Dabei kann die Dephosphorylierung in Gegenwart der phosphatspezifischen PPIase Pin1 beschleunigt werden (Zhou et al., 2000).

Diese Ergebnisse deuten auf ein neuartiges Regulationsprinzip zur Kontrolle des Phosphorylierungsgrades von Substraten prolinspezifischer Proteinkinasen hin. Dieser Mechanismus beinhaltet das Zusammenwirken von spezifischen PPIasen mit den an der Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung beteiligten Enzymen.

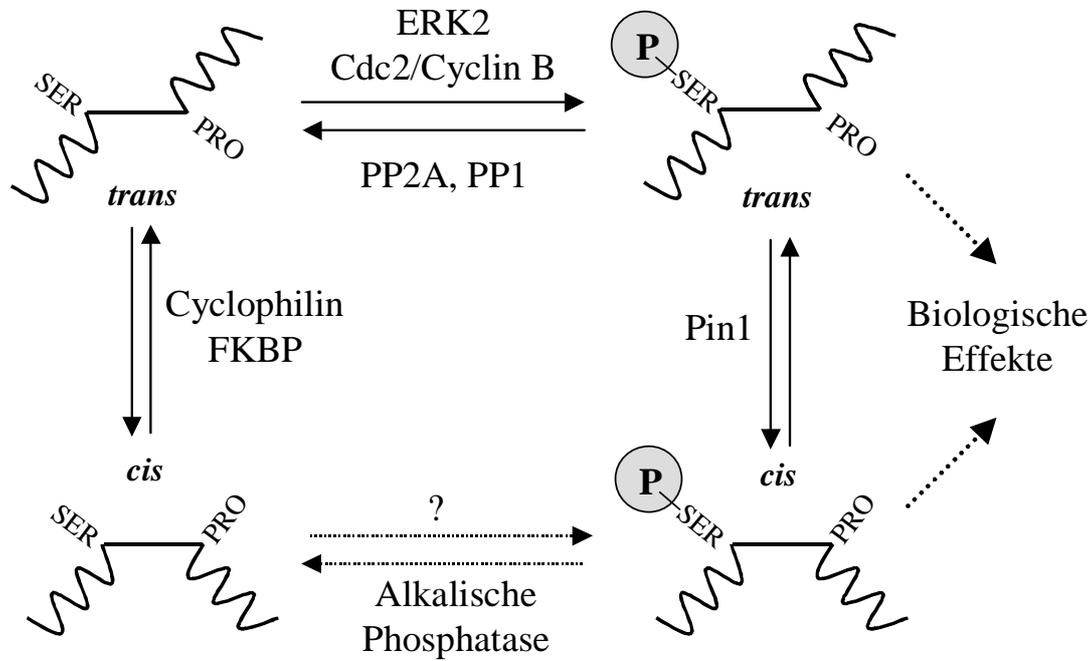


Abb. 4.1 Regulationsmechanismus zur Kontrolle des Phosphorylierungsgrades von Substraten prolinspezifischer Proteinkinasen

Das Modell geht davon aus, dass die in der *trans*- bzw. *cis*-Konformation vorliegenden phosphorylierten Ser/Thr-Pro-Motive unterschiedliche biologische Eigenschaften der Proteine bewirken. Dazu gehören z. B. die Bindung von Liganden sowie die Regulation der Enzymaktivität. Die *cis/trans*-Isomerisierung der phosphorylierten Motive wird durch die phosphatspezifischen PPIasen katalysiert (Pin1). Die Phosphorylierung der Ser/Thr-Pro-Bindungen in der *trans*-Konformation kann durch die prolinspezifischen Kinasen ERK2 und Cdc2/Cyclin B katalysiert werden. Damit die Motive in der *cis*-Konformation phosphoryliert werden können, müssen sie zuerst (unter Beteiligung von PPIasen wie z.B. FKBP und Cyclophiline) in die *trans*-Konformation isomerisieren. Proteinkinasen, die ausschließlich die *cis*-Konformation phosphorylieren können, wurden bis jetzt noch nicht beschrieben. Dagegen kann die Alkalische Phosphatase *in vitro* auch pSer/pThr-Pro-Motive in der *cis*-Konformation dephosphorylieren.

Dabei können die PPIasen durch die Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung die Bereitstellung des für die isomerspezifische Phosphatase bzw. Kinase (de)phosphorylierbaren Isomers regeln (Abb. 4.1). Die Katalyse der PPIasen kann somit in Verbindung mit Phosphorylierungs- bzw. Dephosphorylierungsreaktionen zu einer strukturellen Änderung des Peptidrückgrates der Proteine führen. Bis jetzt war aus der Literatur bekannt, dass allein durch die Bindung von Phosphatresten Veränderungen in der Konformation der Polypeptidkette induziert werden können (Johnson, 1994). Die in der *trans*- bzw. *cis*-Konformation

vorliegenden phosphorylierten Ser/Thr-Pro-Motive können unterschiedliche biologische Eigenschaften der Proteine bewirken. Dazu gehören veränderte katalytische Aktivitäten von Enzymen oder verschieden starke Bindungskapazitäten gegenüber Liganden. So könnten Phosphatrest-erkennende Proteindomänen wie z. B. die SH-2- und WW-Domäne selektiv ein Isomer erkennen. Anhand der Kristallstruktur der WW-Domäne von Pin1 mit dem gebundenen Peptid Tyr-Ser(PO₃H₂)-Pro-Thr-Ser(PO₃H₂)-Pro-Ser wurde gezeigt, dass die beiden phosphorylierten Ser-Pro-Motive nur in der *trans*-Konformation gebunden werden können (Verdecia et al., 2000). Die Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung der Phosphorylierungsstellen durch Pin1 könnte somit nicht nur die Dephosphorylierung, sondern auch die Wechselwirkungen mit anderen Proteinen regulieren.

In Proteinen wird die relative Häufigkeit von phosphorylierten *cis*-Ser/Thr-Pro-Bindungen auf 10 - 20 % geschätzt (Zhou et al., 2000). Ob diese *cis*-pSer-Pro-Motive erst nach erfolgter Phosphorylierung und anschließender *cis/trans*-Isomerisierung in die *cis*-Konformation übergehen oder ob Kinasen existieren, die auch die *cis*-Ser/Thr-Pro-Bindungen phosphorylieren können, konnte bis jetzt noch nicht geklärt werden. Für die Thr²⁰-Pro²¹-Phosphorylierungsstelle der cytoplasmatischen Domäne des Amyloid Precursor Proteins konnte durch NMR-Spektroskopie gezeigt werden, dass der *cis*-Isomeranteil dieser Bindung sich infolge der Phosphorylierung durch GSK-3 β um 9 % erhöht (Ramelot & Nicholson, 2001). Durch Untersuchungen an kurzen Oligopeptiden konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Ser/Thr-Pro Motiven die Geschwindigkeitskonstanten der *cis/trans*-Isomerisierung beeinflusst. So waren die Geschwindigkeitskonstanten nach Phosphorylierung der Peptide bis um das Achtfache reduziert. Auch ein leicht verringerter *cis*-Gehalt konnte beobachtet werden (Schutkowski et al., 1998). Dabei waren im Gegensatz zu unphosphorylierten Peptiden sowohl die Isomerisierungsgeschwindigkeiten als auch die *cis*-Gehalte der phosphorylierten Peptide im physiologischen Bereich sehr stark vom pH-Wert abhängig.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung prolinspezifischer Motive nicht nur von der Primärsequenz der Phosphorylierungsstelle, sondern auch von der Konformation des Peptidrückgrates abhängig sein kann. So konnte gezeigt werden, dass bestimmte *cis*-Ser/Thr-Pro-Motive erst durch eine vorangeschaltete *cis/trans*-Isomerisierung effizient phosphoryliert werden können. Ob auch Proteinkinasen existieren, die ausschließlich die *cis*-Konformation phosphorylieren, bleibt noch eine offene Frage.

5. Zusammenfassung

Die reversible Proteinphosphorylierung an Serin- oder Threoninresten N-terminal zum Prolin gehört zu den wichtigsten Regulationsmechanismen einer Vielzahl zellulärer Prozesse. Die Phosphorylierung wird durch die Vertreter der prolinspezifischen Proteinkinasen katalysiert. Diese werden in die Familien der cyclinabhängigen Kinasen, welche eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Zellzyklus besitzen, und in die der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen, die entscheidend an der intrazellulären Signalübertragung beteiligt sind, eingeteilt.

Durch die einzigartigen Eigenschaften des Prolins kann es zum gleichzeitigen Auftreten von *cis*- und *trans*-Isomeren der Peptidyl-Prolylbindung in nativen Proteinen kommen. Wie am Beispiel von Proteasen bereits gezeigt wurde, können die sich ineinander umwandelnden Isomere in Enzymreaktionen unterschiedlich reagieren. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin zu untersuchen, ob auch prolinspezifische Proteinkinasen zwischen dem *cis*- und dem *trans*-Isomer der Ser/Thr-Pro-Bindung unterscheiden können. Die Untersuchung des Einflusses von Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen auf die Phosphorylierung war ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit.

- Die *trans*-Isomerspezifität der MAP-Kinase ERK2 konnte mit dem Peptidsubstrat Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np nachgewiesen werden. Die Herstellung des reinen *cis*-Konformers erfolgte mittels isomerspezifischer Proteolyse. Während der Wiedereinstellung des *cis/trans*-Gleichgewichtes konnte die Phosphorylierungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Isomerenzusammensetzung untersucht werden. So wurde eine Zunahme der ERK2-Aktivität gegenüber dem Peptidsubstrat in Korrelation mit dem ansteigenden *trans*-Isomeranteil beobachtet. Dabei stimmte die aus den Phosphorylierungsexperimenten berechnete Geschwindigkeitskonstante fast genau mit der für die *cis/trans*-Isomerisierung direkt gemessenen überein.
- Zur Aufklärung der Isomerspezifität der prolinspezifischen Kinase Cdc2/Cyclin B wurde ein weiterer Test unter Verwendung des disulfidverbrückten, intern gequenchten fluorogenen Peptidsubstrats $\text{Abz-Cys-Ser-Pro-Arg-Cys-Nty-NH}_2$ entwickelt. Nach der Öffnung der Disulfidbrücke mittels DTT isomerisiert das Peptid bis zur Einstellung des *cis/trans*-Gleichgewichtes. Die Untersuchung der Phosphorylierung des Peptidsubstrats, welches unterschiedliche Konzentrationen an *cis*- und *trans*-Konformer während der Isomerisierung enthielt, zeigte eine nahezu absolute Spezifität der Cdc2/Cyclin B für das *trans*-Isomer.

- Die *cis/trans*-Isomerspezifität der ERK2 wurde anhand der Ribonuklease T1 weiter untersucht. Die Analyse der Phosphorylierungsstellen mittels tryptischem Verdau und Massenspektrometrie sowie die Untersuchungen mit RNase T1-Varianten haben gezeigt, dass die RNase T1 sowohl an der Serin⁵⁴-Prolin⁵⁵-Bindung als auch an der Serin⁷²-Prolin⁷³-Bindung durch die ERK2 phosphoryliert wird. Die Untersuchung der Phosphorylierung der beiden RNase T1-Varianten zeigte, dass die katalytische Effizienz der ERK2 gegenüber der RNase T1-P73V-Variante, die nur noch die Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Phosphorylierungsstelle in der *cis*-Konformation besitzt, im Vergleich zur S54G/P55N-Variante deutlich erhöht war. Diese bevorzugte Phosphorylierung der *cis*-Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung steht im scheinbaren Widerspruch zu der an dem Peptidsubstrat Pro-Arg-Ser-Pro-Phe-NH-Np gefundenen absoluten Spezifität der ERK2 für das *trans*-Isomer. Durch Untersuchungen an von der RNase T1 abgeleiteten Peptidsubstraten konnte gezeigt werden, dass diese Bevorzugung gegenüber der Ser⁷²-Pro⁷³-Bindung zum größten Teil auf einer besseren Erkennung der Sekundärbindestellen beruht.

- Die Untersuchungen zur Abhängigkeit der Initialgeschwindigkeiten von den eingesetzten Kinasekonzentrationen zeigten, dass bei hohen ERK2-Konzentrationen die *cis/trans*-Isomerisierung der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung für die Phosphorylierung der RNase T1-P73V-Variante geschwindigkeitsbestimmend wird. In Gegenwart katalytischer Konzentrationen der PPIase Cyp18 wird die Phosphorylierung der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung deutlich beschleunigt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese hauptsächlich in der *cis*-Konformation vorliegende Bindung sich in einem Konformationsgleichgewicht mit einem kleinen *trans*-Isomeranteil befindet. Somit trägt die PPIase wahrscheinlich zu einer schnelleren Bereitstellung des durch die isomerspezifische Kinase phosphorylierbaren *trans*-Konformers bei. Die Phosphorylierungsgeschwindigkeit gegenüber der RNase T1-wt konnte auch durch das FKBP25 um das 2.5fache beschleunigt werden. Dagegen konnte in Anwesenheit des *E. coli* Triggerfaktors nur ein geringer Effekt auf die Phosphorylierung der RNase T1 beobachtet werden. Keinen Einfluss hatten bei einer eingesetzten PPIase-Konzentration von jeweils 1 µM das Parvulin 10 aus *E. coli* und das humane FKBP12. Durch Experimente mit katalytisch inaktiven PPIase-Varianten sowie durch den Einsatz von spezifischen Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass die katalytische Aktivität der PPIasen für die Beschleunigung der Phosphorylierungsgeschwindigkeit absolut notwendig ist.

- Da die isomerspezifische Kinasereaktion deutlich schneller als die Prolylisomerisierung abläuft, wird die Nachlieferung des Substrates in der katalysierbaren *trans*-Konformation für die Phosphorylierung geschwindigkeitsbestimmend. Dadurch wurde es möglich, die Geschwindigkeitskonstanten der *native-state* Isomerisierung sowie die konformationelle Zusammensetzung der Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Bindung direkt aus der gemessenen Kinasereaktion zu ermitteln. Die mit Hilfe des Software-Programms Dynafit aus der v/S-Charakteristik und der Abhängigkeit der Initialgeschwindigkeit von der Kinasekonzentration berechneten Konstanten der *cis/trans*-Isomerisierung betragen für die *cis*→*trans* Isomerisierung $1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und für die *trans*→*cis* Isomerisierung $5.8 \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$. Aus den Geschwindigkeitskonstanten der *native-state* Isomerisierung konnte ein *trans*-Isomeranteil von 0,017 % für die Ser⁵⁴-Pro⁵⁵-Peptidbindung der RNase T1-P73V-Variante ermittelt werden.

Die in dieser Arbeit gezeigten Experimente zur isomerspezifischen Phosphorylierung der RNase T1 beschreiben eine neue, sehr empfindliche Methode zur Untersuchung der konformationellen Heterogenität von nativen Proteinen. Obwohl die Aufklärung der Konformationen von Peptidyl-Prolylbindungen in Proteinen durch isomerspezifische Kinasen auf phosphorylierbare Ser/Thr-Pro-Motive begrenzt ist, besitzt sie einige Vorteile gegenüber den bis jetzt angewandten Methoden. So wird infolge des Einsatzes von radioaktiv markiertem ATP eine sehr hohe Sensitivität erreicht, wodurch im Vergleich zur NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallstrukturanalyse nur sehr geringe Proteinkonzentrationen benötigt werden.

6. Literatur

- Adjadj, E., Naudat, V., Quiniou, E., Wouters, D., Sautiere, P. und Craescu, C.T.** (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.
- 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.
- Arni, R., Heinemann, U., Tokuoka, R. und Saenger, W.** (1988) Three-dimensional structure of the ribonuclease T1 2'-GMP complex at 1.9-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 15358.
- Avruch, J., Zhang, X.-f. und Kyriakis, J.M.** (1994) Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, 19, 279-283.
- Beals, C.R., Sheridan, C.M., Turck, C.W., Gardner, P. und Crabtree, G.R.** (1997) Nuclear Export of NF-ATc Enhanced by Glycogen Synthase Kinase-3. *Science*, 275, 1930-1933.
- Belec, L., Slaninova, J. und Lubell, W.D.** (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.
- Booher, R.N., Holman, P.S. und Fattaey, A.** (1997) Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits cdc2 but not cdk2 activity. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 22300.
- 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, M.M.** (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., Thuncke, F., Kullertz, G., Schutkowski, M., Fischer, G. und Neubert, K.** (1998) Evidence for the Absolute Conformational Specificity of the Intestinal H⁺/Peptide Symporter, Pept1. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 3861-3864.
- Brillantes, A.M.B, Ondrias, K, Scott, A, Kobrinsky, E, Ondriasova, et al.** (1994) Stabilization of calcium release channel (Ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell*, 77, 513-523.
- Brown, N.R., Noble, M.E.M., Endicott, J.A. und Johnson, L.N.** (1999) The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases. *Nature Cell Biology*, 1, 438-443.
- Brunet, A., Roux, D., Lenormand, P., Dowd, S., Keyse, S. und Pouyssegur, J.** (1999) Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO Journal*, 18, 664-674.
- Cai, H., Smola, U., Wixler, V., Eisenmann-Tappe, I. und Copper, G.M.** (1997) Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isoforms in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase. *Molecular & Cellular Biology*, 17, 732.

- Cameron, A.M., Nucifora, F.C., Fung, E.T., Livingston, D.J., Aldape, R.A., Ross, C.A. und Snyder, S.H.** (1997) FKBP12 Binds the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor at Leucine-Proline (1400-1401) and Anchors Calcineurin to This FK506-Like Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 27582-27588.
- Canagarajah, B.J., Khokhlatchev, A., Cobb, M.H. und Goldsmith, E.J.** (1997) Activation Mechanism of the MAP Kinase ERK2 by Dual Phosphorylation. *Cell*, 90, 859-869.
- Chan, J.R. und Stinson, R.A.** (1986) Dephosphorylation of phosphoproteins of human liver plasma membranes by endogenous and purified liver alkaline phosphatases. *Journal of Biological Chemistry*, 261, 7635-7639.
- Chang, L.F. und Karin, M.** (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410, 37-40.
- Charbonnier, J.B., Belin, P., Moutiez, M., Stura, E.A. und Quemeneur, E.** (1999) On the role of the *cis*-proline residue in the active site of DsbA. *Protein Science*, 8, 96-105.
- Chazin, W.J., 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 2195-2198.
- Cheetham, J.C., Smith, D.M., Aoki, K.H., Stevenson, J.L., Hoeffel, T.J., Syed, R.S., Egrie, J. und Harvey, T.S.** (1998) NMR Structure of Human Erythropoietin and a Comparison with Its Receptor Bound Conformation. *Nature Structural Biology*, 5, 861-866.
- Chen, Y.G., Liu, F. und Massague, J.** (1997) Mechanism of TGF-Beta Receptor Inhibition by FKBP12. *EMBO Journal*, 16, 3866-3876.
- Cheng, H.N. und Bovey, F.A.** (1977) *Cis-trans* equilibrium and kinetic studies of acetyl-L-proline and glycyl-L-proline. *Biopolymers*, 16, 1465-1472.
- Chiti, F., Taddei, N., Giannoni, E., Nuland, N.A.J.v., Ramponi, G. und Dobson, C.M.** (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.
- Chu, Y.F., Solski, P.A., Khosravifar, R., Der, C.J. und Kelly, K.** (1996) The Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatases Pac1, Mkp-1, and Mkp-2 Have Unique Substrate Specificities and Reduced Activity in Vivo toward the Erk2 Sevenmaker Mutation. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 6497-6501.
- Cobb, M.H.** (1999) MAP kinase pathways [Review]. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 71, 479-500.
- Cobb, M.H. und Goldsmith, E.J.** (1995) How MAP kinases are regulated. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 14843.
- Cobb, M.H. und Goldsmith, E.J.** (2000) Dimerization in MAP-kinase signalling. *Trends in Biochemical Sciences*, 25, 7-9.
- Cohen, P.** (2000) The regulation of protein function by multisite phosphorylation - a 25 year update. *Trends in Biochemical Sciences*, 25, 596-601.
- Coleman, J.E.** (1992) Structure and mechanism of Alkaline Phosphatase. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 21, 441-483.

- Colley, N.J., Baker, E.K., Starnes, M.A. und Zuker, C.S.** (1991) The cyclophilin homolog NINA A is required in the secretory pathway. *Cell*, 67, 255-263.
- Corbalangarcia, S., Yang, S.S., Degenhardt, K.R. und Barsagi, D.** (1996) Identification of the Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphorylation Sites on Human Sos1 That Regulate Interaction with Grb2. *Molecular & Cellular Biology*, 16, 5674-5682.
- Crespo, P., Xu, N., Daniotti, J.L., Troppmair, J., Rapp, U.R. und Gutkind, J.S.** (1994) signaling through transforming G protein-coupled receptors in NIH 3T3 cells involves c-Raf activation. Evidence for a protein kinase C independent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 21103.
- Cunningham, D.F. und Oconnor, B.** (1997) Proline specific peptidases [Review]. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure & Molecular Enzymology*, 1343, 160-186.
- 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, R.J.** (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases [Review]. *Cell*, 103, 239-252.
- Dementieva, D.V., Bocharov, E.V. und Arseniev, A.S.** (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.
- Dolinski, K., Muir, S., Cardenas, M. und Heitman, J.** (1997) All Cyclophilins and FK506 Binding Proteins Are, Individually and Collectively, Dispensable for Viability in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 13093-13098.
- Downward, J., Graves, J.D., Warne, P.H., Rayter, S. und Cantrell, D.A.** (1990) Stimulation of p21ras upon T-cell activation [see comments]. Comment in: *Nature* 1990 Aug 23;346(6286):696-7. *Nature*, 346, 719-723.
- Drakenberg, T.** (1972) The barrier to internal rotation in amides VI acetamide solvent dependent entropy of activation. *Tetrahedron Letters*, 1743-1746.
- Dunphy, W.G.** (1994) The decision to enter mitosis (Review). *Trends in Cell Biology*, 4, 202-207.
- Ekholm, S.V. und Reed, S.I.** (2000) Regulation of G(1) cyclin dependent kinases in the mammalian cell cycle [Review]. *Current Opinion in Cell Biology*, 12, 676-684.
- Endicott, J.A., Noble, M.E.M. und Tucker, J.A.** (1999) Cyclin-dependent kinases: inhibition and substrate recognition. *Current Opinion in Structural Biology*, 9, 738-744.
- English, J.M., Pearson, G., Hockenberry, T., Shivakumar, L., White, M.A. und Cobb, M.H.** (1999) Contribution of the ERK5/MEK5 pathway to Ras/Raf signaling and growth control. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 31588-31592.
- Erickson, A., Payne, D.M., Martino, P.A., Rossomando, A.J., Shabonowitz, J., Weber, M.J., Hunt, D.F. und Sturgill, T.W.** (1990) Identification by mass spectrometry of threonine 97 in bovine myelin basic protein as a specific phosphorylation site for mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 19728-19735.

- Evans, P.A., Dobson, C.M., Kautz, R.A., Hatfull, G. und Fox, R.O.** (1987) Proline isomerism in staphylococcal nuclease characterized by NMR and site-directed mutagenesis. *Nature*, 329, 266-268.
- Evans, P.A., Kautz, R.A., Fox, R.O. und Dobson, C.M.** (1989) A magnetization-transfer nuclear magnetic resonance study of the folding of staphylococcal nuclease. *Biochemistry*, 28, 362-370.
- Evans, T.C. und Nelsestuen, G.L.** (1996) Importance of *Cis*-Proline 22 in the Membrane-Binding Conformation of Bovine Prothrombin. *Biochemistry*, 35, 8210-8215.
- Fairbanks, G., Steck, T. und Wallach, D.** (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 10, 2606.
- Faux, M.C. und Scott, J.D.** (1996) More on target with protein phosphorylation - Confering specificity by location [Review]. *Trends in Biochemical Sciences*, 21, 312-315.
- Feng, Y.Q., Hood, W.F., Forgey, R.W., Abegg, A.L., Caparon, M.H., Thiele, B.R., Leimgruber, R.M. und Mcwherter, C.A.** (1997) Multiple Conformations of a Human Interleukin-3 Variant. *Protein Science*, 6, 1777-1782.
- Ferrell, J.E. und Bhatt, R.R.** (1997) Mechanistic Studies of the Dual Phosphorylation of Mitogen-Activated Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 19008-19016.
- Fischer, G.** (1994) Peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases and their effectors. *Angewandte Chemie - International Edition in English*, 33, 1415-1436.
- 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) [Determination of enzymatic catalysis for the *cis-trans*-isomerization of peptide bonds in proline-containing peptides]. *Biomed Biochim Acta*, 43, 1101-1111.
- Fischer, G., Heins, J. und Barth, A.** (1983) The conformation around the peptide bond between the P1- and P2-positions is important for catalytic activity of some proline-specific proteases. *Biochim.Biophys.Acta*, 742, 452-462.
- Fischer, G., Liebold, B.W., Lang, K., Kiefhaber, T. und Schmid, F.X.** (1989) Cyclophilin and peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase are probably identical proteins. *Nature*, 337, 476-478.
- Fisher, D.L. und Nurse, P.** (1996) A single fission yeast mitotic cyclin B p34cdc2 promotes both S-phase and mitosis in the absence of G1 cyclins. *EMBO Journal*, 15, 850.
- Fisher, R.P. und Morgan, D.O.** (1994) A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell*, 78, 713-724.
- Forood, B., Feliciano, E.J. und Nambiar, K.P.** (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.
- Franke, E.K., Yuan, H.E.H. und Luban, J.** (1994) Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature*, 372, 359-362.

- Franklin, C.C. und Kraft, A.S.** (1997) Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 16917-16923.
- Franzoni, L., Nicastro, G., Pertinhez, T.A., Oliveira, E., Nakaie, C.R., Paiva, A.C.M., 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.
- Furnari, B., Blasina, A., Boddy, M.N., McGowan, C.H. und Russell, P.** (1999) Cdc25 inhibited in vivo and in vitro by checkpoint kinases Cds1 and Chk1. *Molecular Biology of the Cell*, 10, 833-845.
- Galat, A. und Metcalfe, S.M.** (1995) Peptidylproline *cis/trans* isomerases. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 63, 67-118.
- Garrington, T.P. und Johnson, G.L.** (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways [Review]. *Current Opinion in Cell Biology*, 11, 211-218.
- Gavin, A.C. und Nebreda, A.R.** (1999) A MAP kinase docking site is required for phosphorylation and activation of p90(rsk)/MAPKAP kinase-1. *Current Biology*, 9, 281-284.
- Gerez, L., Mohrmann, K., Raak, M.v., Jongeneelen, M., Zhou, X.Z., Lu, K.P. und Sluijs, P.v.d.** (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, R.K., Lee, B.M., Walker, J., Summers, M.F., Yoo, S. und Sundquist, W.I.** (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, E.M.** (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.
- Gothel, S.F., Scholz, C., Schmid, F.X. und Marahiel, M.A.** (1998) Cyclophilin and Trigger Factor from *Bacillus Subtilis* Catalyze in Vitro Protein Folding and Are Necessary for Viability under Starvation Conditions. *Biochemistry*, 37, 13392-13399.
- Grana, X. und Reddy, E.P.** (1995) Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin- dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene*, 11, 211.
- Grathwohl, Wüthrich und K.** (1981) NMR studies of the rates of proline *cis/trans* isomerization in oligopeptides. *Biopolymers*, 20, 2623-2633.
- Grathwohl, C. und Wuthrich, K.** (1976a) NMR studies of the molecular conformations in the linear oligopeptides H-(L-Ala)_n-L-Pro-OH. *Biopolymers*, 15, 2043-2057.
- Grathwohl, C. und Wuthrich, K.** (1976b) The X-Pro peptide bond as an NMR probe for conformational studies of flexible linear peptides. *Biopolymers*, 15, 2025-2041.
- Gunasekaran, K., Nagarajaram, H.A., 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.

- Gutkind, J.S.** (1998) The Pathways Connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades [Review]. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 1839-1842.
- Hacker, J. und Fischer, G.** (1993) Immunophilins - Structure Function Relationship and Possible Role in Microbial Pathogenicity. *Molecular Microbiology*, 10, 445-456.
- Hamilton, G.S. und Steiner, J.P.** (1998) Immunophilins: Beyond immunosuppression [Review]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 41, 5119-5143.
- Handschumacher, R.E., Harding, M.W., Rice, J., Drugge, R.J. und Speicher, D.W.** (1984) Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science*, 226, 544-547.
- 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.
- Hanks, S.K. und Hunter, T.** (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J*, 9, 576-596.
- Harding, M.W., Galat, A., Uehling, D.E. und Schreiber, S.L.** (1989) A receptor for the immunosuppressant FK506 is a *cis-trans* peptidyl-prolyl isomerase. *Nature*, 341, 758-760.
- Harrison, R.K. und Stein, R.L.** (1990) Substrate specificities of the peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase activities of cyclophilin and FK-506 binding protein: evidence for the existence of a family of distinct enzymes. *Biochemistry*, 29, 3813-3816.
- Harrison, R.K. und Stein, R.L.** (1992) Mechanistic Studies of Enzymic and Nonenzymic Prolyl *Cis-Trans* Isomerization. *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 3464-3471.
- Heinemann, U. und Hahn, U.** (1989) *Protein-Nucleic Acid Interactions* (Macmillan Press, London), 11-141.
- Heinemann, U. und Saenger, W.** (1982) Specific protein-nucleic acid recognition in ribonuclease T1-2'-guanylic acid complex: An X-ray structure. *Nature*, 299, 27-31.
- Helekar, S.A. und Patrick, J.** (1997) Peptidyl Prolyl *Cis-Trans* Isomerase Activity of Cyclophilin a in Functional Homo-Oligomeric Receptor Expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 5432-5437.
- Hennig, L., Christner, C., Kipping, M., Schelbert, B., Rucknagel, K.P., Grabley, S., Kullertz, G. und Fischer, G.** (1998) Selective Inactivation of Parvulin-Like Peptidyl-Prolyl *Cis/Trans* Isomerases by Juglone. *Biochemistry*, 37, 5953-5960.
- Hetzl, R. und Wüthrich, K.** (1979) Conformational energy studies of linear dipeptides H-X-pro-OH. *biopolymers*, 18, 2589-2606.
- Holtz, K.M. und Kantrowitz, E.R.** (1999) The mechanism of the alkaline phosphatase reaction: insights from NMR, crystallography and site-specific mutagenesis [Review]. *FEBS Letters*, 462, 7-11.
- Houry, W.A. und Scheraga, H.A.** (1996) Nature of the Unfolded State of Ribonuclease A - Effect of *Cis-Trans* X-Pro Peptide Bond Isomerization. *Biochemistry*, 35, 11719-11733.
- Hubbard, M.J. und Cohen, P.** (1993) On Target with a New Mechanism for the Regulation of Protein Phosphorylation. *Trends in Biochemical Sci.*, 18, 172-177.

- Hunter, T.** (1995) Protein kinases and phosphatases - The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling[Review]. *Cell*, 80, 225-236.
- Imparl, J.M., Senshu, T. und Graves, D.J.** (1995) Studies of calcineurin-calmodulin interaction: Probing the role of arginine residues using peptidylarginine deiminase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 318, 370-377.
- Jabs, A., Weiss, M.S. und Hilgenfeld, R.** (1999) Non-proline *cis* peptide bonds in proteins. *Journal of Molecular Biology*, 286, 291-304.
- Jacobs, D., Glossip, D., Xing, H., Muslin, A.j. und Kornfeld, K.** (1999) Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes & Development*, 13, 163-175.
- Jeffrey, P.D., Tong, L. und Pavletich, N.P.** (2000) Structural basis of inhibition of CDK-cyclin complexes by INK4 inhibitors. *Genes & Development*, 14, 3115-3125.
- Johnson, L.H.** (1994) Control by protein phosphorylation. *Nature Structural Biology*, 1, 657.
- Johnson, L.N. und Barford, D.** (1991) The effects of phosphorylation on structure and function of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 22, 199.
- Johnson, L.N., Noble, M.E.M. und Owen, D.J.** (1996) Active and inactive protein kinase : structural basis for regulation. *Cell*, 85, 149.
- Johnson, L.N. und Richard, J.L.** (2001) Structural basis for control by phosphorylation. *Chemical Society Reviews*, 101, 2209-2242.
- Kautz, R.A. und Fox, R.O.** (1993) NMR Analysis of Staphylococcal Nuclease Thermal Quench Refolding Kinetics. *Protein Science*, 2, 851-858.
- Khokhlatchev, A., Canagarajah, B.J., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E.J. und Cobb, M.H.** (1998) Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell*, 93, 605-615.
- Kiefhaber, T., Grunert, H.P., Hahn, U. und Schmid, F.X.** (1990a) Replacement of a *cis* proline simplifies the mechanism of ribonuclease T1 folding. *Biochemistry*, 29, 6475-6480.
- Kiefhaber, T., Quaas, R., Hahn, U. und Schmid, F.X.** (1990b) Folding of ribonuclease T1. 1. Existence of multiple unfolded states created by proline isomerization. *Biochemistry*, 29, 3053-3061.
- Kiefhaber, T., Quaas, R., Hahn, U. und Schmid, F.X.** (1990c) Folding of ribonuclease T1. 2. Kinetic models for the folding and unfolding reactions. *Biochemistry*, 29, 3061-3070.
- King, R.W., Jackson, P.K. und Kirschner, M.W.** (1994) Mitosis in transition (review). *Cell*, 79, 563-571.
- Koepke, J., Maslowska, M., Heinemann, U. und Saenger, W.** (1989) Three-dimensional Structure of Ribonuclease T1 complexed with Guanylyl-2',5'-guanosine at 1.8 Å. *Journal of Molecular Biology*, 206, 475.
- Kuntz.** (1972) Protein folding. *J Am Chem Soc*, 94, 4009-4012.

- Kuzmic, P.** (1996) Program Dynafit for the Analysis of Enzyme Kinetic Data - Application to HIV Proteinase. *Analytical Biochemistry*, 237, 260-273.
- Kyriakis, J.M. und Avruch, J.** (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological Reviews*, 81, 807-869.
- Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E.A., Ahmad, M.F., Avruch, J. und Woodgett, J.R.** (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*, 369, 156-160.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lander, E.S.** (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860.
- Li, P.S., Chen, X.G., Shulin, E. und Asher, S.A.** (1997) UV Resonance Raman Ground and Excited State Studies of Amide and Peptide Isomerization Dynamics. *Journal of the American Chemical Society*, 119, 1116-1120.
- Liakopoulou-Kyriakides, M. und Galardy, R.E.** (1979) *s-Cis* and *s-trans* isomerism of the His-Pro peptide bond in angiotensin and thyroliberin analogues. *Biochemistry*, 18, 1952-1957.
- Lin, L.N. und Brandts, J.F.** (1979a) Evidence suggesting that some proteolytic enzymes may cleave only the *trans* form of the peptide bond. *Biochemistry*, 18, 43-47.
- Lin, L.N. und Brandts, J.F.** (1979b) Role of *cis-trans* isomerism of the peptide bond in protease specificity. Kinetic studies on small proline-containing peptides and on polyproline. *Biochemistry*, 18, 5037-5042.
- Lin, L.N. und Brandts, J.F.** (1983) Evidence showing that a proline-specific endopeptidase has an absolute requirement for a *trans* peptide bond immediately preceding the active bond. *Biochemistry*, 22, 4480-4485.
- Lin, L.N. und Brandts, J.F.** (1985) Isomer-specific proteolysis of model substrates: influence that the location of the proline residue exerts on *cis/trans* specificity. *Biochemistry*, 24, 6533-6538.
- Liu, W., Youn, H., Zhou, X.Z., Lu, K.P. und Liu, J.O.** (2001) Binding and regulation of the transcription factor NFAT by the peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase Pin1. *FEBS Letters*, 496, 105-108.
- Lodish, H.F. und Kong, N.** (1991) Cyclosporin A inhibits an initial step in folding of transferrin within the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 266, 14835-14838.
- Loh, S.N., McNemar, C.W. und Markley, J.L.** (1991) Detection and kinetic characterization of a novel proline isomerism in staphylococcal nuclease by NMR. *Techniques in protein Chem.* 2, 275-282.
- Lopez-Illasaca, 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, K.P., Hanes, S.D. und Hunter, T.** (1996) A Human Peptidyl-Prolyl Isomerase Essential for Regulation of Mitosis. *Nature*, 380, 544-547.

- Lu, P.J., Wulf, G., Zhou, X.Z., Davies, P. und Lu, K.P.** (1999) The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature*, 399, 784-788.
- Luban, J.** (1996) Absconding with the chaperone - Essential cyclophilin-gag interaction in HIV-1 virions [Review]. *Cell*, 87, 1157-1159.
- Ludwig, B, Rahfeld, J, Schmidt, Mann, K, Wintermeyer, E, et al.** (1994) Characterization of Mip proteins of *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiology Letters*, 118, 23-30.
- Lundgren, K.N., Walworth, R., Booher, R.N., Dembski, M., Kirschner, M.W. und Beach, D.** (1991) Mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell*, 64, 1111.
- Lyons, W.E, Steiner, J.P, Snyder, S.H, Dawson und T.M.** (1995) Neuronal regeneration enhances the expression of the immunophilin FKBP-12. *Journal of Neuroscience*, 15, 2985-2994.
- Macarthur, M.W. und Thornton, J.M.** (1991) Influence of Proline Residues on Protein Conformation. *J Mol Biol*, 218, 397-412.
- Mahoney, N.M., Janmey, P.A. und Almo, S.C.** (1997) Structure of the Profilin-Poly-L-Proline Complex Involved in Morphogenesis and Cytoskeletal Regulation. *Nature Structural Biology*, 4, 953-960.
- Manea, V.P., Wilson, K.J. und Cable, J.R.** (1997) Conformations and Relative Stabilities of the *Cis* and *Trans* Isomers in a Series of Isolated N-Phenylamides. *Journal of the American Chemical Society*, 119, 2033-2039.
- Martinez-Oyanedel, J., Choe, H.W., Heinemann, U. und Saenger, W.** (1991) Ribonuclease T1 with free recognition and catalytic site: crystal structure analysis at 1.5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 222, 335-352.
- Maucuer, A., Caer, J.P.L., 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.
- Mayr, J.E. und Schweiger, M.** (1983) RNase III is positively regulated by T7 protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 5340-5343.
- Mayr, L.M., Odefey, C., Schutkowski, M. und Schmid, F.X.** (1996) Kinetic Analysis of the Unfolding and Refolding of Ribonuclease T1 by a Stopped-Flow Double-Mixing Technique. *Biochemistry*, 35, 5550-5561.
- Mayr, L.M., Willbold, D., Landt, O. und Schmid, F.X.** (1994) Role of the Cys 2/Cys 10 Disulfide Bond for the Structure, Stability, and Folding Kinetics of Ribonuclease T1. *Protein Science*, 3, 227-239.
- Medrano, F.J., Alonso, J., Garcia, J.L., Romero, A., Bode, W. und Gomisruth, F.X.** (1998) Structure of Proline Imino-peptidase from *Xanthomonas Campestris* Pv. *Citri* - a Prototype for the Prolyl Oligopeptidase Family. *EMBO Journal*, 17, 1-9.
- Morgan, D.O.** (1997) Cyclin-dependent kinases - engines, clocks and microprocessors [Review]. *Annual Review of Cell & Developmental Biology*, 13, 261-291.
- Morrison, D.K., Kaplan, D.R., Escobedo, J.A., Rapp, U.R., Roberts, T.M. und Williams, L.T.** (1989) Direct activation of the serine/threonine kinase activity of Raf-1 through tyrosine phosphorylation by the PDGF beta-receptor. *Cell*, 58, 649.

- Morrison, P., Takishima, K. und Rosner, M.R.** (1993) Role of threonine residues in regulation of the epidermal growth factor receptor by protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 268, 15536-15543.
- Muda, M., Theodosiou, A., Gillieron, C., Smith, A., Chabert, C., Camps, M., Boschert, U., Rodrigues, N., Davies, K., et al.** (1998) The mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 N-terminal noncatalytic region is responsible for tight substrate binding and enzymatic specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 9323-9329.
- Mueller, P.R.** (1995) A membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates cdc2 on both threonine14 and tyrosine15. *Science*, 270, 86.
- 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.
- Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M. und Shaw, A.S.** (1996) Interaction of 14-3-3 with Signaling Proteins Is Mediated by the Recognition of Phosphoserine. *Cell*, 84, 889-897.
- Nasmyth, K.** (1996) Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science*, 274, 1643.
- Ng, K.K.S., Park-Snyder, S. und Weis, W.I.** (1998) Ca²⁺-dependent structural changes in C-type mannose-binding proteins. *Biochemistry*, 37, 17965-17976.
- Ng, K.K.S. und Weis, W.I.** (1998) Coupling of prolyl peptide bond isomerization and Ca²⁺ binding in a C-type mannose-binding protein. *Biochemistry*, 37, 17977-17989.
- Nicholson, A.W.** (1999) Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiology Letters*, 23, 371-390.
- Niebuhr, K., Ebel, F., Frank, R., Reinhard, M., Domann, E., Carl, U.D., Walter, U., Gertler, F.B., Wehland, J., et al.** (1997) Novel Proline-Rich Motif Present in Acta of *Listeria Monocytogenes* and Cytoskeletal Proteins Is the Ligand for the Evh1 Domain, a Protein Module Present in the Ena/Vasp Family. *EMBO Journal*, 16, 5433-5444.
- Nurse, P.** (1997) Checkpoint pathways come of age [Review]. *Cell*, 91, 865-867.
- Nurse, P.** (1999) Cyclin dependent kinases and regulation of the fission yeast cell cycle. *Biological Chemistry*, 380, 729-733.
- Nurse, P.** (2000) A long twentieth century of the cell cycle and beyond [Review]. *Cell*, 100, 71-78.
- Okeefe, M.P., Nedelkov, D., Bieber, A.L. und Nieman, R.A.** (1996) Evidence for Isomerization in Myotoxin a from the Prairie Rattlesnake (*Crotalus Viridis Viridis*). *Toxicon*, 34, 417-434.
- Ottleben, H., Haasemann, M., Ramachandran, R., Grolach, M., Muller-Esterl, W. und Brown, L.R.** (1997) An NMR study of the interaction of 15N-labelled bradykinin with an antibody mimic of the bradykinin B2 receptor. *European Journal of Biochemistry*, 244, 471-478.
- Pace, C.N. und Creighton, T.E.** (1986) The disulphide folding pathway of ribonuclease T1. *J Mol Biol*, 188, 477-486.

- Pace, C.N., Grimsley, G.R., Thomson, J.A. und Barnett, B.J.** (1988) Conformational stability and activity of ribonuclease T1 with zero, one, and two intact disulfide bonds. *J Biol Chem*, 263, 11820-11825.
- Pace, C.N., Heinemann, U., Hahn, U. und Saenger, W.** (1991) Ribonuclease T1: Structure, Function and Stability. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 30, 343-354.
- Pawson, T. und Scott, J.D.** (1997) Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins [Review]. *Science*, 278, 2075-2080.
- Perona, J.J. und Craik, C.S.** (1995) Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Science*, 4, 337-360.
- Pines, J.** (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view (Review). *Biochemical Journal*, 308, 697-711.
- Pinna, L.A. und Ruzzene, M.** (1996) How do protein kinases recognize their substrates? (Review). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1314, 191-225.
- Pirozzi, G., Mcconnell, S.J., Uveges, A.J., Carter, J.M., Sparks, A.B., Kay, B.K. und Fowlkes, D.M.** (1997) Identification of Novel Human WW Domain-Containing Proteins by Cloning of Ligand Targets. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 14611-14616.
- Prowse, C.N., Hagopian, J.C., Cobb, M.H., Ahn, N.G. und Lew, J.** (2000) Catalytic reaction pathway for the mitogen-activated protein kinase ERK2. *Biochemistry*, 39, 6258-6266.
- Radzicka, A., Pedersen, L. und Wolfenden, R.** (1988) Influences of solvent water on protein folding: free energies of solvation of *cis* and *trans* peptides are nearly identical. *Biochemistry*, 27, 4538-4541.
- Rahfeld, J.U., Rucknagel, K.P., 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, J.U., Schierhorn, A., Mann, K. und Fischer, G.** (1994b) A Novel Peptidyl-Prolyl *Cis/Trans* Isomerase from *Escherichia Coli*. *FEBS Letters*, 343, 65-69.
- Ramelot, T.A. und Nicholson, L.K.** (2001) Phosphorylation-induced Structural Changes in the Amyloid Precursor Protein Cytoplasmic Tail Detected by NMR. *Journal of Molecular Biology*, 307, 871-884.
- 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.
- Richards, S.A., Fu, J., Romanelli, A., Shimamura, A. und Blenis, J.** (1999) Ribosomal S6 kinase 1 (RSK1) activation requires signals dependent on and independent of the MAP kinase ERK. *Current Biology*, 9, 810-820.
- Rose, G.D., Gierasch, L.M. und Smith, J.A.** (1985) Turns in peptides and proteins. *Adv Protein Chem*, 37, 1-109.

- Rubin, G.M., Yandell, M.D., Wortman, J.R., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C.R., Hariharan, I.K., Fortini, M.E., Li, P.W., Apweiler, R., et al.** (2000) Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*, 287, 2204-2215.
- Russell, P.** (1998) Checkpoints on the road to mitosis [Review]. *Trends in Biochemical Sciences*, 23, 399-402.
- 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.
- Sarcevic, B., Lilischkis, R. und Sutherland, R.L.** (1997) Differential Phosphorylation of T-47d Human Breast Cancer Cell Substrates by D1-, D3-, E-, and a-Type Cyclin-Cdk Complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 33327-33337.
- Scherer, G., Kramer, M.L., Schutkowski, M., Reimer, U. und Fischer, G.** (1998) Barriers to Rotation of Secondary Amide Peptide Bonds. *Journal of the American Chemical Society*, 120, 5568-5574.
- Schiene, C. und Fischer, G.** (2000) Enzymes that catalyse the restructuring of proteins [Review]. *Current Opinion in Structural Biology* 2000 Feb;10(1):40-45.
- Schindler, T., Mayr, L.M., Landt, O., Hahn, U. und Schmid, F.X.** (1996) The Role of a *Trans*-Proline in the Folding Mechanism of Ribonuclease T1. *European Journal of Biochemistry*, 241, 516-524.
- Schlessinger, J.** (1993) How Receptor Tyrosine Kinases Activate Ras. *Trends in Biochemical Sciences*, 18, 273-275.
- Schmid, F.X., Frech, C., Scholz, C. und Walter, S.** (1996) Catalyzed and assisted protein folding of ribonuclease T1 [Review]. *Biological Chemistry*, 377, 417-424.
- Scholz, C., Stoller, G., Zarnt, T., Fischer, G. und Schmid, F.X.** (1997) Cooperation of Enzymatic and Chaperone Functions of Trigger Factor in the Catalysis of Protein Folding. *EMBO Journal*, 16, 54-58.
- Schutkowski, M., Bernhardt, A., Zhou, X.Z., Shen, M.H., Reimer, U., Rahfeld, J.U., Lu, K.P. und Fischer, G.** (1998) Role of phosphorylation in determining the backbone dynamics of the serine/threonine-proline motif and PIN1 substrate recognition [Review]. *Biochemistry*, 37, 5566-5575.
- Seger, R. und Krebs, E.G.** (1995) The MAPK Signaling Cascade (Review). *FASEB Journal*, 9, 726-735.
- Shen, M.H., Stukenberg, P.T., Kirschner, M.W. und Lu, K.P.** (1998) The Essential Mitotic Peptidyl-Prolyl Isomerase Pin1 Binds and Regulates Mitosis-Specific Phosphoproteins. *Genes & Development*, 12, 706-720.
- Sheng, X.R., Zhang, H.J., Pan, X.M., Li, X.F. und Zhou, J.M.** (1997) Domain Movement in Rabbit Muscle Adenylate Kinase Might Involve Proline Isomerization. *FEBS Letters*, 413, 429-432.
- Sherr, C.J.** (1996) Cancer cell cycles. *Science*, 274, 1672-1677.
- Shou, W.N., Aghdasi, B., Armstrong, D.L., Guo, Q.X., Bao, S.D., Charng, M.J., Mathews, L.M., Schneider, M.D., Hamilton, S.L., et al.** (1998) Cardiac Defects and Altered Ryanodine Receptor Function in Mice Lacking FKBP12. *Nature*, 391, 489-492.

- Siekierka, J.J., Hung, S.H., Poe, M., Lin, C.S. und Sigal, N.H.** (1989) A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature*, 341, 755-757.
- Solomon, M.J.** (1994) The functions of CAK, the p34(cdc2)-activating kinase. *Trends in Biochemical Sciences*, 19, 496-500.
- Staub, O. und Rotin, D.** (1996) WW Domains. *Structure*, 4, 495-499.
- Stein, R.L.** (1993) Mechanism of enzymic and non-enzymic prolyl *cis/trans* isomerization. *Adv. Protein Chem.*, 44, 1-24.
- Steinberg, R.A., Cauthron, R.D., Symcox, M.M. und Shuntoh, H.** (1993) Autoactivation of Catalytic (C) Subunit of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase by Phosphorylation of Threonine 197. *Molecular & Cellular Biology*, 13, 2332.
- Steiner, J.P., Hamilton, G.S., Ross, D.T., Valentine, H.L., Guo, H.Z., Connolly, M.A., Liang, S., Ramsey, C., Li, J.H.J., et al.** (1997) Neurotrophic Immunophilin Ligands Stimulate Structural and Functional Recovery in Neurodegenerative Animal Models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 2019-2024.
- Steinmann, B., Bruckner, P. und Furga, A.S.** (1991) Cyclosporin A slows collagen triple-helix formation *in vivo*: indirect evidence for a physiologic role of peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomerase. *J Biol Chem*, 266, 1299-1303.
- Stewart, D.E., Sarkar, A. und Wampler, J.E.** (1990) Occurrence and role of *cis* peptide bonds in protein structures. *J Mol Biol*, 214, 253-260.
- Stillman, B.** (1996) Cell cycle control of DNA replication. *Science*, 274, 1659-1664.
- Stoddard, B.L. und Pietrokovski, S.** (1998) Breaking up Is Hard to Do. *Nature Structural Biology*, 5, 3-5.
- Stokoe, D., Macdonald, S.G., Cadwallader, K., Symons, M. und Hancock, J.F.** (1994) Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science*, 264, 5164.
- Stoller, G., Rucknagel, K.P, Nierhaus, K.H, Schmid, F.X, Fischer, et al.** (1995) A ribosome-associated peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase identified as the trigger factor. *EMBO Journal*, 14, 4939-4948.
- Strausfeld, U., Labbe, J.C., Fesquet, D., Cavadore, J.C., Picard, A., Sadhu, K., Russell, P. und Doree, M.** (1991) Dephosphorylation and Activation of a p34cdc2 Cyclin B Complex *in vitro* by Human Cdc25 Protein. *Nature*, 351, 242-245.
- Su, B. und Karin, M.** (1996) Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression [Review]. *Current Opinion in Immunology*, 8, 402-411.
- Sudol, M.** (1996) The WW Module Competes with the SH3 Domain. *Trends in Biochemical Sciences*, 21, 161-163.
- ter Haar, E., Coll, J.T., Austen, D.A., Hsiao, H.M., Swenson, L. und Jain, J.** (2001) Structure of GSK3beta reveals a primed phosphorylation mechanism. *Nature Structural Biology*, 8, 593-596.

- Texter, F.L., Spencer, D.B., Rosenstein, R. und Matthews, C.R.** (1992) Intramolecular Catalysis of a Proline Isomerization Reaction in the Folding of Dihydrofolate Reductase. *Biochemistry*, 31, 5687-5691.
- Trandinh, C.C., Pao, G.M. und Saier, M.H.** (1992) Structural and Evolutionary Relationships Among the Immunophilins - 2 Ubiquitous Families of Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerases. *Faseb J.*, 6, 3410-3420.
- Van Putten, V., Refaat, Z., Dessev, C., Blaine, S., Wick, M., Butterfield, L., Han, S.Y., Heasley, L.E. und Nemenoff, R.A.** (2001) Induction of cytosolic phospholipase A2 by oncogenic Ras is mediated through the JNK and ERK pathways in rat epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 1226-1232.
- Vance, J.E., Leblanc, D.A. und London, R.E.** (1997a) Cleavage of the X-Pro Peptide Bond by Pepsin Is Specific for the *Trans* Isomer. *Biochemistry*, 36, 13232-13240.
- Vance, J.E., Leblanc, D.A., Wingfield, P. und London, R.E.** (1997b) Conformational Selectivity of HIV-1 Protease Cleavage of X-Pro Peptide Bonds and Its Implications. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 15603-15606.
- Verdecia, M.A., Bowman, M.E., Lu, K.P., Hunter, T. und Noel, J.P.** (2000) Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains. *Nature Structural Biology*, 7, 639-643.
- Wang, T.W., Donahoe, P.K. und Zervos, A.S.** (1994) Specific interaction of type I receptors of the TGF-beta family with the immunophilin FKBP-12. *Science*, 265, 674-676.
- Wang, T.W., Li, B.Y., Danielson, P.D., Shah, P.C., Rockwell, S., Lechleider, R.J., Martin, J., Manganaro, T. und Donahoe, P.K.** (1996) The Immunophilin FKBP12 Functions as a Common Inhibitor of the TGF-Beta Family Type I Receptors. *Cell*, 86, 435-444.
- Weiss, M.S., Jabs, A. und Hilgenfeld, R.** (1998) Peptide Bonds Revisited. *Nature Structural Biology*, 5, 676.
- Werner, A.** (2001) Konformerspezifität der Proteinphosphatase 2A bei der Dephosphorylierung prolinenspezifischer Phosphorylierungsstellen. *Doktorarbeit*.
- Whitmarsh, A.J., Cavanagh, L., Tournier, C., Yasuda, L. und Davis, R.J.** (1998) A Mammalian Scaffold Complex That Selectively Mediates Map Kinase Activation. *Science*, 281, 1671-1674.
- Whitmarsh, A.J. und Davis, R.J.** (1996) Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways [Review]. *Journal of Molecular Medicine-Imm*, 74, 589-607.
- Whitmarsh, A.J. und Davis, R.J.** (1998) Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals [Review]. *Trends in Biochemical Sciences*, 23, 481-485.
- Whitmarsh, A.J. und Davis, R.J.** (2000) Regulation of transcription factor function by phosphorylation [Review]. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 57, 1172-1183.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B. und Johnson, G.L.** (1999) Mitogen-activated protein kinase: Conservation of a three-kinase module from yeast to human [Review]. *Physiological Reviews*, 79, 143-180.

- Williamson, M.P.** (1994) The Structure and Function of Proline-Rich Regions in Proteins. *Biochemical Journal*, 297, 249-260.
- 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.
- Wu, J., Dent, P., Jelinek, T., Wolfman, A., Weber, et al.** (1993) Inhibition of the EGF-Activated MAP Kinase Signaling Pathway by Adenosine 3',5'-Monophosphate. *Science*, 262, 1065-1069.
- Wulf, G.M., Ryo, A., Wulf, G.G., Lee, S.W., Niu, T., Petkova, V. und Lu, K.P.** (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.
- Yamazaki, T., Ro, S., Goodman, M., Chung, N.N. und Schiller, P.W.** (1993) A topochemical approach to explain morphiceptin bioactivity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 36, 708-719.
- 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.
- Yang, S.H., Whitmarsh, A.J., Davis, R.J. und Sharrocks, A.D.** (1998) Differential Targeting of MAP Kinases to the Ets-Domain Transcription Factor Elk-1. *EMBO Journal*, 17, 1740-1749.
- Yaron, A. und Naider, F.** (1993) Proline-Dependent Structural and Biological Properties of Peptides and Proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 28, 31-81.
- Yem, A.W., Tomasselli, A.G., Heinrikson, R.L., Neely, H.Z., Ruff, V.A., Johnson, R.A. und Deibel, M.R.Jr.** (1992) The Hsp56 component of steroid receptor complexes binds to immobilized FK506 and shows homology to FKBP-12 and FKBP-13. *J Biol Chem*, 267, 2868-2871.
- Yu, H., Chen, J.K., Feng, S., Dalgarno, D.C., Brauer, A.W. und Schreiber, S.L.** (1994) Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell*, 76, 933-945.
- Yu, H.A., Pettitt, B.M. und Karplus, M.** (1991) Aqueous Solvation of N-Methylacetamide Conformers - Comparison of Simulations and Integral Equation Theories. *J Am Chem Soc*, 113, 2425-2434.
- Yuan, X.M., Werner, J.M., Knott, V., Handford, P.A., Campbell, I.D. und Downing, A.K.** (1998) Effects of Proline *Cis-Trans* Isomerization on Tb Domain Secondary Structure. *Protein Science*, 7, 2127-2135.
- Zachariae, W.** (1999) Progression into and out of mitosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 11, 708-716.
- Zarnt, T., Tradler, T., Stoller, G., Scholz, C., Schmid, F.X. und Fischer, G.** (1997) Modular Structure of the Trigger Factor Required for High Activity in Protein Folding. *Journal of Molecular Biology*, 271, 827-837.
- Zhou, G., Bao, Z.Q. und Dixon, J.E.** (1995) Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 12665.
- Zhou, X.Z., Kops, O., Werner, A., Lu, P.J., Shen, M.H., Stoller, G., Kullertz, G., Stark, M., Fischer, G., et al.** (2000) Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Molecular Cell*, 6, 873-883.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Forschungsstelle "Enzymologie der Proteinfaltung" der Max-Planck-Gesellschaft unter Leitung von Herrn Professor Dr. G. Fischer angefertigt. Ihm danke ich für die Möglichkeit, dieses interessante Thema in seiner Arbeitsgruppe bearbeiten zu können, für sein Interesse am Fortgang der Arbeit sowie für die stete Diskussionsbereitschaft und wissenschaftliche Betreuung.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben, für die Zusammenarbeit und freundliche Atmosphäre bedanken. Besonders danke ich:

PD. Dr. habil. Gerd Küllertz für die gute Betreuung und Zusammenarbeit sowie die vielen anregenden Diskussionen und seiner konstruktiven Kritik.

Andreas Werner für viele wertvolle Tipps und Ratschläge bei der experimentellen Arbeit. Für die technische Unterstützung gilt mein Dank Frau H. Unger. Allen anderen Mitstreitern im Labor danke ich für das angenehme Arbeitsklima.

Ria Baumgraß, Frank Erdmann und Martina Heidler für die gute Zusammenarbeit am Gossypol-Projekt.

Dr. Angelika Schierhorn und Marc Kipping für die Aufnahme der Massenspektren sowie Dr. Peter Rücknagel für die Durchführung der Proteinsequenzierung und der HPLC-Läufe.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, deren vielfältige Unterstützung diese Arbeit erleichterte.

Lebenslauf

Matthias Weiwad

geboren am 21.11.1973 in Halle/Saale

- | | |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1980-90 | Besuch der Polytechnischen Oberschule
Abschluss: mittlere Reife |
| 1990-91 | Vorkurs der Pädagogischen Hochschule in Dessau
Abschluss: 11. Klasse |
| 1991-92 | Besuch des mathematisch-naturwissenschaftlich-technischen
Landesgymnasiums Georg Cantor in Halle
Abschluss: Abitur |
| 1992-1997 | Biochemie-Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg |
| 1993-1994 | Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz in Halle |
| 1996-1997 | Diplomarbeit in der Forschungsstelle der Max-Planck-
Gesellschaft „Enzymologie der Proteinfaltung“ zum Thema:
„Isolierung und Charakterisierung einer membrangebundenen
prolinspezifischen Proteinphosphatase aus Schweinehirn“ |
| Sept. 1997 | Abschluss: Diplom-Biochemiker |
| seit Okt. 1997 | Promotion in der Forschungsstelle der Max-Planck-
Gesellschaft „Enzymologie der Proteinfaltung“ zum Thema:
„Untersuchungen zur Konformerspezifität prolinspezifischer
Proteinkinasen“ |

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet. Diese Arbeit wurde noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Matthias Weiwad, Halle, 20.02.2002