

**Prolylisomerisierung als molekulares Gedächtnis bei der
Regulation von Proteinen und die Beteiligung von
Prolylisomerasen an Faltungsprozessen**

Dissertation zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Philipp A.M. Schmidpeter M.Sc.

bei der Graduiertenschule für Naturwissenschaften BayNAT
an der Universität Bayreuth
im Rahmen des Promotionsprogrammes Molekulare Biowissenschaften

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2010 bis Juni 2014 in Bayreuth am Lehrstuhl für Biochemie unter der Betreuung von Herrn Professor Dr. Franz X. Schmid angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 11. Juni 2014

Zulassung durch das Leitungsgremium: 18. Juni 2014

Wissenschaftliches Kolloquium: 27. Oktober 2014

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Franz Xaver Schmid

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Franz Xaver Schmid (Erstgutachter)

Prof. Dr. Wulf Blankenfeldt (Zweitgutachter)

Prof. Dr. Olaf Stemmann (Vorsitz)

Prof. Dr. Birgitta Wöhrl

Drittgutachter: PD Dr. Jochen Reinstein

*Der Tag gehört dem Irrtum und dem Fehler,
die Zeitreihe dem Erfolg und dem Gelingen*

– Johann Wolfgang von Goethe (1749 – 1832)

Inhaltsverzeichnis	
1	Einleitung - 1 -
1.1	Meilensteine der Proteinbiochemie - 1 -
1.2	Energetik und Kinetik der Proteinfaltung - 5 -
1.3	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerisierung zur Regulation der Proteinaktivität..... - 9 -
1.4	Peptidyl-Prolyl <i>cis/trans</i> Isomerasen - 11 -
1.5	Ein Vierteljahrhundert c-CrkII - 13 -
1.6	Problemstellung - 15 -
2	Material und Methoden..... - 17 -
2.1	Materialien..... - 17 -
2.1.1	Bakterienstämme und Vektoren - 17 -
2.1.2	Enzyme und Größenstandards - 17 -
2.1.3	Chemikalien - 17 -
2.1.4	Verbrauchsmaterialien - 18 -
2.1.5	Geräte und Software - 18 -
2.2	Methoden - 19 -
2.2.1	Molekularbiologische Methoden..... - 19 -
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden - 22 -
2.2.3	Biophysikalische Analysen - 27 -
3	Ergebnisse und Diskussion - 39 -
3.1	Biophysikalische Analysen von c-CrkII Proteinen - 39 -
3.1.1	Molekulare Grundlagen regulatorischer Prolylisomerisierung - 39 -
3.1.2	Isomerspezifischer Kommunikationsweg in SH3 ^C von c-CrkII..... - 61 -
3.1.3	Prolylisomerisierung als molekulares Gedächtnis bei der Signaltransduktion durch c-CrkII - 77 -
3.1.4	Tyrosin-Phosphorylierung von c-CrkII - 97 -
3.2	Regulation von Cyclophilin D - 105 -
3.2.1	Mitochondriales Cyclophilin D - 105 -
3.2.2	Das Tumorsuppressorprotein p53..... - 105 -
3.2.3	Prolylisomeraseaktivität von mCypD - 106 -
3.2.4	Spezifische Interaktion zwischen p53-DBD und mCypD - 110 -
3.3	Anpassung von PPlasen an die Umwelt – Leben unter extremen Bedingungen - 115 -

3.3.1	Triggerfaktor aus <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> TAC125.....	- 116 -
3.3.2	Chaperonaktivität und Substratbindung.....	- 117 -
3.3.3	Prolylisomeraseaktivität von Triggerfaktor	- 119 -
4	Zusammenfassende Diskussion.....	- 125 -
4.1	Prolylisomerisierung als molekulares Gedächtnis bei der Regulation von c-CrkII Proteinen.....	- 125 -
4.2	p53 als Spezifitätsmodul für mitochondriales Cyclophilin	- 131 -
4.3	Die Bedeutung von Prolylisomerasen bei der Anpassung von Bakterien an unterschiedliche Lebensräume.....	- 132 -
4.4	Zusammenfassende Schlussfolgerungen.....	- 133 -
5	Zusammenfassung	- 135 -
6	Summary	- 139 -
7	Anhang	- 143 -
7.1	Unterstützende Abbildungen	- 143 -
7.2	Unterstützende Tabellen.....	- 151 -
7.3	Verwendete Oligodesoxyribonukleotide	- 162 -
8	Abkürzungsverzeichnis.....	- 164 -
9	Publikationsliste.....	- 167 -
10	Literaturverzeichnis	- 169 -

1 Einleitung

Eine Literatursuche bei dem *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, *pubmed*) nach Proteinfehlfaltungskrankheiten liefert über 35000 Ergebnisse (Stand: 10.06.2014). Der älteste Artikel zu dieser Suchanfrage wurde 1945 veröffentlicht und behandelt das Thema Amyotrophe Lateralsklerose. Heute sind die bekanntesten Proteinfehlfaltungskrankheiten vermutlich die neurodegenerativen Krankheiten Alzheimer, Parkinson, Chorea Huntington und Creutzfeldt-Jakob. Doch auch die amyloide Polyneuropathie, Typ 2 Diabetes und sekundäre Amyloidosen gehören zu den Krankheiten, die durch fehlgefaltete Proteine entstehen ⁽¹⁻⁴⁾. Ebenso können Krankheiten durch die fehlerhafte Funktion, oder Regulation einzelner Proteine oder ganzer Kommunikationsnetzwerke ausgelöst werden. Fehlfunktionen einzelner Proteine können durch Mutationen in dem kodierenden Gen oder durch fehlerhafte Regulation der Genexpression entstehen. Treten diese Effekte erst in ausdifferenzierten Zellen auf, werden sie nicht vererbt. Nicht selten führen derartige Regulationsdefekte zur Entstehung von Krebs.

Unser heutiges Wissen über Proteine und deren Wirkungsmechanismen erlaubt eine detaillierte Beschreibung vieler Prozesse in lebenden Organismen auf molekularer Ebene. Doch, wie erwähnt, wurde die Fehlfaltung von Proteinen zum ersten Mal bereits 1945 mit einer Krankheit assoziiert, zu einer Zeit als noch wenig über Proteine im Allgemeinen bekannt war. Im folgenden Abschnitt soll in Kürze auf wichtige Forschungsarbeiten an Proteinen vom Anfang der Biochemie bis heute eingegangen werden.

1.1 Meilensteine der Proteinbiochemie

Die Anfänge der Proteinbiochemie gehen zurück bis ins 19. Jahrhundert. Albrecht Kossel war einer der ersten Forscher, die sich grundlegend mit Proteinen beschäftigten. Er beobachtete, dass Proteine aus mindestens 19 unterschiedlichen Bausteinen aufgebaut sind, die alle dem Gerüst einer Aminosäure entsprechen, in ihren Seitenketten aber erhebliche chemische Unterschiede aufweisen können, wie das von ihm entdeckte Histidin. Für seine Arbeiten zum chemischen Aufbau von Proteinen erhielt Albrecht Kossel 1910 den Nobelpreis für Medizin.

Einige Jahre später, 1926, konnte James B. Sumner Urease aus Riesenbohnen in kristalliner Form erhalten ⁽⁵⁾. Seine Ergebnisse gewannen an Überzeugungskraft, als 1930 Trypsin und Chymotrypsin von John H. Northrop ebenfalls in kristalliner Form gewonnen werden konnten. 1946 erhielt James B. Sumner den Nobelpreis in Chemie für seine Arbeiten zur chemischen Natur der Enzyme

zusammen mit John H. Northrop und Wendell M. Stanley für die Präparation von Enzymen und Virusproteinen in reiner Form ⁽⁶⁾. Diese Arbeiten waren bahnbrechend für das heutige Verständnis über Proteine, da sie die Analyse von definierten, homogenen Proteinlösungen möglich machten.

Linus Pauling konnte zeigen, dass die Peptidbindung planar sein muss. Aus theoretischen, quantenmechanischen Berechnungen zusammen mit experimentellen Daten zu Bindungslängen und Mesomeriestabilisierung folgerte er, dass die Peptidbindung in Proteinen einen partiellen Doppelbindungscharakter besitzen muss, nämlich zu genau 40 % ⁽⁷⁾. Dadurch ist die Beweglichkeit einer Polypeptidkette stark eingeschränkt und durch die sterischen Ansprüche der Seitenketten der einzelnen Aminosäuren werden die strukturellen Freiheitsgrade eines Proteins stark verringert. Er stellte die These auf, dass die Amid-Protonen und die Carbonyl-Funktionen aller Amidbindungen in räumliche Nähe gebracht werden müssen, um Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden zu können. Er schlug vor, dass α -Helices und Faltblattstrukturen als Grundelemente entstehen müssen ⁽⁸⁻¹⁰⁾. Für seine Ergebnisse erhielt Pauling 1954 den Chemie-Nobelpreis.

Zur gleichen Zeit untersuchte Vincent du Vigneaud die Herkunft von Schwefel bei der Präparation von Insulin und kam zu dem Ergebnis, dass der nachgewiesene Schwefel nur von Cystein stammt. Er zeigte, dass Cystein in Proteinen als Cystin vorliegen kann und dass die beiden Formen (reduziert und oxidiert) distinkte Auswirkungen auf die Aktivität von Proteinen haben ^(11, 12). Vigneaud wurde 1955 mit dem Chemie-Nobelpreis ausgezeichnet für seine Arbeit an biochemisch wichtigen schwefelhaltigen Verbindungen.

Aufbauend auf das bisherige Wissen über Proteine und die einzelnen Bestandteile, wollte Frederick Sanger aufklären, ob Proteine durch beliebige Verknüpfung der einzelnen Aminosäuren entstehen. Er konnte zeigen, dass Insulin aus zwei getrennten Peptidketten mit 20 und 30 Resten besteht, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die Oxidation von Cystein-Resten läuft dabei nicht beliebig ab, sondern distinkte Cysteine bilden die jeweilige Disulfidbrücke aus ^(13, 14). Frederick Sanger erhielt dafür 1958 den Nobelpreis in Chemie, da er zeigte, dass jedes Protein durch die Aminosäuresequenz definiert wird.

Der nächste entscheidende Schritt war die Aufklärung der räumlichen Struktur von Proteinen. 1958 berichtete John C. Kendrew die erste Kristallstruktur eines Proteins – Myoglobin ⁽¹⁵⁾. Zu der gleichen Zeit konnte Max F. Perutz die Struktur von Hämoglobin lösen ⁽¹⁶⁾. Für diese bahnbrechenden Arbeiten wurden die beiden 1962 mit dem Nobelpreis in Chemie ausgezeichnet. In den folgenden Jahren wurden weitere Kristallstrukturen von einfachen Proteinen gelöst. Die Komplexität von Proteinstrukturen nahm eine neue Dimension an, als die chemische Struktur von Antikörpern und der damit verbundene Wirkungsmechanismus

im Immunsystem aufgeklärt wurden. Für die Untersuchungen an Mehrdomänenproteinen und die Entschlüsselung des modularen Aufbaus erhielten Gerald M. Edelman und Rodney R. Porter 1972 den Nobelpreis für Medizin.

Nachdem die ersten Proteinstrukturen bekannt waren, wurde eine andere Frage immer bedeutender: Wo und wie ist die Information über die räumliche Anordnung der Aminosäuren eines Proteins kodiert? In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts konnten Anson und Mirsky sowie Lumry und Eyring zeigen, dass Proteine unter bestimmten Bedingungen denaturiert werden und dabei ihre Struktur verlieren ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Cyrus Levinthal formulierte die Hypothese, dass Proteinfaltung ein gerichteter Prozess sein muss, der einem bestimmten Faltungsweg folgt, kein zufälliges Suchen und Finden der nativen Konformation (Levinthal Paradoxon) ⁽²⁰⁾. Gemäß der thermodynamischen Hypothese zeichnet sich die native Struktur dadurch aus, dass sie unter den jeweiligen Bedingungen die höchste Stabilität aufweist. Christian B. Anfinsen zeigte an pankreatischer RNase (RNase A), dass die Aminosäuresequenz alleine dafür verantwortlich ist, dass ein Protein, das vollständig entfaltet wurde, spontan in seine native, katalytisch aktive Form zurückfalten kann. Selbst die Bildung der richtigen Disulfidbrücken findet dabei statt. Die oxidative Faltung eines Proteins ist zwar sehr langsam, kann jedoch durch zelluläre Enzyme dramatisch beschleunigt werden ⁽²¹⁻²³⁾. In seiner Rede zur Annahme des Nobelpreises für Chemie 1972 folgerte Christian Anfinsen aus seinen Arbeiten:

“The native conformation is determined by the totality of interatomic interactions and hence by the amino acid sequence, in a given environment.”

Den Nobelpreis erhielt er zusammen mit Stanford Moore und William H. Stein für ihre Arbeiten über den Zusammenhang der chemischen Struktur und der katalytischen Aktivität im aktiven Zentrum von RNase A.

Dass Proteine effizient und spezifisch arbeiten war bekannt, doch durch die Beobachtungen von John Cornforth, dass enzymkatalysierte Reaktionen stereoselektiv ablaufen ⁽²⁴⁻²⁶⁾, wurde das Denken über die Genauigkeit chemischer Reaktionen und grundlegender Stoffwechselprozesse revolutioniert. Er konnte damit das Schlüssel-Schloss-Prinzip, das 1894 von Hermann Emil Fischer (Nobelpreis in Chemie 1902) formuliert wurde, eindrucksvoll bestätigen und erhielt 1975 dafür den Nobelpreis in Chemie zusammen mit Vladimir Prelog.

Ein großer Fortschritt in der Strukturbestimmung von Proteinen ist auf Herbert A. Hauptman und Jerome Karle zurückzuführen. Sie wurden 1985 mit

dem Nobelpreis für Chemie für die Entwicklung direkter Methoden zur Bestimmung von Kristallstrukturen ausgezeichnet^(27, 28). Für die zweite wichtige Methode zur Strukturaufklärung, NMR (*nuclear magnetic resonance*), erhielt Richard R. Ernst 1991 den Chemienobelpreis⁽²⁹⁻³¹⁾.

Dass die Funktionen von Proteinen auch nach der Synthese am Ribosom verändert werden können, wurde zum ersten Mal von Edmond H. Fischer und Edwin G. Krebs gezeigt⁽³²⁾. Am Beispiel der Phosphorylasekinase konnten sie nachweisen, dass reversible Modifikationen an definierten Aminosäureseitenketten die Form und Aktivität von Proteinen orts- und zeitspezifisch verändern können. Für diese Entdeckungen wurden sie 1992 mit dem Medizinnobelpreis ausgezeichnet.

Ein weiterer Aspekt der Bedeutung posttranslationaler Modifikationen wird bei der Zellteilung deutlich. Dabei müssen die korrekte Duplikation des Erbgutes und die fehlerfreie Verteilung der einzelnen Chromosomen auf Mutter- und Tochterzelle sichergestellt sein. Diese Regulation läuft über Proteinphosphorylierungen ab, die von cyclinabhängigen Kinasen während der einzelnen Zellteilungsschritte vermittelt werden. Für die Entschlüsselung der Hauptregulatoren des Zellzyklus erhielten Leland H. Hartwell, Tim Hunt und Sir Paul M. Nurse 2001 den Nobelpreis für Medizin⁽³³⁻³⁵⁾.

Nicht nur innerhalb einzelner Zellen müssen Prozesse reguliert ablaufen, auch mit der Umgebung muss Stoffaustausch und molekulare Kommunikation stattfinden. Dies wird durch Kanäle und Rezeptoren in den Zellmembranen gewährleistet. 2003 wurde der Nobelpreis für Chemie an Peter Agre für die Entdeckung von Wasserkanälen und an Roderick MacKinnon für strukturelle und mechanistische Untersuchungen an Ionenkanälen verliehen^(36, 37). 2012 wurden Robert J. Lefkowitz und Brian K. Kobilka für ihre Arbeiten zur Signalweiterleitung über Membranen durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet^(38, 39).

Diese Auswahl an Meilensteinen in der Erforschung von Proteinen verdeutlicht wie wichtig ihre Funktion und deren Regulation sind. Damit Proteine richtig arbeiten können, müssen sie nach der Synthese am Ribosom ihre native Struktur einnehmen. Selbst intrinsisch entfaltete Proteine haben vermutlich keine willkürliche Struktur, sondern nehmen spätestens mit der Bindung an einen Interaktionspartner eine definierte dreidimensionale Struktur ein. Somit faltet jedes Protein in eine physiologisch aktive Konformation. Der Prozess der Strukturausbildung wird in dem Forschungsfeld der Proteinfaltung zusammengefasst.

1.2 Energetik und Kinetik der Proteinfaltung

Besonders die theoretischen Überlegungen von Levinthal ⁽²⁰⁾, dass Proteinfaltung kein zufälliges Ausprobieren aller möglichen Konformationen ist und die Experimente von Anfinsen ⁽⁴⁰⁾, dass vollständig denaturierte Proteine ohne zusätzliche Hilfe in ihre native Form zurückfalten können, führten zu unzähligen Studien zum Mechanismus und zur Kinetik der Proteinfaltung.

Nach der Synthese am Ribosom liegen alle Proteine als entfaltete Polypeptidketten vor und müssen zunächst in ihre korrekte dreidimensionale Struktur falten, um ihre biologische Aktivität ausüben zu können. Die natürliche Umgebung im Cytosol oder im endoplasmatischen Retikulum ist dicht gepackt mit anderen Proteinen und experimentell nur sehr schwer zugänglich. Daher stellen *in vitro* Experimente unter definierten Bedingungen die beste Möglichkeit dar, die Energetik und die Kinetik der Proteinfaltung zu analysieren.

Eine wichtige Anforderung an die Faltungskinetik eines Proteins besteht darin, dass sie in einem angemessenen zeitlichen Rahmen ablaufen muss, da im entfaltenen Zustand eines Proteins viele hydrophobe Bereiche lösungsmittel exponiert vorliegen und denaturierte Proteine daher aggregationsanfällig sind. Bei den Überlegungen von Levinthal wird jeder Aminosäure einer Peptidkette eine definierte Anzahl an Freiheitsgraden zugesprochen. Das Suchen der passenden Konformation für das gesamte Protein würde damit auf einem einheitlichen energetischen Niveau stattfinden und nur die zufällige Kombination der richtigen Konformation aller Aminosäuren zur gleichen Zeit würde zur Faltung führen (Abbildung 1-1a). Die Proteinfaltung ist jedoch ein gerichteter Prozess, der energetisch gesteuert ist. Dabei sind der hydrophobe Effekt sowie die Sättigung nahezu aller Peptidbindungen durch Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brücken) die wichtigsten treibenden Kräfte des Faltungsprozesses ⁽⁴¹⁻⁴³⁾. Zusätzlich beeinflussen van der Waals Wechselwirkungen, elektrostatische Interaktionen geladener Seitenketten und die Tendenz jeder einzelnen Aminosäure Sekundärstrukturen wie α -Helices oder β -Faltblätter auszubilden den Vorgang.

Die Faltung von Proteinen wird vermutlich dadurch initiiert, dass sich hydrophobe Reste zusammenlagern und Wasser von ihrer Oberfläche verdrängt wird (hydrophober Kollaps). Hydrophobizität beschreibt die Eigenschaft eines Stoffes, sich gut in unpolare Lösung zu lösen. Die entscheidende Beobachtung war, dass die Änderung der freien Enthalpie ΔG des Transfers in wässrige Bedingungen linear mit der unpolaren, lösungsmittelzugänglichen Oberfläche des Stoffes korreliert ist ⁽⁴⁴⁻⁴⁸⁾.

Nach der ersten Kompaktierung der Peptidkette sind Effekte wie van-der-Waals und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen von Bedeutung. Deren Beiträge zur

gesamten Energetik werden durch das Lennard-Jones-Potential der interagierenden Gruppen bestimmt und die Abstände der einzelnen Gruppen zueinander dadurch limitiert. Insgesamt ist die kompaktierte Peptidkette energetisch bereits deutlich begünstigt gegenüber dem vollständig entfalteten Protein und die noch zu Verfügung stehenden Freiheitsgrade sind stark reduziert (vgl. Abbildung 1-1b).

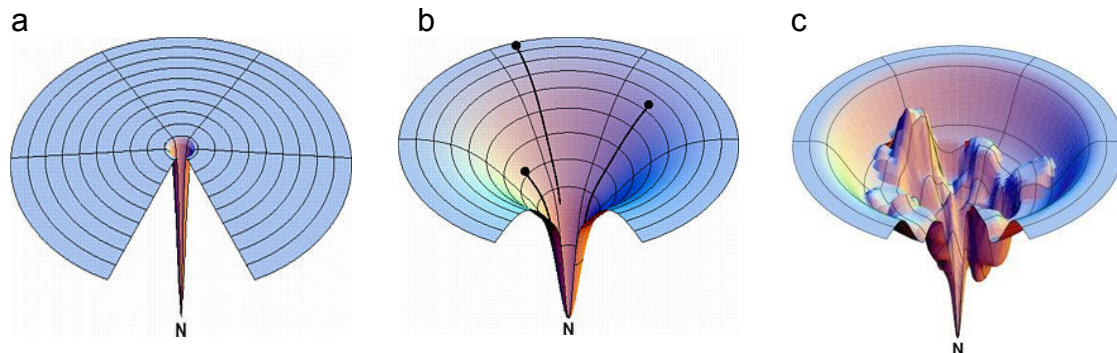


Abbildung 1-1: Hypothetische Proteinfaltungswege dargestellt als Energiehyperflächen. Veranschaulicht sind verschiedene Modelle, die mögliche Proteinfaltungsmechanismen beschreiben ⁽⁴⁹⁾, (a) Levinthal-Paradoxon („Golfplatz“-Modell), (b) Faltungstrichter (kleine Eindomänenproteine), (c) zerklüfteter Trichter (lokale Minima und Intermediate).

Generell stellt das Innere von Proteinen eine hydrophobe Umgebung dar, weshalb die Zusammenlagerung unpolarer Aminosäuren eine große Triebkraft für die Faltung darstellt. Gleichzeitig müssen dabei jedoch Peptidbindungen desolvatisiert werden ⁽⁵⁰⁾. Im entfalteten Zustand können alle NH- und CO-Gruppen der Amidbindungen über H-Brücken mit Wasser interagieren. Das Aufheben dieser H-Brücken während der Faltung stellt eine Austauschreaktion mit der Neubildung von H-Brücken zwischen NH- und CO-Gruppen einzelner Peptidbindungen dar. Wasser wird dabei nahezu vollständig aus dem Proteininneren verdrängt ⁽⁵¹⁾. Eine einzelne H-Brücke übt nur einen geringen stabilisierenden Effekt aus, da jedoch in Proteinen alle Peptidbindungen im Proteininneren ein H-Brückennetzwerk ausbilden ist der Gesamtbeitrag von Wasserstoffbrücken zur Stabilität von Proteinen hoch. Das Aufbrechen der H-Brücken des Peptidrückgrats zum Lösungsmittel ist enthalpisch ungünstig und die Faltungsenergetik wird in der Theorie von einem einfachen Trichter (Abbildung 1-1b) hin zu einem zerklüfteten Trichter (Abbildung 1-1c) verschoben.

Wasserstoffbrücken zwischen Peptidbindungen zeigen eine hohe Richtungs- und Abstandsspezifität und definieren so Strukturelemente wie α -Helices ⁽⁵²⁻⁵⁴⁾. Zusammen mit den sterischen Einschränkungen durch die unterschiedlichen Seitenketten ergeben sich die φ -/ ψ -Winkelkombinationen in der Ramchandran-Auftragung ^(55, 56).

Nach der Kompaktierung der entfalteten Peptidkette bilden sich erste Strukturelemente wie α -Helices und β -Stränge aus, da die räumliche Nähe interagierender Reste gegeben und ausreichend Information für erste Strukturbildung vorhanden ist. In ähnlichem Maß wie sich einzelne Strukturelemente bilden, werden diese Elemente miteinander interagieren. Dazu tragen sowohl hydrophobe als auch elektrostatische Wechselwirkungen bei. Wenn die Faltung dem nativen Zustand des Proteins bereits sehr ähnlich ist, kann man von einem *wet molten globule* sprechen ⁽⁵⁷⁻⁶²⁾. Um die Faltung abzuschließen, müssen die letzten Wassermoleküle aus dem Proteinkern verdrängt werden, wodurch ein *dry molten globule* entsteht ⁽⁶³⁾. Ausgehend von diesem Zustand werden die verbleibenden Interaktionen zwischen den Proteinseitenketten aufgebaut und die Faltung abgeschlossen.

Die bisher beschriebenen Vorgänge sind alle enthalpiebegünstigt. Unter physiologischen Bedingungen stellt die Desolvatisierung der einzelnen Gruppen zwar einen enthalpisch ungünstigen Prozess dar, durch die Entstehung von neuen H-Brücken, van-der-Waals Wechselwirkungen, elektrostatischen Anziehungen und Salzbrücken wird die gesamte Änderung der Enthalpie ΔH jedoch negativ. Gleichzeitig wird während der Faltung die gesamte Kettenentropie extrem verringert, die des Lösungsmittels wiederum nimmt zu. Die Entropie des Gesamtsystems bleibt in etwa erhalten. Die Änderung der freien Enthalpie ΔG ist damit negativ und die Faltung von Proteinen läuft somit unter nativen Bedingungen spontan ab ⁽⁶⁴⁾. Durch das Zusammenspiel von Enthalpie- und Entropieeffekten kann ein gefaltetes Protein als ausbalanciertes, thermodynamisches Gleichgewicht betrachtet werden, das durch ein dynamisches Netzwerk vieler einzelner Interaktionen stabilisiert wird, wobei genug destabilisierende Kräfte wirken, um ausreichend Flexibilität zu gewährleisten. Dieses Zusammenwirken positiver und negativer Effekte führt letztendlich zu der vereinfachten Darstellung der Faltungsenergetik als zerklüfteter Trichter (Abbildung 1-1c) ⁽⁴⁹⁾.

Ein fundiertes Verständnis der Faltung eines Proteins ist wichtig, um seine Funktion zu beschreiben und zu verstehen. So finden bei der Bindung von Interaktionspartnern oder der Umsetzung von Substraten in der Regel strukturelle Umlagerungen statt, die als partielle Ent- und Rückfaltungsprozesse angesehen werden können.

Bisher wurde nur auf die Energetik der Proteinfaltung eingegangen. Tatsächlich ist der Faltungsprozess jedoch ein Zusammenwirken der thermodynamischen und der kinetischen Kontrolle einzelner Prozesse. Unter nativen Bedingungen nehmen Proteine den Zustand der niedrigsten Energie ein, der durch relativ hohe Energiebarrieren von teilgefalteten Strukturen und dem entfalteten Zustand abgegrenzt ist ⁽⁶⁵⁾. Der Prozess der Faltung muss dabei schnell

ablaufen, um die Anhäufung aggregationsanfälliger Zwischenstufen zu vermeiden⁽⁶⁶⁻⁷⁰⁾. Für kleine Proteine oder stabile Faltungseinheiten (Domänen) in Mehrdomänenproteinen kann der kinetische Mechanismus oft auf ein Zwei-Zustands-Modell vereinfacht werden, in dem das native Protein mit dem vollständig entfalteten Protein unter allen Bedingungen im Gleichgewicht steht. Da der entfaltete Zustand eine extrem heterogene Population darstellt, müssen sämtliche konformationellen Umordnungen schnell ablaufen, im Vergleich zu dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Faltung, um dem Zwei-Zustands-Modell gerecht zu werden. Dass Proteinfaltung hoch-effizient sein kann zeigen gerade kleine globuläre Proteine, die im Zeitbereich weniger Millisekunden ihre vollständig native Struktur einnehmen können⁽⁷¹⁻⁷⁹⁾. Kann die Faltung eines Proteins nicht mit diesem einfachen Modell erklärt werden und werden Intermediate gefunden, so muss genau analysiert werden, an welcher Stelle des Faltungsmechanismus diese Intermediate auftreten und wie stark sie populiert werden (kurz- oder langlebige Intermediate auf einem Faltungsweg oder auf alternativen Faltungswegen)⁽⁸⁰⁻⁸⁴⁾.

Die bekanntesten geschwindigkeitsbestimmenden Schritte während der Faltung von Proteinen sind die Zusammenlagerung einzelner Domänen in Mehrdomänenproteinen⁽⁸⁵⁻⁸⁷⁾, die Ausbildung richtiger Disulfidbrücken bei der oxidativen Faltung⁽⁸⁸⁻⁹⁰⁾ und die Isomerisierung von Peptidbindungen^(83, 91-94). Aufgrund des Doppelbindungscharakters der Peptidbindung sind letztere sehr langsame Prozesse und werden nur selten in Proteinen beobachtet, da nahezu alle Peptidbindungen in *trans*-Konformation vorliegen, so wie sie vermutlich auch am Ribosom gebildet werden. Die Ausnahme davon stellen Peptidyl-Prolylbindungen (Xaa-Pro) dar. Durch den intramolekularen Ringschluss der Seitenkette mit dem Amidstickstoff in Prolin (Abbildung 1-2) steht immer ein C-Atom (C_α oder C_δ) in *cis* zu dem C_α der vorangehenden Aminosäure, der energetische Unterschied zwischen der *trans* und der *cis* Konformation der Peptidyl-Prolylbindung (Prolylbindung) ist somit deutlich verringert⁽⁹⁵⁾. Diese besondere Eigenschaft von Prolin führt dazu, dass man in gefalteten Proteinen etwa 7 % *cis*-Prolylbindungen findet^(96, 97).

Erste Faltungsanalysen an RNase A führten zu der Vermutung, dass die Isomerisierung von Prolylbindungen die Faltungsgeschwindigkeit eines Proteins bestimmen kann und dass nur Proteine mit allen Prolinen in der natürlichen Konformation auch funktional sind^(23, 69, 98-100). Das bedeutet, dass während der Faltung eines Proteins teilgefaltete Intermediate entstehen, die dem nativen Zustand bereits sehr ähnlich sein können. Der finale Schritt wird dann durch die Isomerisierung an einem oder mehreren Prolinresten limitiert. In dem gleichen Maß, wie die richtige Konformation einer Prolylbindung populiert wird, rastet die

native Struktur ein und wird somit energetisch von nicht vollständig gefalteten Spezies abgetrennt.

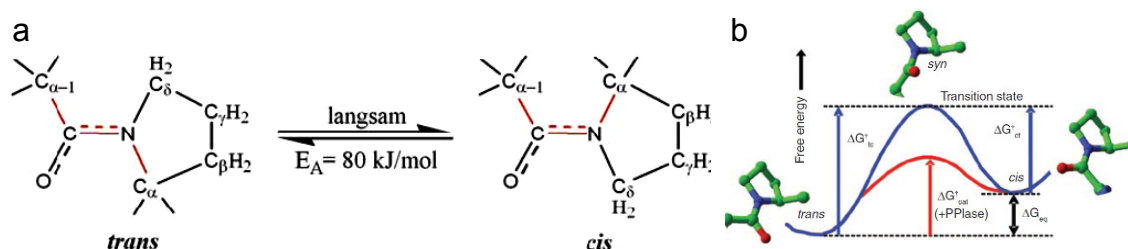


Abbildung 1-2: *trans* → *cis* Umlagerung einer Peptidyl-Prolylbindung

Dargestellt sind (a) die *trans*- und die *cis*-Konformation einer Xaa-Pro Bindung ⁽⁹⁵⁾, sowie (b) das Energiediagramm für den Umlagerungsprozess ⁽¹⁰¹⁾.

Da Thiol-Disulfid Austauschreaktionen und Prolylisomerisierung langsame Prozesse sind, gibt es in der Natur Enzyme, die diese Reaktionen beschleunigen ⁽¹⁰²⁻¹⁰⁶⁾. Nicht selten besitzen diese Enzyme neben der katalytischen Domäne eine Chaperondomäne, die teil- oder fehlgefaltete Substrate erkennt und in der Nähe des aktiven Zentrums anreichert ^(107, 108). Diese Chaperondomänen weisen im Allgemeinen keine Substratspezifität auf und interagieren hoch dynamisch mit entfaltenen Proteinketten. In der Zelle stehen generelle Chaperone zur Verfügung, die neusynthetisierte Peptidketten vor Aggregation und Fehlfaltung schützen. Von diesen Chaperonen können ent- oder teilgefaltete Substrate an Faltungshelferenzyme wie Oxidoreduktasen oder Prolylisomerasen weitergegeben werden, die langsame Schritte der Proteinfaltung beschleunigen und somit die Zelle vor der Akkumulation fehlgefalteter oder aggregierter Proteine schützen. Durch die hohe Dynamik dieser Faltungshelfer und die Interaktion mit einer Vielzahl an Substraten wird sichergestellt, dass alle Proteine die benötigte Hilfe bekommen und die Faltungshelferenzyme nicht durch permanent denaturierte Proteine blockiert werden ⁽¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾.

1.3 Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung zur Regulation der Proteinaktivität

Die *cis/trans* Isomerisierung an Peptidyl-Prolylbindungen wird nicht nur bei der Faltung von Proteinen beobachtet, sondern auch in nativ gefalteten Proteinen werden immer häufiger beide Konformere einer Prolylbindung identifiziert. Anfangs wurde vermutet, dass diese Proline in ungeordneten Bereichen des Proteins vorkommen und somit eine Gleichgewichtsverteilung gemäß der Energetik in entfaltenen Proteinstrukturen zu beobachten ist ⁽¹¹²⁾. Mittlerweile gibt es jedoch klare Hinweise darauf, dass strukturelle Veränderungen, die an Prolyl-isomerisierung gekoppelt sind, verwendet werden, um die Funktion eines

Proteins zu regulieren. Durch Prolylisomerisierung können nicht nur lokale, strukturelle Heterogenitäten entstehen, sondern auch weitreichende konformationelle Änderungen induziert werden ⁽¹¹³⁻¹¹⁷⁾.

Eines der ersten Prolin-*cis/trans*-Gleichgewichte im nativen Zustand eines Proteins wurde in Nuklease aus Staphylokokken identifiziert. NMR-Analysen zeigten, dass in diesem Protein zwei Spezies in Lösung vorliegen, die langsam interkonvertieren ^(118, 119). Weitere Beispiele für ein derartiges Verhalten wurden unter anderem für Calbindin ^(120, 121), Interleukin-3 ⁽¹²²⁾ und Insulin ⁽¹²³⁾ beschrieben. Dass die *trans* und *cis* Konformere unterschiedliche Auswirkungen auf die Aktivität eines Proteins haben, wurde das erste Mal an der SH2-Domäne der Tyrosinkinase Itk (Itk-SH2) beobachtet. Hier zeigte sich, dass die Konformation an einem Prolin Auswirkungen auf die gesamte Struktur des Proteins hat und nicht nur eine lokale, strukturelle Heterogenität entsteht. Es wurde beobachtet, dass Itk-SH2 mit *cis*- oder *trans*-Prolin unterschiedliche Affinitäten gegenüber Liganden aufweist ^(124, 125).

Das vermutlich am besten charakterisierte *cis/trans* Gleichgewicht im nativen Zustand eines Proteins existiert im Gen-3-Protein des Phagen fd (G3P). Liegt in G3P Pro213 in *cis* vor, interagieren die beiden N-terminalen Domänen fest miteinander und das Protein ist inaktiv, der Phage nicht infektiös ⁽¹²⁶⁻¹²⁸⁾. Durch die Bindung eines F-Pilus einer *E. coli* Zelle an G3P wird die Domänenassoziation aufgelöst, der Linkerbereich zwischen den beiden N-terminalen Domänen entfaltet und Pro213 isomerisiert von *cis* nach *trans* ⁽¹²⁹⁾. Durch das Aufheben der Domäneninteraktion wird die Bindungsstelle für den Rezeptor TolAC zugänglich und der Phage kann *E. coli* Zellen infizieren. Die intrinsisch langsame Re-Isomerisierung von *trans*Pro213 zu *cis*Pro213 stellt sicher, dass der Phage ausreichend lange Zeit hat, um Bakterien zu infizieren. Somit kann die *cis/trans* Gleichgewichtsverschiebung an einem Prolin in G3P als molekulare Zeitschaltuhr angesehen werden.

Ein weiteres Beispiel, das die Bedeutung von Prolylisomerisierungen im nativen Zustand verschiedener Proteine verdeutlicht, ist die Regulation des Zellzyklus. Cyclinabhängige Kinasen phosphorylieren verschiedene Proteine zu definierten Zeitpunkten der Zellteilungsphasen. Durch diese Phosphorylierungen wird Pin1 rekrutiert, eine Prolylisomerase, die spezifisch Phospho-Ser/Phospho-Thr-Pro Motive (pSer/pThr-Pro) als Substrate erkennt. Durch die Beschleunigung der Prolylisomerisierung derartiger pSer/pThr-Pro Motive werden die jeweiligen Proteine vor Abbauprozessen oder weiteren posttranslationalen Modifikationen geschützt. Durch Dephosphorylierung der Proteine können die somit ausgelösten Effekte wieder rückgängig gemacht werden ⁽¹³⁰⁻¹³⁹⁾.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Prolylisomerisierungen im nativen Zustand von Proteinen verwendet werden können, um Protein-Protein-Interaktionen zu steuern. Da Prolylisomerisierungen keine chemischen, sondern lediglich strukturelle Modifikationen von Proteinen darstellen, sind sie vollständig reversibel und es bedarf keiner zusätzlichen Enzyme, um die Ausgangsstruktur wieder herzustellen. Allerdings gibt es eine Vielzahl an Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen (PPIasen), die die Gleichgewichtseinstellung zwischen der *cis* und der *trans* Spezies beschleunigen.

1.4 Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerasen

Da Prolylisomerisierungen wegen der Rotation um eine partielle Doppelbindung intrinsisch langsame Reaktionen sind ($E_A \approx 80 \text{ kJ/mol}$)⁽⁹⁵⁾, war nach der Bestätigung der Prolinhypothese klar, dass es Enzyme geben sollte, die diese Isomerisierung katalysieren. Gunter Fischer konnte 1984 zeigen, dass in unterschiedlichen Geweben Enzyme vorhanden sind, die die langsame Umlagerung an Prolinresten in kurzen Peptiden beschleunigen⁽¹⁴⁰⁾. 1989 konnte er zusammen mit Franz Schmid und zeitgleich mit Nobuhiro Takahashi zeigen, dass Prolylisomerase und Cyclophilin identische Proteine sind^(141, 142). Cyclophilin wurde nach seiner hohen Affinität für Cyclosporin A benannt⁽¹⁴³⁾ ($K_D \approx 2 \text{ nM}$), das bis heute eines der am häufigsten verabreichten Immunsuppressiva nach Organtransplantationen ist. Seitdem wurden Prolylisomerasen in allen Bereichen des Lebens in Bakterien, Archaeen und Eukaryoten identifiziert⁽¹⁰⁶⁾ und in drei Familien eingeteilt (Abbildung 1-3), Cyclophiline (Cyp), FK506 Bindeproteine (FKBP) und Parvuline (Par).

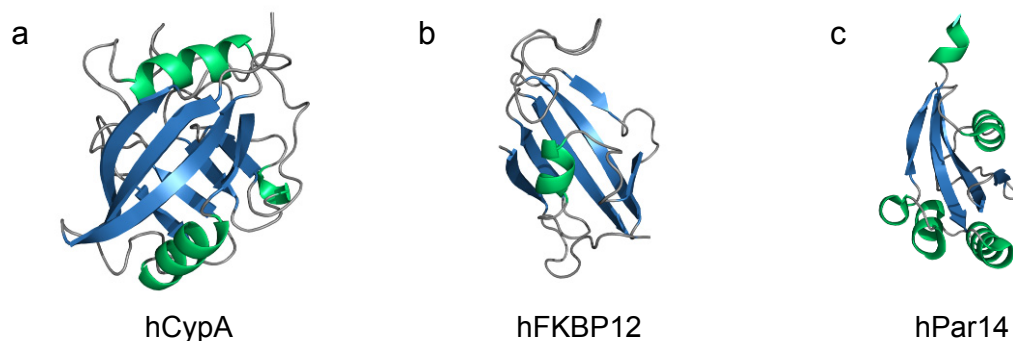


Abbildung 1-3: Raumstrukturen der PPIase-Domänen der drei Prolylisomerasefamilien

Gezeigt sind Vertreter der drei Prolylisomerasefamilien in der Bänderdarstellung. Die Abbildung wurde mit PyMol⁽¹⁴⁴⁾ und den PDB-Dateien 1OCA⁽¹⁴⁵⁾ (humanes Cyclophilin A (a)), 1FKF⁽¹⁴⁶⁾ (humanes FKBP12 (b)) und 3UI4⁽¹⁴⁷⁾ (humanes Parvulin 14 (c)) erstellt.

In allen drei Familien kann die PPIase-Domäne isoliert (als Eindomänenprotein), oder als Teil eines Mehrdomänenproteins vorkommen. Nach heutigem

Wissen ist zudem die Sequenzspezifität der katalytischen Aktivität zwischen den Mitgliedern der einzelnen Isomerasefamilien konserviert. So zeigen alle drei Familien ein spezifisches Aktivitätsprofil in Bezug auf die Aminosäuren vor und nach dem Prolin des Substrats ^(148, 149).

Im menschlichen Genom wurden 16 verschiedene Cyclophiline gefunden ⁽¹⁵⁰⁾. Besonders über CypA und CypD (mitochondriales Homolog zu CypA) ist aus medizinischer Sicht viel bekannt.

CypA kommen in der Zelle wichtige Funktionen bei der Faltung und dem Transport von Proteinen, sowie bei der Aktivierung von T-Zellen zu ⁽¹⁵¹⁾. Darüber hinaus wurde Überexpression von CypA bei verschiedenen Krebsarten beobachtet. Sie führt zur Proliferation von Krebszellen ^(152, 153), trägt zur Regulation des Zellzyklus bei ⁽¹⁵⁴⁾, verhindert Apoptose ⁽¹⁵⁵⁾ und fördert die Zellwanderung und -invasion ⁽¹⁵⁶⁾. Die Überexpression wird durch p53 und HIF1 α kontrolliert ^(155, 157). Die katalytische Aktivität von CypA ist außerdem bei verschiedenen Virusinfektionen wichtig. So sind HIV-1 ⁽¹⁵⁸⁻¹⁶⁰⁾, Hepatitisviren (HBV, HCV) ⁽¹⁶¹⁻¹⁶³⁾ und der Influenza A Virus ⁽¹⁶⁴⁻¹⁶⁶⁾ auf zelluläres CypA angewiesen. Bei Sepsispatienten kann eine deutlich erhöhte Prolylisomeraseaktivität von CypA beobachtet werden, die zu erhöhter Sterblichkeit führt ⁽¹⁶⁷⁻¹⁶⁹⁾. Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass CypA ein interessanter Ansatzpunkt für viele Therapien ist. Fundiertes Verständnis über diese PPIase ist demnach von unmittelbarer medizinischer Relevanz.

Das mitochondriale Homolog zu CypA, CypD (92 % Sequenzidentität zu CypA), ist vermutlich an der Faltung von Proteinen in der Matrix von Mitochondrien beteiligt ^(170, 171). Außerdem wurde CypD bislang als einziger essentieller Bestandteil der mitochondrialen Permeabilitätspore (mPTP, *mitochondrial permeability transition pore*) identifiziert ⁽¹⁷²⁻¹⁷⁶⁾. Über diese Pore wird der Ca²⁺-Strom über die innere Membran der Mitochondrien reguliert. Fehlfunktionen der mPTP führen zum Anschwellen und Aufbrechen der Mitochondrien, was schließlich zu Nekrose führt. Dies geschieht häufig als Folge oxidativer Schädigung nach Wiederdurchblutung von Geweben (z.B. nach einem Schlaganfall). Die Regulation der Porenöffnung durch CypD wird möglicherweise durch das Tumorsuppressorprotein p53 gesteuert ^(177, 178), das ebenfalls in der Matrix von Mitochondrien vorkommen kann ⁽¹⁷⁹⁾ und dort unabhängig von seinen bekannten Funktionen als Transkriptionsfaktor wirkt.

Die prototypische Isomerase der FK506-Bindeproteine (FKBPs) ist FKBP12, das nur aus der katalytisch aktiven Domäne besteht. Für viele Rezeptoren wurde eine Interaktion mit FKBP12 nachgewiesen und diese Interaktion konnte direkt mit der Regulation von Proteinaktivitäten verbunden werden. Beispiele dafür sind die Interaktion von FKBP12 mit dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor

(EGF-R) ⁽¹⁸⁰⁾, sowie die Interaktion mit Lektinen, deren Fähigkeit, Ca²⁺ und dadurch Kohlenhydrate zu binden, kinetisch mit Prolylisomerisierung gekoppelt ist ⁽¹⁸¹⁾.

Parvuline stellen die kleinste Familie der PPlasen dar ⁽¹⁰⁶⁾. Humanes Par17 wurde als wichtiges Enzym bei der Assemblierung von Mikrotubuli beschrieben ⁽¹⁸²⁾ und kommt auch als *splice*-Variante Par14 vor. Der wohl bekannteste Vertreter der Parvuline ist Pin1, eine pSer/pThr-Pro spezifische PPlase, die zusätzlich zur Isomerasedomäne eine WW-Domäne besitzt ^(131, 183). Zahlreiche Studien beschreiben die Bedeutung von Pin1 für die Regulation des Zellzyklus, die direkte Regulation verschiedener Signaltransduktionswege und als wichtigen Schutzfaktor bei altersbedingten, neurodegenerativen Krankheiten ^(101, 184).

1.5 Ein Vierteljahrhundert c-CrkII

Crk wurde 1988 bei der Suche nach neuen Onkogenen als virales Protein ohne katalytische Aktivität entdeckt ⁽¹⁸⁵⁾. Das virale Protein ist modular aus dem *gag* Gen (Strukturprotein des Virions) und Regionen, die homolog zu bekannten Proteinen aus Signalkaskaden sind, aufgebaut. Diese Homologieregionen sind heute als SH2- und SH3-Domänen bekannt (*Src homology*) ^(185, 186). Trotz der fehlenden katalytischen Aktivität des Proteins wurde in Fibroblasten aus Hühnerembryonen, die mit dem Virus transformiert waren, ein deutlich erhöhter Anteil an Phosphotyrosin-Proteinen beobachtet und das neu entdeckte Onkogen daher als *chicken tumor virus 10* [CT10] *regulator of kinase* – Crk – benannt ⁽¹⁸⁵⁾. Nur wenige Zeit später wurden zelluläre Proteine (c-CrkII) identifiziert ⁽¹⁸⁷⁾, die homolog zu dem viralen Protein (v-Crk) sind. c-CrkII war das erste Signaladapterprotein, das in der Literatur beschrieben wurde und ist heute eines der am besten charakterisierten Adapterproteine.

c-CrkII ist modular aus drei Domänen aufgebaut (Abbildung 1-4): die N-terminale SH2-Domäne nimmt Signale über die spezifische Erkennung von pTyr-Motiven auf, die folgende SH3-Domäne (SH3^N) gibt das Signal an polyPro-haltige Bindungspartner weiter. Die zweite SH3-Domäne (SH3^C) weist nur eine geringe Sequenzhomologie zu bekannten SH3-Domänen auf, zeigt jedoch eine identische Faltung und wirkt regulatorisch auf die vorangehende SH3^N-Domäne. Es sind drei distinkte Formen von Crk bekannt: c-CrkII (SH2-SH3^N-SH3^C), c-CrkI (SH2-SH3^N, *splice*-Variante von c-CrkII) und CrkL (Crk *like*, 58 % Sequenzidentität zu c-CrkII, *crkl* Gen).

Die NMR-Strukturen von c-CrkII (Abbildung 1-4b und c) zeigen dabei deutlich den modularen Aufbau aus drei Domänen und eine insgesamt kompakte Proteinstruktur. Lediglich der ungewöhnlich lange Linkerbereich, von etwa 40 Amino-

säuren, zwischen den beiden SH3-Domänen ist nicht Teil dieser globulären Faltung. Er kann in zwei Abschnitte unterteilt werden. Der N-terminale Bereich ist sehr flexibel und die Sequenz ist nicht konserviert. Im Gegensatz dazu ist die Aminosäuresequenz des C-terminalen Bereichs (ab Position 220) hoch konserviert und bildet Interaktionen mit den SH3-Domänen aus. Dies führt zu einer deutlichen Strukturierung der zweiten Hälfte des Linkers.

Die Bedeutung von c-CrkII wird dadurch verdeutlicht, dass das Protein an unterschiedlichsten Prozessen wie Zellmobilität, Zelladhäsion, Regulation der Genexpression und Zellproliferation beteiligt ist⁽¹⁸⁸⁾. In den letzten Jahren wurden immer mehr Erkenntnisse darüber gewonnen, wie c-CrkII an der Transformation von Zellen beteiligt ist⁽¹⁸⁹⁻¹⁹³⁾. Dabei wird die Aktivität von c-CrkII durch Überexpression verändert⁽¹⁹⁴⁾. Neueste Ergebnisse zeigen, dass Effekte der Überexpression von c-CrkII in Krebszellen durch gleichzeitige Überexpression der isolierten SH3^N-Domäne verringert werden können, da dadurch nachgelagerte Bindungspartner für c-CrkII abgefangen werden⁽¹⁹⁵⁾. Diese Beobachtungen deuten an, dass die direkte Signalweiterleitung durch c-CrkII an der Transformation von Säugerzellen beteiligt ist. Daher ist die Regulation dieses Adapterproteins für ein geregeltes Zellwachstum von großer Bedeutung.

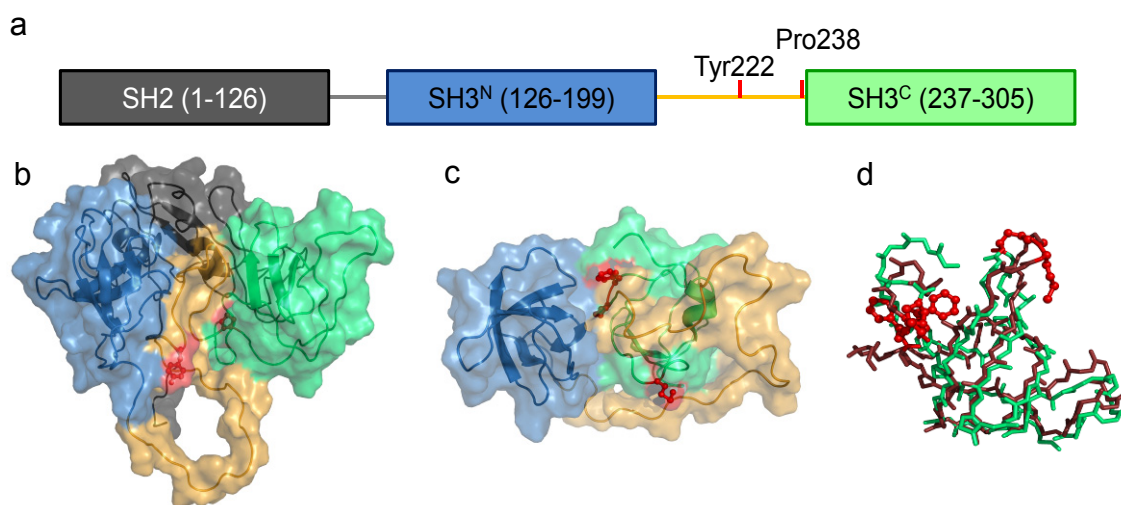


Abbildung 1-4: NMR-Strukturen verschiedener c-Crk Proteine

Dargestellt sind (a) die Domänenorganisation von c-CrkII sowie die NMR-Strukturen von (b) *HsCrkII* (PDB: 2EYZ⁽¹⁹⁶⁾), (c) *GgSH3^N-SH3^C* (PDB: 2L3S⁽¹¹⁷⁾) mit Farben wie in (a) und (d) *GgSH3^C* mit *cis*Pro238 (PDB: 2L3P⁽¹¹⁷⁾, dunkelrot) und *trans*Pro238 (PDB: 2L3Q⁽¹¹⁷⁾, grün). Die Reste Pro238, Ile239 (human), Phe239 (Huhn) und Val272 (human), Met272 (Huhn) sind in rot als Stäbchen dargestellt. Die Abbildung wurde mit PyMol erstellt⁽¹⁴⁴⁾.

Eine wichtige Regulation von c-CrkII findet durch die Abelson-Kinase (c-Abl) statt. c-Abl kann c-CrkII spezifisch an Tyr222 phosphorylieren^(197, 198), wodurch ein pTyr-Pro-Motiv entsteht, das intramolekular von der SH2-Domäne erkannt

wird ⁽¹⁹⁹⁾. Durch diese intramolekulare Interaktion wird die Signalaufnahme verhindert und c-CrkII somit autoinhibiert ^(196, 197, 199).

Eine weitere Regulationsebene wurde beschrieben und beruht auf Prolylisomerisierung im nativen Zustand des Proteins. Aus NMR-Analysen wurde geschlussfolgert, dass Pro238 am Übergang des Linkers in die C-terminale SH3 Domäne in *cis* und in *trans* Konformation vorliegen kann und dass durch Prolylisomerisierung an Pro238 die Bindungsaffinität von SH3^N für Interaktionspartner moduliert wird. Es wurde beschrieben, dass *cis*Pro238 dazu führt, dass die beiden SH3 Domänen miteinander wechselwirken und dabei die Ligandenbindungsstelle auf SH3^N von SH3^C okkupiert wird. Liegt Pro238 dagegen in *trans* Konformation vor, ist die Bindungsstelle auf SH3^N frei zugänglich für Liganden ^(116, 117). Diese Beobachtungen wurden mit c-CrkII aus dem Huhn gemacht.

1.6 Problemstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob c-CrkII aus dem Huhn, wie beschrieben, durch Prolylisomerisierung reguliert wird und ob ein ähnlicher Mechanismus auch für das humane Protein existiert. Durch kinetische Analysen zur Faltung und zur Assoziation mit Liganden konnten zwei Sequenzunterschiede zwischen den Proteinen der beiden Spezies identifiziert werden, die essentiell sind für die Regulation von c-CrkII aus dem Huhn durch Prolylisomerisierung. Um die Frage zu beantworten, wie die beiden essentiellen Reste strukturell miteinander verknüpft sind, sollte eine strukturbasierte Mutationsanalyse durchgeführt werden. Die Ergebnisse aus Faltungs- und Bindungsstudien der resultierenden Proteinvarianten ermöglichten es, zusammen mit existierenden NMR-Strukturen, die Frage zu beantworten, wie durch Prolylisomerisierung der hydrophobe Kern der C-terminalen Domäne umstrukturiert wird.

Auf molekularer Ebene ist nur wenig darüber bekannt, wie Prolylisomerisierung verwendet wird, um die Funktion eines Proteins zu regulieren. Detaillierte kinetische Analysen (Doppelmischexperimente) sollten Einblicke geben, wie die Faltung von c-CrkII mit der biologischen Funktion verknüpft ist. Durch unterbrochene Ent- und Rückfaltungsanalysen und weitere Bindungsstudien konnten die mikroskopischen Ratenkonstanten der Prolylisomerisierung im nativen Protein und im Protein-Ligand-Komplex ermittelt werden. Schließlich wurde mittels kinetischer Simulationen ein Mechanismus aufgestellt, der beschreibt, wie das *cis/trans* Gleichgewicht an Pro238 in c-CrkII während der Faltung und der Ligandenbindung verschoben wird.

c-CrkII wird neben Prolylisomerisierung auch durch Tyrosinphosphorylierung reguliert. Bislang war unklar, ob die beiden Regulationsebenen miteinander

verknüpft sind. Um c-CrkII auf ein mögliches Zusammenspiel der beiden Mechanismen hin zu untersuchen, sollte die Phosphorylierung *in vitro* nachvollzogen werden. Biophysikalische Analysen zur Faltung und zur Bindung nachgelagerter Liganden konnten zeigen, wie durch spezifische Phosphorylierung die Struktur und die Funktion von c-CrkII als Adapterprotein beeinflusst werden.

Neben der Regulation von c-CrkII war eine weitere Fragestellung dieser Arbeit, wie Prolylisomerasen an wichtigen Prozessen in lebenden Organismen beteiligt sind. Dazu wurde mitochondriales Cyclophilin D (mCypD) sowie die prokaryotische Prolylisomerase Triggerfaktor (TF) in Kooperationen mit Gruppen aus Stony Brook (NY, USA) und Lüttich (Belgien) analysiert.

mCypD ist an der Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätspore beteiligt, was zu nekrotischem Zelltod führt. Die Interaktion des Tumorsuppressorproteins p53 mit mCypD aktiviert diesen Signalweg und sollte *in vitro* nachvollzogen werden. Besonders die Effekte von p53 auf die katalytische Aktivität von mCypD sollten erarbeitet werden. Aufgrund differentieller Effekte gegenüber Peptid- und Proteinsubstraten konnte ein Modell aufgestellt werden, das beschreibt, wie die Bindung von p53 an mCypD gewissermaßen als Selektivitätsfilter verwendet wird.

Die bakterielle Prolylisomerase TF ist mit dem Ribosom assoziiert und ein wichtiger Proteinfaltungshelfer in Bakterien. In Kooperation mit der Gruppe von Professor Feller (Lüttich, Belgien) sollte erarbeitet werden, welche Bedeutung TF für extremophile Bakterien und deren Anpassung an unterschiedliche Lebensräume hat. Dazu wurden die TFs aus *Pseudoalteromonas haloplanktis* (psychrophil), aus *Escherichia coli* (mesophil) und aus *Thermotoga maritima* (hyperthermophil) hinsichtlich ihrer Chaperoneigenschaften und ihrer Prolylisomeraseaktivitäten gegenüber verschiedenen Substraten verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bakterienstämme und Vektoren

<i>E. coli</i> XL1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qΔM15 Tn10</i> (Tet ^R)]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> B, F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>galλ</i>
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Rosetta	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE (Cam ^R)

Der Bakterienstamm *E. coli* XL1 Blue wurde zur Amplifizierung von Plasmiden verwendet. Für die Proteinexpression wurden *E. coli* BL21 (DE3) oder *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta Zellen (für die humanen Proteine) verwendet. Die Gene für die verwendeten Proteine wurden in das Plasmid pET11a (Amp^r, NOVAGEN, Madison, USA) kloniert.

2.1.2 Enzyme und Größenstandards

<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	
<i>DpnI</i> -Restriktionsendonuklease	
T4-DNA-Ligase	
T4-Polynukleotidkinase (PNK)	Thermo Scientific (Erlangen, D)
<i>NdeI</i> , <i>Eco31I</i> , <i>BamHI</i>	
PageRuler Unstained Protein Ladder	
Q5-DNA-Polymerase	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Johanna Koch und Philipp Schmidpeter (Bayreuth, D)
Sentrin-specific protease 2 (Senp2)	
λ-DNA/ <i>Eco</i> 130 I: 421-19329 bp	MBI FERMENTAS (Vilnius, LT)
bp-Leiter: 100-1500 bp	Genaxxon (Ulm, D)

2.1.3 Chemikalien

Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG), Harnstoff	Gerbu (Gaiberg, D)
5-(((2-Iodoacetyl)amino)ethyl)amino)naphthalin-1-sulfonsäure (1,5-IAEDANS)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Guanidiniumchlorid (ultra pure)	MP (Biomedicals, Irvine, USA)
peqGREEN DNA-und RNA-Farbstoff	Peqlab (Erlangen, D)
Adenosin-5'-Triphosphat, Ampicillin,	Roth (Karlsruhe, D)

Chloramphenicol, Imidazol, Coomassie Brilliant Blue G-250, Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamidlösung (37,5:1 "Rotiphorese 30"), Dithiotreitol (DTT), Desoxyribonukleotide, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Glutathion ox. (GSSG), Glutathion red. (GSH), Glycin, N,N,N',N'-Tetramethylenethylendiamin (TEMED), N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin (Tricin), Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Tris-(2-carboxyethyl)-phosphinhydrochlorid (TCEP), Agarose, Ammoniumpersulfat (APS), Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg, D)
Bromphenolblau, 3'5'-cCMP, 3'5'-cGMP, Natriumiodacetat, β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich (Deisenhofen, D)
Proteaseinhibitor cOmplete ULTRA Tablets	Roche Diagnostics (Mannheim, D)

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden im Reinheitsgrad p.A. von der Firma Grüssing (Filsum, D) bezogen. Für Puffer und Lösungen wurde Wasser mit einer Seralpur Pro90CN-Reinstwasseranlage deionisiert (ddH₂O, Leitfähigkeit < 0,055 μ S/cm). Die Puffer für alle Messungen wurden durch 0,45 μ m-Nylonfilter filtriert und vor Gebrauch mindestens 30 min entgast.

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Ni-NTA-Superflow-Agarose-Säule (5 ml)	Qiagen (Hilden, D)
NAP-5 und -10 Säulen (Sephadex G-25 DNA-grade), Gelfiltrationssäule HiLoad Superdex 75 (16/600 prep grade)	GE Healthcare (Freiburg, D)
Konzentratoren Amicon Ultra-15 (3 kDa Ausschluss), Millipore Filter Typ VS 0,025 μ m	Millipore (Carrigtwohill, Ireland)
ZelluTrans Dialysiermembran (> 3,5 kDa)	Roth (Karlsruhe, D)
Filtropur Spritzenfilter (0,45; 0,2 μ m)	Sarstedt (Nürnberg, D)
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit, peqGOLD Cycle-Pure Kit	Peqlab (Erlangen, D)

2.1.5 Geräte und Software

DX.17MV <i>sequential stopped-flow</i> -Fluoreszenzspektrophotometer	Applied Photophysics, (Leatherhead, GB)
Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B <i>plus</i>	Du Pont (Bad Homburg, D)
Rotoren GS-3 und SS-34	
Zentrifuge 5415 R, Mastercycler Gradient, Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg, D)

ÄKTA-FPLC (academic edition), Vertikalelektrophoresekammer 2050 MIDGET und Netzgerät 2301 Macro	GE Healthcare (Freiburg, D)
Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil	Hellma (Müllheim, D)
Laborfuge 400 R	Heraeus (Hanau, D)
Zentrifuge Z 216 MK	Hermle (Wehingen, D)
Refraktometer	Krüß (Hamburg, D)
Microfluidizer M-110L	Microfluidics (Newton, USA)
Thermocycler PTC 100	MJ Research (Watertown, USA)
Environmental incubator shaker G24, Innova 3000 incubator shaker C24	New Brunswick Scientific (Edison, USA)
Easyject Prima Elektroporationsapparatur, E- Box VX Geldokumentationssystem	Peqlab (Erlangen, D)
Laborwaage L610D, Analysenwaage R200D	Sartorius (Göttingen, D)
Seralpur pro 90 CN Reinstwasseranlage	Seral (Ransbach, D)
Spektropolarimeter Jasco J-710, Peltierelement PTC-348WI	Jasco (Groß-Umstadt, D)
Jasco-Fluoreszenzspektrophotometer FP-6500	
UV/Vis-Spektrophotometer Cary 100 Bio	Varian (Darmstadt, D)
Mikroprozessor pH-Meter WTW pH 537	WTW (Weilheim, D)
Grafit 3.0 / 5.0	Erithacus (Middlesex, UK),
PyMol	DeLanoScientific (San Francisco, USA)
Scientist 2.01	Micromath (St. Louis, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer (1x):	40 mM Tris, 20 mM Acetat, 1 mM EDTA, pH ^{20 °C} 8,0
Probenpuffer (6x):	4 M Harnstoff, 10 mM EDTA, 50 % (v/v) Glycerin, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
Färbelösung:	1 mg peqGREEN in 0,5x TAE-Puffer

Um DNA-Fragmente gemäß ihrer Größe voneinander zu trennen, wurde jeweils eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Konzentration an Agarose wurde entsprechend der Größe des zu analysierenden Fragments angepasst (0,6 – 1,6 % (w/v)). 8 µl der DNA-Proben wurden mit 2 µl Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Neben den zu analysie-

renden DNA-Fragmenten wurde ein geeigneter Basenpaarstandard auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 16 min lang in 0,5x TAE-Puffer bei einer Spannung von 6 V pro cm Elektrodenabstand. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 20 min lang in Färbelösung gefärbt, kurz in 0,5x TAE-Puffer entfärbt und die DNA-Banden durch Bestrahlung mit UV-Licht (302 nm) visualisiert.

2.2.1.2 Herstellung elektrokompenter Zellen

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen, die zur Transformation mit der gewünschten Plasmid-DNA verwendet werden konnten, wurden 500 ml dYT-Medium mit 2 ml einer über-Nacht-Kultur der gewünschten Zellen (*E. coli* XL1 blue, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3) Rosetta) angeimpft und im Schüttler bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,7 kultiviert. Die Zellen wurden mindestens 30 min auf Eis abgekühlt und anschließend durch Zentrifugation pelletiert (5 000 rpm; 10 min; 4 °C; GS-3 Rotor). Das Zellpellet wurde auf Eis mit 500 ml sterilem ddH₂O gewaschen und erneut, wie beschrieben, pelletiert. Ein weiterer Waschschrift wurde mit 250 ml 10 % (v/v) sterilem Glycerin durchgeführt. Danach wurde das Pellet in 10 ml 10 % (v/v) sterilem Glycerin aufgenommen und nochmals zentrifugiert (6 000 rpm; 10 min; 4 °C; SS34-Rotor). Abschließend wurden die Zellen in 1,5 ml 10 % (v/v) sterilem Glycerin aufgenommen, aliquotiert (je 40 µl) und bei -80 °C gelagert. Wichtig bei diesem Protokoll ist, dass die Zellen ununterbrochen auf Eis gelagert werden und alle Lösungen ausreichend gekühlt sind.

2.2.1.3 Isolierung und Reinigung von DNA

Der Expressionsvektor pET11a mit dem gewünschten Gen, wurde aus *E. coli*-XL1 Blue-Zellen isoliert. Dafür wurden Kulturen der jeweiligen *E. coli* XL1 Blue-Zellen bei 37 °C über Nacht inkubiert. Aus 4 ml dieser Kulturen wurde Plasmid-DNA mit dem Plasmid-Miniprep-Kit von Peqlab entsprechend den Herstellerangaben präpariert. Die Elution der DNA erfolgte mit 50 µl ddH₂O.

2.2.1.4 Polymerasekettenreaktion

Jeder PCR-Ansatz bestand aus 1x Polymerasepuffer (optimiert für *Pfu*-, *Taq*- oder Q5-Polymerase), 200 µM dNTPs, je 200 nM Primer und 0,5 µl Templat-DNA. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 U Polymerase gestartet. Für gerichtete Mutagenese wurden 50 µl-Ansätze hergestellt, für Kolonie-PCR 10 µl-Ansätze.

2.2.1.5 Klonierung

Um ein gewünschtes Gen in den Expressionsvektor pET11a einzubauen, wurde zunächst Plasmid-DNA präpariert (2.2.1.3) und durch Restriktionsverdau, gemäß den Herstellerangaben, mit *NdeI* und *BamHI* geöffnet. Durch Agarosegelelektrophorese (2.2.1.1) wurde lineare Plasmid-DNA von dem Insert getrennt, die DNA-Bande für den geschnittenen Vektor wurde aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert. Die verwendeten Gene sollten nach Möglichkeit als SUMO-Fusion kloniert werden, um die spätere Reinigung der Proteine zu erleichtern. Daher wurden zunächst das *smt3*-Gen (SUMO aus *Saccharomyces cerevisiae*) und das zu klonierende Gen durch PCR amplifiziert. Durch die verwendeten Primer wurden die Schnittstellen für *NdeI* und *BsaI* am 5'- bzw. 3'-Ende angebracht (*smt3*) sowie die Restriktionsschnittstellen für *BsaI* und *BamHI*, ebenfalls am 5'- bzw. 3'-Ende des zu klonierenden Gens. Die PCR erfolgte durch initiale Denaturierung (2 min, 95 °C) und 33 Zyklen aus Denaturierung (30 s, 95 °C) Hybridisierung der Primer (30 s, 52-65 °C) und Polymerisation durch Pfu-Polymerase (500 bp/min, 72 °C). Der Erfolg der PCR wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft (2.2.1.1), die gewünschten DNA-Banden aus dem Gel eluiert (2.2.1.3) und mit den jeweiligen Restriktionsenzymen gemäß den Herstellerangaben geschnitten. Für die Klonierung wurden je ein Teil geschnittene Plasmid-DNA, zwei Teile geschnittenes *smt3*-Fragment und drei Teile des geschnittenen, zu klonierenden Gens in 1x Ligasepuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µl 2 h lang bei 15 °C inkubiert. T4-DNA-Ligase wurde danach 20 min bei 65 °C inaktiviert. 10 µl des Ligationsansatzes wurden durch Mikrodialyse gegen ddH₂O entsalzt und durch Elektroporation in elektrokompente *E. coli* XL1 Blue (2.2.1.2) eingebracht. Die transformierten Zellen wurden auf dYT-Nährboden (300 µg/ml Amp) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden als Templat für eine Kolonie-PCR eingesetzt und mit den gleichen Kolonien wurden auch je 5 ml dYT-Röhrchen angeimpft. Die PCR war aus initialer Denaturierung (2 min, 95 °C) und 33 Zyklen aus Denaturierung (30 s, 95 °C) Hybridisierung der Primer (T7 vorwärts- und rückwärts-Primer, 30 s, 48 °C) und Polymerisation durch *Taq*-Polymerase (1000 bp/min, 72 °C) aufgebaut. Der Erfolg der PCR wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft (2.2.1.1), die Kolonien mit dem Fusionsgen der richtigen Größe wurden in 5 ml dYT-Medium über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, Plasmid-DNA isoliert (2.2.1.3) und der Erfolg der Klonierung durch Sequenzierung (Microsynth AG, Balgach, Schweiz) sichergestellt. pET11a Plasmide mit dem gewünschten Gen wurden anschließend durch Elektroporation in elektrokompente *E. coli* BL21(DE3), oder elektrokompente *E. coli* BL231(DE3) Rosetta eingebracht und auf dYT-Nährboden mit 300 µg/ml Amp ausplattiert.

2.2.1.6 Gerichtete Mutagenese

Gerichtete Mutagenese wurde verwendet, um Mutationen in Plasmid-DNA einzuführen, wozu entweder eine *blunt-end* PCR oder eine *quick-change* PCR durchgeführt wurde. Nach zweiminütiger Inkubation bei 95 °C wurden 31 Zyklen aus Strangtrennung (30 s, 95 °C), Hybridisierung (30 s, 52-65 °C) und Polymerisation (Dauer an verwendete Polymerase angepasst, 72 °C) durchlaufen. Der Erfolg der PCR wurde durch Agarosegelelektrophorese (2.2.1.1, 0,6 % Agarose) nachgewiesen und die lineare Plasmid-DNA gereinigt (2.2.1.3). Anschließend wurde die reine DNA phosphoryliert und rezirkularisiert (45 µl gereinigtes PCR-Produkt, 5 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer, 1 µl 10 mM ATP, 1 µl T4-PNK, 1 µl T4-DNA-Ligase, 2 h Inkubation bei 25 °C). T4-DNA-Ligase wurde danach Hitzeinaktiviert (20 min, 65 °C) und durch *DpnI*-Spaltung (4 h, 37 °C) wurde methylierte Templat-DNA abgebaut, um die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Klone zu verringern. Nach einer Mikrodialyse gegen ddH₂O wurden je 5 µl der mutierten Plasmid-DNA in elektrokompente *E. coli* XL1 Blue Zellen transformiert und auf dYT-Nährboden (300 µg/ml Amp) ausplattiert. Mit einzelnen Kolonien wurden 5 ml Kulturen angeimpft (dYT+300 µg/ml Amp) und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Aus je 4 ml wurde Plasmid-DNA isoliert (2.2.1.3) und durch Sequenzieren (Microsynth AG, Balgach, Schweiz) der Erfolg der Mutagenese überprüft. Die Plasmide mit den gewünschten Mutationen wurden in elektrokompente *E. coli* BL21(DE3) oder *E. coli* BL21(DE3) Rosetta (2.2.1.2) transformiert, auf dYT-Nährboden (300 µg/ml Amp) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Fermentation

dYT-Medium: 5 g/l NaCl, 10 g/l Hefeextrakt, 16 g/l Pepton
Lysepuffer: 50 mM Tris/HCl pH^{RT} 8,0, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl

Am Vortag der Fermentation wurde eine 100 ml dYT Vorkultur mit einem Einzelklon *E. coli* BL21(DE3) oder *E. coli* BL21(DE3) Rosetta mit dem gewünschten Gen angeimpft. Die Vorkultur wurde über Nacht unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2,5 l dYT-Medium mit entsprechenden Antibiotika versetzt und 30 min lang bei 37 °C unter Schütteln präinkubiert, bevor mit insgesamt 2,5 ml der Vorkultur inokuliert wurde. Die Zellen wurden bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 – 0,8 inkubiert. Durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) wurde die Proteinüberexpression induziert. Die Kultur wurde weitere 3,5 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert und die Zellen

anschließend durch Zentrifugation pelletiert (GS-3 Rotor, 5000 rpm, 4 °C, 20 min). Die Zellpellets wurden in 60 ml Lysepuffer resuspendiert und bei -80 °C bis zum Zellaufschluss gelagert. Die Expression der Abl-Kinase erfolgte bei 25 °C über Nacht.

2.2.2.2 Zellaufschluss und Reinigung der His₆-SUMO-Fusionsproteine durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Auftragspuffer: 50 mM Na₂HPO₄ pH^{RT 8,0}, 100 mM NaCl, 5 mM Imidazol

Elutionspuffer: 50 mM Na₂HPO₄ pH^{RT 8,0}, 100 mM NaCl, 250 mM Imidazol

Die Zellen (2.2.2.1) wurden unter Rühren aufgetaut und die Zellsuspension dadurch homogenisiert. Danach erfolgte der Zellaufschluss an einem Microfluidizer. Zellbestandteile und unlösliche Proteine wurden durch Zentrifugation (SS-34 Rotor, 15 000 rpm, 4 °C, 45 min) abgetrennt und das lösliche His₆-SUMO-Fusionsprotein im Überstand erhalten. Der Überstand wurde für den ersten Reinigungsschritt auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen. Es wurde eine frisch regenerierte Ni-NTA-Säule (5 ml Volumen) verwendet, die vor dem Auftragen mit 20 ml Auftragspuffer äquilibriert worden war. Anschließend wurde das gebundene Protein mit 25 Säulenvolumen Auftragspuffer gewaschen, um andere, lösliche Proteine und unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Die Elution erfolgte mit vier Säulenvolumen Elutionspuffer. Dabei wurde das erste Säulenvolumen als Durchbruch verworfen, die folgenden drei Säulenvolumen wurden als Eluat gesammelt und die Konzentration des Fusionsproteins durch Absorptionmessung bei 280 nm gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz (Gleichung 1) bestimmt.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d \quad 1$$

- A gemessene Absorption bei 280 nm
- ϵ molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm (M⁻¹ cm⁻¹)
- c Proteinkonzentration (M)
- d Schichtdicke der Küvette (cm)

Um das gewünschte Protein von dem His₆-SUMO-Tag zu spalten, wurde das Eluat über Nacht bei 4 °C in Anwesenheit von His₆-Senp2 (humane SUMO-Protease, 1 mg Protease pro 150 mg Fusionsprotein) gegen 2 l Auftragspuffer (+ 0,5 mM DTT) dialysiert (3,5 kDa Ausschlussvolumen) und dabei das Fusionsprotein gespalten und das Imidazol aus dem Elutionspuffer verdünnt. Das Dialysat wurde erneut auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen. Dabei blieben das gespaltene His₆-SUMO und His₆-Senp2 an der Säule gebunden, das Tag-freie Protein wurde im Durchbruch erhalten, die Säule mit zusätzlich zwei Säulenvolumen Auftragspuffer gespült und das Volumen auf 4 ml eingengt (Amicon®

Ultra-15, 3 kDa Ausschlussvolumen). Dieses Volumen konnte direkt für die abschließende Gelfiltrationschromatographie eingesetzt werden.

2.2.2.3 Gelfiltrationschromatographie

Gelfiltrationspuffer 100 mM Kaliumphosphat pH 7,4
Gelfiltrationspuffer für
Abl-KD und c-CrkII für 50 mM Hepes, 100 mM NaCl, pH^{RT} 7,6, 1 mM DTT
die Phosphorylierung

Als letzter Reinigungsschritt der Proteinvarianten wurde eine Gelfiltrationschromatographie durchgeführt. Bei dieser Methode werden Moleküle nach ihrer Größe voneinander getrennt, wodurch Gelfiltration eine exzellente Möglichkeit ist, um fehlgefaltete oder aggregierte Proteine abzutrennen und das Protein gleichzeitig in einen anderen Puffer zu überführen. Es wurde eine Superdex 75 *prep-grade* Gelfiltrationssäule (Pharmacia XK 16/600) verwendet, die zuvor mit einem Säulenvolumen Gelfiltrationspuffer (1,0 ml/min) äquilibriert worden war. Danach wurden 4 ml der Proteinlösung (2.2.2.2) aufgetragen und mit einem Säulenvolumen Gelfiltrationspuffer eluiert (1,0 ml/min). Während der Chromatographie wurde die Absorption bei 280 nm aufgezeichnet, um das Chromatogramm zu erhalten. Zwischen einem Elutionsvolumen von 25 ml und 130 ml wurden 1,7 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden vereinigt und auf etwa 1,0 ml konzentriert (Amicon® Ultra-15, Ausschlussgewicht 3 kDa). Die Proteinkonzentration wurde durch Absorptionsmessung gemäß Gleichung 1 bestimmt. Die gereinigten Proteinvarianten wurden bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.2.4 Reinigung eines Peptidliganden

Auftragspuffer: 50 mM Na₂HPO₄, pH^{RT} 8,0, 100 mM NaCl, 5 mM Imidazol
Waschpuffer: 50 mM Na₂HPO₄, pH^{RT} 8,0, 100 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 6 M
GdmCl
Elutionspuffer: 50 mM Na₂HPO₄, pH^{RT} 8,0, 100 mM NaCl, 250 mM Imidazol

Um die Bindung eines Peptidliganden an SH3-Domänen messen zu können, wurde dieser Ligand heterolog in *E. coli* BL21(DE3) als His₆-SUMO-Fusion exprimiert (2.2.1.5 und 2.2.2.1). Dieses Expressions- und Reinigungsprotokoll wurde von C. Baumgärtel im Rahmen ihrer Masterarbeit (durchgeführt unter meiner Betreuung) erarbeitet und danach nur noch leicht modifiziert. Nach dem Zellaufschluss an einem Microfluidizer wurden Zellbestandteile und unlösliche Proteine durch Zentrifugation (SS-34 Rotor, 15 000 rpm, 4 °C, 30 min) abgetrennt und der Überstand auf eine 5 ml Ni-NTA-Säule aufgetragen. Danach wurde die

Säule mit dem gebundenen Fusionsprotein unter denaturierenden Bedingungen mit zehn Säulenvolumen Waschpuffer gespült, um mögliche Interaktionen zwischen dem Peptid und zellulären Proteinen aus *E. coli* aufzuheben. Anschließend wurde mit zehn Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen, damit His₆-SUMO zurückfalten konnte und mit vier Säulenvolumen Elutionspuffer eluiert (vgl. 2.2.2.2). Das Eluat wurde auf ein Volumen von 4 ml reduziert (Amicon® Ultra-15, Ausschlussgewicht 3 kDa) und auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen (2.2.2.3). Die vereinigten Fraktionen wurden auf ein Volumen von 4 ml eingengt, die Peptidkonzentration bestimmt und unter leichtem Rühren die Abspaltung des His₆-SUMO-Tags durch His₆-Senp2 durchgeführt (über Nacht, 4 °C). Durch eine zweite Ni-NTA-Affinitätschromatographie (2.2.2.2) wurden His₆-SUMO und His₆-Senp2 abgetrennt. Bei diesem Schritt wurde ddH₂O für die Elution und das Waschen verwendet, der gesammelte Durchbruch wurde anschließend gefriergetrocknet und in 600 µl 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4 resuspendiert.

2.2.2.5 Phosphorylierung von c-CrkII

Phosphorylierungspuffer: 20 mM Hepes, 2 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT, pH 7,6

Um den Einfluss der spezifischen Phosphorylierung von c-CrkII zu untersuchen, wurde gereinigtes c-CrkII *in vitro* mittels der gereinigten Kinase-Domäne der Abl-Kinase (Abl-KD) phosphoryliert. Dazu wurden 10 µM der jeweiligen c-CrkII Variante mit 0,1 µM Abl-KD in Phosphorylierungspuffer 3 h lang unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Phosphorylierungsansatz wurde auf etwa 4 ml eingengt (Amicon® Ultra-15, Ausschlussgewicht 3 kDa). Durch Gelfiltration (2.2.2.3) in 100 mM Kaliumphosphat pH 7,4 wurden Spuren der Kinase sowie die Nukleotide abgetrennt, das phosphorylierte Protein auf etwa 1 ml konzentriert und die Konzentration durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt.

2.2.2.6 Reinigung der isolierten N2-Domäne des Gen-3-Proteins

Die isolierte N2-Domäne des Gen-3-Proteins des filamentösen Phagen fd mit der stabilisierenden Mutation Q129H (N2) wurde als Proteinsubstrat für Prolyl-isomerasen verwendet. Bei der Expression bildet N2 Einschlusskörper (*inclusion bodies*) und muss daher unter denaturierenden Bedingungen gereinigt werden. Die Rückfaltung erfolgt dabei während das Protein an die Ni-NTA-Säule gebunden ist. Die Reinigung wurde, wie in der Literatur beschrieben, durchgeführt ^(200, 201).

2.2.2.7 Reinigung von p53-DBD

Das Expressionskonstrukt für p53-DBD wurde von Professor Dr. Johannes Buchner zur Verfügung gestellt. p53-DBD (94-312) ist dabei mit einem N-terminalen Hexahistidin-Tag gefolgt von einer TEV-Protease-Schnittstelle in pET28a kloniert. Die Reinigung erfolgte wie in der Literatur beschrieben ⁽²⁰²⁾.

2.2.2.8 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Trenngel:	12,5 % (w/v) Acrylamid (Stammlösung mit 37,5:1 Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid), 1 M Tris/HCl, pH ^{RT} 8,45, 0,1 % (w/v) SDS
Sammelgel:	4,2 % (w/v) Acrylamid, 0,75 M Tris/HCl, pH ^{RT} 8,45, 0,07 % (w/v) SDS
Probenpuffer (4x):	0,2 M Tris/HCl, pH ^{RT} 7,0, 10 mM DTT, 10 mM EDTA, 1,5 % (w/v) SDS, 48 % (w/v) Glycerin, 0,04 % (w/v) Bromphenolblau
Anodenpuffer:	0,2 M Tris/HCl, pH ^{RT} 8,9
Kathodenpuffer:	0,1 M Tris/HCl, 0,1 M Tricin, 0,1 % (w/v) SDS, pH ^{RT} 8,25
Färbelösung:	0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Acetat
Entfärbelösung:	10 % (v/v) Acetat

Bei der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger und von Jagow ⁽²⁰³⁾ werden kleine Proteine gut nach ihrer Größe aufgetrennt. Dazu wurden die Proben (etwa 10 µM Protein) mit ¼ Volumen Probenpuffer versetzt und 10 min lang im kochenden Wasserbad erhitzt. Die Elektrophorese wurde in einer MIDGET-Vertikal-Elektrophorese-Apparatur bei einer Stromstärke von 25 mA für das Sammelgel und 35 mA für das Trenngel durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt, das Trenngel in der Färbelösung kurz erhitzt und 20 min lang gefärbt. Danach wurde die Färbelösung gegen Entfärbelösung ausgetauscht, kurz erhitzt und 1 h lang entfärbt.

2.2.2.9 Diskontinuierliche native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Trenngel:	20 % (w/v) Acrylamid (Stammlösung mit 37,5:1 Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid), 0,5 M Tris/HCl, pH ^{RT} 8,9
Sammelgel:	3 % (w/v) Acrylamid, 0,5 M Tris/HCl, pH ^{RT} 6,8
Probenpuffer (4x):	0,2 M Tris/HCl, pH ^{RT} 6,8, 48 % (w/v) Glycerin, 0,04 % (w/v), Bromphenolblau
Anodenpuffer:	0,2 M Tris/HCl, pH ^{RT} 8,9
Kathodenpuffer:	0,05 M Tris/HCl, 0,38 M Glycin, pH ^{RT} 8,9
Färbelösung:	0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Acetat
Entfärbelösung:	10 % (v/v) Acetat

Bei der diskontinuierlichen nativen-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine sowohl nach ihrer Größe als auch nach der Oberflächenladung aufgetrennt. Dazu wurden die Proben (etwa 10 µM Protein) mit ¼ Volumen Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde in einer MIDGET-Vertikal-Elektrophorese-Apparatur bei einer konstanten Stromstärke von 33 mA durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt, das Trenngel in der Färbelösung kurz erhitzt und 20 min lang gefärbt. Danach wurde die Färbelösung gegen Entfärbelösung ausgetauscht, kurz erhitzt und 1 h lang entfärbt.

2.2.3 Biophysikalische Analysen

2.2.3.1 Fluoreszenzspektren

Messpuffer:	100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4
Entfaltungspuffer:	100 mM Kaliumphosphat, 6 M GdmCl, pH 7,4

Die konformationelle Entfaltung eines Proteins ist nahezu immer mit einer Änderung der spektralen Eigenschaften der Chromophore verbunden, da diese bei Entfaltung lösungsmittelzugänglich werden. Fluoreszenzspektren wurden aufgenommen, um diese Änderungen aufzuzeichnen und geeignete Sonden für weitere Experimente zu identifizieren. Dafür wurde je 0,5 µM Protein in Lösungen unterschiedlicher GdmCl-Konzentrationen 30 min lang bei 15 °C inkubiert. Anschließend wurde unter konstantem Rühren in der 1 cm Küvette bei 15 °C für jede GdmCl-Konzentration ein Fluoreszenzspektrum von 290 nm bis 450 nm nach Anregung bei 280 nm an einem Jasco FP-6500 Fluoreszenzspektrometer aufgezeichnet. Die Bandbreiten für Anregung und Emission betragen je 3 nm, die Dämpfung 0,5 s.

2.2.3.2 Fern-UV-Circulardichroismus-Spektren

CD-Puffer: 10 mM Kaliumphosphat, pH 7,4

Durch die Aufnahme von Fern-UV-CD-Spektren kann auf einfache und schnelle Weise überprüft werden, ob Proteine korrekt gefaltet sind. Da im Wellenlängenbereich von 185 nm bis 260 nm die Peptidbindungen eines Proteins entsprechend der jeweiligen Sekundärstruktur eine charakteristische Absorption von zirkular polarisiertem Licht aufweisen, kann zwischen α -helikalen, β -Faltblatt- und ungeordneten Strukturen unterschieden werden.

Dazu wurden die Proteinvarianten mit Hilfe einer NAPTM-Säule in CD-Puffer überführt. Die Proteinlösung wurde in 0,1 cm Rundküvetten gegeben und CD-Spektren von 260 nm bis 185 nm bei 15 °C (Bandbreite 2 nm; Auflösung 0,2 s; 20 nm/min) an einem Jasco J-710 Spektropolarimeter gemessen. Um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu verbessern, wurden mindestens 12 Spektren gemittelt und um das Puffersignal korrigiert. Optional wurden die Spektren auf die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure $[\Theta]_{MRW}$ normiert (Gleichung 2).

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

Θ	gemessene Elliptizität in mGrad
Θ_{MRW}	mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure in Grad cm ² dmol ⁻¹
c	Proteinkonzentration in M
d	Schichtdicke der Küvette in cm
N _{AS}	Anzahl der Aminosäuren im Protein

2.2.3.3 GdmCl-induzierte Entfaltung im Gleichgewicht

Messpuffer: 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4

Entfaltungspuffer: 100 mM Kaliumphosphat, 6 M GdmCl, pH 7,4

Um die Stabilität der Proteinvarianten gegenüber GdmCl zu analysieren, wurden Lösungen mit aufsteigender GdmCl-Konzentration vorbereitet. Nach Zugabe des Proteins (Endkonzentration 0,5 μ M) wurden die Gefäße dreimal invertiert und 1 h lang bei 15 °C inkubiert, damit sich das Entfaltungsgleichgewicht einstellen konnte. Die Fluoreszenzintensität der einzelnen Proben wurde an einem Jasco FP6500 Fluoreszenzspektrophotometer bestimmt. Dazu wurde die Emission bei 330 nm (3 nm Spaltbreite) nach Anregung bei 280 nm (Spaltbreite 3 nm) unter konstantem Rühren gemessen (Dämpfung 0,5 s). Um ein stabiles Signal zu erhalten, wurde über sechs Messungen gemittelt. Die exakte GdmCl-Konzentration wurde über die Brechungsindices der einzelnen Proben nach Gleichung 3 berechnet⁽²⁰⁴⁾.

$$[\text{GdmCl}] = 57,147 \cdot \Delta n + 38,68 \cdot \Delta n^2 - 91,60 \cdot \Delta n^3 \quad 3$$

$[\text{GdmCl}]_M$	GdmCl-Konzentration (M)
n	Brechungsindex der Lösung
Δn	Änderung des Brechungsindex

Nachdem die Fluoreszenzwerte um die Pufferfluoreszenz korrigiert worden waren, wurden die Kurvenverläufe nach Gleichung 4, unter Annahme eines Zwei-Zustands-Modells, ausgewertet ⁽²⁰⁵⁾. Der erhaltene Kooperativitätsparameter m und die freie Enthalpie der Entfaltung ΔG_D wurden verwendet, um die GdmCl-Konzentration am Übergangsmittelpunkt $[\text{GdmCl}]_M$ nach Gleichung 5 zu berechnen ⁽²⁰⁶⁾.

$$y(D) = \frac{y_N^0 + m_N \cdot [D] + (y_U^0 + m_U \cdot [D]) \cdot e^{\left(\frac{\Delta G}{R \cdot T} - \frac{m \cdot [D]}{R \cdot T}\right)}}{1 + e^{\left(\frac{\Delta G}{R \cdot T} - \frac{m \cdot [D]}{R \cdot T}\right)}} \quad 4$$

$y(D)$	Messgröße in Abhängigkeit der Denaturierungsmittelkonzentration
$[D]$	Denaturierungsmittelkonzentration (M)
y_N^0	theoretische Messgröße für natives Protein in Abwesenheit von Denaturierungsmittel
y_U^0	theoretische Messgröße für denaturiertes Protein in Abwesenheit von Denaturierungsmittel
m	Kooperativitätsparameter ($\text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1}$)
m_N	Steigung der Basislinie des nativen Proteins (M^{-1})
m_U	Steigung der Basislinie für denaturiertes Protein (M^{-1})
ΔG_D	freie Enthalpie der Entfaltungsreaktion (kJ mol^{-1})
R	allgemeine Gaskonstante ($\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)
T	Temperatur (K)

$$[\text{GdmCl}]_M = \frac{\Delta G_D}{-m} \quad 5$$

2.2.3.4 Thermisch-induzierte Entfaltung

Messpuffer: 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4

Neben der Stabilität gegenüber GdmCl ist auch die thermische Stabilität von Proteinen eine Standardgröße, um Proteine und Proteinvarianten untereinander zu vergleichen. Auch für Aktivitätsmessungen ist es wichtig zu wissen, ob das Protein unter den jeweiligen Versuchsbedingungen stabil gefaltet ist. Die thermisch-induzierte, konformationelle Entfaltung der Proteinvarianten wurde an einem Jasco J-710 Spektropolarimeter mit PTC-348 WI Peltierelement über die Änderung des CD-Signals bei 222 nm verfolgt. Dazu wurde die Proteinlösung (2 μM in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4) in eine Quarzküvette mit 1 cm

Schichtdicke gegeben. Bei einer Heizrate von 60 K/h wurde alle 0,2 K ein Messwert mit einer Dämpfung von 8 s aufgenommen. Die Bandbreite betrug dabei 1 nm.

Die thermischen Entfaltungsübergänge wurden, unter Annahme eines Zwei-Zustands-Modells, entsprechend Gleichung 6 analysiert. Aus dem Übergangsmittelpunkt T_M und der van't Hoff Enthalpie ΔH_D wurde die freie Enthalpie der Entfaltung ΔG_D bei 15 °C bestimmt (Gleichung 7).

$$y(T) = \frac{y_N^0 + m_N \cdot [T] + (y_U^0 + m_U \cdot [T]) \cdot e^{\left(\frac{\Delta H_D}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_M}\right) - \frac{\Delta C_P}{R} \left(1 - \frac{T_M}{T} + \ln \frac{T_M}{T}\right)\right)}}{1 + e^{\left(\frac{\Delta H_D}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_M}\right) - \frac{\Delta C_P}{R} \left(1 - \frac{T_M}{T} + \ln \frac{T_M}{T}\right)\right)}} \quad 6$$

$y(T)$	Messgröße in Abhängigkeit der Temperatur
y_N^0	theoretische Messgröße für natives Protein bei 0 K
y_U^0	theoretische Messgröße für denaturiertes Protein bei 0 K
m_N	Steigung der Basislinie des nativen Proteins (K^{-1})
m_U	Steigung der Basislinie des denaturierten Proteins (K^{-1})
ΔH_D	van't Hoff Enthalpie der Entfaltungsreaktion ($kJ mol^{-1}$)
ΔC_P	Änderung der molaren Wärmekapazität ($J mol^{-1} K^{-1}$)
R	allgemeine Gaskonstante ($kJ mol^{-1} K^{-1}$)
T	Temperatur (K)
T_M	Temperatur am Übergangsmittelpunkt (K)

$$\Delta G_D(T) = \Delta H_D \cdot \left(1 - \frac{T}{T_M}\right) - \Delta C_P \cdot \left(T_M - T + T \cdot \ln\left(\frac{T}{T_M}\right)\right) \quad 7$$

$\Delta G_D(T)$	freie Enthalpie der Entfaltung in Abhängigkeit der Temperatur ($kJ mol^{-1}$)
ΔH_D	Änderung der Enthalpie der Entfaltungsreaktion ($kJ mol^{-1}$)
ΔC_P	Änderung der molaren Wärmekapazität ($J mol^{-1} K^{-1}$)
T	Temperatur (K)
T_M	Temperatur am Übergangsmittelpunkt (K)

2.2.3.5 Analyse der Faltungskinetik von Proteinen

Messpuffer: 100 mM Kaliumphosphat pH 7,4

Entfaltungspuffer: 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4, 6 M GdmCl

Neben der Analyse der Stabilität im Gleichgewicht kann der Prozess der Proteinfaltung auch zeitaufgelöst aufgezeichnet werden. Für die Entfaltungskinetiken wurde Protein ausgehend von nativen Bedingungen (Messpuffer) in Kaliumphosphatpuffer hoher GdmCl-Konzentrationen verdünnt. Für Rück-

faltungsexperimente wurde das jeweilige Protein in 5 M GdmCl inkubiert (1 h, 15 °C) und durch Verdünnung in Kaliumphosphatpuffer niedriger GdmCl-Konzentrationen die Rückfaltung initiiert. Bei allen Messungen wurde mit einer finalen Proteinkonzentration von 0,5 µM und bei einer konstanten Temperatur von 15 °C gearbeitet. Die exakte GdmCl-Konzentration wurde aus den Brechungsindices der einzelnen Proben bestimmt (Gleichung 3), bei den *stopped flow* Messungen wurde zudem der jeweilige Verdünnungsfaktor berücksichtigt. Die Fluoreszenzverläufe zeigten immer exponentielle Kinetiken.

Bei den Messungen nach manueller Mischung wurde das Protein (nativ oder denaturiert) jeweils 20-fach verdünnt und die Fluoreszenzänderung bei 330 nm (Spaltbreite 3 nm) nach Anregung bei 280 nm (Spaltbreite 3 nm) an einem Jasco FP6500 Fluoreszenzspektrophotometer mit einer Dämpfung von 0,5 s aufgezeichnet.

Die schnellen Faltungsreaktionen wurden nach *stopped flow* Mischung an einem Applied Photophysics DX.17MV *sequential stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer gemessen. Die Fluoreszenzänderung wurde als Spannung des *photomultiplier* aufgezeichnet. Nach Anregung bei 280 nm wurde die integrale Fluoreszenz oberhalb von 320 nm detektiert, da für die Faltungsstudien cGMP pH 1,4 als Streulichtfilter zwischen Messkammer und *photomultiplier* verwendet wurde. Da schnelle kinetische Messungen fehleranfällig sind, wurden alle Messungen mindestens sechsmal unter identischen Bedingungen durchgeführt und gemittelt.

$$[D]_M = \frac{\ln \frac{k_{NU}^0}{k_{UN}^0}}{m_{NU} - m_{UN}} \quad 8$$

$$\beta_T = \frac{m_{UN}}{m_{UN} - m_{NU}} \quad 9$$

m_{UN}	Kooperativitätsparameter der Rückfaltungsreaktion (M^{-1})
m_{NU}	Kooperativitätsparameter der Entfaltungsreaktion (M^{-1})
k_{NU}^0	Rate der Entfaltung in Abwesenheit von Denaturierungsmittel (s^{-1})
k_{UN}^0	Rate der Rückfaltung in Abwesenheit von Denaturierungsmittel (s^{-1})
$[D]_M$	Konzentration des Denaturierungsmittels am Übergangsmittelpunkt (M)
β_t	Tanford-Wert

Aus den exponentiellen Zeitverläufen wurden durch Angleich geeigneter Summen aus Exponentialfunktionen die apparenten Raten λ der Ent- und Rückfaltungsreaktionen ermittelt und logarithmisch gegen die GdmCl-Konzentration aufgetragen. Aus dieser Auftragung wurden die Kooperativitätsparameter der Ent- und Rückfaltungsreaktionen (m_{NU} , m_{UN}), der kinetische Kooperativitäts-

parameter m ($m = RT(m_{\text{NU}} - m_{\text{UN}})$) und die Raten der Ent- und Rückfaltungsreaktionen in Abwesenheit von Denaturierungsmittel (k_{NU}^0 , k_{UN}^0) bestimmt. Zusammen wurden diese Parameter verwendet, um die GdmCl-Konzentration am Übergangsmittelpunkt ($[\text{GdmCl}]_{\text{M}}$) zu berechnen (Gleichung 8). Als Maß für die Lösungsmittelzugänglichkeit des Übergangszustandes wurde der Tanford-Wert β_{T} berechnet (Gleichung 9).

2.2.3.6 Bindung des Peptidliganden

Um die Affinität zweier Bindungspartner zu analysieren wurden Assoziationskinetiken an einem Applied Photophysics DX.17MV *sequential stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer aufgezeichnet. Dafür wurden die beiden Bindungspartner durch 1:1 Verdünnung gemischt und die Fluoreszenzänderung oberhalb von 320 nm aufgezeichnet. Bei den Messungen wurde die Proteinkonzentration konstant gehalten, die des Bindungspartners variiert. Für alle Bedingungen wurden mindestens sechs einzelne Kinetiken gemessen, gemittelt und durch den Angleich von Exponentialfunktionen ausgewertet. Folgen Assoziationsreaktionen einer Reaktion zweiter Ordnung (Gleichung 10), so nimmt die apparente Rate der Bindung linear mit der Konzentration des Liganden zu, wobei die Steigung der Assoziationsrate k_{on} , der Schnittpunkt mit der Ordinate der Dissoziationsrate k_{off} entspricht.



Ist die Ligandenkonzentration deutlich höher als die Proteinkonzentration, so kann die Reaktion als pseudo-erster Ordnung angesehen werden und die gemessenen Kinetiken als Exponentialfunktionen behandelt werden. Unter Berücksichtigung der Massenerhaltung und der Dissoziationskonstante K_{D} (Gleichung 11) kann die Konzentration des Komplexes $[\text{AB}]$ als Funktion der Gesamtkonzentrationen von $[\text{A}]_0$ und $[\text{B}]_0$ berechnet werden (Gleichung 12).

$$K_D = \frac{[A] \cdot [B]}{[AB]} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} \quad 11$$

$$[AB] = \frac{[A]_0 + [B]_0 + K_D \pm \sqrt{([A]_0 + [B]_0 + K_D)^2 - 4[A]_0 \cdot [B]_0}}{2} \quad 12$$

K_D	Dissoziationskonstante (μM)
$[A]_0$	Gesamtkonzentration an A (μM)
$[B]_0$	Gesamtkonzentration an B (μM)
$[A]$	Konzentration an freiem A (μM)
$[B]$	Konzentration an freiem B (μM)
$[AB]$	Konzentration des Komplexes aus A und B (μM)
k_{off}	Rate der Dissoziation (s^{-1})
k_{on}	Rate der Assoziation ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)

2.2.3.7 Doppelmischexperimente zur Analyse der Entfaltung

Probenpuffer:	100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4
Entfaltungspuffer:	100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4; 3,3 M GdmCl
Entfaltungspuffer pH 2:	100 mM Glycin, pH 1,8; 3,3 M GdmCl

Bei Doppelmischexperimenten werden die Versuchsbedingungen zweimal verändert, bevor eine Reaktion aufgezeichnet wird. Kombiniert mit *stopped-flow* Mischung können diese Änderungen innerhalb weniger Millisekunden durchgeführt werden. Somit können Reaktionen zu definierten Zeitpunkten abgebrochen und dadurch kinetische Intermediate analysiert werden.

Um die Entfaltung eines Proteins zu analysieren und mögliche Intermediate zu identifizieren, die zu keiner Fluoreszenzänderung führen, wurde natives Protein (0 M GdmCl) durch elffache Verdünnung in Entfaltungsbedingungen (3 M GdmCl) überführt und nach definierten Zeitintervallen ein weiteres Mal sechsfach verdünnt, um wieder Rückfaltungsbedingungen zu erreichen (0,5 M GdmCl). Da nach der zweiten Mischung nur die Moleküle rückfalten können, die während der ersten Mischung entfalten konnten, ist die Amplitude der aufgezeichneten Rückfaltungsreaktion ein direktes Maß für die Entfaltungsreaktion. Müssen etwa einzelne Moleküle eine hohe Energiebarriere überwinden, bevor sie entfalten, so wird dadurch die Rate der Entfaltung in diesem Versuchsaufbau verlangsamt. Die Versuche wurden an einem Applied Photophysics DX.17MV *sequential stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer mit einer finalen Proteinkonzentration von 0,5 μM durchgeführt. Anregung erfolgte bei 280 nm, Emission wurde oberhalb von 320 nm aufgezeichnet. Alle Messungen wurden bei 15 °C durchgeführt. Es

wurden für jedes Entfaltungsintervall mindestens acht einzelne Kinetiken gemessen, gemittelt und durch Angleich von Exponentialfunktionen ausgewertet. Die exakten GdmCl-Konzentrationen wurden refraktometrisch (Gleichung 3) unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung bestimmt. Die Amplitude der Rückfaltung wurde als Funktion der Entfaltungsdauer aufgetragen.

2.2.3.8 Doppelmischexperimente zur Analyse der Rückfaltung

Probenpuffer: 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4
Entfaltungspuffer: 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4; 5,5 M GdmCl

Analog zur Analyse der Entfaltung (2.2.3.7) kann auch die Rückfaltung durch Doppelmischexperimente analysiert werden. Denaturiertes Protein (1 h, 15 °C, 5,5 M GdmCl) wird dabei elffach mit Probenpuffer verdünnt, um die Rückfaltung (0,5 M GdmCl) zu initiieren. Nach definierten Zeitintervallen wird die Proteinlösung durch weitere sechsfache Verdünnung zurück zu Entfaltungsbedingungen (3 M GdmCl) gebracht und die Kinetik der Entfaltung aufgezeichnet. Die Amplitude dieser Reaktion gibt Auskunft über das Ausmaß der Rückfaltungsreaktion während der ersten Mischung.

Alle Messungen wurden mindestens achtmal unter identischen Bedingungen an einem Applied Photophysics DX.17MV *sequential stopped-flow*-Fluoreszenzspektrometer mit einer finalen Proteinkonzentration von 0,5 µM bei 15 °C durchgeführt und gemittelt. Die Auswertung erfolgte durch Angleich von Exponentialfunktionen an die Messdaten. Unter Berücksichtigung der einzelnen Verdünnungen wurde die genaue GdmCl-Konzentration über die Brechungsindices bestimmt (Gleichung 3). Die Amplitude der Entfaltung wurde als Funktion der Rückfaltungsdauer aufgetragen.

2.2.3.9 Doppelmischexperimente um den Zusammenhang von Faltung und Funktion zu untersuchen

Probenpuffer: 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4
Entfaltungspuffer: 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4; 5,5 M GdmCl

Um den Faltungszustand der verschiedenen Proteine mit deren Funktion zu verbinden, wurden Doppelmischexperimente wie in 2.2.3.8 durchgeführt. Protein wurde in 3 M GdmCl denaturiert (1 h, 15 °C) und anschließend die Rückfaltung durch elffache Verdünnung in Probenpuffer initiiert. Nach definierten Zeitintervallen wurde durch weitere sechsfache Verdünnung mit Probenpuffer + 2,4 µM C3G₁₈ die Assoziation des jeweiligen Proteins mit dem Peptidliganden C3G₁₈ aufgezeichnet. Da die Assoziationsreaktion etwa 100-mal schneller abläuft

als die Faltung des Proteins, konnte somit der Zustand, der nach der ersten Mischung erreicht wurde, hinsichtlich der Funktion untersucht werden. In diesem Experiment gibt die Amplitude der Bindung Auskunft über den Faltungszustand des Proteins.

2.2.3.10 Aktivitätstest von Prolylisomerasen

Messpuffer für Tetrapeptide: 100 mM Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,5

Messpuffer für XP-N2: 100 mM Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,5

Messpuffer für RCM-T1 100 mM Tris/HCl, pH^{RT} 7,8, 2 M NaCl

Um die katalytische Effizienz verschiedener PPlasen gegenüber den einzelnen Substraten zu bestimmen, wurden PPlase-Tests durchgeführt. Dazu wurden in 1 cm Quarzküvetten der jeweilige Puffer sowie die jeweilige Konzentration an PPlase vorgelegt und bei 15 °C äquilibriert. Durch Zugabe des Substrats (entfaltete N2, RCM-T1 oder kurzes Peptid) wurde die Reaktion gestartet. Für N2' als Substrat erfolgte Anregung bei 280 nm und die Fluoreszenz wurde bei 340 nm aufgezeichnet, Die Fluoreszenz von RCM-T1 wurde bei 268 nm angeregt und bei 320 nm ausgelesen. Die Peptidsubstrate wurden bei 316 nm angeregt und die Fluoreszenz bei 416 nm detektiert. Alle PPlase-Tests wurden an einem Jasco FP-6500 Fluoreszenzspektrometer (Anregungsbandbreite 3 nm; Emissionsbandbreite 5 nm) mit einer Dämpfung von 0,5 s aufgenommen. Die Daten wurden als monoexponentielle Funktionen ausgewertet.

Die dadurch erhaltenen, apparenten Geschwindigkeitskonstanten λ (s^{-1}) setzen sich aus den Geschwindigkeitskonstanten der katalysierten k_{kat} (s^{-1}) und der unkatalysierten Reaktionen k_0 (s^{-1}) zusammen. Um die katalytische Effizienz einfacher, enzymkatalysierter Reaktionen zu beschreiben, wird die Spezifitätskonstante k_{kat}/K_M (Gleichung 13 - 15) bestimmt. Unter der Voraussetzung, dass die Substratkonzentration deutlich unter der Michaelis-Menten-Konstante K_M liegt, kann die Spezifitätskonstante k_{kat}/K_M aus der Abhängigkeit der apparenten Geschwindigkeitskonstante λ von der PPlase-Konzentration bestimmt werden (Gleichung 15). Dazu muss zusätzlich die Rate der unkatalysierten Reaktion k_0 bekannt sein. Nimmt die apparente Rate λ linear mit der PPlase-Konzentration zu, so kann die katalytische Effizienz k_{kat}/K_M gemäß Gleichung 15 durch lineare Regression bestimmt werden.

$$v = k_0 \cdot [S]_0 + k_{\text{kat}} \cdot [E]_0 \cdot \frac{[S]_0}{K_M} \quad 13$$

$$v = \lambda \cdot [S]_0 \quad 14$$

$$\lambda = k_0 + \frac{k_{\text{kat}}}{K_M} \cdot [E]_0 \quad 15$$

v	Reaktionsgeschwindigkeit
k_0	Geschwindigkeitskonstante der unkatalysierten Reaktion (s^{-1})
k_{kat}	Geschwindigkeitskonstante der katalysierten Reaktion (s^{-1})
λ	beobachtete Geschwindigkeitskonstante (s^{-1})
$[S]_0$	eingesetzte Substratkonzentration (M)
$[E]_0$	eingesetzte Enzymkonzentration (M)

2.2.3.11 Theoretische Analysen kinetischer Prozesse

Um zu überprüfen, ob ein aufgestelltes Modell mit den experimentellen Daten kompatibel ist, wurden theoretische Berechnungen zu dem Modell durchgeführt. Dazu wird für jede Spezies eine Differentialgleichung aufgestellt, die die zeitliche Zu- und Abnahme derselben beschreibt. Um die Berechnungen für das Sechs-Spezies-Doppelboxmodell (Abbildung 3-24) durchzuführen, wurden die Gleichungen 16 - 21 und das Programm Scientist verwendet.

Die berechneten Zeitverläufe für die Protein-Ligand-Komplexe (mit *cis*Pro238 und *trans*Pro238) wurden summiert und mittels Exponentialfunktionen ausgewertet. Die dadurch erhaltenen Amplituden entsprechen prozentualen Werten.

$$\frac{\delta U_c}{\delta t} = -(k_2 + k_3) \cdot U_c + k_1 \cdot U_t + k_4 \cdot N_c \quad 16$$

$$\frac{\delta U_t}{\delta t} = -(k_1 + k_5) \cdot U_t + k_2 \cdot U_c + k_6 \cdot N_t \quad 17$$

$$\frac{\delta N_c}{\delta t} = -(k_4 + k_8 + k_9) \cdot N_c + k_3 \cdot U_c + k_7 \cdot N_t + k_{10} \cdot C_c \quad 18$$

$$\frac{\delta N_t}{\delta t} = -(k_6 + k_7 + k_{11}) \cdot N_t + k_5 \cdot U_t + k_8 \cdot N_c + k_{12} \cdot C_t \quad 19$$

$$\frac{\delta C_c}{\delta t} = -(k_{10} + k_{14}) \cdot C_c + k_9 \cdot N_c + k_{13} \cdot C_t \quad 20$$

$$\frac{\delta C_t}{\delta t} = -(k_{12} + k_{13}) \cdot C_t + k_{11} \cdot N_t + k_{14} \cdot C_c \quad 21$$

- U entfaltetes Protein
- N natives Protein
- C Protein-Ligand-Komplex
- X_c *cis*Pro238 Form des jeweiligen Zustands
- X_t *trans*Pro238 Form des jeweiligen Zustands
- k_i mikroskopische Ratenkonstante

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Biophysikalische Analysen von c-CrkII Proteinen

3.1.1 Molekulare Grundlagen regulatorischer Prolylisomerisierung

Lange galt die Annahme, dass in gefalteten Proteinen jede Prolylbindung in einer definierten Konformationen vorkommt, *cis* oder *trans*. Mittlerweile wurden allerdings zahlreiche Proteine identifiziert, die in ihrer nativ gefalteten Struktur einzelne Proline in *cis* und *trans* enthalten. Dadurch lassen sich Aktivitäten oder Interaktionen mit anderen Molekülen zeitlich genau steuern^(101, 112). Die genauen Ursachen für die Verschiebung des *cis/trans* Gleichgewichts im nativen Zustand, sowie die Weiterleitung des dadurch generierten Signals, sind oft nur näherungsweise verstanden.

In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob c-CrkII tatsächlich durch Prolylisomerisierung im nativen Zustand reguliert wird und ob sich die Proteine aus Mensch (*Homo sapiens*, Hs) und Huhn (*Gallus gallus*, Gg) darin unterscheiden. Aufbauend auf diese Ergebnisse sollte die molekulare Basis für die regulatorische Prolylisomerisierung in c-CrkII erarbeitet werden.

3.1.1.1 Faltung und Funktion von SH3^N-SH3^C aus c-CrkII

Alle bestehenden Modelle zur intramolekularen Regulation von c-CrkII beschreiben, dass die beiden SH3-Domänen, sowie der dazwischen liegende Linkerbereich, miteinander interagieren und dadurch die Bindungsstelle für Proteinliganden in der N-terminalen SH3-Domäne (SH3^N) blockiert wird^(116, 196) (Abbildung 1-4). Gemäß dem Prinzip der thermodynamischen Kopplung müssen feste Domäneninteraktionen die beteiligten Domänen stabilisieren und so vor Entfaltung schützen. Eine direkte und einfache Methode, um Mehrdomänenproteine auf eine derartige Kopplung hin zu analysieren, ist die Bestimmung der Stabilität der Domänen in Isolation und im Gesamtprotein. Da für das Protein aus dem Huhn die Regulation durch Prolylisomerisierung vorgeschlagen wurde und diese Analysen mit dem Zweidomänenkonstrukt SH3^N-SH3^C durchgeführt wurden, soll auch hier mit diesem vereinfachten System gearbeitet werden. Die Proteine aus dem Mensch und aus dem Huhn wurden dabei direkt miteinander verglichen.

Zunächst wurden Fluoreszenzspektren der nativen und der denaturierten (6 M GdmCl) Proteine aufgezeichnet, um eine geeignete Sonde für Stabilitätsmessungen festzulegen. Die intrinsische Fluoreszenz der beiden SH3-Domänen

sowie des Zweidomänenproteins nimmt durch Entfaltung jeweils ab und kann gut als Sonde für Faltungsexperimente verwendet werden.

Die isolierten Domänen SH3^N und SH3^C aus beiden Spezies zeigen einfache Entfaltungsübergänge (Abbildung 3-1 und Tabelle 3-1) und können nach einem Zwei-Zustands-Modell ausgewertet werden.

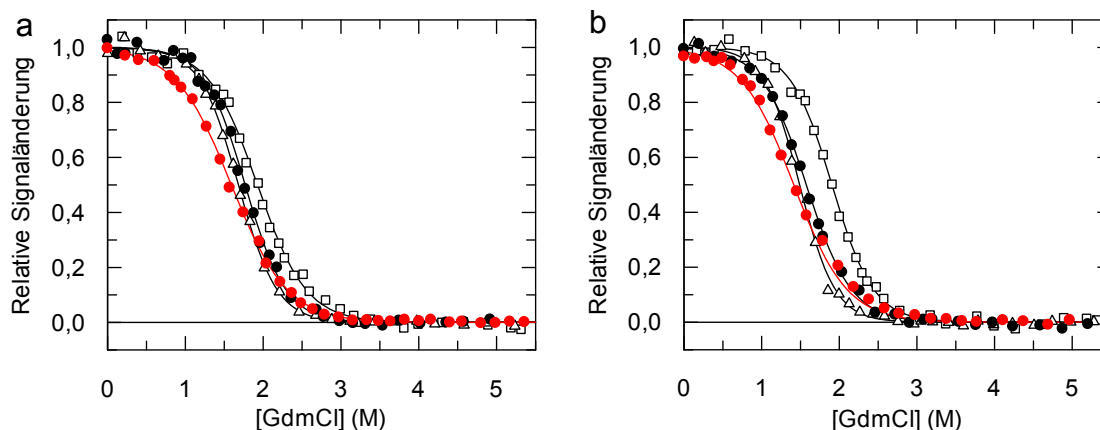


Abbildung 3-1: Stabilität der SH3^N-SH3^C Proteine gegenüber GdmCl

Dargestellt sind die Entfaltungsübergänge von SH3^N (Quadrate), SH3^C (Dreiecke), SH3^N-SH3^C (schwarze Kreise) und SH3^N-SH3^C P238A (rote Kreise) für die Proteine (a) aus dem Mensch und (b) aus dem Huhn. 0,5 μ M des jeweiligen Proteins wurde mindestens 1 h lang bei 15 °C in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4, 0 – 6 M GdmCl inkubiert. Die Fluoreszenz bei 330 nm wurde nach Anregung bei 280 nm aufgezeichnet und gegen die GdmCl-Konzentration aufgetragen. Die Werte aus der Analyse nach einem Zwei-Zustands-Modell (Gleichung 4) sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

Generell weisen die SH3^N-Domänen eine höhere Stabilität auf als die SH3^C-Domänen. Die Übergänge für die SH3^N-SH3^C Zweidomänenproteine liegen jeweils zwischen den Übergängen der isolierten Domänen. Dieser Befund deutet daraufhin, dass die beiden Domänen in SH3^N-SH3^C keiner thermodynamischen Kopplung unterliegen. Da beschrieben ist, dass GgSH3^N-SH3^C durch Prolyl-isomerisierung an Pro238 reguliert wird, wurden auch die Stabilitäten der SH3^N-SH3^C P238A Varianten bestimmt (Abbildung 3-1 und Tabelle 3-1). Die Proteine beider Spezies, Mensch und Huhn, werden durch diese Substitution leicht destabilisiert und die Entfaltungsübergänge weisen ebenfalls einen einphasigen Verlauf auf.

Die Auswertung der Übergänge der SH3^N-SH3^C Proteine nach einem Zwei-Zustands-Modell ist eigentlich nicht gerechtfertigt, da in Gegenwart von zwei Domänen mehrere Zustände existieren können. Dennoch lassen sich die Verläufe am besten nach diesem einfachen Modell auswerten. Bei den erhaltenen, apparenten Parametern muss jedoch beachtet werden, dass sie eine Mischung aus den Werten der beiden Einzeldomänen sind. Die Auswertung wird

zusätzlich dadurch erschwert, dass die Beiträge der beiden Domänen zum Fluoreszenzsignal nicht abgeschätzt werden können.

Tabelle 3-1: Stabilitätsparameter aus GdmCl-induzierten Entfaltungsübergängen

Proteinvariante		[GdmCl] _M (M)	<i>m</i> (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	Δ <i>G</i> ^{15 °C} (kJ mol ⁻¹)		
Homo sapiens	isolierte SH3 ^N		1,93	7,67	14,77	
	isolierte SH3 ^C	wt	1,68	9,63	16,20	
		P238A	1,61	9,70	15,59	
		I239F	1,41	9,89	13,98	
		V272M	1,66	9,15	15,27	
		I239F V272M	1,33	8,21	10,95	
	SH3 ^N -SH3 ^C	wt	1,77	9,17	16,22	
		P238A	1,59	6,65	10,59	
		I239F	1,50	6,00	8,97	
		V272M	1,87	8,23	15,39	
		I239F V272M	1,60	7,35	11,76	
		P238A I239F V272M	1,39	5,86	8,15	
	Gallus gallus	isolierte SH3 ^N		1,90	8,90	16,96
		isolierte SH3 ^C	wt	1,49	10,46	15,58
P238A			1,35	10,00	13,49	
F239I			1,66	7,98	13,25	
M272V			1,39	10,65	14,85	
F239I M272V			1,62	9,75	15,82	
SH3 ^N -SH3 ^C		wt	1,58	8,23	12,97	
		P238A	1,41	6,98	9,87	
		F239I	1,82	9,19	16,74	
		M272V	1,44	6,89	9,92	
	F239I M272V	1,66	7,84	13,00		

In Tabelle 3-1 sind die thermodynamischen Parameter aus den Entfaltungsübergängen zusammengefasst. Die Spezies, das untersuchte Protein und die jeweiligen Aminosäureaustausche sind angegeben. Gemäß der Analyse nach einem Zwei-Zustands-Modell (Gleichung 4) wurden der Kooperativitätsparameter *m*, die freie Enthalpie der Entfaltung bei 15 °C Δ*G*^{15 °C} und die GdmCl-Konzentration am Übergangsmittelpunkt [GdmCl]_M erhalten.

Um potentielle Domäneninteraktionen genauer analysieren zu können, wurden die Ent- und Rückfaltungsraten der einzelnen Proteine bestimmt (Abbildung 3-2). Dafür wird natives Protein in Lösungen hoher GdmCl-Konzentrationen verdünnt und die Fluoreszenzabnahme zeitaufgelöst detektiert. Für Rückfaltungsexperimente wird das zu analysierende Protein zunächst vollständig

entfaltet. Durch Verdünnung in Lösungen niedriger GdmCl-Konzentrationen wird anschließend die Fluoreszenzzunahme während der Rückfaltung aufgezeichnet.

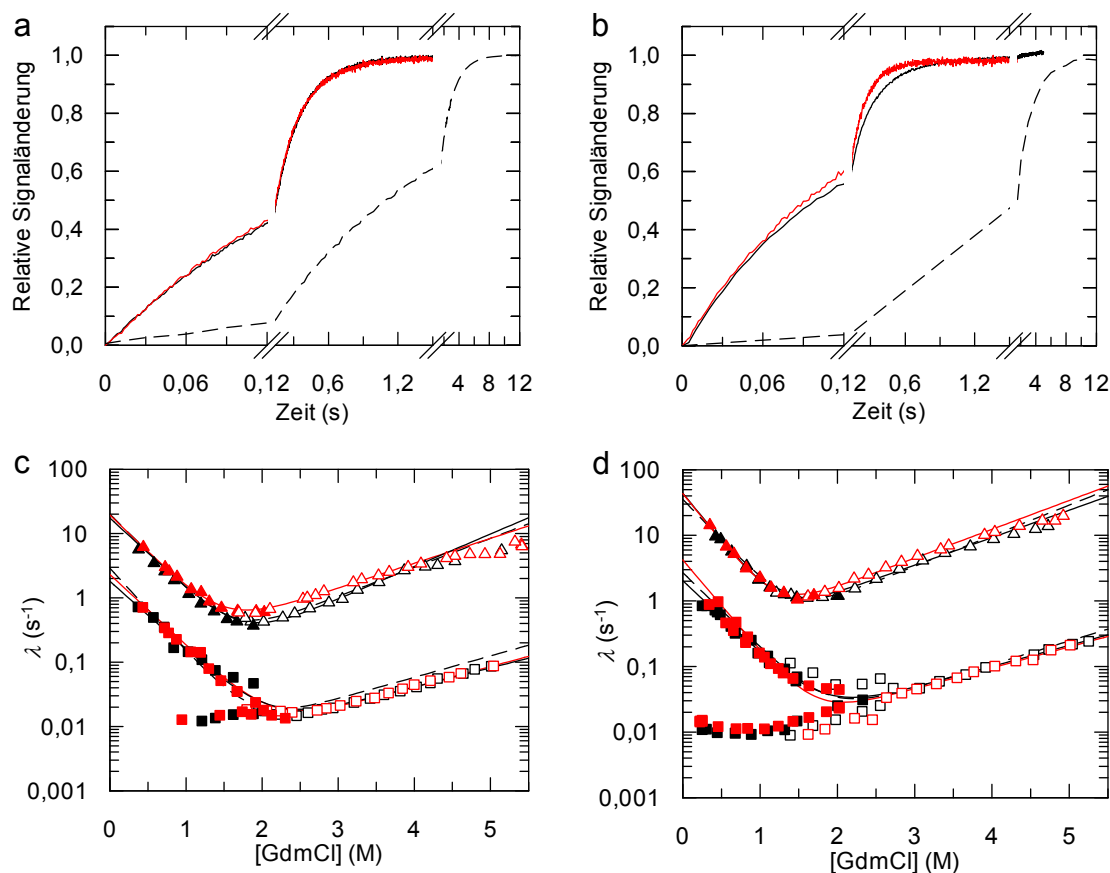


Abbildung 3-2: Chevron-Auftragung für SH3^N-SH3^C

Exemplarische Rückfaltungskinetiken von SH3^C (schwarz), SH3^C P238A (rot) und SH3^N (gestrichelt) sind für die Proteine aus dem Mensch (a) und aus dem Huhn (b) aufgetragen. Die Ratenkonstanten der Entfaltung (offene Symbole) und der Rückfaltung (ausgefüllte Symbole) für HsSH3^N-SH3^C (c) und GgSH3^N-SH3^C (d) sind als Funktion der GdmCl-Konzentration aufgetragen. Daten für die P238A Varianten sind in rot dargestellt. Die Ratenkonstanten für SH3^N sind als Quadrate, für SH3^C als Dreiecke aufgetragen. Alle Versuche wurden mit 0,5 μM Protein in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4 bei 15 °C durchgeführt. Für die Rückfaltungsexperimente wurden die Proteine mindestens 1 h lang in 4 M GdmCl bei 15 °C inkubiert. Nach manueller Mischung (SH3^N) wurde die Fluoreszenz bei 330 nm nach Anregung bei 280 nm detektiert. Bei den *stopped-flow* Messungen (SH3^C) wurde die integrale Fluoreszenz oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm aufgezeichnet. Die Abhängigkeit der Ratenkonstanten von der GdmCl-Konzentration wurde gemäß einem Zwei-Zustands-Modells ausgewertet. Die ermittelten Parameter sind in Tabelle A 1 zusammengefasst.

Dabei zeigt sich deutlich, dass SH3^C etwa zehnmal schneller faltet als SH3^N (Abbildung 3-2a und b). Diese kinetische Trennung der beiden Domänen wird über den gesamten Bereich an GdmCl-Konzentrationen beobachtet. Daher können in diesen zeitaufgelösten Experimenten beide Domänen der SH3^N-SH3^C Proteine getrennt voneinander untersucht werden.

Die beobachteten Faltungsreaktionen setzen sich aus Denaturierungsmittel-abhängigen Phasen im Zeitbereich von Millisekunden bis Sekunden und einer GdmCl-unabhängigen Reaktion im Zeitbereich von Minuten zusammen. Dabei folgen die schnellen Raten jeweils einer Chevron-Auftragung. Sie spiegeln vermutlich die konformationelle Faltung der Domänen wider.

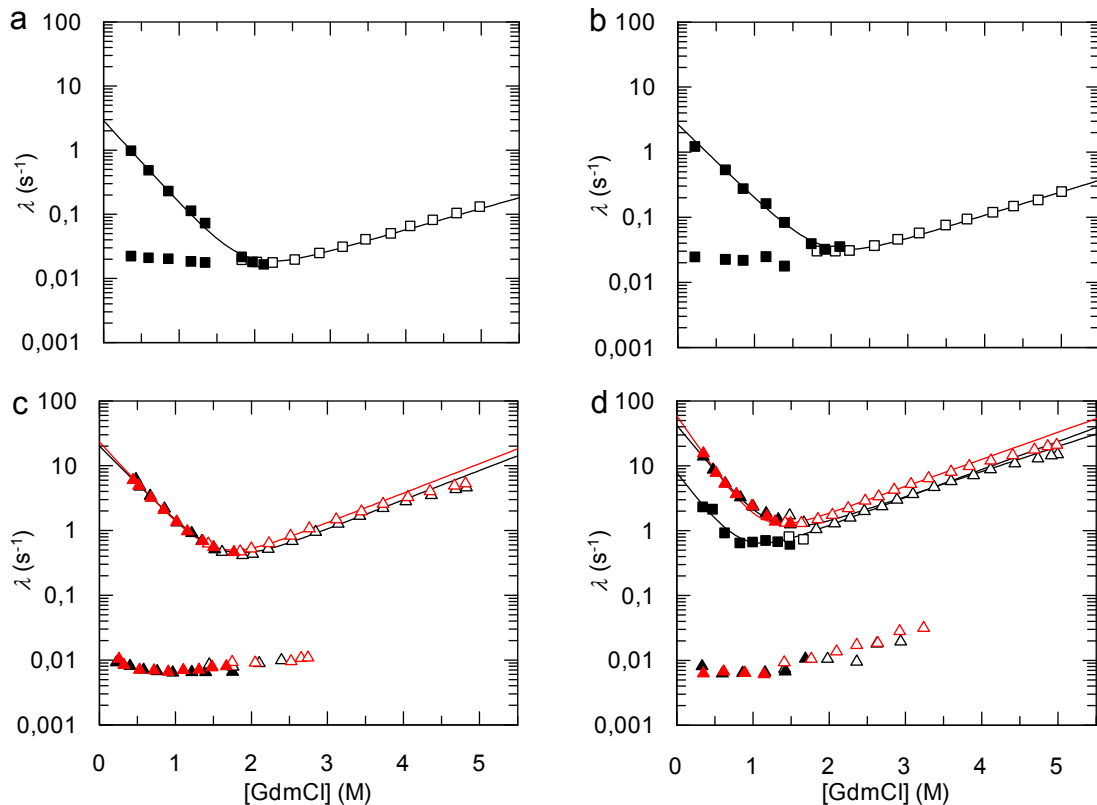


Abbildung 3-3: Chevron-Auftragung für die isolierten Domänen SH3^N und SH3^C

Die Ratenkonstanten der Entfaltung (offene Symbole) und der Rückfaltung (ausgefüllte Symbole) für (a) HsSH3^N, (b) GgSH3^N, (c) HsSH3^C und (d) GgSH3^C sind als Funktion der GdmCl-Konzentration aufgetragen. Die Ratenkonstanten für SH3^N sind als Quadrate, für SH3^C als Dreiecke aufgetragen. Die Daten für die P238A Varianten von SH3^C sind in rot dargestellt. Alle Versuche wurden mit 0,5 μM Protein in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4 bei 15 °C durchgeführt. Für die Rückfaltungsexperimente wurden die Proteine mindestens 1 h lang in 4 M GdmCl bei 15 °C inkubiert. Nach manueller Mischung wurde die Fluoreszenz bei 330 nm nach Anregung bei 280 nm detektiert. Bei den *stopped-flow* Messungen wurde die integrale Fluoreszenz oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte durch den Angleich von Exponentialfunktionen an die gemessenen Fluoreszenzverläufe. Die Abhängigkeit der Ratenkonstanten von der GdmCl-Konzentration wurde gemäß einem Zwei-Zustands-Modells ausgewertet. Die somit erhaltenen Parameter sind in Tabelle A 1 zusammengefasst.

Die langsame, GdmCl-unabhängige Phase ist vermutlich auf *cis*→*trans* Prolylisomerisierung zurückzuführen, da im denaturierten Zustand eines Proteins etwa 10 % der Prolylbindungen *cis*-Konformation einnehmen. Neben Pro238 besitzt SH3^C drei, SH3^N fünf weitere Proline.

Die isolierten Domänen SH3^N und SH3^C (Abbildung 3-3) zeigen die gleichen Faltungsraten und Chevron-Auftragungen wie die Zweidomänenproteine (Abbildung 3-2). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Domänen in SH3^N-SH3^C kinetisch und damit auch thermodynamisch entkoppelt vorliegen. Dennoch weisen die Faltungskinetiken einen wichtigen Unterschied zwischen den Proteinen der beiden Spezies (Mensch und Huhn) auf. Während *HsSH3^C* nur eine Phase für die konformationelle Faltung zeigt, wurden für *GgSH3^C* zwei Rückfaltungsreaktionen aufgezeichnet (Abbildung 3-3d). In dem *GgSH3^N-SH3^C* Konstrukt konnte die zweite, langsamere Phase nicht detektiert werden, da sie vermutlich von der Rückfaltung von SH3^N überlagert wird.

In der Literatur ist beschrieben, dass c-CrkII aus dem Huhn durch Prolylisomerisierung an Pro238 reguliert wird. Daher wurde dieses Prolin durch Alanin ausgetauscht und die entsprechenden P238A Varianten der isolierten Domänen und der Zweidomänenproteine hinsichtlich ihrer Faltungskinetik untersucht (Abbildung 3-2 und Abbildung 3-3, jeweils in rot). Dabei zeigt sich, dass diese Aminosäuresubstitution auf *HsSH3^C* keine Auswirkung hat. Die Raten der Ent- und Rückfaltung, sowie die dazugehörigen Amplituden verhalten sich genau wie im Wildtypprotein (Abbildung 3-4a). Für die isolierte SH3^C-Domäne aus dem Huhn hingegen führt die Sequenzvariation P238A zum Verlust der langsamen Faltungsphase. Unter der Annahme, dass eine Peptidyl-Alanyl-Bindung aus energetischen Gründen so gut wie immer in *trans*-Konformation vorliegt, ist anzunehmen, dass die langsame Rückfaltungsphase im Wildtypprotein (*GgSH3^C*) durch die *cis*Pro238 Spezies verursacht wird. Wie bereits erwähnt, liegen in entfalteten Proteinen Prolylbindungen zu etwa 10 % in *cis*-Konformation vor. Die Analyse der Rückfaltungsamplituden (Abbildung 3-4b) bestärkt die Annahme, dass die langsame Faltungsreaktion der *cis*Pro238 Spezies entspricht, da sie nur etwa 11 % zur gesamten Amplitude der Rückfaltung in den *stopped-flow* Messungen beiträgt.

Der Anteil an *cis*Pro238 in nativ gefalteter *GgSH3^C* kann ebenfalls aus den Amplituden abgeschätzt werden. Zwar entfalten die Proteine mit *trans*Pro238 und *cis*Pro238 gleich schnell, wodurch sich nur ein Entfaltungsast für *GgSH3^C* ergibt, im Übergangsbereich (etwa 1,5 M GdmCl) unterscheiden sich jedoch die beiden Spezies aufgrund ihrer geringfügig unterschiedlichen Stabilitäten. Da die Amplituden der beiden Entfaltungsreaktionen in diesem Bereich ähnlich sind, deutet sich an, dass in isolierter *GgSH3^C* die *cis*Pro238 und *trans*Pro238 Spezies etwa gleich stark populiert werden. Diese Beobachtung stimmt gut mit den NMR-Analysen von Kalodimos und Mitarbeitern überein ^(116, 117).

Die langsame, GdmCl-unabhängige Phase ist wahrscheinlich ebenfalls auf Prolylisomerisierung während der Faltung zurückzuführen. Von der P238A-

Substitution wird diese Reaktion allerdings nicht beeinflusst (Abbildung 3-3 und Abbildung 3-4). Vermutlich wird sie von der Isomerisierung an anderen Prolinen verursacht.

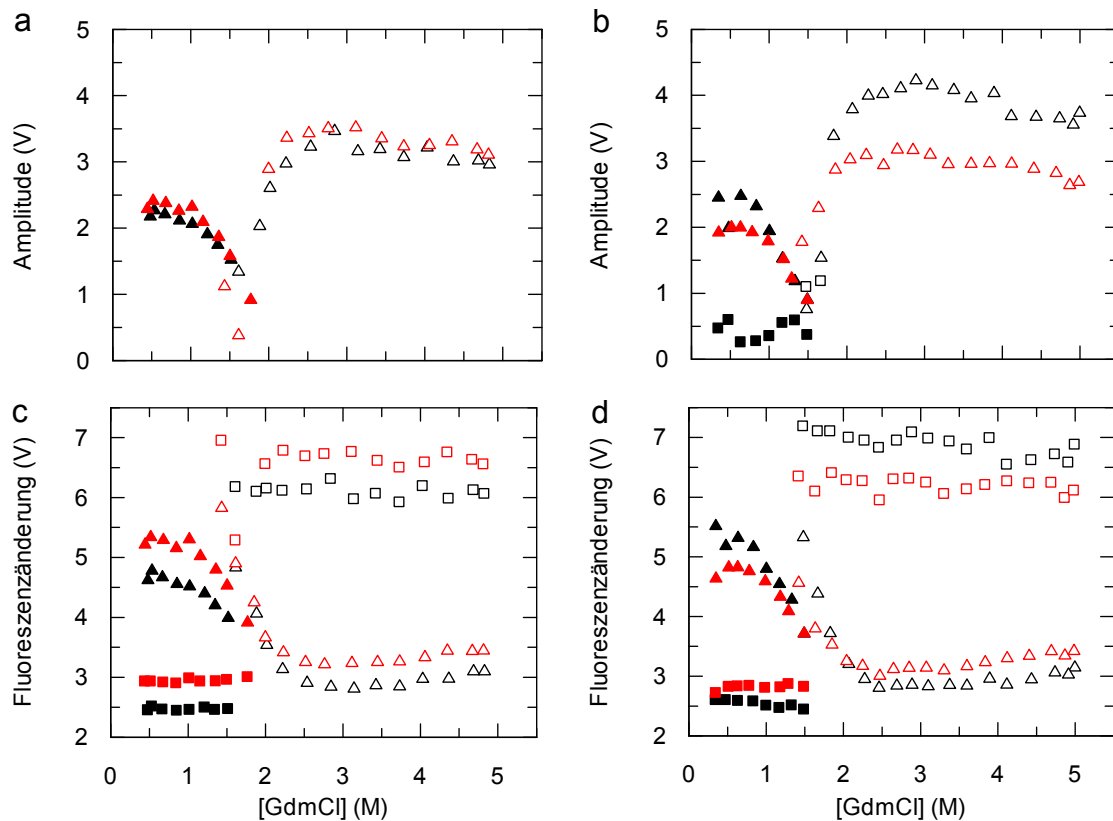


Abbildung 3-4: Amplitudenverlauf der Faltungsreaktionen von SH3^C

Die Amplituden der Entfaltungs- (offene Symbole) und der Rückfaltungsreaktionen (ausgefüllte Symbole) für (a) HsSH3^C und (b) GgSH3^C sind als Funktion der GdmCl-Konzentration dargestellt. (c) und (d) zeigen die Start- (Quadrate) und Endwerte (Dreiecke) der Faltungskinetiken. Alle Werte sind den Faltungsraten für SH3^C aus Abbildung 3-3 zugeordnet. Die Ergebnisse für die jeweilige P238A Variante sind in rot dargestellt.

Neben der Amplitudenauftragung für die Ent- und Rückfaltungsreaktion eines Proteins gibt auch die Start-Endwert-Analyse Aufschlüsse über den Faltungsprozess. Die Startwerte der Entfaltungskinetiken bei verschiedenen Denaturierungsmittelkonzentrationen beschreiben dabei die Grundlinien des nativen Proteins, die Startwerte der Rückfaltung die Grundlinien des denaturierten Proteins. Die Endwerte beider Reaktionen liegen auf dem eigentlichen Übergang. Folgt ein Protein einem Zwei-Zustands-Modell, so ergibt die Start-Endwert-Analyse also den Gleichgewichtsübergang des Proteins.

Für alle Varianten von SH3^C zeigt sich, dass die Rückfaltung nicht vollständig während der *stopped-flow* Messungen abläuft, da die Endwerte der Rückfaltung nicht den Fluoreszenzwert des nativen Proteins erreichen (Startwert der Entfaltung, Abbildung 3-4c und d). Diese fehlende Reaktion während der Rück-

faltung entspricht der langsamen Rückfaltungsphase, die nach manueller Mischung aufgezeichnet werden kann (Abbildung 3-3c und d). Die einfachste Erklärung dafür ist *cis*→*trans* Prolylisomerisierung an einem oder mehreren der drei Proline in SH3^C, die im nativen Protein in *trans* vorliegen.

Die Faltungsanalysen zeigen also, dass Pro238 eine strukturelle Heterogenität in c-CrkII erzeugt. Im humanen Protein liegt das Gleichgewicht dabei deutlich auf der Seite von *trans*Pro238, sodass die *cis* Spezies nicht detektiert werden kann. SH3^C aus dem Huhn zeigt hingegen zwei deutlich voneinander getrennte Faltungsphasen, die durch Analyse der Amplituden, sowie Aminosäureaustausch der *cis* (langsame Faltung) und *trans* (schnelle Faltung) Konformation an Pro238 zugeordnet werden konnten. In der isolierten Domäne, GgSH3^C, liegt das Gleichgewicht zwischen *cis* und *trans*Pro238 bei etwa 1 : 1. Die Verteilung im Zweidomänenprotein SH3^N-SH3^C ist mit den bisherigen Ergebnissen nicht zugänglich.

Die Funktion von c-CrkII in Zellen ist die Bindung von Liganden. Um die Auswirkungen der Heterogenität an Pro238 auf die biologische Aktivität des Adapterproteins zu testen, wurden Bindungsexperimente durchgeführt. Dazu wurde ein Peptidligand verwendet, der hochaffin mit c-CrkII interagiert^(116, 188, 207). Dieser Ligand stammt aus dem Guaninnukleotidaustauschfaktor C3G, einem natürlichen Bindungspartner von c-CrkII und wurde schon in mehreren Studien als Modellpeptid für die Interaktion von c-CrkII mit natürlichen Bindungspartnern verwendet. Trp170 macht den zentralen Teil der Ligandenbindungsstelle in SH3^N aus⁽²⁰⁷⁾. Durch Bindung eines Interaktionspartners, in diesem Fall des C3G-Peptids (C3G₁₈), ist dieses Trp deutlich weniger lösungsmittlexponiert, wodurch die Fluoreszenz zunimmt. Daher kann das Peptid ohne zusätzliche Modifikation verwendet werden, um Bindung an SH3^N an Hand der Zunahme der proteineigenen Fluoreszenz aufzuzeichnen (Abbildung 3-5a).

Generell bindet der Peptidligand sehr schnell an SH3^N, mit apparenten Ratenkonstanten zwischen 50 s⁻¹ und 800 s⁻¹, je nach Proteinvariante und Peptidkonzentration. Die höchste Affinität gegenüber C3G₁₈ weisen die isolierten SH3^N Domänen auf, da die Bindungsstelle für Liganden frei zugänglich ist. SH3^N aus Mensch und Huhn unterscheiden sich dabei nur geringfügig, die Assoziationsreaktion läuft mit HsSH3^N etwas schneller ab. Wesentlich deutlicher ist der Unterschied bei den SH3^N-SH3^C Proteinen. HsSH3^N-SH3^C assoziiert mit C3G₁₈ mit $k_{on} = 90 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, in einer einphasigen Reaktion (Abbildung 3-5b und c, Tabelle 3-2) und folgt somit dem einfachsten Bindungsmechanismus, in dem die freien Reaktionspartner mit dem gebildeten Komplex in einem Gleichgewicht stehen (Gleichung 10). Die Reaktionsverläufe des Zweidomänenproteins und der isolierten SH3^N-Domäne sind sehr ähnlich, was den Schluss zulässt, dass SH3^C

im humanen Protein keinen Einfluss auf die Interaktion von SH3^N mit Liganden hat.

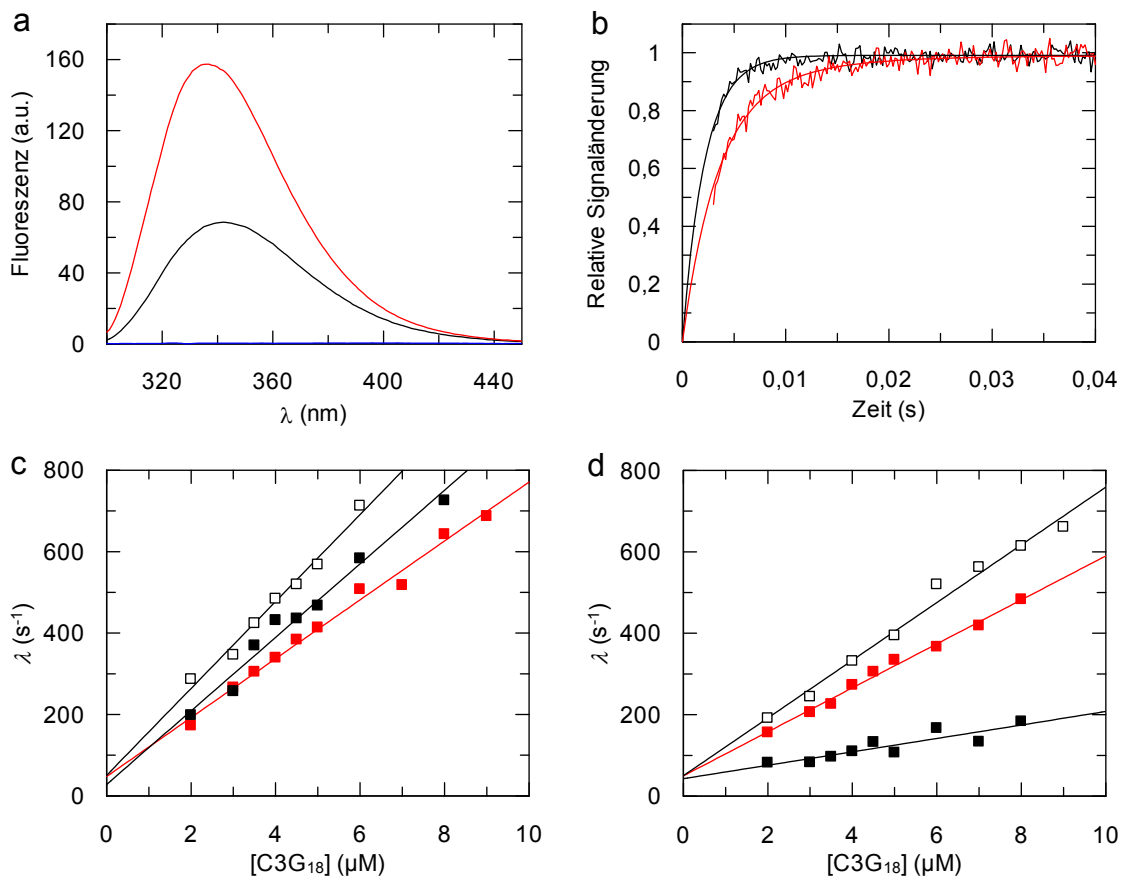


Abbildung 3-5: Bindung von C3G₁₈ an SH3^N-SH3^C

Dargestellt sind die Fluoreszenzemissionsspektren (a) von 0,5 μ M GgSH3^N (schwarz), 2 μ M C3G₁₈ (blau), sowie 0,5 μ M GgSH3^N in Anwesenheit von 2 μ M C3G₁₈ (rot). Exemplarische Assoziationskinetiken und der Kurvenangleich mit Exponentialfunktionen von 6 μ M C3G₁₈ mit 0,5 μ M HsSH3^N-SH3^C (schwarz) und GgSH3^N-SH3^C (rot) sind in (b) aufgetragen. (c) und (d) zeigen die Abhängigkeit der Assoziationsraten von der Peptidkonzentration für jeweils das menschliche und das Hühnerprotein mit SH3^N (offene Quadrate), SH3^N-SH3^C (ausgefüllte Quadrate) und der SH3^N-SH3^C P238A Varianten in rot. Lineare Regression ergibt k_{on} ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) und k_{off} (s^{-1}). Diese Werte sind in Tabelle 3-2 zusammengefasst. Alle Experimente wurden in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4, bei 15 °C durchgeführt. Bei der Messung der Fluoreszenzemissionsspektren erfolgte die Anregung bei 295 nm. Bei den Assoziationskinetiken wurde die Fluoreszenz oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 295 nm aufgezeichnet.

Im Zweidomänenprotein SH3^N-SH3^C aus dem Huhn hingegen ist die Assoziationsreaktion deutlich verlangsamt im Vergleich zu der isolierten Domäne GgSH3^N. Darüber hinaus ist die Bindungsreaktion komplexer und erfordert den Angleich der gemessenen Daten an die Summe zweier Exponentialfunktionen (Abbildung 3-5b).

Aus der Auftragung der apparenten Raten der Assoziation gegen die Peptidkonzentration (Abbildung 3-5d) wird deutlich, dass in Anwesenheit von SH3^C (in GgSH3^N-SH3^C) die Assoziation mit dem Liganden etwa vierfach verlangsamt wird. Da die schnelle Phase der Bindung bei 15 °C nicht zuverlässig aufgezeichnet werden kann, wurden die Messungen auch bei 4,5 °C durchgeführt, um die Assoziation zu verlangsamen und die beobachtete, zwei-phasige Bindung zu bestätigen (Abbildung A 1 und Tabelle A 2).

Tabelle 3-2: Parameter aus den Assoziationsexperimenten

	Proteinvariante	k_{on} ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	k_{off}/k_{on} (μM)	
	isolierte SH3 ^N	106 ± 6	50 ± 26	0,47	
Homo sapiens	SH3 ^N -SH3 ^C	wt	90 ± 4	28 ± 18	0,31
		P238A	72 ± 3	47 ± 16	0,66
		I239F	57 ± 2	43 ± 8	0,75
		V272M	68 ± 1	19 ± 5	0,28
		I239F V272M	12 ± 1	39 ± 4	3,31
		P238A I239F V272M	65 ± 5	25 ± 12	0,39
		c-CrkII	57 ± 3	36 ± 16	0,62
		c-CrkII P238A	54 ± 2	29 ± 10	0,54
	isolierte SH3 ^N	71 ± 4	50 ± 22	0,70	
Gallus gallus	SH3 ^N -SH3 ^C	wt	16 ± 3	42 ± 16	2,58
		P238A	54 ± 2	50 ± 10	0,91
		F239I	82 ± 4	30 ± 21	0,36
		M272V	52 ± 2	22 ± 11	0,43
		F239I M272V	55 ± 2	43 ± 10	0,77
		c-CrkII	21 ± 1	36 ± 5	1,70
		c-CrkII P238A	58 ± 4	35 ± 20	0,60

In Tabelle 3-2 sind die Parameter aus den Bindungsstudien (Abbildung 3-5 bis Abbildung 3-9) zusammengefasst. Die Spezies und die jeweilige Proteinvariante sind angegeben. Durch lineare Regression der apparenten Assoziationsraten in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration wurden k_{on} ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) und k_{off} (s^{-1}) ermittelt. Der Quotient k_{off}/k_{on} entspricht der Bindungskonstante K_D (μM). Fehlerangaben entsprechen der Standardabweichung der Regression. Alle Ergebnisse wurden in unabhängigen Experimenten reproduziert.

Gemäß dem Modell von Kalodimos und Mitarbeitern wird in GgSH3^N-SH3^C die Bindungsstelle in SH3^N durch Interaktionen mit SH3^C blockiert^(116, 117). Die Assoziationsstudien (Abbildung 3-5b und d) zeigen zwar eine verlangsamt aber deutliche Bindungsphase ($k_{on} = 16 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$). Diese Beobachtung ist am einfachsten damit zu erklären, dass SH3^C in GgSH3^N-SH3^C die Affinität von

SH3^N gegenüber Liganden lediglich verringert, die Bindungsreaktion aber nicht vollständig verhindert.

In den Faltungsstudien zu SH3^C wurde in dem Protein aus dem Huhn eine strukturelle Heterogenität beobachtet, die auf Pro238 zurückgeführt werden konnte. Um die Effekte von *cis* und *trans* Pro238 auf die Ligandenbindung zu analysieren, wurden für die SH3^N-SH3^C P238A Varianten ebenfalls Bindungskinetiken aufgezeichnet (Abbildung 3-5c und d). Das Bindungsverhalten des humanen Proteins gegenüber C3G₁₈ wird von der Substitution P238A nur unwesentlich beeinflusst (Abbildung 3-5c). Die Rate der Assoziation k_{on} und der Quotient k_{off}/k_{on} liegen beide im gleichen Bereich wie für das Wildtypprotein (Tabelle 3-2). GgSH3^N-SH3^C P238A zeigt dagegen deutliche Unterschiede zu dem Wildtypprotein (Abbildung 3-5d). In der Variante kann nur noch eine Bindungsphase beobachtet werden. Diese verläuft nahezu identisch wie die Assoziation von C3G₁₈ an die isolierte SH3^N Domäne mit $k_{on} = 54 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ und $K_D < 1 \mu\text{M}$ (Tabelle 3-2).

In Kombination führen die Faltungsanalysen und die Bindungsexperimente zu dem Ergebnis, dass GgCrkII wie beschrieben durch Prolylisomerisierung an Pro238 reguliert wird. Mit *cis*Pro238 nimmt das Protein einen geschlossenen Zustand ein, in dem die Bindungsstelle auf SH3^N von SH3^C abgeschirmt wird. Dieser Zustand führt jedoch nicht, wie in der Literatur beschrieben, zu einer vollständigen Inhibition der Bindung an Effektorproteine, sondern reduziert lediglich die Affinität gegenüber Bindungspartnern. Die Spezies mit *trans*Pro238 stellt die aktive Proteinkonformation dar, in der die Ligandenbindung nicht durch SH3^C eingeschränkt wird und das Protein somit in einer permanent aktiven, offenen Form vorliegt. Diese Heterogenität wird trotz hoher Sequenzidentität für das humane Protein nicht beobachtet. Da sowohl die NMR-Studien ^(116, 117), als auch die hier gezeigten Fluoreszenzmessungen mit dem artifiziellen Zweidomänenprotein SH3^N-SH3^C durchgeführt wurden, wurde die Bindung von C3G₁₈ auch an das Volllängenprotein c-CrkII gemessen (Abbildung A 2 und Tabelle 3-2). Da die Ergebnisse gut mit den Werten für SH3^N-SH3^C übereinstimmen, ist dieses vereinfachte System valide, um die Regulation von c-CrkII durch Prolylisomerisierung zu analysieren.

3.1.1.2 Ursachen des *cis/trans* Gleichgewichts an Pro238

In Abschnitt 3.1.1.1 wurde gezeigt, dass c-CrkII aus dem Mensch und aus dem Huhn unterschiedlich reguliert werden. *HsCrkII* liegt als homogenes Protein vor, das konstitutiv aktiv ist und Interaktionspartner hoch-affin bindet. *GgCrkII* dagegen existiert in zwei Formen, einer offenen, bindungskompetenten Form mit

*trans*Pro238 und einer geschlossenen, niedrig-affinen Form mit *cis*Pro238. Aufbauend auf diese Ergebnisse sollte im Folgenden erarbeitet werden, auf welche Aminosäurevariationen dieses verschiedenartige Verhalten der beiden Spezies zurückzuführen ist. Der auffälligste Unterschied der Aminosäuresequenz ist unmittelbar an der Position nach Pro238 mit Ile im humanen Protein und Phe in dem Protein aus dem Huhn. Es ist daher naheliegend anzunehmen, dass diese Sequenzvariation von großer Bedeutung für die Regulation von c-CrkII durch Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung ist.

Um mögliche Effekte der Position nach Pro238 auf dessen Isomerisierung und damit auf die Ligandenbindung von c-CrkII zu charakterisieren, wurden die entsprechenden Kreuzvariationen zwischen dem menschlichen und dem Hühnerprotein in die isolierte SH3^C Domäne, sowie in SH3^N-SH3^C eingeführt und hinsichtlich ihrer Faltung und der Affinität gegenüber C3G₁₈ analysiert (Abbildung 3-6 und Abbildung 3-7).

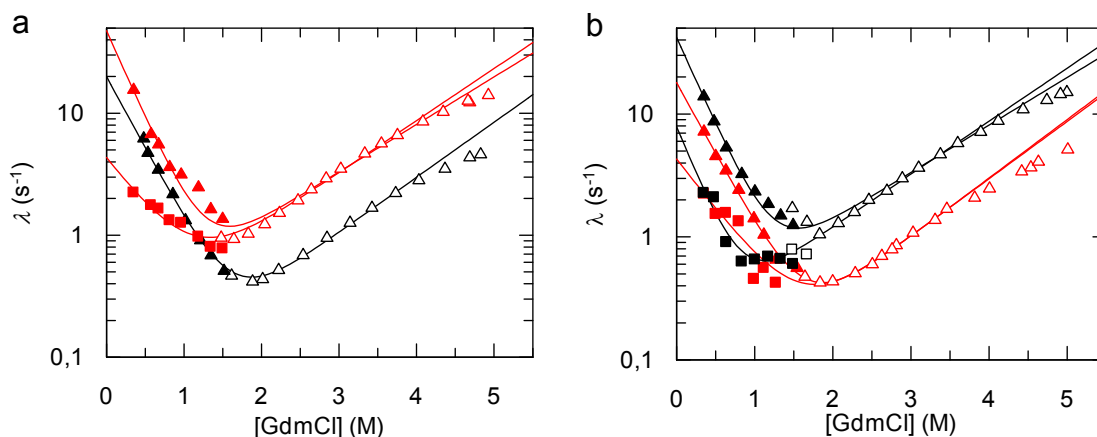


Abbildung 3-6: Bedeutung der Position nach Pro238 für die Faltung isolierter SH3^C

Die Ratenkonstanten der Entfaltung (offene Symbole) und der Rückfaltung (ausgefüllte Symbole) für *Hs*SH3^C (a) und *Gg*SH3^C (b) sind als Funktion der GdmCl-Konzentration aufgetragen. Die jeweiligen reziproken Varianten I239F und F239I sind in rot dargestellt. Alle Versuche wurden mit 0,5 μM Protein in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4 bei 15 °C durchgeführt. Für die Rückfaltungsexperimente wurden die Proteine mindestens 1 h lang in 4 M GdmCl bei 15 °C inkubiert. Die integrale Fluoreszenz wurde oberhalb von 320 nm nach Anregung bei 280 nm aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte durch den Angleich von Exponentialfunktionen an die gemessenen Fluoreszenzverläufe. Die Abhängigkeit der Ratenkonstanten von der GdmCl-Konzentration wurde gemäß einem Zwei-Zustands-Modells ausgewertet. Die ermittelten Parameter sind in Tabelle A 1 zusammengefasst.

Für humane SH3^C mit der Substitution I239F sind zwei Effekte zu beobachten. Das Protein wird durch die Aminosäurevariation destabilisiert und entfaltet etwa viermal schneller, genau wie SH3^C aus dem Huhn (Abbildung 3-6a). Außerdem verläuft die Rückfaltung zweiphasig. Diese zweite Phase wurde in *Gg*SH3^C auf unterschiedliche Konformationen an Pro238 zurückgeführt. Für *Hs*SH3^C I239F bedeutet diese Beobachtung, dass das Protein mit Phe an Position 239,

ähnlich wie GgSH3^C, in zwei unterschiedliche native Strukturen falten kann, die sich vermutlich durch die Konformation an Pro238 unterscheiden. Somit kann durch I239F nach Pro238 im menschlichen Protein eine Faltungsheterogenität der Gly237-Pro238 Bindung erzeugt werden, so wie sie für die Wildtypform des Proteins aus dem Huhn beobachtet wurde. Interessanter Weise führt die reziproke Variation F239I in SH3^C aus dem Huhn zwar zu einer Stabilisierung, da das Protein langsamer entfaltet (entsprechend HsSH3^C), die zweite Rückfaltungsphase bleibt jedoch erhalten (Abbildung 3-6b). Da in dem Zweidomänenprotein nur die schnelle Rückfaltungsphase aufgelöst werden kann (vgl. 3.1.1.1), ist nur der Effekt auf die Entfaltung in den Varianten zu beobachten (Abbildung 3-7a und b).

Die I239F Substitution führt also im humanen Protein eine ähnliche Heterogenität an Pro238 ein, wie sie für das Protein aus dem Huhn beobachtet wurde. Daher wurde auch die Ligandenbindung an die jeweiligen SH3^N-SH3^C Proteine gemessen. Es zeigt sich, dass HsSH3^N-SH3^C I239F etwa 30 % langsamer mit dem C3G-Peptid assoziiert (Abbildung 3-7c). Die Rate der Assoziation k_{on} liegt dabei jedoch nach wie vor etwa dreimal höher als k_{on} der *cis*-Spezies von GgSH3^N-SH3^C. Auf Seite des Proteins aus dem Huhn führt die Substitution F239I hingegen zu einem vollständigen Verlust der Domäneninteraktion und die Assoziationsreaktion verläuft vergleichbar zu der Reaktion mit der isolierten SH3^N Domäne. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Position nach Pro238 extrem wichtig ist, um einen signifikanten Anteil an Molekülen mit *cis*Pro238 zu generieren. Sie machen aber ebenfalls deutlich, dass diese Variation alleine nicht ausreichend ist, um die verschiedenen Konformationen an Pro238 an die SH3^N Domäne weiterzuleiten und die beobachteten Unterschiede in der Faltung und der Ligandenbindung der SH3^N-SH3^C Proteine aus Mensch und Huhn zu erklären.

Ein weiterer Sequenzunterschied zwischen c-CrkII aus Mensch und Huhn ist an Position 272 zu finden. Dieser Rest ist entweder ein Val (Mensch) oder ein Met (Huhn). Um Effekte dieser Position zu untersuchen, wurden die entsprechenden Kreuzvariationen zunächst wieder in die isolierten SH3^C-Domänen eingeführt. Ihre Entfaltungsraten und die Stabilitäten blieben von der jeweiligen Substitution unbeeinflusst (Abbildung 3-8a und b). Für das humane Protein war allerdings auch bei dieser Variante eine zweite Rückfaltungsphase zu beobachten, wie zuvor schon bei der I239F Substitution. Diese Beobachtung bedeutet, dass auch mit Ile an Position 239 ein *cis/trans* Gleichgewicht an Pro238 existieren kann, wenn sich an Position 272 nicht das wildtypische Val, sondern ein Met wie in dem Protein aus dem Huhn befindet.

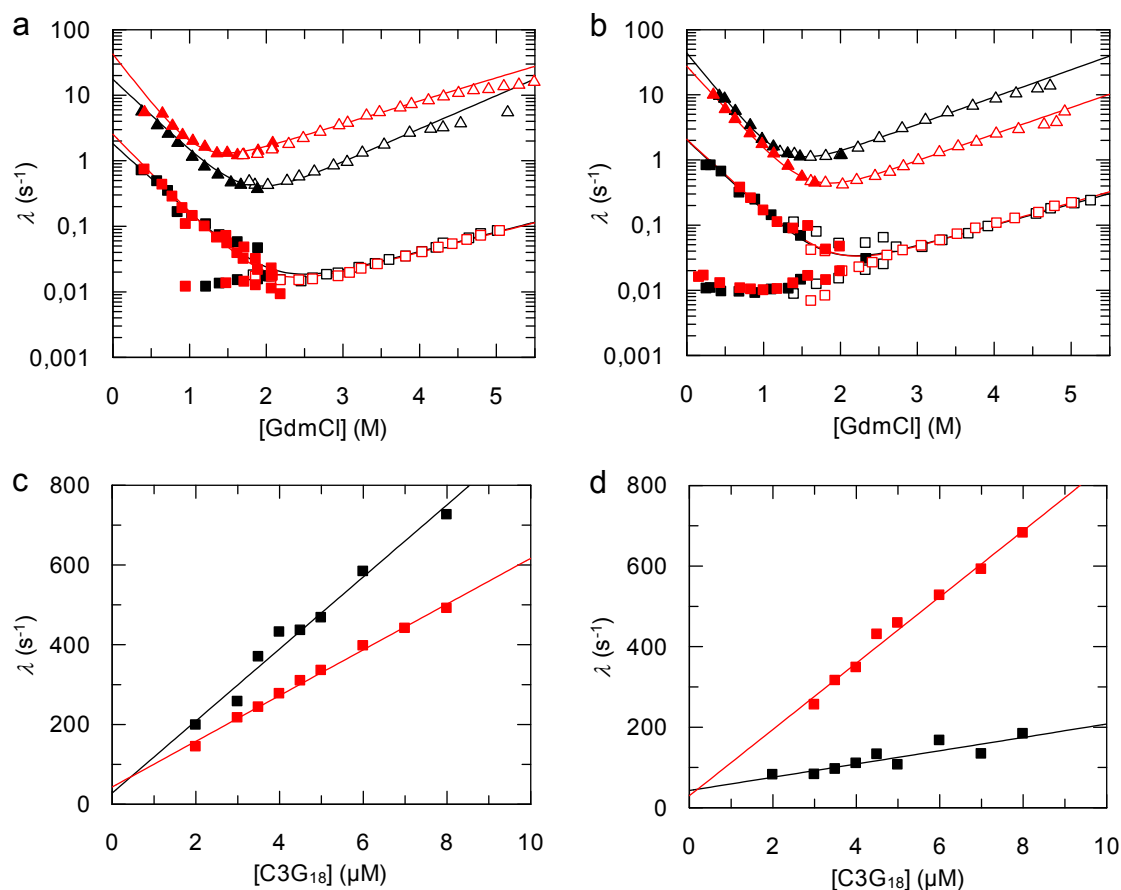


Abbildung 3-7: Faltung und Ligandenbindung der reziproken SH3^N-SH3^C Varianten

Die Ratenkonstanten der Entfaltung (offene Symbole) und der Rückfaltung (ausgefüllte Symbole) für (a) *Hs*SH3^N-SH3^C und (b) *Gg*SH3^N-SH3^C sind als Funktion der GdmCl-Konzentration aufgetragen. Daten für die Kreuzvarianten (I239F und F238I) sind in rot dargestellt. Die Ratenkonstanten für SH3^N sind als Quadrate, für SH3^C als Dreiecke aufgetragen. (c) und (d) zeigen die Abhängigkeit der Assoziationsraten von der Peptidkonzentration für jeweils das menschliche und das Hühnerprotein mit SH3^N-SH3^C in schwarz und den jeweiligen Kreuzvarianten (I239F und F238I) in rot. Die experimentellen Bedingungen wurden wie in Abbildung 3-3 und Abbildung 3-5 gewählt. Die numerischen Werte sind in Tabelle 3-2 und Tabelle A 1 zusammengefasst.

Die Sequenzvariation M272V in SH3^C aus dem Huhn zeigt ebenfalls eine zweiphasige Rückfaltung (Abbildung 3-8b), was die Ergebnisse zu den Kreuzvariationen an Position 239 unterstützt (Abbildung 3-6). Auf die Faltung der Zweidomänenproteine SH3^N-SH3^C haben die Kreuzvariationen an Position 272 keinen Einfluss (Abbildung 3-8c und d).

Bei der Bindung des Peptidliganden zeigt sich, dass die Assoziation für *Hs*SH3^N-SH3^C V272M ähnlich zu dem Wildtypprotein verläuft (Abbildung 3-8e). Die Rate der Assoziation ist nur minimal verlangsamt und es kann kein Hinweis darauf gefunden werden, dass das erzeugte *cis/trans* Gleichgewicht an Pro238 (Abbildung 3-8a) eine Auswirkung auf die Funktion des Proteins hat.

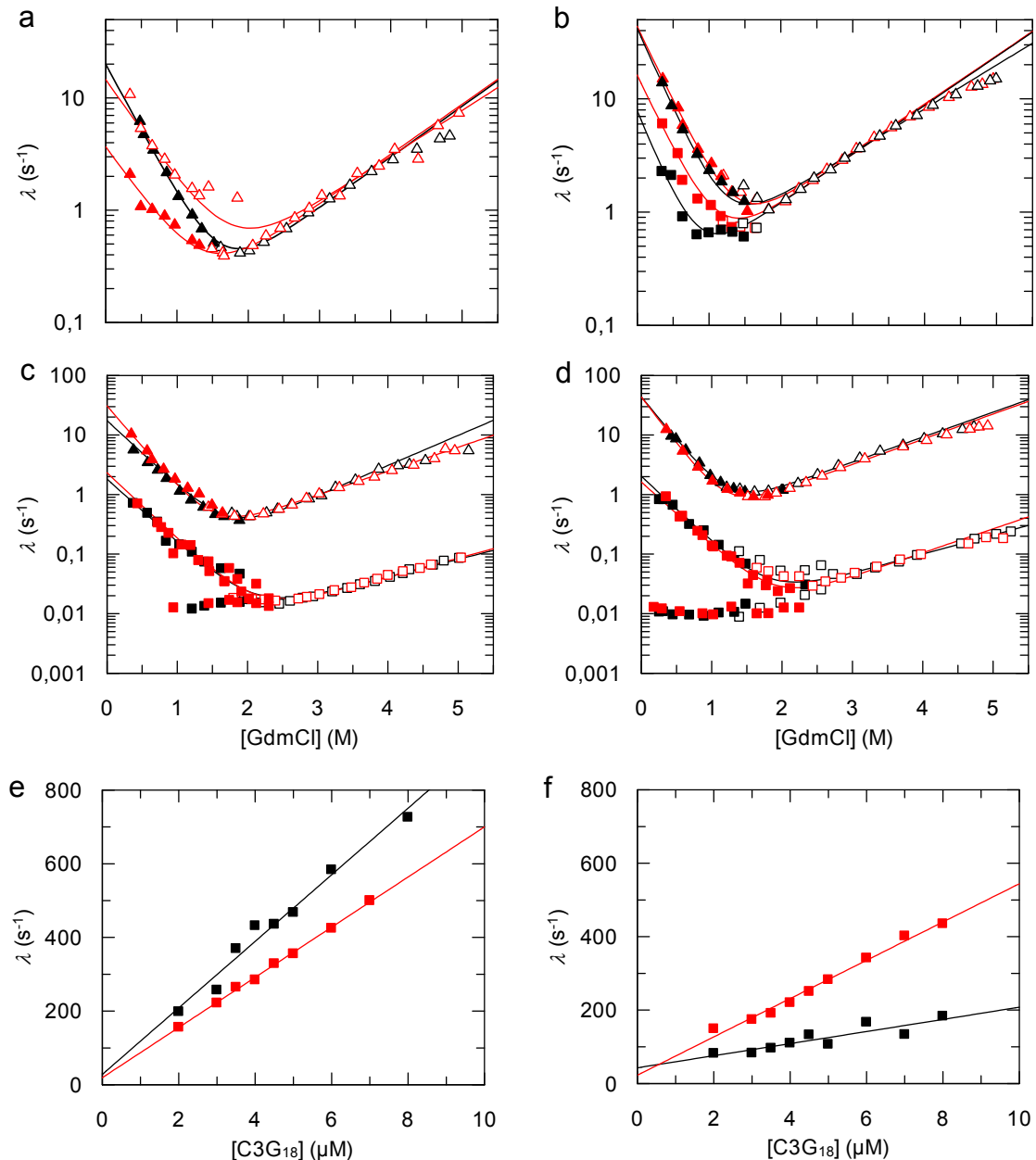


Abbildung 3-8: Faltung und Ligandenbindung der Kreuzvarianten an Position 272

Auftragung der Ratenkonstanten der Entfaltung (offene Symbole) und der Rückfaltung (ausgefüllte Symbole) für (a) *HsSH3^C*, (b) *GgSH3^C*, (c) *HsSH3^N-SH3^C* und (d) *GgSH3^N-SH3^C* als Funktion der GdmCl-Konzentration. Daten für die Kreuzvarianten (V272M und M272V) sind in rot dargestellt. Die Ratenkonstanten für SH3^N sind als Quadrate, für SH3^C als Dreiecke aufgetragen. (e) und (f) zeigen die Abhängigkeit der Assoziationsraten von der C3G₁₈-Konzentration für jeweils das menschliche und das Hühnerprotein mit SH3^N-SH3^C in schwarz und den jeweiligen Kreuzvarianten (V272M und M272V) in rot. Die experimentellen Bedingungen wurden wie in Abbildung 3-3 und Abbildung 3-5 gewählt. Die numerischen Werte sind in Tabelle 3-2 und Tabelle A 1 zusammengefasst.

Für die entsprechende Proteinvariante aus dem Huhn, *GgSH3^N-SH3^C* M272V, ist die Weiterleitung des *cis/trans*Pro238 abhängigen Signals unterbrochen (Abbildung 3-8f). Die Affinität gegenüber C3G₁₈ ist deutlich erhöht

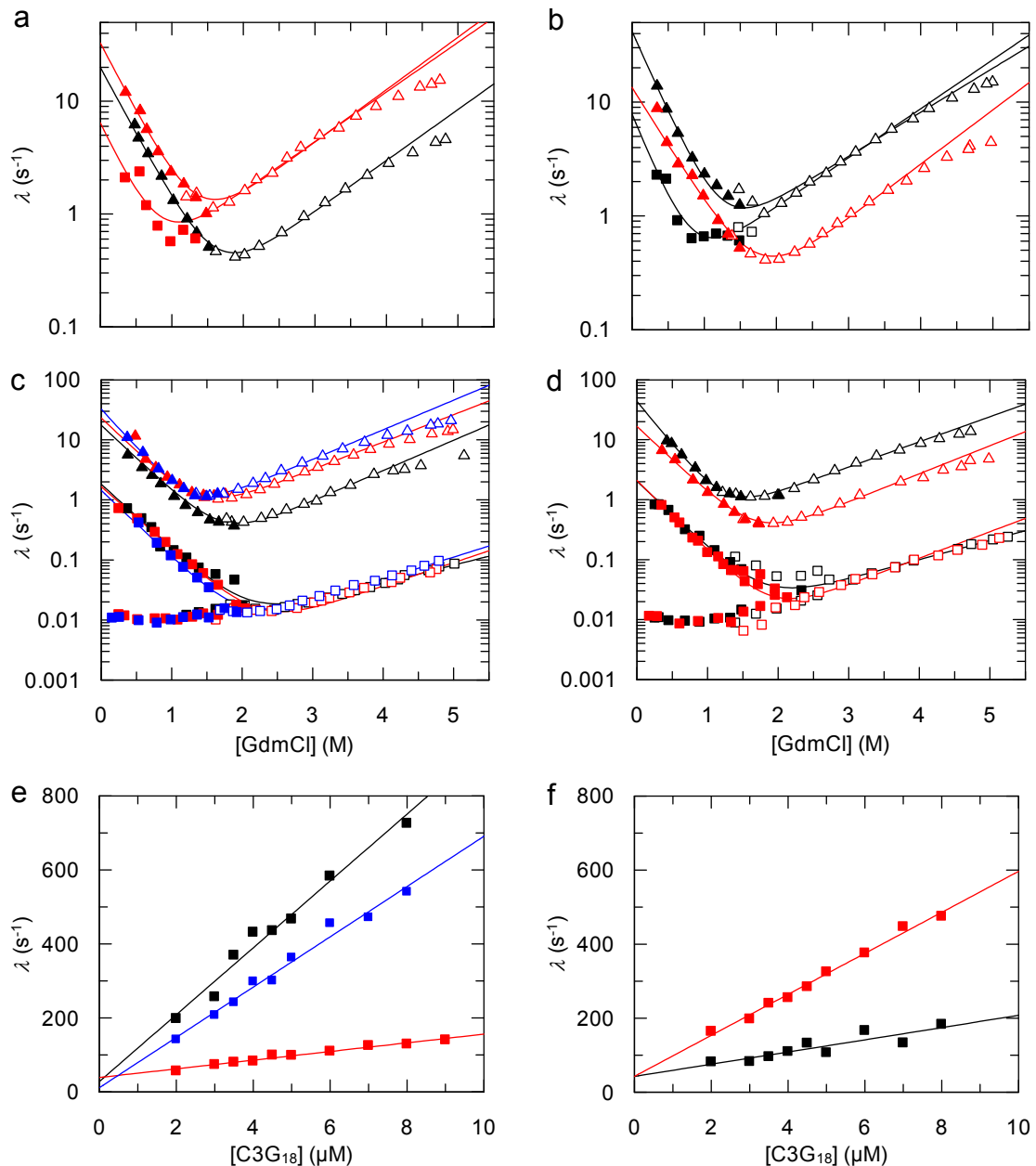
relativ zu GgSH3^N-SH3^C. Damit wird verdeutlicht, dass auch der zweite Rest, Met272, neben Phe239 von großer Bedeutung ist für den Aufbau verschiedener konformationeller Zustände an Pro238 in SH3^C und für die Weiterleitung des dadurch generierten Signals an die Substratbindungsstelle in SH3^N.

Aufbauend auf den Ergebnissen zu den einzelnen Aminosäureaustauschen an Position 239 und 272 wurden beide Variationen gleichzeitig in die Proteine eingebracht (I239F V272M im den humanen Proteinen und F239I M272V in den Proteinen aus dem Huhn, Abbildung 3-9). Das Faltungsverhalten der isolierten C-terminalen Domänen konnte dadurch komplett ineinander umgewandelt werden (Abbildung 3-9a und b). Für SH3^N-SH3^C zeigen die Faltungskinetiken ebenfalls, dass durch die zwei Substitutionen I239F V272M, bzw. F239I M272V die Proteine aus Mensch und Huhn hinsichtlich der Faltungsraten ihrer SH3^C Domänen vollständig ineinander überführt werden (Abbildung 3-9c und d). Die verbliebenen Sequenzunterschiede liegen alle im N-terminalen Bereich des unstrukturierten Linkers und haben daher keinen Einfluss auf Faltung und Stabilität von SH3^C.

Am größten sind die Effekte jedoch auf die biologische Funktion, die spezifische Bindung von Interaktionspartnern. Die einzelnen Substitutionen I239F und V272M waren im humanen Protein zwar in der Lage ein *cis/trans* Gleichgewicht an Pro238 zu erzeugen, aber sie hatten nur einen geringen Einfluss auf die Bindung des Peptidliganden. Die Variante mit beiden Aminosäureaustauschen, HsSH3^N-SH3^C I239F V272M, zeigt dagegen das gleiche Bindungsverhalten wie GgSH3^N-SH3^C, dessen Bindung von der Konformation an Pro238 abhängt.

Um zu überprüfen, ob durch die beiden simultanen Austausch wirklich ein Pro238-abhängiges Bindungsverhalten im humanen Protein induziert werden konnte, wurde in diese Doppelvariante zusätzlich die P238A Variation eingeführt. Diese dreifach substituierte Proteinvariante zeigt keine Auffälligkeiten in der Faltung, das Bindungsverhalten jedoch entspricht wieder nahezu dem humanen Protein (Abbildung 3-9e) bzw. der P238A Variante des Proteins aus dem Huhn (Abbildung 3-5d).

Zusammen zeigen diese Ergebnisse, dass c-CrkII aus Mensch und Huhn sehr wahrscheinlich unterschiedlich reguliert werden und dass diese Unterschiede auf lediglich zwei Sequenzunterschiede zurückgeführt werden können. Ein Sequenzunterschied folgt direkt auf die Prolylbindung, die in *cis* und in *trans* Konformation vorliegen kann, um damit zwischen einem offenen und einem geschlossenen Zustand des Proteins zu differenzieren.


 Abbildung 3-9: Generierung einer prolinabhängigen Regulation in *HsSH3^N-SH3^C*

Auftragung der Ratenkonstanten der Entfaltung (offene Symbole) und der Rückfaltung (ausgefüllte Symbole) für (a) *HsSH3^C*, (b) *GgSH3^C*, (c) *HsSH3^N-SH3^C* und (d) *GgSH3^N-SH3^C* als Funktion der GdmCl-Konzentration. Daten für die Kreuzvarianten (I239F V272M und F239I M272V) sind in rot dargestellt. In blau ist die zusätzliche Variation P238A vor dem I239F V272M Hintergrund im humanen Protein dargestellt. Die Ratenkonstanten für SH3^N sind als Quadrate, für SH3^C als Dreiecke aufgetragen. (e) und (f) zeigen die Abhängigkeiten der Assoziationsraten von der C3G₁₈-Konzentration für jeweils das menschliche und das Hühnerprotein mit den Farben wie in (c) und (d). Die experimentellen Bedingungen wurden wie in Abbildung 3-3 und Abbildung 3-5 gewählt. Die numerischen Werte sind in Tabelle 3-2 und Tabelle A 1 zusammengefasst.

Mit Ile an dieser Position (wie im Mensch) tragen nahezu alle Moleküle eine *trans*-Prolinbindung vor Pro238, wohingegen Phe239 dazu führt, dass eine

deutlich messbare Population mit *cis*Pro238 vorliegt. Der Rest nach Prolin ist folglich wichtig für die Ausprägung des *cis/trans* Gleichgewichts, die Heterogenität alleine ist jedoch nicht ausreichend, um das konformationsabhängige Signal an die SH3^N Domäne zu kommunizieren. Dazu bedarf es eines zweiten Aminosäurerests, der interessanter Weise weit entfernt von Pro238 ist, Val272. Wird dieses Val gegen ein Met (wie in dem Protein aus dem Huhn) ausgetauscht, so kann das Phe239 abhängige *cis/trans* Gleichgewicht an Pro238 in SH3^C an die Bindungsstelle in SH3^N weitergeleitet werden. Diese beiden Substitutionen in Kombination sind ausreichend, um das Bindungsverhalten von HsSH3^N-SH3^C an das von GgSH3^N-SH3^C anzugleichen und damit einen Prolin-Schalter zu generieren.

3.1.1.3 Energetische Kopplung zwischen Ligandenbindung und Prolylisomerisierung

Wie in den vorangehenden Abschnitten gezeigt, unterscheidet sich die Bindung von Interaktionspartnern an c-CrkII bei Mensch und Huhn. Das humane Protein liegt permanent aktiv vor, wohingegen das Protein aus dem Huhn in einer offenen, hoch-affinen Form (mit *trans*Pro238) und einer geschlossenen, niedrig-affinen Form (mit *cis*Pro238) vorkommen kann. Dieses unterschiedliche Verhalten konnte auf lediglich zwei Sequenzunterschiede zurückgeführt werden. Durch reziproke Mutationen konnten die Proteine beider Spezies ineinander überführt werden. Dabei wurden bisher zwei Bindungsphasen aufgezeichnet, wobei selbst die langsame Reaktion (Pro238-abhängige Bindung) mit apparenten Raten von 50 s⁻¹ und mehr deutlich zu schnell für *cis/trans* Prolin gesteuerte Prozesse ist.

In den Faltungsstudien konnte keine thermodynamische Kopplung zwischen den beiden SH3 Domänen beobachtet werden. In den Ligandenbindungsstudien konnten jedoch verschiedene Phasen detektiert werden, die unterschiedlichen konformationellen Zuständen an Pro238 zugeordnet wurden. Mit *trans*Pro238 liegt GgCrkII in einem offenen, hoch-affinen Zustand vor, der C3G₁₈ sehr schnell bindet, mit *cis*Pro238 dagegen in einem niedrig-affinen, der deutlich langsamer bindet. Wenn die Heterogenität an Pro238 wichtig ist für die Funktion von GgCrkII und, wenn die Isomerisierung dieser Bindung zur Regulation der Ligandenbindung verwendet wird, dann müssen diese beiden Prozesse energetisch gekoppelt sein. Die offene Form von GgCrkII, mit *trans*Pro238, weist einen niedrigeren K_D -Wert gegenüber dem C3G-Peptid auf als die *cis*Pro238 Spezies (Tabelle 3-2), bindet den Interaktionspartner somit stärker. Der *trans*Pro238 GgCrkII-Peptid-Komplex sollte folglich energetisch begünstigt sein gegenüber

dem *cis*Pro238 GgCrkII-Peptid-Komplex. Strukturelle Analysen von GgCrkII durch NMR-Spektroskopie schlagen vor, dass im nativ gefalteten Protein ohne Ligand das *cis/trans* Gleichgewicht an Pro238 deutlich auf der Seite der *cis* Konformation liegt⁽¹¹⁶⁾.

Wählt man die Ligandenkonzentration so, dass die *trans*Pro238 Spezies (gemäß $K_D \approx 0,5 \mu\text{M}$) zum größten Teil im Komplex mit C3G₁₈ vorliegt, die *cis*Pro238 Spezies ($K_D \approx 4 \mu\text{M}$) jedoch nur zu einem geringen Teil den Komplex ausbildet (vgl. Gleichung 12), dann muss eine zusätzliche Bindungsphase beobachtet werden können, deren Rate durch Prolylisomerisierung limitiert wird und die der Gleichgewichtsverschiebung von der niedrig-affinen *cis* hin zu der hoch-affinen *trans* Konformation entspricht. Hierfür wurde wieder das vereinfachte System SH3^N-SH3^C verwendet. Mit 1 μM Protein und 4 μM Peptid ergeben sich $\approx 85 \%$ Komplex für die *trans* und $\approx 50 \%$ Komplex für die *cis* Spezies von GgSH3^N-SH3^C. Dies sind nur Näherungswerte, da sich 1 μM SH3^N-SH3^C auf die beiden Spezies (*cis* und *trans*) aufteilt und bisher keine Informationen über das Gleichgewicht im freien und im peptidgebunden Zustand verfügbar sind.

Abbildung 3-10a zeigt deutlich, dass für GgSH3^N-SH3^C tatsächlich eine langsame Bindungsphase beobachtet werden kann, die vermutlich der beschriebenen Gleichgewichtsverschiebung entspricht. Diese Reaktion läuft mit einer Rate von ungefähr $0,01 \text{ s}^{-1}$ ab, was der Rate für Prolylisomerisierung bei 15 °C entspricht⁽¹⁴⁸⁾ und kann für GgSH3^N-SH3^C P238A, sowie für das humane Protein nicht detektiert werden. Dies ist ein weiterer wichtiger Hinweis darauf, dass die Interaktion mit Liganden in c-CrkII aus dem Huhn durch Prolylisomerisierung reguliert wird, in dem Protein aus dem Mensch jedoch nicht. Durch die zwei Sequenzvariationen I239F und V272M kann diese *cis/trans* Pro regulierte Bindung auch in dem humanen Protein etabliert werden. Dadurch wird das unterschiedliche Bindungsverhalten von c-CrkII der beiden Spezies noch deutlicher und die Ergebnisse aus Abschnitt 3.1.1.2 werden bestätigt. Dass die Kombination der beiden Reste, Phe an Position 239 und Met an 272, essentiell wichtig ist um die konformationelle Heterogenität an Pro238 an die Ligandenbindungsstelle in SH3^N zu kommunizieren, wird durch die gestörte Gleichgewichtsverschiebung in den Einzelvarianten klar gezeigt (Abbildung 3-10b).

Mit den Bindungsexperimenten nach manueller Mischung konnte die Gleichgewichtsverschiebung der Reaktion von *cis*Pro238 nach *trans*Pro238 zugeordnet werden, da in der P238A Variante diese Verschiebung nicht stattfindet und die Gly237-Ala238 Bindung vermutlich ausschließlich in *trans* Konformation vorliegt. Dies bedeutet, dass, wie in der Literatur beschrieben^(116, 117), GgCrkII im nativ gefalteten Zustand überwiegend mit *cis*Pro238 vorliegt, im c-CrkII-C3G₁₈-Komplex jedoch *trans*Pro238 energetisch begünstigt ist.

Kommunikation auf molekularer Ebene ist ein bidirektionaler Prozess. Da die Bindung des Liganden in der Lage ist, das *cis/trans* Gleichgewicht im gefalteten Zustand des Proteins nach *trans* zu verschieben, muss die Faltung in Abwesenheit eines Liganden das Gleichgewicht in Richtung *cis*Pro238 verschieben, oder in Anwesenheit niedriger Peptidkonzentrationen in der Lage sein, durch die Ausbildung des geschlossenen Zustandes Peptid von der Bindungsstelle zu verdrängen.

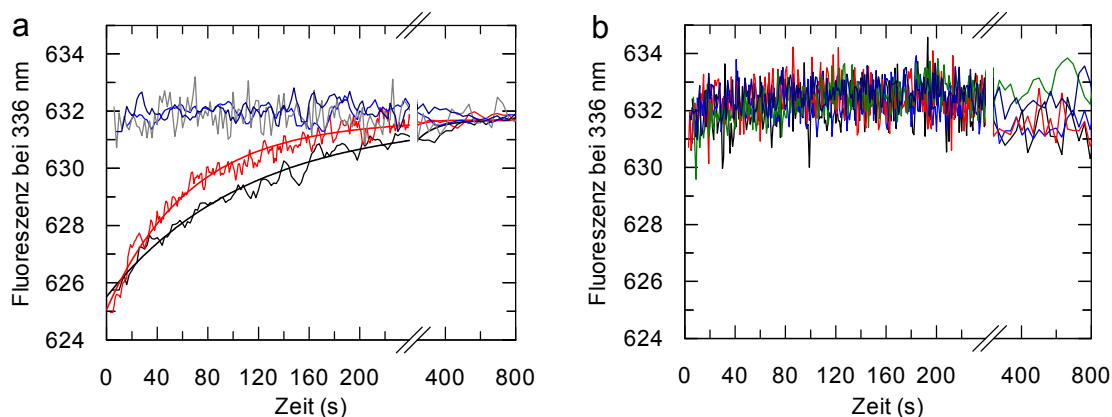


Abbildung 3-10: *cis* → *trans* Gleichgewichtsverschiebung durch Ligandenbindung

Aufgetragen ist die Fluoreszenzänderung von 1 μM Protein nach manueller Mischung mit 4 μM C3G₁₈ in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4 bei 15 °C. Gezeigt sind die Zeitverläufe der langsamen Bindung für (a) HsSH3^N-SH3^C (grau), HsSH3^N-SH3^C I239F V272M (rot), HsSH3^N-SH3^C P238A I239F V272M (blau), GgSH3^N-SH3^C (schwarz), GgSH3^N-SH3^C P238A (dunkelblau) und (b) HsSH3^N-SH3^C I239F (schwarz), HsSH3^N-SH3^C V272M (blau), GgSH3^N-SH3^C F239I (rot), GgSH3^N-SH3^C M272V (grün), GgSH3^N-SH3^C F239I M272V (dunkelblau). Die Anregung erfolgte bei 295 nm, die Emission wurde bei 336 nm aufgezeichnet. Der Kurvenangleich erfolgte durch Exponentialfunktionen.

Bei diesen Überlegungen müssen wieder die unterschiedlichen Dissoziationskonstanten berücksichtigt werden. Im denaturierten Protein liegt das Gleichgewicht *cis* : *trans* Pro bei etwa 1 : 9. Da die konformationelle Faltung der beiden Domänen bei niedrigen GdmCl-Konzentrationen (< 0,5 M) mit einer Rate von mindestens 1 s⁻¹ abläuft, ist die Faltung nahezu vollständig in der Totzeit der manuellen Mischung beendet und es liegen dabei zunächst überwiegend Moleküle mit *trans*Pro238 vor, die das Peptid hochaffin binden, was ebenfalls in der Totzeit der Mischung abläuft. Es sollte dabei jedoch nicht 100 % Komplex gebildet werden, vielmehr sollte nur etwa die Hälfte der Moleküle im Komplex vorliegen. Unter diesen Bedingungen reagiert das System am empfindlichsten auf Gleichgewichtsverschiebungen. Mit zunehmender Rückfaltungsdauer sollten immer mehr Moleküle den geschlossenen Zustand mit *cis*Pro238 einnehmen, da diese Form im nativen Protein begünstigt ist. Durch die Veränderungen der einzelnen Proteinkonzentrationen (*trans* Spezies nimmt ab, *cis* Spezies nimmt zu) und die unterschiedlichen Dissoziationskonstanten der beiden Zustände

sollte die Faltung genug Energie aufbringen können, um einen Teil des Peptides durch *trans*→*cis* Isomerisierung an Pro238 aus dem Komplex zu verdrängen.

Die Bindung des C3G-Peptids und die Rückfaltung führen beide zu einer Erhöhung der Proteinfluoreszenz. Daher wurde für dieses Experiment eine Variante des Peptides verwendet, das am C-Terminus ein zusätzliches Cys trägt, das mit AEDANS markiert wurde, um damit Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) von Trp in SH3^N auf den Dansyl-Rest aufzuzeichnen und so Signalüberlagerungen zwischen Faltung einerseits und Ligandenbindung und -verdrängung andererseits zu reduzieren.

Dieses Verdrängungsexperiment ist in Abbildung 3-11a dargestellt. Wie beschrieben laufen die Faltung und die Bindung in der Totzeit der manuellen Mischung ab. Für isolierte SH3^N wird eine weitere, langsame Bindungsphase beobachtet, die durch nicht-native Prolinismere in SH3^N verursacht wird (vgl. Abbildung 3-3b). In Gegenwart der SH3^C-Domäne (in GgSH3^N-SH3^C) wird diese langsame Bindungsphase durch die Verdrängung des Liganden überkompensiert, was insgesamt zu einer Abnahme des Energietransfers führt. Dieses Verhalten wurde für die P238A Variante nicht beobachtet. Damit wird bestätigt, dass die *trans*Pro238 Spezies die aktive Form bei der Signalweiterleitung ist und ein Faltungsintermediat darstellt. Durch die Isomerisierung zur *cis*Pro238 Spezies wird die native, niedrig-affine Form von c-CrkII populiert und entsprechend Peptid verdrängt.

Mit den beschriebenen Ergebnissen kann ein Mechanismus aufgestellt werden, der die Interaktion von c-CrkII aus dem Huhn mit nachgelagerten Substraten während der Signaltransduktion beschreibt (Abbildung 3-11b). Aus den Assoziationsstudien wurde deutlich, dass GgSH3^N-SH3^C mit C3G₁₈ in zwei schnellen Phasen reagiert. Die langsamere Phase ist dabei abhängig von der *cis*-Konformation der Prolylbindung an Position 238 und kann in der P238A Variante nicht beobachtet werden (Abbildung 3-5d und Abbildung A 1). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass c-CrkII aus dem Huhn durch Domäneninteraktion zwischen SH3^N und SH3^C nicht autoinhibiert wird, sondern vielmehr ein niedrig-affiner Zustand populiert wird, der von der Konformation an Pro238 abhängt. Wegen der unterschiedlichen Affinitäten führt die Assoziation mit Liganden zu einer Gleichgewichtsverschiebung von *cis*Pro238 zu *trans*Pro238 durch eine Prolylisomerisierung im nativen Zustand (Abbildung 3-10a). Dass im nativen Zustand *cis*Pro238 und damit der niedrig affine Zustand bevorzugt ist, wurde durch die Verdrängung des Liganden während der Rückfaltung gezeigt (Abbildung 3-11b). Durch reziproke Mutationsanalysen konnten zwei Reste identifiziert werden, die für die Ausbildung der prolinabhängigen Regulation und

somit für die Kommunikation zwischen Pro238 und der Ligandenbindungsstelle in SH3^N notwendig sind.

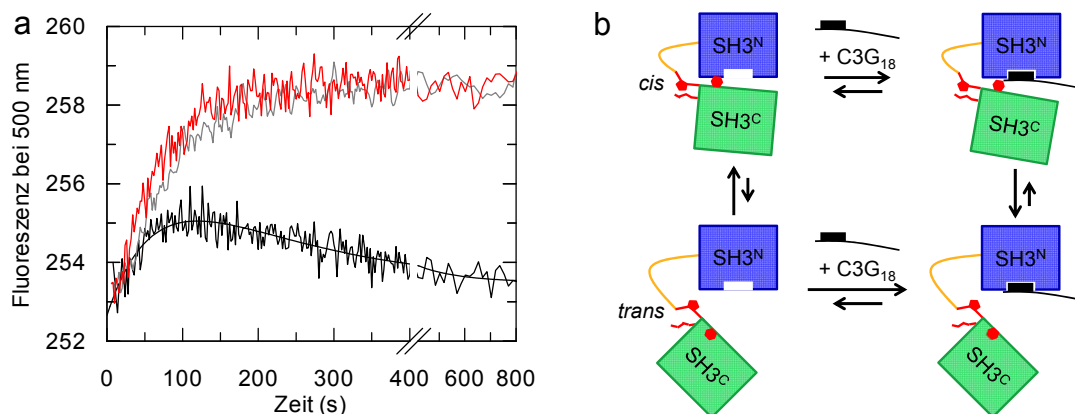


Abbildung 3-11: Verdrängung des Liganden während der Rückfaltung von GgSH3^N-SH3^C

In (a) ist die Bindung von 2 μM AEDANS-markiertem C3G₁₈ an 1 μM GgSH3^N-SH3^C (schwarz), GgSH3^N-SH3^C P238A (rot) und GgSH3^N (grau) während der Rückfaltung in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4, 0,06 M GdmCl bei 15 °C dargestellt. Die Anregung erfolgte bei 280 nm, der Energietransfer von Trp in SH3^N auf AEDANS wurde bei 500 nm aufgezeichnet. (b) zeigt die schematische Darstellung des Bindungsmechanismus für SH3^N-SH3^C aus dem Huhn.

Zusammenfassend folgt die Bindung eines Liganden an GgSH3^N-SH3^C einem Vier-Spezies-Boxmodell (Abbildung 3-11b). Das Modell beschreibt, dass ohne Ligand der Zustand von GgCrkII mit *cis*Pro238 bevorzugt ist. Es können jedoch beide Zustände, mit *cis*Pro238 und *trans*Pro238, mit C3G₁₈ interagieren. Die Affinität wird dabei von der Konformation an Pro238 gesteuert. Die Affinität der *trans*Pro238 Spezies ist höher als die der *cis*Pro238 Spezies, wodurch die Bindung von Interaktionspartnern zu einer Gleichgewichtsverschiebung hin zu *trans*Pro238 führt. Nachdem der Komplex aus c-CrkII und C3G₁₈ wieder aufgelöst ist, bleibt der hoch-affine, bindungskompetente Zustand weiter erhalten. Die Lebensdauer wird dabei durch die langsame Re-Isomerisierung an Pro238 sichergestellt. Somit dient Prolylisomerisierung im nativen Zustand von GgCrkII als molekulare Zeitschaltuhr, die sicherstellt, dass auch nach dem Abbau des Eingangssignals noch für eine definierte Zeit Signaltransduktion stattfindet. Mit diesen Ergebnissen wird ein neuartiger Regulationsmechanismus bei der Signaltransduktion vorgeschlagen, der beschreibt, wie Prolylisomerisierung im nativen Zustand eines Proteins als molekulares Gedächtnis verwendet werden kann.

3.1.2 Isomerspezifischer Kommunikationsweg in SH3^C von c-CrkII

Aufbauend auf die Ergebnisse aus 3.1.1 ergibt sich unmittelbar die Frage, über welchen Weg das Signal, das durch die Konformation der Prolylbindung an Position 238 erzeugt wird, unter Einbeziehung von Met272 zur Ligandenbindungsstelle in SH3^N kommuniziert wird. Um näheres Verständnis über die Signalweiterleitung innerhalb von c-CrkII zu erhalten, wurden systematisch einzelne Aminosäuren gegen Reste mit anderem chemischen Charakter ausgetauscht. Die Affinität gegenüber dem C3G-Peptid sollte dabei als Sonde verwendet werden, um zu überprüfen ob in den einzelnen Varianten noch eine prolinabhängige Regulation besteht. Als Ausgangsprotein wurde das humane SH3^N-SH3^C Protein mit den Substitutionen I239F und V272M (*HsSH3^N-SH3^C_{PS}*) verwendet, in dem durch die beiden Substitutionen ein Prolinschalter etabliert worden war. Damit sollte aufgeklärt werden, warum die beiden Aminosäureaustausche ausreichend sind, um die Proteine der beiden Spezies in einander zu überführen.

3.1.2.1 Die SH3^C-Domäne von c-CrkII als variable Faltungseinheit

Gemäß der Interpretation der NMR-Strukturen beginnt die C-terminale SH3-Domäne von c-CrkII im Bereich um Pro238⁽¹¹⁶⁾. Um die Strukturen von SH3^C aus dem Huhn mit *cis* oder *trans* Pro238 zu lösen, musste die Domäne jedoch um 50 % des vorangehenden Linkers verlängert werden⁽¹¹⁷⁾. Dieser ungewöhnlich lange Linkerbereich von etwa 40 Resten setzt sich aus einem flexiblen, N-terminalen und einem strukturierten, hochkonservierten, C-terminalen Bereich zusammen (Abbildung 1-4). In den bisherigen Experimenten wurde immer die SH3^C-Domäne mit dem gesamten vorangehenden Linker (beginnend an Position 200) als Referenz verwendet. Dabei war auffällig, dass sich SH3^C aus Mensch und Huhn in ihrer Stabilität unterscheiden und dass dieser Unterschied auf die Position nach Pro238 zurückgeführt werden konnte (Abbildung 3-7, Tabelle 3-1). Falls die Stabilisierung von *HsSH3^C* durch Wechselwirkungen mit dem Linker aufgebaut wird, muss dieser Effekt durch Verkürzung des Linkers aufgehoben werden können. Um dies zu überprüfen, wurden zunächst Varianten mit sukzessiv verkürztem Linker vor SH3^C hergestellt. Diese Konstrukte werden jeweils nach der Position im Gesamtprotein benannt, an der sie beginnen (z.B. *Hs222SH3^C* beginnt an Position 222 in der Mitte des Linkers).

Um den Einfluss des Linkerbereichs auf SH3^C aus dem Menschen abzuschätzen, wurden die SH3^C-Domänen mit dem gesamten Linker (*Hs200SH3^C*), dem halben Linker (*Hs222SH3^C*) und SH3^C ohne vorangehenden Linker

(*Hs237SH3^C*) miteinander verglichen. Dafür wurden jeweils die Stabilitäten im Gleichgewicht sowie die Faltungsraten dieser Proteinvarianten bestimmt (Abbildung 3-12).

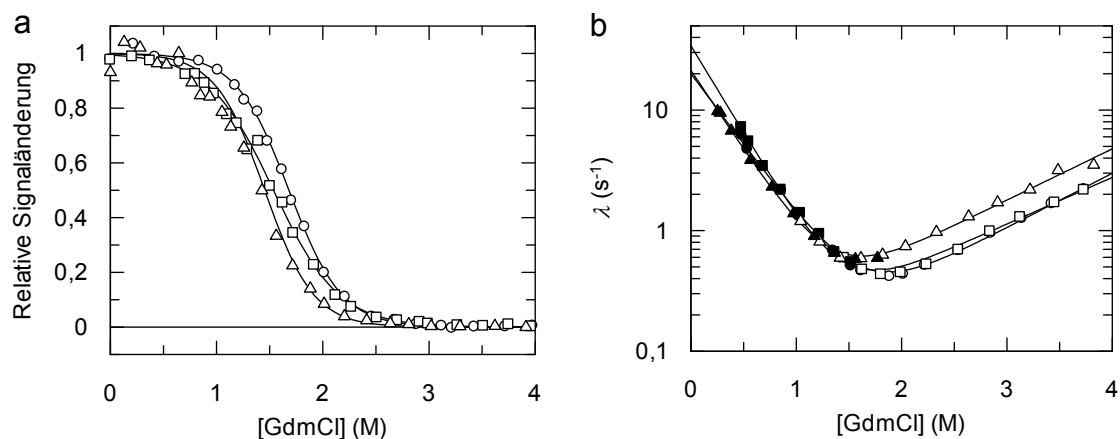


Abbildung 3-12: Einfluss der Linkerlänge auf die humane SH3^C-Domäne

Dargestellt sind (a) die GdmCl-induzierten Gleichgewichtsübergänge von *Hs200SH3^C* (Kreise), *Hs222SH3^C* (Quadrate) und *Hs237SH3^C* (Dreiecke) sowie (b) die jeweiligen Raten der Ent- und Rückfaltungskinetiken (offene bzw. ausgefüllte Symbole). Alle Messungen wurden mit 0,5 μ M Protein in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4, 0 – 4 M GdmCl bei 15 °C durchgeführt. Fluoreszenz wurde bei 330 nm (Gleichgewichtsübergang) oder oberhalb von 320 nm (Faltungskinetiken) nach Anregung bei 280 nm ausgelesen. Die Auswertung erfolgte jeweils nach einem Zwei-Zustands-Modell. Die erhaltenen Parameter sind in Tabelle 3-3 und Tabelle A 3 zusammengefasst.

Abbildung 3-12a zeigt, dass die Stabilität von *HsSH3^C* von der Länge des vorangehenden Linkers abhängt und zunimmt, je mehr Reste des Linkerbereichs vorhanden sind. Dabei scheint besonders der konservierte C-terminale Bereich des Linkers (von Position 222 bis 237) wichtig für die Stabilisierung zu sein. Zudem liegen die Effekte auf die Kinetik vollständig auf der Entfaltungsseite des Proteins (Abbildung 3-12b), was bedeutet, dass die Stabilität von SH3^C durch verlangsamte Entfaltung erhöht wird, wenn der halbe oder der gesamte Linker vorhanden ist.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden weitere SH3^C-Konstrukte hergestellt, um den Linkerbereich, der notwendig für die Stabilisierung der Domäne ist, genauer einzugrenzen (Abbildung 3-13 und Abbildung A 3). Dafür wurde der Linker zunächst noch weiter verkürzt. Alle Proteine wurden als SUMO-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und nach einer Ni-NTA Chromatographie wurde der SUMO-Tag abgespalten. Die SUMO-Protease Senp2 spaltet nicht vor Pro, deshalb wurde in der Variante *Hs238SH3^C* das Pro238 gegen Ala ausgetauscht und das entsprechende Protein *Hs238SH3^C* P238A analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Verkürzung um die Aminosäure Gly237 keinen Einfluss auf die Stabilität der Domäne hatte (Abbildung 3-13a). Fehlt jedoch die Aminosäure 238

(Hs239SH3^C), so ist die Rückfaltung des Proteins verlangsamt, das gesamte Protein somit destabilisiert.

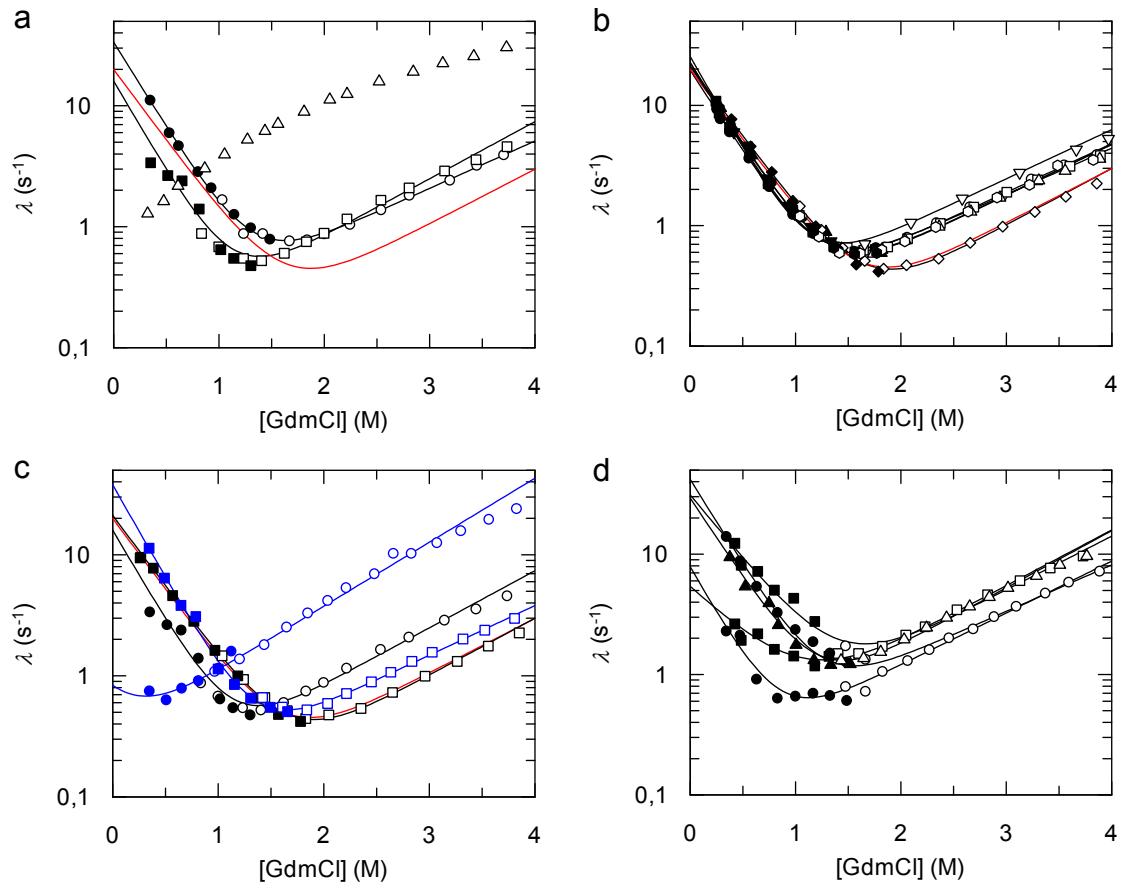


Abbildung 3-13: Analyse der Interaktion zwischen SH3^C und dem vorangehenden Linker

Dargestellt sind die Raten der Ent- (offene Symbole) und Rückfaltung (ausgefüllte Symbole) für (a) Hs238SH3^C (Kreise), Hs239SH3^C (Quadrate), Hs240SH3^C (Dreiecke), (b) Daten aus der Bachelorarbeit von Tatjana Theer für die Varianten Hs237SH3^C (Sechsecke), Hs236SH3^C (Kreise), Hs235SH3^C (Quadrate), Hs234SH3^C (Dreiecke), Hs233SH3^C (umgekehrte Dreiecke), Hs229SH3^C (Raute), (c) Hs239SH3^C (schwarze Kreise), Hs239SH3^C I239G (blaue Kreise), Hs229SH3^C (schwarze Quadrate), Hs229SH3^C P230A P232A (blaue Quadrate), (d) Gg200SH3^C (Kreise), Gg233SH3^C (Quadrate), Gg237SH3^C (Dreiecke). Das Chevron für Hs200SH3^C ist in (a) – (c) als rote Linie mit eingezeichnet. Alle Kinetiken wurden mit 0,5 µM Protein in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4, 0 – 4 M GdmCl bei 15 °C mindestens siebenmal gemessen, gemittelt und durch Exponentialfunktionen ausgewertet. Die Chevron-Analyse wurde nach einem Zwei-Zustands-Modell durchgeführt (Tabelle A 3).

Interessant dabei ist, dass das Fehlen der Aminosäure an Position 238 die Rückfaltungsreaktion verlangsamt. Im Gegensatz dazu führten alle Substitutionen oder Verkürzungen im Linkerbereich (200 – 237), wenn überhaupt, zu einer veränderten Entfaltungsrate. Es wird damit bestätigt, dass die Position 238 nicht nur eine Schlüsselposition für die Regulation der Bindungsaffinität von c-CrkII ist, sondern dass Position 238 auch für die Stabilität der C-terminalen SH3-

Domäne wichtig ist, die wiederum regulatorisch auf das Gesamtprotein c-CrkII wirkt.

Wird auch Ile239 deletiert (*Hs240SH3^C*), ist die SH3^C- Domäne extrem destabilisiert und die Entfaltung etwa zehnfach beschleunigt. Rückfaltungskinetiken können für dieses Protein nicht aufgezeichnet werden (Abbildung 3-13a) und eine Abschätzung der Signaländerung im Gleichgewicht zeigt, dass *Hs240SH3^C* bereits bei 15 °C und 0 M GdmCl zu etwa 70 % entfaltet vorliegt (Abbildung A 3a). Interaktionen der Aminosäure nach Pro238 scheinen also von essentieller Bedeutung für die Stabilität von SH3^C zu sein.

Tabelle 3-3: Stabilitätsparameter aus den GdmCl-induzierten Entfaltungsübergängen

Variante von SH3 ^C		[GdmCl] _M (M)	<i>m</i> (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	Δ <i>G</i> ^{15 °C} (kJ mol ⁻¹)
Homo sapiens	200	1,68	9,63	16,2
	222	1,57	8,23	12,9
	229*	1,67	9,33	15,5
	229 P230A P232A	1,57	10,3	16,2
	233	1,36	9,70	13,1
	234*	1,33	8,51	11,3
	235*	1,27	11,1	14,2
	236*	1,33	8,81	11,7
	237*	1,45	10,4	15,1
	238 P238A	1,47	8,13	11,9
	239	1,00	8,54	8,54
	239 I239G	0,71	10,9	7,75
	240	-	-	-
Gallus gallus	200	1,49	10,5	15,6
	233	1,30	10,3	13,4
	237	1,27	10,6	13,5

Tabelle 3-3 fasst die thermodynamischen Parameter der untersuchten SH3^C Varianten mit unterschiedlicher Linkerlänge zusammen. Die Spezies, die jeweilige Proteinvariante, der Kooperativitätsparameter *m*, die freie Enthalpie der Entfaltung bei 15 °C, Δ*G*^{15 °C} und die GdmCl-Konzentration am Übergangsmittelpunkt [GdmCl]_M gemäß der Auswertung nach einem Zwei-Zustands-Modell (Gleichung 4) sind angegeben. Die entsprechenden Messdaten sind in Abbildung 3-12 und Abbildung A 3 dargestellt. Varianten, die mit (*) gekennzeichnet sind, wurden von Tatjana Theer im Rahmen ihrer Bachelorarbeit untersucht, die von mir betreut wurde.

Wird die SH3^C-Domäne ausgehend von der Variante *Hs238SH3^C* schrittweise um einzelne Aminosäuren verlängert (bis Position 233, Abbildung 3-13b), so wird dadurch die Stabilität nicht weiter erhöht (Bachelorarbeit von T. Theer). Betrachtet man jedoch die Variante *Hs229SH3^C*, so erhält man die maximale

Stabilisierung, wie sie für *Hs200SH3^C* mit dem gesamten Linkerbereich beobachtet wurde (Abbildung 3-13b und Tabelle 3-3).

Die Position 239 ist nicht nur für die Regulation, sondern auch für die Stabilität von *SH3^C* von großer Bedeutung und *Hs239SH3^C* definiert die kleinste, stabile Faltungseinheit dieser Domäne. Eine Verlängerung in den N-terminalen Linker hinein führt bis zur Aminosäure 229 jedoch zu einer weiteren Stabilisierung von *SH3^C*.

Bei der Analyse der Faltung von *SH3^C* war schon beobachtet worden, dass Ile und Phe an Position 239 unterschiedliche Auswirkungen auf die Entfaltung der Domäne haben (3.1.1.2). Nach Verkürzung des Linkers bis an diese Position war die Rückfaltung verlangsamt und *SH3^C* destabilisiert. Um zu überprüfen, ob die Seitenkette der Aminosäure an Position 239 oder nur das Peptidrückgrat für eine stabile Faltung notwendig ist, wurde die Variante *239SH3^C I239G* untersucht, bei der nur das Peptidrückgrat Interaktionen mit der Domäne etablieren kann (Abbildung 3-13c). Die Variante *Hs239SH3^C I239G* ist deutlich destabilisiert relativ zu *Hs239SH3^C*, fast so stark wie *Hs240SH3^C* (Abbildung 3-13a und c). Wie bei *Hs240SH3^C* ist auch bei *Hs239SH3^C I239G* die Entfaltung fast zehnfach beschleunigt, wodurch der Übergangsmittelpunkt um etwa 0,5 M GdmCl verschoben wird (Tabelle A 3). Aus dieser Beobachtung kann gefolgert werden, dass die Seitenkette an Position 239 extrem wichtig für die korrekte Faltung der gesamten Domäne ist.

Die *SH3^C* Domäne von c-CrkII weist keine Sequenzhomologie zu anderen *SH3*-Domänen auf und wird nur auf Grund ihrer Faltung als *SH3*-Domäne klassifiziert. Generell binden *SH3*-Domänen polyPro-Motive. Bislang sind jedoch keine Bindungspartner für *SH3^C* aus c-CrkII bekannt. Bei den Verkürzungen des Linkers wurde beobachtet, dass *Hs229SH3^C* bereits die maximale Stabilisierung durch den vorangehenden Linker erfährt. Die Sequenz beginnend an Position 229 bis 238 ist TPLPNLQNGP. Die Reste 230-232 bilden dabei ein typisches PXP-Motiv mit dem *SH3*-Domänen interagieren können. Ob dieses PXP-Motiv mit der atypischen *SH3*-Domäne aus c-CrkII wechselwirkt und dadurch die gesamte Domäne stabilisiert wird, wurde untersucht, indem die beiden Proline gegen Alanine ausgetauscht wurden (*Hs229SH3^C P230A P232A*, *Hs229SH3^C PAPA*). In der Tat kann für diese Variante eine leichte Destabilisierung der Domäne beobachtet werden. Die Entfaltung von *Hs229SH3^C PAPA* verläuft schneller als bei *Hs229SH3^C*, ist jedoch langsamer als bei *Hs233SH3^C*, einer Variante bei der das PXP-Motiv komplett fehlt. Da die beobachteten Effekte nur schwach ausgeprägt sind, ist anzunehmen, dass das PXP-Motiv von 230-232 mit dem globulären Teil von *SH3^C* interagiert, dass diese Wechselwirkung aber

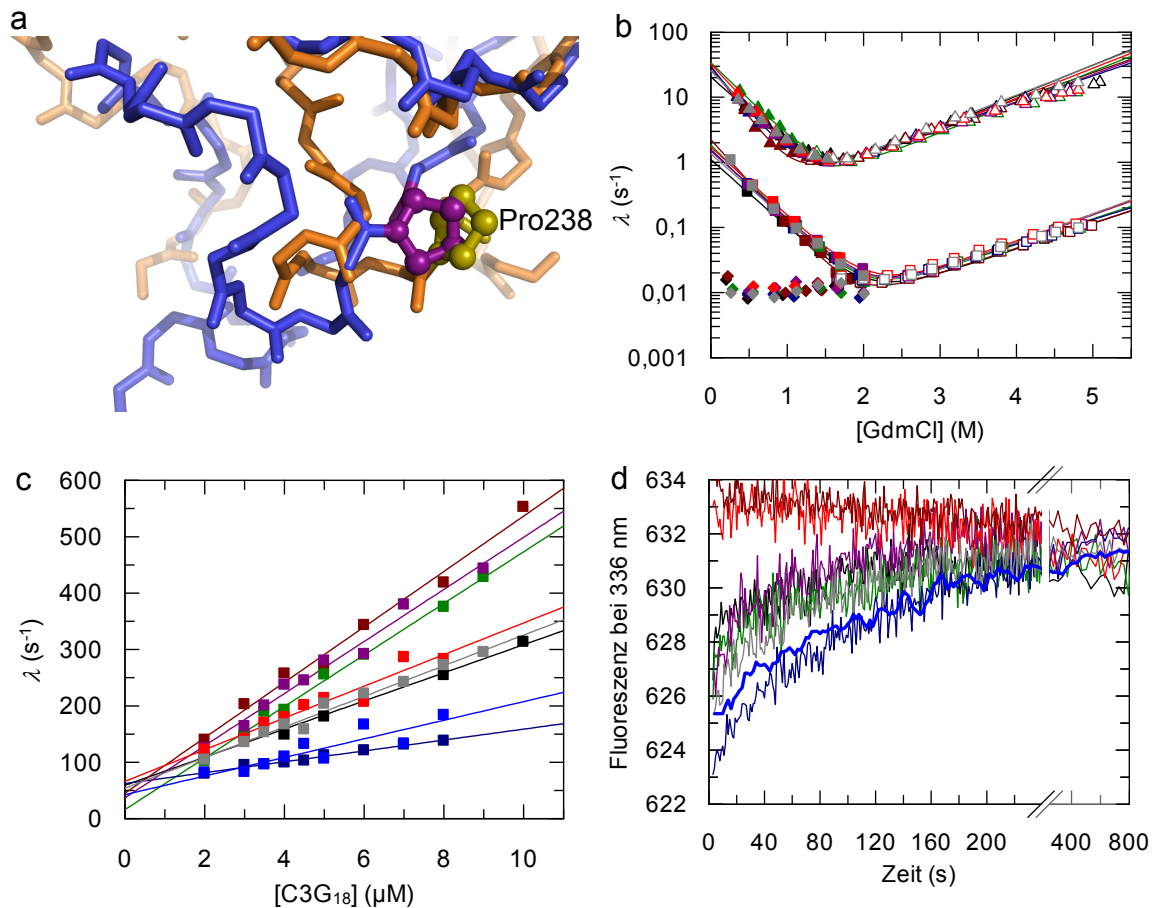
nicht alleine für die beobachtete Stabilisierung von SH3^C durch den Linkerbereich von Position 229 bis Position 237 verantwortlich ist.

Die bisherigen Analysen zum Einfluss der Linkerlänge auf die Stabilität von SH3^C wurden mit Varianten des humanen Proteins durchgeführt. Um zu untersuchen, ob die Befunde auch für das Protein aus dem Huhn gelten, dessen SH3^C-Domäne durch Phe an Position 239 *per se* instabiler ist (Tabelle 3-1), wurden auch von diesem Protein einige Schlüsselvarianten hergestellt und analysiert (Abbildung 3-13d). Hier zeigt sich ebenfalls, dass Gg200SH3^C die stabilste Faltungseinheit ist. Die Stabilisierung ist jedoch nicht so deutlich wie für das humane Protein und Gg200SH3^C entfaltet etwa viermal schneller als das entsprechende Protein aus dem Menschen. Ein weiterer Unterschied zwischen den Proteinen der beiden Spezies liegt in der zweiphasigen Rückfaltung des Proteins aus dem Huhn. Diese Beobachtung wurde auch für die verkürzte Variante Gg233SH3^C gemacht, wobei sich die Kooperativität der Rückfaltung der *cis*Pro238 Spezies veränderte (Abbildung 3-13d). Wird der Linker komplett entfernt (Gg237SH3^C), so kann nur noch eine Rückfaltungsphase aufgezeichnet werden, die der *trans*Pro238 Spezies entspricht (vgl. Abbildung 3-3d und Tabelle A 1). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass neben Phe239 und Met272 auch die Reste direkt vor Pro238 (233-237) wichtig sind für die Kommunikation der beiden SH3-Domänen und damit für die Regulation von c-CrkII aus dem Huhn durch Prolylisomerisierung im nativen Zustand des Proteins.

Desweiteren zeigen die Ergebnisse einen weiteren Unterschied zwischen den c-CrkII Proteinen der beiden Spezies Mensch und Huhn auf. Zum einen wird SH3^C stabilisiert, wenn Ile auf Pro238 folgt (wie im humanen Protein), zum anderen hat der vorangehende Linker, der die beiden SH3-Domänen miteinander verbindet, auf die humane SH3^C-Domäne einen deutlich größeren Einfluss (Abbildung A 3d). Vermutlich interagieren die Proteine aus Mensch und Huhn unterschiedlich mit dem Linker, weshalb die Regulation unter Berücksichtigung des Linkerbereichs unterschiedlich ist.

3.1.2.2 Kommunikation des Linkers mit der SH3^C-Domäne

Für die Weiterleitung des isomeren Zustands von Pro238 in SH3^C an die Ligandenbindestelle in SH3^N sind die Reste Phe239 und Met272 essentiell wichtig. Um die Frage zu beantworten, wie die *cis/trans* Konformation der Gly237-Pro238 Bindung in den Linker weitergeleitet wird, wurden ausgehend von dem humanen Protein HsSH3^N-SH3^C I239F V272M (HsSH3^N-SH3^C_{PS}) zunächst einzelne Reste im Linkerbereich vor Pro238 ausgetauscht und die Proteinvarianten auf ihre Fähigkeit Liganden zu binden untersucht (Abbildung 3-14).


 Abbildung 3-14: *cis/trans* Pro238 abhängige Strukturierung des Linkerbereichs

Die Überlagerung der NMR-Strukturen (a) von *GgSH3^C* mit *cis*Pro238 (bronze, PDB: 2L3P⁽¹¹⁷⁾) und *trans*Pro238 (blau, PDB: 2L3Q⁽¹¹⁷⁾) wurde mit PyMol erstellt⁽¹⁴⁴⁾. Pro238 ist farblich hervorgehoben. Die Raten der Ent- (offene Symbole) und Rückfaltung (ausgefüllte Symbole) der untersuchten Varianten sind in (b) dargestellt. Die Faltung von SH3^C (Dreiecke) wurde durch *stopped-flow* Messungen untersucht (Anregung 280 nm, Emission oberhalb von 320 nm), die Faltung von SH3^N durch manuelle Mischung (Anregung 280 nm, Emission 330 nm). Gemessen wurde mit je 0,5 μM Protein in der Messzelle. Die Raten der Assoziation der Proteinvarianten mit C3G₁₈ sind in (c) aufgetragen. 0,5 μM Protein wurden mit zunehmenden Konzentrationen an C3G₁₈ gemischt (*stopped-flow*, Anregung 295 nm, Emission oberhalb von 320 nm). Mindestens sechs Einzelkinetiken wurden gemittelt und durch Angleich von Exponentialfunktionen ausgewertet. Die prolinabhängige Bindungsphase für die einzelnen Varianten ist in (d) dargestellt. Gemessen wurde mit 1 μM Protein und 4 μM C3G₁₈ (Anregung 295 nm, Emission 336 nm). Die Messungen wurden bei 15 °C durchgeführt. Alle Variationen wurden in das Protein *HsSH3^N-SH3^C_{PS}* (I239F V272M) eingeführt mit den Farben: N233A (schwarz), L234A (braun), Q235A (grün), N236A (blau), G237A (violett), PEP217AAA (rot), PLP230AAA (grau). *HsSH3^N-SH3^C_{PS}* ist als Referenz in hellblau gezeigt. Die ermittelten Parameter aus den Faltungs- und Bindungsstudien sind in Tabelle A 4 und Tabelle 3-4 zusammengefasst.

Um auszuschließen, dass die eingebrachten Aminosäurevariationen das Protein an sich destabilisieren, wurden zunächst die Faltungskinetiken gemessen, die es ermöglichen Faltung und Stabilität beider SH3-Domänen in dem Zweidomänenkonstrukt separat zu analysieren (Abbildung 3-14b).

Es zeigt sich, dass keiner der Austausche in dem hier analysierten Sequenzbereich vor Pro238 die Stabilität und die Faltung von SH3^C beeinflusst. Gleiches gilt, wie erwartet, für die SH3^N-Domäne. Wie aus den NMR-Analysen ersichtlich ist, wird der Bereich vor Pro238 (232-237) in seiner Struktur stark von der Konformation der Prolylbindung an Position 238 beeinflusst (Abbildung 3-14a). Inwiefern diese strukturellen Veränderungen für die Regulation durch Prolyliso-merisierung wichtig sind, sollte durch die Bindung von C3G₁₈ an die HsSH3^N-SH3^C_{PS} Varianten untersucht werden (Abbildung 3-14c). N236A ist die einzige Substitution, die die Kinetik der Bindung von C3G₁₈ an SH3^N nicht beeinflusst (Abbildung 3-14c). Sie ist genauso langsam wie die Bindung an das Referenzprotein. Alle anderen Aminosäureaustausche im Linkerbereich führen zu einer Beschleunigung der Assoziation. Am stärksten ausgeprägt ist der Effekt für die Varianten L234A und Q235A. Für diese beiden Proteine ergeben sich k_{off}/k_{on} -Werte $< 1 \mu\text{M}$, was andeutet, dass die Kommunikation gestört und die Affinität gegenüber Liganden erhöht ist (Tabelle 3-4). In allen anderen Varianten ist die Bindungsreaktion in unterschiedlichem Ausmaß beschleunigt, was darauf hindeutet, dass auch in diesen Proteinen die Domäneninteraktion beeinträchtigt ist (Abbildung 3-14c und Tabelle 3-4).

Substitutionsbedingte Störungen in der Domänenkommunikation wurden auch mit Hilfe der prolinabhängigen Bindung von C3G₁₈ nach manueller Mischung analysiert (Abbildung 3-14d). Wie schon ausgeführt, führt die bevorzugte Bindung von C3G₁₈ an die offene Form mit *trans*Pro238 zu einer Verschiebung des *cis/trans* Gleichgewichts hin zu *trans* und damit zu einer zusätzlichen, langsamen Bindungsphase (vgl. 3.1.1.3). Falls die Kommunikation zwischen SH3^N und SH3^C in den Varianten unterbrochen ist, sollte diese langsame Phase nicht mehr auftreten. Auch bei diesem Versuch zeigt die Variante HsSH3^N-SH3^C_{PS} N236A die größte Amplitude, die sogar etwas stärker ausgeprägt ist, als bei dem Ausgangsprotein (Abbildung 3-14d). Dies bestätigt, dass Asn236 für die Signalweiterleitung unwichtig ist. Für zwei Varianten (HsSH3^N-SH3^C_{PS} PEP217AAA und HsSH3^N-SH3^C_{PS} L234A) konnte die prolinlimitierte Bindungsreaktion nicht mehr detektiert werden. Die Kommunikation zwischen den beiden SH3-Domänen ist durch diese Sequenzvariationen offenbar vollständig aufgehoben. Diese Beobachtungen sind interessant, da das Motiv Pro217-Glu218-Pro219 in der Mitte des Linkerbereichs liegt und gemäß der Analysen zum Einfluss der Linkerlänge (vgl. 3.1.2.2) keine Interaktionen mit SH3^C ausbildet. Für Leu234 zeigen die NMR-Strukturen, dass die Seitenkette direkt mit *cis*Pro238 interagiert (Abbildung 3-15a und b). Diese Interaktion wird durch die veränderten sterischen Ansprüche der *trans*Pro238 Bindung verhindert (Abbildung 3-15a).

Tabelle 3-4: Parameter der Bindungsreaktionen der HsSH3^N-SH3^C_{PS} Varianten

Proteinvariante		k_{on} ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	k_{off}/k_{on} (μM)
HsSH3 ^N -SH3 ^C _{PS}	HsSH3 ^N -SH3 ^C _{PS}	12 ± 1	39 ± 4	3,31
	PEP217AAA	28 ± 3	66 ± 14	2,36
	PLP230AAA	27 ± 1	54 ± 7	2,00
	N233A	25 ± 1	59 ± 7	2,36
	L234A	49 ± 2	45 ± 15	0,92
	Q235A	46 ± 1	16 ± 7	0,35
	N236A	10 ± 1	62 ± 2	6,20
	G237A	46 ± 2	37 ± 13	0,80
	V267G	39 ± 2	35 ± 9	0,90
	T268G	48 ± 4	25 ± 10	0,52
	K269A	37 ± 3	56 ± 16	1,51
	I270G	47 ± 2	18 ± 11	0,38
	N271A	44 ± 2	16 ± 8	0,36
	S273G	43 ± 2	24 ± 12	0,56
	Q275A	23 ± 2	79 ± 11	3,43
	Q297E	50 ± 4	31 ± 16	0,62

Tabelle 3-4 fasst die Ergebnisse aus den Assoziationsstudien zu den HsSH3^N-SH3^C_{PS} Varianten mit C3G₁₈ zusammen. Die Werte für k_{on} und k_{off} sowie der resultierende Quotient k_{off}/k_{on} sind angegeben. Auswertung erfolgte durch lineare Regression der apparenten Raten als Funktion der Peptidkonzentration (Abbildung 3-14 und Abbildung 3-16). Fehlerangaben entsprechen der Standardabweichung der Regression. Alle Ergebnisse wurden in unabhängigen Experimenten reproduziert.

Alle weiteren Varianten in dem konservierten Linkerbereich zeigen eine prolinlimitierte Bindungsphase (Abbildung 3-14d), die minimal schwächer ausgeprägt ist, als bei dem Ausgangsprotein. Dies bedeutet, dass die Kommunikation zwischen SH3^N und SH3^C in den Varianten abgeschwächt aber noch möglich ist. Die Seitenketten dieser Positionen modulieren also das Ausmaß der regulatorischen Domäneninteraktion von GgCrkII.

Der Vergleich der NMR-Strukturen von GgSH3^C mit *cis* oder *trans*Pro238 zeigt deutlich, dass der Bereich vor Pro238 abhängig von der Konformation der Prolylbindung an 238 unterschiedlich mit der SH3^C-Domäne interagiert (Abbildung 3-15c und d). Besonders auffällig ist dabei, dass das Motiv Pro230-Leu231-Pro232 mit *cis*Pro238 Interaktionen zu Trp276 ausbildet (Abbildung 3-15d). Diese Orientierung ist sehr ähnlich zur Bindung von PXP-Motiven an SH3-Domänen. Mit *trans*Pro238 sind diese Wechselwirkungen vollständig aufgehoben (Abbildung 3-15c). Die NMR-Strukturen (Abbildung 3-15) unterstützen somit die Funktionsdaten (Abbildung 3-14c und d), dass der Linkerbereich

unmittelbar vor Pro238 wichtig ist für das Ausmaß der *cis/trans* Gleichgewichtsverschiebung.

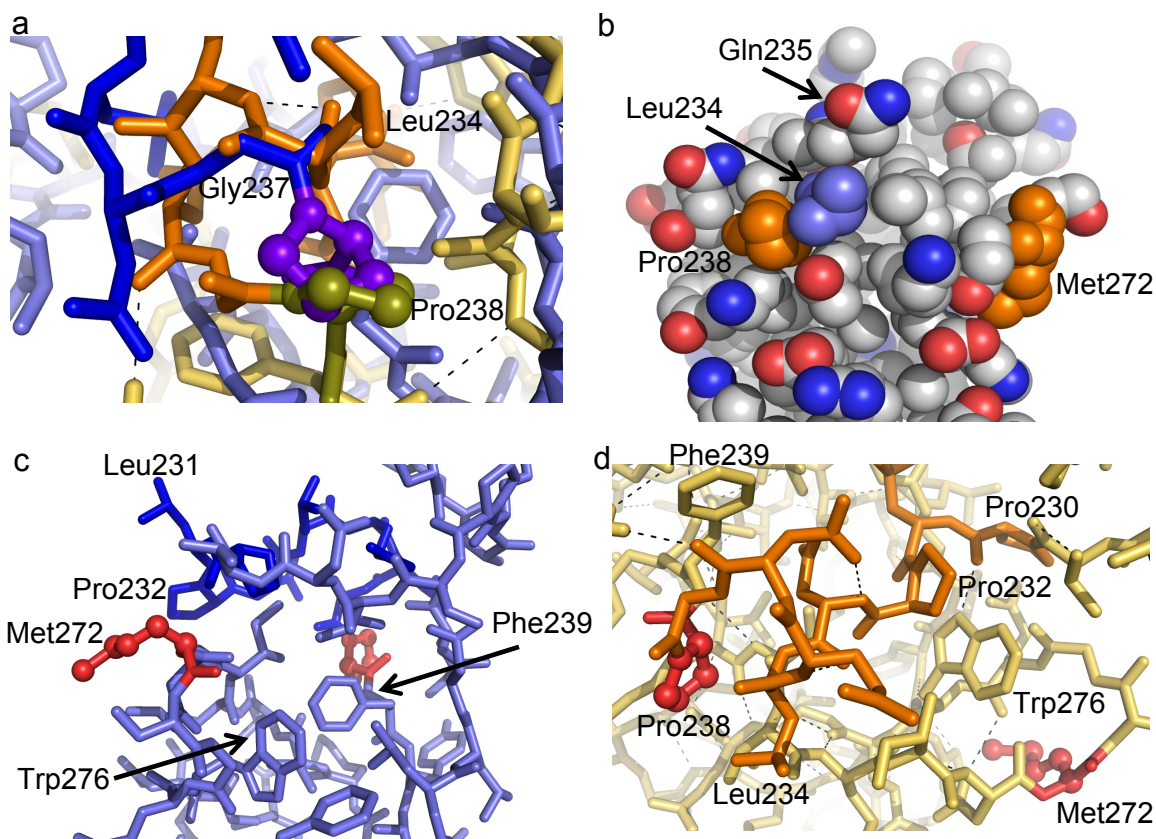


Abbildung 3-15: *cis/trans* Pro238 abhängige Struktur des Linkers

Dargestellt sind die Strukturen von GgSH3^C mit *trans*Pro238 (PDB: 2L3Q⁽¹¹⁷⁾) und *cis*Pro238 (PDB: 2L3P⁽¹¹⁷⁾). Die Überlagerung der beiden Strukturen in (a) zeigt den Zusammenstoß von Leu234 (*cis*Pro238, oliv/ orange) mit Gly237 (*trans*Pro238, violett/ blau). In (b) ist das Kalottenmodell von GgSH3^C mit *cis*Pro238 gezeigt. Veränderungen der Orientierung des Linkers sind in (c) für *trans*Pro238 und (d) für *cis*Pro238 dargestellt. Die variierten Reste sind dunkler gefärbt, Pro238 und Met272 sind rot hervorgehoben. Die Abbildungen wurden mit dem Programm PyMol erstellt⁽¹⁴⁴⁾.

3.1.2.3 Die strukturelle Beziehung zwischen Pro238 und Met272

Met272 befindet sich an der lösungsmittlexponierten Spitze eines *loops* und ist zusammen mit Phe239 notwendig für die Regulation von GgCrkII durch Prolylisomerisierung. Um den Zusammenhang dieser beiden Reste auf molekularer Ebene aufzuklären, wurden Varianten von HsSH3^N-SH3^C_{PS} hergestellt und analysiert, die Aminosäureaustausche vor und nach Met272 tragen (Abbildung 3-16).

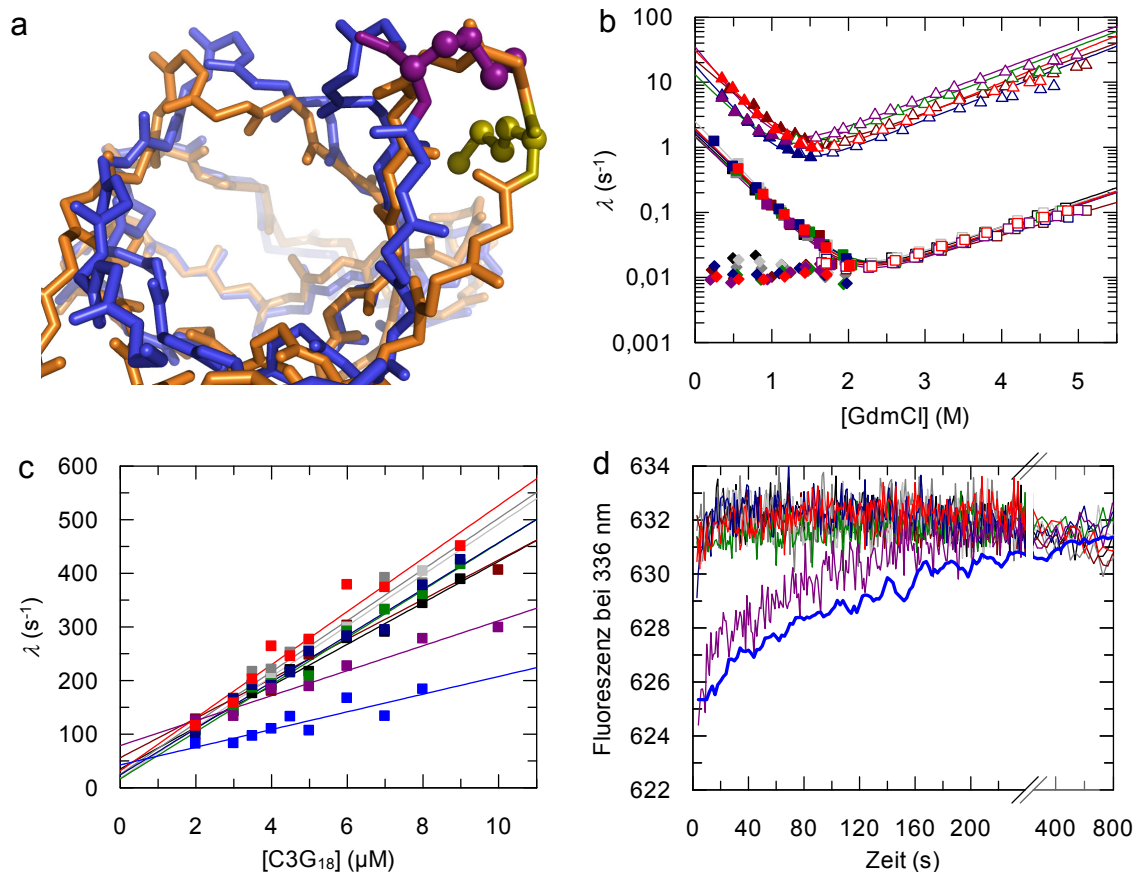


Abbildung 3-16: *cis/trans* Pro238 abhängige Signalweiterleitung entlang eines β -Stranges in SH3^C

Die Überlagerung der NMR-Strukturen von (a) GgSH3^C mit *cis* (bronze, PDB: 2L3P⁽¹¹⁷⁾) und *trans* (blau, PDB: 2L3Q⁽¹¹⁷⁾) Pro238 wurde mit PyMol erstellt⁽¹⁴⁴⁾. Met272 ist farblich hervorgehoben. Die Raten der Ent- (offene Symbole) und Rückfaltung (ausgefüllte Symbole) der untersuchten Varianten sind in (b) dargestellt. Die Faltung von SH3^C (Dreiecke) wurde durch *stopped-flow* Messungen untersucht (Anregung 280 nm, Emission oberhalb von 320 nm), die Faltung von SH3^N durch manuelle Mischung (Anregung 280 nm, Emission 330 nm). Gemessen wurde mit je 0,5 μM Protein in der Messzelle. Die Raten der Assoziation der Proteinvarianten mit C3G₁₈ sind in (c) aufgetragen. 0,5 μM Protein wurde mit zunehmenden Konzentrationen an C3G₁₈ gemischt (*stopped-flow*, Anregung 295 nm, Emission oberhalb von 320 nm). Mindestens sechs Einzelkinetiken wurden gemittelt und durch Angleich von Exponentialfunktionen ausgewertet. Die prolinabhängige Bindungsphase für die einzelnen Varianten ist in (d) dargestellt. Gemessen wurde mit 1 μM Protein und 4 μM C3G₁₈ (Anregung 295 nm, Emission 336 nm). Alle Variationen wurden in das Protein HsSH3^N-SH3^C_{PS} (I239F V272M) eingeführt mit den Farben: V267G (schwarz), T268G (grau), K269A (braun), I270G (silber), N271A (grün), S273G (blau), Q275A (violett), Q297E (rot). HsSH3^N-SH3^C_{PS} ist als Referenz in hellblau gezeigt. Die ermittelten Parameter aus den Faltungs- und Bindungsstudien sind in Tabelle A 5 und Tabelle 3-4 zusammengefasst.

Die Varianten V267G, T268G und I270G (in HsSH3^N-SH3^C_{PS}) konnten als lösliche Proteine gereinigt werden, zeigten jedoch keine Ent- und Rückfaltungskinetiken für SH3^C (Abbildung 3-16b und Tabelle A 5), da die Domäne durch die Aminosäureaustausche offenbar stark destabilisiert wird. In den anderen

Varianten mit Sequenzvariationen vor und nach Met272 zeigten die SH3^C-Domänen Faltungsreaktionen ähnlich zu dem Ausgangsprotein. Die Stabilität und die Faltung von SH3^N wurden von den Austausch in SH3^C nicht beeinflusst (Abbildung 3-16b und Tabelle A 5).

Bei der Bindung von C3G₁₈ zeigten alle Proteine schnellere Assoziationsreaktionen als HsSH3^N-SH3^C_{PS} (Abbildung 3-16c und Tabelle 3-4). Die langsamste Bindungsreaktion wurde für HsSH3^N-SH3^C_{PS} Q275A beobachtet, die anderen Varianten zeigten Assoziationsraten ähnlich zu den Wildtypproteinen mit der P238A Substitution (vgl. Tabelle 3-2). Entsprechend zu den Varianten im Linkerbereich vor Pro238 wurde auch für die Varianten vor und nach Met272 die prolinlimitierte Bindung, die der *cis/trans* Gleichgewichtsverschiebung entspricht, aufgezeichnet (Abbildung 3-16d). Nur für HsSH3^N-SH3^C_{PS} Q275A konnte dabei eine Kinetik aufgezeichnet werden, die der Pro238-abhängigen Bindung entspricht (Abbildung 3-16d). In allen anderen Varianten blieb das Fluoreszenzsignal über 800 s konstant. Für die Varianten V267G, T268G und I270G kann dieses Verhalten durch die starke Destabilisierung von SH3^C erklärt werden. Für alle anderen untersuchten Proteine, die stabil gefaltet waren, bedeutet das Fehlen der prolinlimitierten Bindungsphase, dass die Kommunikation zwischen den beiden SH3-Domänen durch die Aminosäureaustausche aufgehoben wurde. Diese Ergebnisse zeigen insbesondere die Wichtigkeit der Reste vor Met272.

In 3.1.2.2 wurde gezeigt, dass der Linkerbereich vor Pro238 abhängig von der Konformation dieser Prolylbindung unterschiedlich mit SH3^C wechselwirkt (Abbildung 3-15). Diese Umlagerungen betreffen auch den Faltblattstrang, der zu Met272 führt und in räumlicher Nähe zu Pro238 beginnt (Abbildung 3-17).

Mit *trans*Pro238 ist der Bereich von 268-271 weniger in die Domänenfaltung eingeschlossen. Der direkte Vergleich der Strukturen mit *trans* und *cis*Pro238 (Abbildung 3-17) zeigt deutlich, dass die Reste Thr268, Lys269 und Asn271 mit *cis*Pro238 (Abbildung 3-17b) deutlich stärker in das H-Brückennetzwerk zweier benachbarter β-Stränge involviert sind als mit *trans*Pro238 (Abbildung 3-17a). Für Asn271 zeigen die Strukturen, dass mit *trans*Pro238 (Abbildung 3-17a) vor allem H-Brücken zu dem Peptidrückgrat der Reste nach Met272 ausgebildet werden. Vermutlich wird die Schleifenstruktur zwischen den zwei β-Strängen dadurch besser geordnet und Met272 stärker an der Oberfläche exponiert. Mit *cis*Pro238 sind die Reste 268, 269 und 271 stärker mit dem folgenden β-Strang verbrückt. Met272 wird dadurch von der Spitze der Schleifenstruktur (mit *trans*Pro238, Abbildung 3-17a) relativ gesehen um eine Position verschoben (an den Anfang der Schleife, Abbildung 3-17b), wodurch auch die Anordnung der Seitenkette verändert wird. Mit *cis*Pro238 ist Met272 somit stärker zur globulären Faltung von SH3^C hin orientiert.

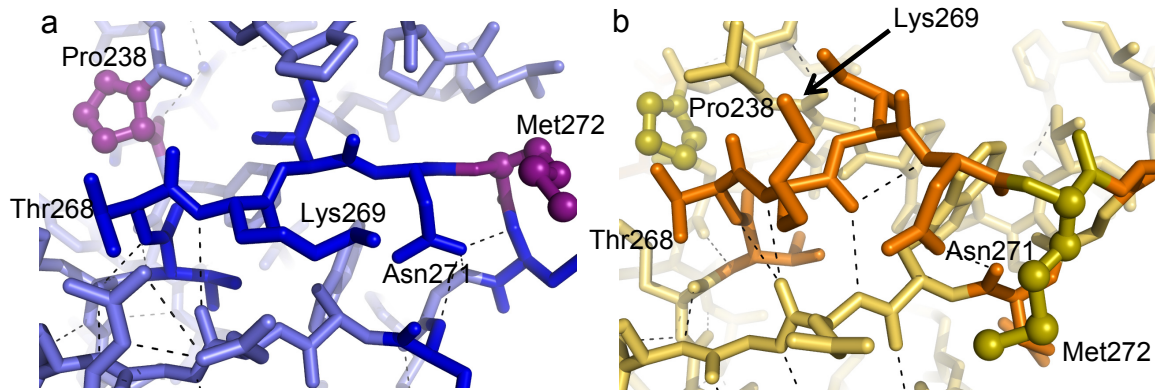


Abbildung 3-17: *cis/trans* Pro238 abhängige strukturelle Umlagerungen innerhalb von GgSH3^C

Dargestellt sind Ausschnitte von GgSH3^C als Stäbchen mit *trans* (a) oder *cis* (b) Pro238 (PDB: 2L3Q und 2L3P)⁽¹¹⁷⁾. Reste, die durch andere Aminosäuren ersetzt wurden, sind dunkler gefärbt, Pro238 und Met272 sind farblich hervorgehoben. Die beiden Strukturen sind in der gleichen Ausrichtung gezeigt. Die Abbildungen wurden mit PyMol erstellt⁽¹⁴⁴⁾.

In 3.1.1 wurde gezeigt, dass Met an Position 272 notwendig ist, um c-CrkII durch Prolylisomerisierung im nativen Zustand zu regulieren. Warum die Seitenkette von Met dafür benötigt wird, kann aus den verfügbaren Strukturdaten nicht geschlussfolgert werden. Möglicherweise wird die Beweglichkeit der Seitenkette durch eine β -verzweigte Aminosäure wie Val (im humanen Protein) zu stark eingeschränkt, um sich an die strukturelle Verschiebung von der Spitze einer Schleife an deren Anfang anzupassen.

Generell zeigen die Strukturanalysen, dass mit *cis*Pro238 sowohl der Linkerbereich vor Pro238, als auch der Faltblattstrang hin zu Met272 stärker in die Domänenstruktur von SH3^C integriert sind (Abbildung 3-15 und Abbildung 3-17). Diese verbesserte Faltblattstruktur kompensiert vermutlich die energetisch ungünstigen Beiträge der *cis*-Konformation an Pro238 und macht diesen Zustand dadurch zugänglich. Die Nettostabilität der gesamten Domäne ist dennoch etwas niedriger als mit *trans*Pro238 (Abbildung 3-3d und Tabelle A 1). Eine mögliche Erklärung dafür ist die Umlagerung von Phe239 (Abbildung 3-18), das neben Met272 essentiell ist für die Regulation von GgCrkII durch Prolylisomerisierung im nativen Zustand.

Die Überlagerung der Strukturen von GgSH3^C mit *cis* und mit *trans*Pro238 in Abbildung 3-18a zeigt deutlich die unterschiedliche Anordnung von Phe239. Während mit *trans*Pro238 Phe239 in die SH3^C Domäne zeigt (Abbildung 3-18a, blau), rotiert die Seitenkette an die Oberfläche der Domäne, wenn Pro238 in *cis*-Konformation vorliegt (Abbildung 3-18a, gelb). Aus dieser Überlagerung wird auch deutlich, warum der Linkerbereich vor Pro238 und der Faltblattstrang zu Met272 hin durch Prolylisomerisierung beeinflusst werden. Zeigt Phe239 in das Innere von SH3^C (mit *trans*Pro238), kommt es zu Abstoßungen mit dem Pro-Leu-

Pro Motiv (230-232) und Val267 (Abbildung 3-18a und b). Diese beiden Motive, die mit *cis*Pro238 um Trp276 gepackt sind (Abbildung 3-15, Abbildung 3-18c), werden durch Phe239 auseinander gedrückt (Abbildung 3-18a und b), wenn Pro238 in *trans*-Konformation vorliegt. Dabei werden die π -Elektronensysteme der Seitenketten von Phe239 und Trp276 nahezu rechtwinklig zueinander ausgerichtet (Abbildung 3-18d). Diese neue hydrophobe Packung des Kerns von SH3^C (mit *trans*Pro238) überkompensiert vermutlich den Verlust der Stabilisierung durch H-Brücken zwischen Pro230 und Trp276 (mit *cis*Pro238, Abbildung 3-18c) und führt zu einer leichten Stabilisierung von GgSH3^C mit *trans*Pro238 über GgSH3^C mit *cis*Pro238 (Abbildung 3-3d und Tabelle A 1).

Die experimentellen Daten zur Ligandenbindung und die Analyse der Strukturdaten zusammen zeigen, dass Phe239 wichtig ist, um die Umstrukturierung des Linkers und des Faltblattstranges zu Met272 auszulösen. Auf Grund der räumlich anspruchsvollen, aromatischen Seitenkette, ist die Propagation des *cis/trans* Gleichgewichts an Pro238 nur mit Phe239 möglich. Über die ebenfalls notwendige Umlagerung von Met272 und die damit verbundene Ausbildung unterschiedlicher Interaktionen an der Oberfläche von SH3^C kann mit den verfügbaren Daten keine Aussage getroffen werden.

Im humanen Protein mit Ile239 nach Pro238 wurde keine Regulation durch Prolylisomerisierung beobachtet, HsSH3^C ist jedoch stabiler als GgSH3^C. Diese Beobachtung konnte auf unterschiedliche Wechselwirkungen der beiden Domänen mit dem vorangehenden Linkerbereich zurückgeführt werden (vgl. 3.1.2.1). Diese Interaktionen sind von der Konformation der Prolylbindung an Pro238 abhängig (Abbildung 3-15). Mit *trans*Pro238 ist SH3^C leicht stabilisiert gegenüber SH3^C mit *cis*Pro238, da Phe239 (in GgSH3^C) durch die Rotation um die vorangehende Prolylbindung in den hydrophoben Kern der Domäne zeigt. Die aliphatische Seitenkette von Ile (wie im humanen Protein) ist sterisch weniger anspruchsvoll als der aromatische Ring von Phe (wie im Protein aus dem Huhn) und kann sich daher vermutlich noch besser in das hydrophobe Innere der Domäne einpassen. Dadurch wird der hydrophobe Kern von SH3^C dichter gepackt und gleichzeitig die *trans*-Konformation an Pro238 deutlich bevorzugt gegenüber der *cis*-Form.

Mit diesen Ergebnissen kann erklärt werden, warum Phe239 und Met272 notwendig sind für die Regulation von GgCrklI durch Prolylisomerisierung im nativen Zustand. Beide Reste in Kombination ermöglichen eine alternative Anordnung des hydrophoben Kerns von SH3^C und eine damit verbundene Umstrukturierung eines H-Brückennetzwerks entlang eines Faltblattstranges der in der Nähe von Pro238 beginnt und dessen isomeren Zustand an Met272 kommuniziert. Die fein abgestimmte Kompensation von konformationeller

Stabilität und *cis/trans* Isomerisierung eines Prolins ist dabei notwendig, damit Prolylisomerisierung als Regulationsmechanismus verwendet werden kann.

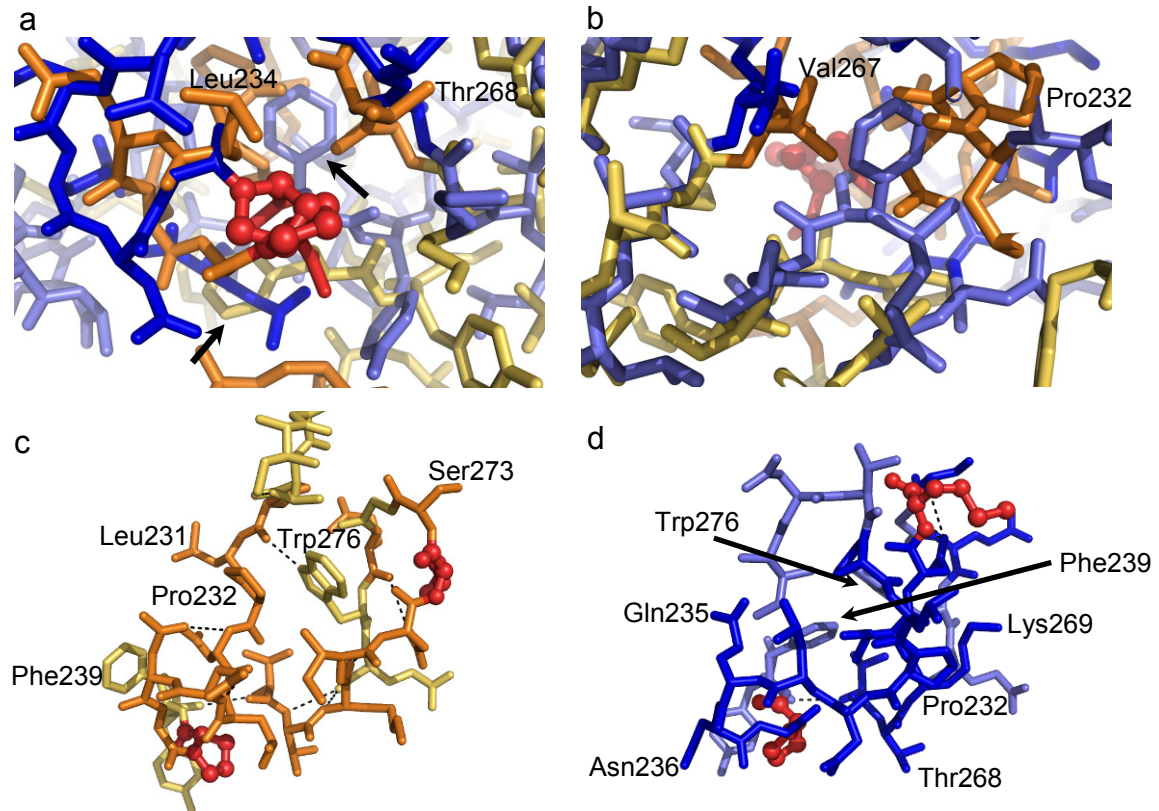


Abbildung 3-18: Phe239 als zentrale Schaltstelle für Strukturumlagerungen

Die Überlagerung der Strukturen von GgSH3^C mit *cis* (gelb) und *trans* (blau) Pro238 (PDB: 2L3Q und 2L3P) ⁽¹¹⁷⁾ ist in (a) und (b) dargestellt. Reste, die im Rahmen dieser Untersuchungen variiert wurden, sind dunkler, Pro238 und Met272 rot gefärbt. (c) und (d) zeigen Ausschnitte von GgSH3^C (mit *cis* und *trans*Pro238) mit wichtigen Interaktionen (gestrichelte Linien) in Abhängigkeit der Konformation der Prolylbindung an Pro238 mit Farben wie in (a) und (b). Die Pfeile in (a) zeigen auf Phe239. Die Abbildungen wurden mit PyMol erstellt ⁽¹⁴⁴⁾.

3.1.3 Prolylisomerisierung als molekulares Gedächtnis bei der Signaltransduktion durch c-CrkII

In den vorangehenden Abschnitten wurde gezeigt, dass c-CrkII Proteine aus Mensch und Huhn unterschiedlich reguliert werden. Dieses verschiedenartige Verhalten konnte auf nur zwei Aminosäureunterschiede zurückgeführt werden. Aufbauend darauf wurde gezeigt, wie diese beiden, weit voneinander entfernten Aminosäuren in SH3^C strukturell miteinander verknüpft sind. Mit weiteren kinetischen Analysen sollte nun der genaue Zusammenhang zwischen Proteinfaltung und -funktion von c-CrkII analysiert werden. Insbesondere sollte herausgearbeitet werden, wie diese beiden Prozesse durch Prolylisomerisierung im nativen Zustand des Proteins gesteuert werden. Mit diesen Experimenten sollte ein kinetischer Mechanismus aufgestellt werden, der die Faltung und die Funktion kombiniert und die Verschiebung des *cis/trans* Gleichgewichts an Pro238 von c-CrkII aus dem Huhn beschreibt.

3.1.3.1 Bildung des geschlossenen Zustands von c-CrkII während der Faltung

Die beiden isolierten SH3-Domänen SH3^N und SH3^C unterscheiden sich deutlich in ihren Faltungsraten und damit auch in ihrer gesamten Dynamik. SH3^C ist hochdynamisch und zeigt etwa zehnmal höhere Ent- und Rückfaltungsraten als SH3^N. Dies gilt auch für das Zweidomänenprotein SH3^N-SH3^C. Faltungsstudien an SH3^N-SH3^C konnten keinen Hinweis auf eine veränderte Faltung oder eine nachgelagerte Domänenassoziation geben. Die Interaktion mit dem Peptidliganden C3G₁₈ zeigte jedoch deutlich, dass für das Protein aus dem Huhn Wechselwirkungen zwischen den beiden Domänen bestehen müssen (Abbildung 3-5).

Doppelmischexperimente ermöglichen es Interaktionen aufzudecken, die nicht mit einer Fluoreszenzänderung verbunden sind. Dabei wird, ausgehend von vollständig denaturiertem Protein, zunächst die Rückfaltung initiiert, in dem das Protein von 5,5 M GdmCl zu 0,5 M GdmCl verdünnt wird. Nach einer definierten Zeit wird durch eine weitere Mischung das rückfaltende Protein wieder in Entfaltungsbedingungen überführt (3 M GdmCl). Die Amplitude der nun einsetzenden Entfaltungsreaktion enthält die Information darüber, wie viele Moleküle während der vorangehenden Rückfaltungsphase den nativen Zustand erreicht haben. Findet nach der konformationellen Faltung eine spektroskopisch unsichtbare Domänenassoziation statt, die durch eine hohe Energiebarriere von dem lose assoziierten Zustand getrennt ist, so kann dies durch den beschriebenen

Versuchsaufbau detektiert werden, da bei der anschließenden Entfaltung ebenfalls diese Energiebarriere überwunden werden muss.

Zunächst wurde die Ausbildung des nativen Zustands der isolierten SH3^C-Domänen (mit dem gesamten vorangehenden Linkerbereich) von c-CrkII untersucht. Dabei wurde wieder das menschliche Protein mit dem Protein aus dem Huhn verglichen, um Unterschiede herausarbeiten zu können (Abbildung 3-19).

Eine wichtige Kontrolle bei derartigen *stopped-flow* Doppelmischexperimenten ist die Rate der aufgezeichneten Entfaltungsreaktion. Native HsSH3^C entfaltet in 3 M GdmCl mit 1 s⁻¹, GgSH3^C etwas schneller mit 4 s⁻¹. Dass diese Raten auch nach allen Rückfaltungsdauern erhalten werden, deutet darauf hin, dass immer die Entfaltungsreaktion nativer Moleküle aufgezeichnet wird.

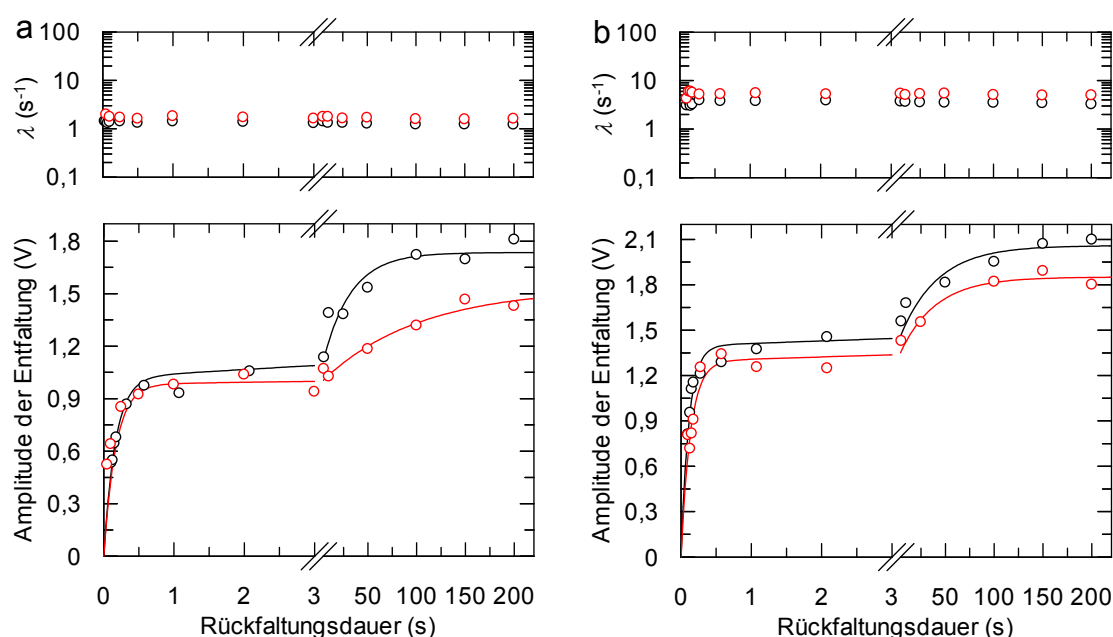


Abbildung 3-19: Bildung des nativen Zustands der isolierten SH3^C Domäne

Dargestellt sind die Raten (oben) und Amplituden (unten) der Entfaltung als Funktion der Rückfaltungsdauer für SH3^C (schwarz) und SH3^C P238A (rot) für isolierte SH3^C aus dem Mensch (a) und dem Huhn (b). Alle Versuche wurden in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4 bei 15 °C durchgeführt. Die Proteine wurden in 5,4 M GdmCl entfaltet, in 0,49 M GdmCl rückgefaltet und anschließend die Fluoreszenzänderung während der Entfaltung in 3,5 M GdmCl oberhalb von 320 nm (Anregung bei 280 nm) aufgezeichnet. Für jede Rückfaltungsdauer wurden mindestens acht Entfaltungskinetiken gemessen, gemittelt und durch Angleich von Exponentialfunktionen ausgewertet. Die Auswertungen der Amplitudenauftragungen sind in Tabelle A 6 zusammengefasst.

Für HsSH3^C zeigen sich zwei Rückfaltungsphasen (Abbildung 3-19a). Die schnelle Reaktion mit einer Rate von 6 s⁻¹ entspricht der konformationellen Faltung, die langsame Reaktion ($\approx 0,02$ s⁻¹) der prolinlimitierten Faltung (vgl. Abbildung 3-3c). Der Aminosäureaustausch P238A zeigt dabei keine Auswirkung

auf die konformationelle Faltung. Für GgSH3^C (Abbildung 3-19b) folgt der Amplitudenverlauf ebenfalls den direkten Faltungskinetiken mit Raten von etwa 8 s⁻¹ und 0,02 s⁻¹. Dabei kann der Verlauf der Entfaltungsamplituden jedoch nicht optimal durch die Summe zweier Exponentialfunktionen angeglichen werden (im Bereich von 0,5 s bis 2 s Rückfaltungsdauer), was auf die zweite Rückfaltungsreaktion von GgSH3^C zurückgeführt wird. Diese Reaktion wurde der cisPro238 Spezies zugeordnet (Abbildung 3-3d). Im entfalteten Protein, dem Ausgangszustand in diesem Experiment, liegt nur ein geringer Anteil der Moleküle mit cisPro238 vor, trägt somit nur geringfügig zu der Entfaltungsamplitude bei und kann daher nicht zuverlässig quantifiziert werden. Dass diese Beobachtung für GgSH3^C P238A nicht gemacht wird, unterstützt diese These. Für alle untersuchten SH3^C-Domänen geben die Entfaltungstests den Zeitverlauf der Bildung nativen Proteins wieder, der auch in direkten, fluorimetrischen Rückfaltungskinetiken aufgezeichnet wurde. Es gibt also keine Hinweise auf spektroskopisch unsichtbare Faltungsintermediate.

Die SH3^N Domäne faltet und entfaltet etwa zehnmal langsamer als SH3^C (Abbildung 3-3) und ändert daher im aufgezeichneten Zeitbereich der Entfaltungsreaktion von SH3^C ihren Faltungszustand kaum. Folglich kann die Bildung nativer SH3^C auch im Zweidomänenprotein SH3^N-SH3^C selektiv analysiert werden (Abbildung 3-20, Abbildung A 4a und b).

Dabei zeigt sich insgesamt das gleiche Verhalten wie für die isolierten SH3^C-Domänen. Auf eine schnelle Reaktion (5 s⁻¹ – 8 s⁻¹), die der konformationellen Faltung zugeordnet wird, folgt eine langsame Reaktion mit etwa 0,02 s⁻¹, die der prolinlimitierten Faltung von SH3^C entspricht. Die P238A Variation zeigt dabei die gleichen Effekte wie in isolierter SH3^C.

Die humanen Proteine HsSH3^C und HsSH3^N-SH3^C verhalten sich gleich (Abbildung 3-19a und Abbildung 3-20a). Für GgSH3^N-SH3^C fällt jedoch auf, dass die beiden Phasen (8 s⁻¹ und 0,02 s⁻¹) nicht so strikt getrennt sind (Abbildung 3-20b), genau wie in GgSH3^C (Abbildung 3-19b). Die molekularen Ursachen dafür stammen vermutlich von Pro238. Auch bei diesen Messungen waren die Raten der aufgezeichneten Entfaltungsreaktionen für alle Rückfaltungsdauern konstant (Abbildung A 4a und b) und es gibt somit keine Hinweise auf eine nachgelagerte Domänenassoziationsreaktion.

Da die Experimente zur unterbrochenen Rückfaltung von SH3^N-SH3^C keine Hinweise auf eine feste Domänenassoziation lieferten (Abbildung 3-20), ist davon auszugehen, dass die fluorimetrisch gemessenen Rückfaltungskinetiken nach einfacher Mischung (3.1.1.1) die vollständige Faltung des Proteins darstellen. Dennoch wurde vorgeschlagen, dass c-CrkII aus dem Huhn durch Prolylisomerisierung im nativen Zustand reguliert wird⁽¹¹⁶⁾. Die Hypothese ist, dass c-CrkII mit

*trans*Pro238 einen offenen, hoch-affinen Zustand einnimmt, mit *cis*Pro238 hingegen einen geschlossenen, niedrig-affinen Zustand (vgl. 3.1.1).

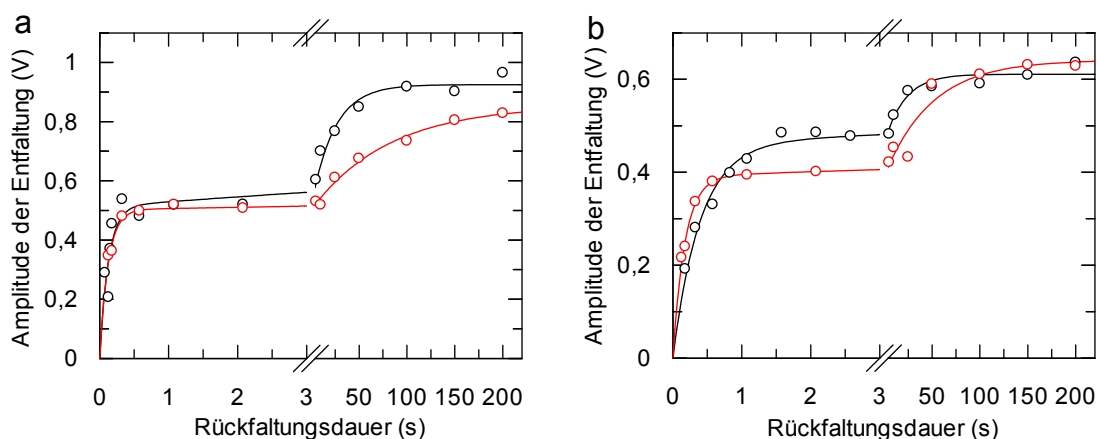


Abbildung 3-20: Analyse der Rückfaltung von SH3^N-SH3^C

Dargestellt sind die Amplituden der Entfaltung als Funktion der Rückfaltungsdauer für SH3^N-SH3^C (schwarz) und SH3^N-SH3^C P238A (rot) für die Proteine aus dem Mensch (a) und Huhn (b). Alle Versuche wurden in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4 bei 15 °C durchgeführt. Die Proteine wurden in 5,4 M GdmCl entfaltet, in 0,49 M GdmCl rückgefaltet und anschließend die Fluoreszenzänderung während der Entfaltung in 3,7 M GdmCl oberhalb von 320 nm (Anregung bei 280 nm) aufgezeichnet. Für jede Rückfaltungsdauer wurden mindestens acht Entfaltungskinetiken gemessen, gemittelt und durch Angleich von Exponentialfunktionen ausgewertet. Die Auswertungen der Amplitudenauftragungen sind in Tabelle A 6 zusammengefasst.

In denaturierten Proteinen liegen Prolylbindungen typischerweise zu etwa 90 % in *trans* Konformation vor ⁽⁹⁵⁾. Wenn die Faltung von c-CrkII jedoch den geschlossenen Zustand mit *cis*Pro238 bevorzugt, so muss die daraus resultierende Gleichgewichtsverschiebung von *trans*Pro238 zu *cis*Pro238 über die damit einhergehende Verringerung der Affinität für C3G₁₈ aufgezeichnet werden können. Dazu wurde der Versuchsaufbau modifiziert und als Sonde für den Faltungszustand wurde nicht die Entfaltung verwendet, sondern die Bindung des Liganden C3G₁₈. Mit diesem Experiment ist zum Einen der Faltungszustand von SH3^N zugänglich, zum Anderen sollten dadurch schwache Interaktionen der beiden SH3-Domänen im Protein aus dem Huhn durch Änderungen der Affinität für das C3G₁₈-Peptid detektiert werden können. Die Peptidkonzentration muss bei diesem Experiment so gewählt werden, dass der offene Zustand mit *trans*Pro238 zu einem Großteil den Protein-Ligand-Komplex ausbildet, der geschlossene Zustand mit *cis*Pro238 jedoch nur zu einem geringen Teil mit C3G₁₈ interagiert.

Um zu überprüfen, ob dieses Experiment geeignet ist, um den Faltungszustand von SH3^N zu verfolgen, wurde die isolierte SH3^N-Domäne entfaltet (3 M GdmCl, 1 h), die Rückfaltung durch Verdünnung in 0,27 M GdmCl initiiert und in der zweiten Mischung, nach definierten Zeitintervallen, die Assoziation der

gefalteten Moleküle mit C3G₁₈ aufgezeichnet (Abbildung 3-21a, b, Abbildung A 4c und d). Da nur gefaltete SH3^N mit C3G₁₈ interagieren kann, nimmt die Amplitude der Bindung zunächst schnell und stark zu. Mit einer Rate von etwa 1 s⁻¹ entspricht dies der Rate der konformationellen Faltung von SH3^N (Abbildung 3-3a und b). Nach Rückfaltungsdauern im Zeitbereich mehrerer Minuten, nimmt die Amplitude der Bindung weiter zu. Diese Beobachtung kann durch die prolinlimitierte Faltung von SH3^N erklärt werden. Zudem befindet sich ein Prolin direkt in der Bindungsoberfläche für polyPro-Liganden. Der funktionsgekoppelte Rückfaltungstest beschreibt somit sehr gut die Rückfaltungsphasen von SH3^N, wie sie auch direkt fluorimetrisch erhalten wurden (Abbildung 3-3a und b). Die Proteine aus Mensch und Huhn unterscheiden sich dabei nicht (Abbildung 3-21a und b, Abbildung A 4c und d).

Das gleiche Experiment wurde auch für SH3^N-SH3^C durchgeführt (Abbildung 3-21c und d, Abbildung A 4e und f). Für das humane Zweidomänenprotein erhält man den gleichen Amplitudenverlauf wie für isolierte SH3^N, mit einer Zunahme der Bindungsamplitude entsprechend der konformationellen Faltung von SH3^N, gefolgt von einer zweiten Phase, die der prolinlimitierten Faltung entspricht (Abbildung 3-21c). Für GgSH3^N-SH3^C zeigt dieses Experiment, dass die hoch-affine Form mit etwa 1 s⁻¹ (gemäß der Faltung von SH3^N) gebildet wird, in einer zweiten, langsamen Reaktion jedoch wieder abnimmt, was zu einer Abnahme und nicht zu einer weiteren Zunahme der Bindungsamplitude führt (Abbildung 3-21d). In der Variante GgSH3^N-SH3^C P238A wird diese Abnahme der Amplitude nicht beobachtet, sondern das gleiche Verhalten wie für die isolierte SH3^N-Domäne.

Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse, dass SH3^N im humanen Protein HsSH3^N-SH3^C konstitutiv aktiv vorliegt, die Bindungsstelle für Liganden also immer frei zugänglich ist. Daher zeigt das Zweidomänenprotein exakt das gleiche Bindungsverhalten wie die isolierte SH3^N-Domäne (Abbildung 3-21a und c). Für das Protein aus dem Huhn lassen sich die Resultate am einfachsten dadurch erklären, dass nach kurzer Rückfaltungsdauer nahezu ausschließlich der hoch-affine Zustand gebildet wird, in dem die Bindungsstelle für Liganden frei zugänglich ist, da in entfaltenen Proteinen Prolin zu etwa 90 % in *trans*-Konformation vorliegt. Da Prolylisomerisierungen intrinsisch langsame Reaktionen sind, bleibt dieses Verhältnis bis zu einer Rückfaltungsdauer von 10 s nahezu erhalten. Innerhalb dieses Zeitraums ist die konformationelle Faltung der beiden SH3-Domänen abgeschlossen (Abbildung 3-2, Abbildung 3-3, Abbildung 3-19, Abbildung 3-20). Durch Prolylisomerisierung im nativen Zustand von *trans*Pro238 zu *cis*Pro238 wird anschließend an die Domänenfaltung ein niedrig-

affiner, geschlossener Zustand gebildet. Die Amplitude der Bindung von C3G₁₈ nimmt dadurch mit zunehmender Rückfaltungsdauer ab (Abbildung 3-21d).

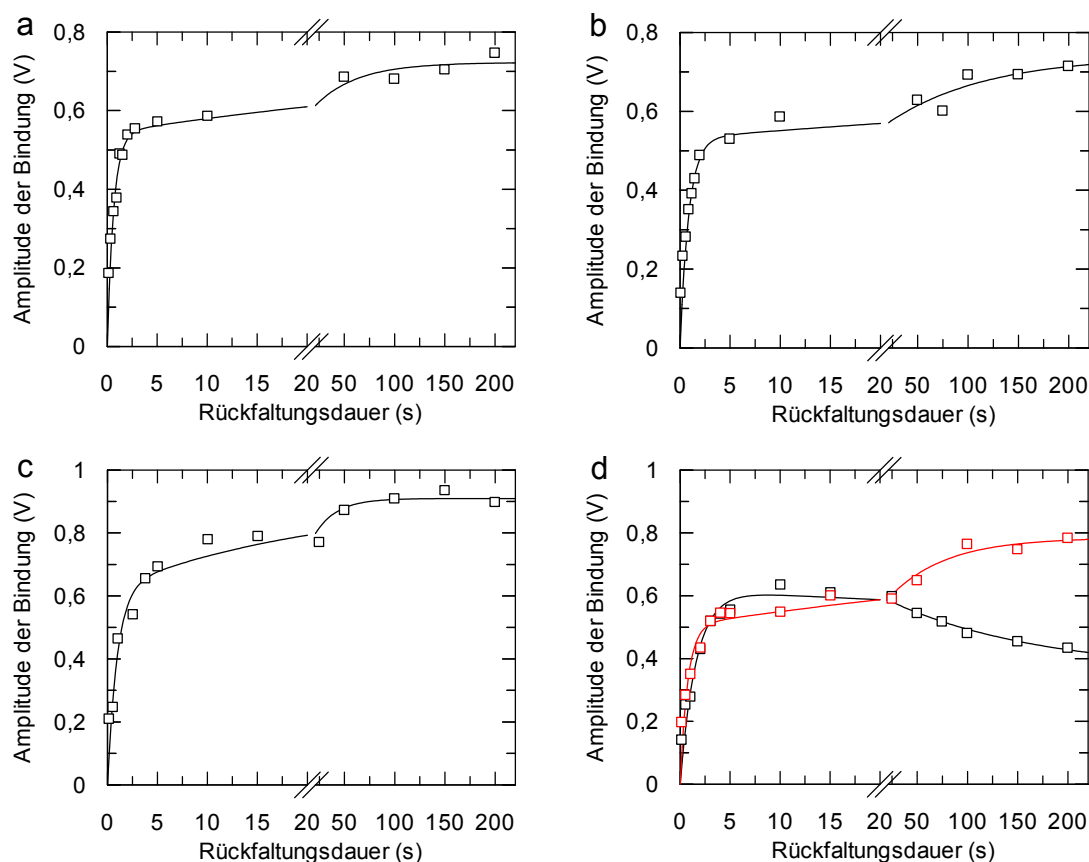


Abbildung 3-21: Ligandenbindung in Abhängigkeit der Rückfaltungsdauer

Aufgetragen ist die Amplitude der Assoziation von C3G₁₈ mit (a) HsSH3^N, (b) GgSH3^N, (c) HsSH3^N-SH3^C, (d) GgSH3^N-SH3^C sowie der Variante P238A (rot) als Funktion der Rückfaltungsdauer. Die Experimente wurden in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4 bei 15 °C durchgeführt. HsSH3^N wurde in 3,0 M GdmCl denaturiert (1 h, 15 °C), GgSH3^N in 5,4 M GdmCl und die SH3^N-SH3^C Proteine in 3,8 M GdmCl. Rückfaltung wurde durch elffache Verdünnung in 0,27 – 0,49 M GdmCl initiiert. Nach definierten Zeiten wurde das Protein ein weiteres Mal verdünnt (sechsfach) und dabei mit C3G₁₈ gemischt. Die finalen Bedingungen waren 0,5 µM Protein, 2 µM C3G₁₈, in 100 mM Kaliumphosphat, 0,05 – 0,08 M GdmCl, pH 7,4, 15 °C. Für jede Rückfaltungsdauer wurden mindestens acht Messungen gemittelt und durch Angleich von Exponentialfunktionen ausgewertet. Die Auswertungen der Amplitudenauftragungen sind in Tabelle A 6 zusammengefasst.

Mit einer Rate von 0,007 s⁻¹ liegt diese Reaktion im Zeitbereich von Prolyl-*trans*→*cis*-Isomerisierung. In der Variante GgSH3^N-SH3^C P238A ist die Gly237-Ala238 Bindung in der *trans* Konformation arretiert und daher kann der niedrig-affine Zustand nicht ausgebildet werden. Tatsächlich nimmt die Amplitude der Bindung bei dieser Variante weiter zu, so wie für die isolierte SH3^N-Domäne (Abbildung 3-21b und d). Diese Zunahme ist, wie erläutert, auf die Isomerisierung von Prolinresten innerhalb von SH3^N zurückzuführen. Diese Beobachtung ist ein

eindeutiger Hinweis darauf, dass die Affinität von GgCrkII gegenüber Liganden Pro238-abhängig gesteuert wird.

Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde aus 3.1.1. c-CrkII aus Mensch und Huhn sind unterschiedlich reguliert. Das humane Protein liegt in einem konstitutiv aktiven Zustand vor und bindet Liganden mit ähnlicher Affinität wie die isolierte SH3^N-Domäne. Entsprechend den bisherigen Analysen falten die beiden SH3-Domänen nach einem Zwei-Zustands-Modell und beeinflussen sich gegenseitig nicht. c-CrkII aus dem Huhn hingegen weist zwei distinkte Zustände auf, die von der Konformation der Prolylbindung an Position 238 abhängen. Mit *trans*Pro238 nimmt GgSH3^N-SH3^C eine offene, aktive Form ein, mit *cis*Pro238 interagieren die beiden Domänen und die Affinität von SH3^N für Liganden ist verringert. Die beiden SH3-Domänen können unabhängig voneinander in ihre native Konformation falten, nachgelagert zu der Domänenfaltung findet jedoch eine Domänenassoziationsreaktion statt, die an Prolylisomerisierung im nativen Zustand gekoppelt ist.

3.1.3.2 Domänenassoziation in c-CrkII

Die Rückfaltungskinetik von c-CrkII war bislang ausgehend von vollständig denaturiertem Protein untersucht worden. Dabei konnte auch für das Protein aus dem Huhn keine kinetische Evidenz für eine nachgelagerte Domänenassoziation gefunden werden. Die Verknüpfung des Faltungszustandes mit der biologischen Funktion zeigte jedoch deutlich, dass die beiden SH3-Domänen miteinander interagieren müssen, um dadurch die Affinität von SH3^N gegenüber Liganden zu verringern (Abbildung 3-21d).

In einer weiteren Serie von Doppelmischexperimenten wurde daher untersucht, ob im Verlauf der Entfaltung Interaktionen zwischen SH3^N und SH3^C detektiert werden können. Diese Versuche beginnen mit nativem Protein, in dem alle stabilisierenden Wechselwirkungen etabliert sind. Durch Verdünnung mit Entfaltungspuffer wird zunächst die Entfaltung des Proteins initiiert. Nach definierten Zeitintervallen werden dann Proben zurück in Faltungsbedingungen überführt und die Rückfaltungsreaktion aufgezeichnet. Die Amplitude dieser Reaktion enthält nun Informationen darüber, wie entfaltete Moleküle mit bestimmten Rückfaltungsraten zeitabhängig auftreten, und somit über den ursprünglichen, nativen Zustand.

Als Referenz wurden zunächst die isolierten SH3-Domänen auf diese Weise analysiert (Abbildung 3-22 und Abbildung A 5). SH3^N aus beiden Spezies entfaltet langsam, im gleichen Zeitbereich in dem Prolylisomerisierung stattfindet (Abbildung 3-22a und b). Die erhaltenen Entfaltungsraten stimmen mit denen aus

der direkt spektroskopisch gemessenen Entfaltung überein (vgl. Abbildung 3-3a und b).

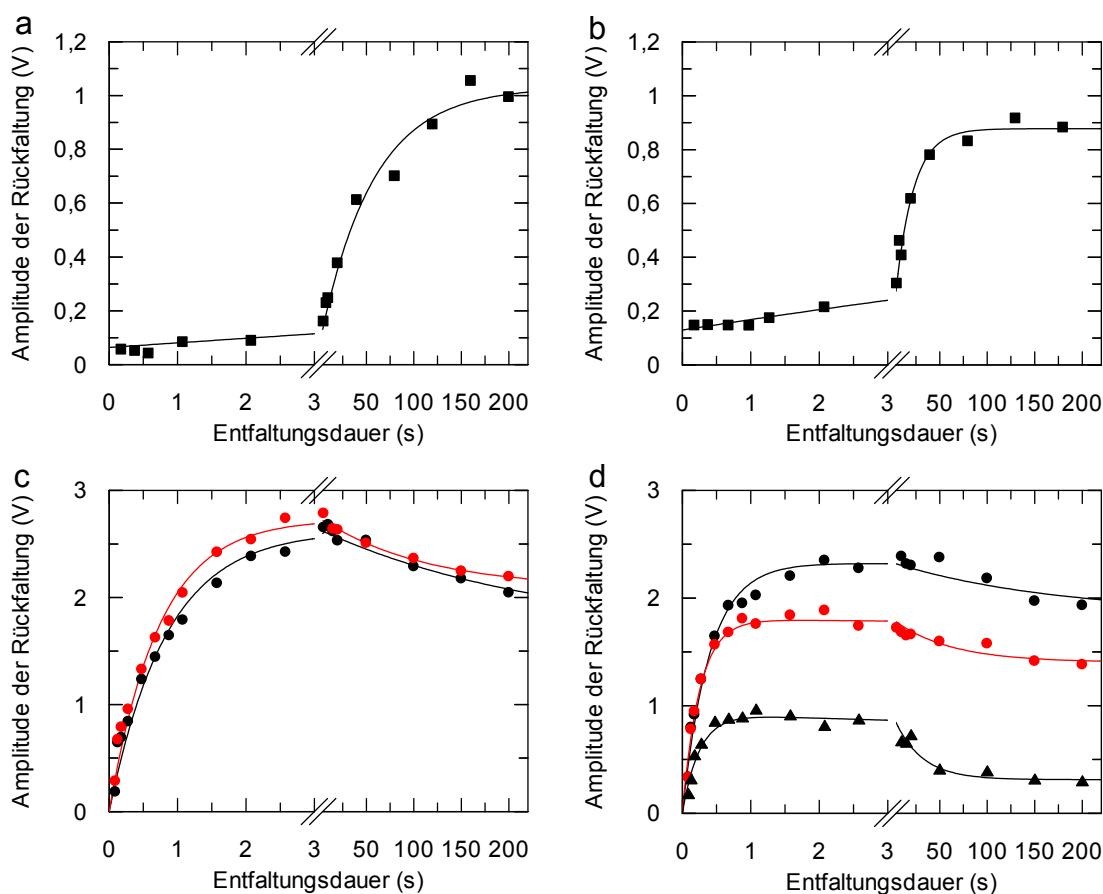


Abbildung 3-22: Analyse der Entfaltung von SH3^N und SH3^C

Aufgetragen ist die Amplitude der Rückfaltung als Funktion der Entfaltungsdauer für (a) HsSH3^N, (b) GgSH3^N, (c) HsSH3^C und (d) GgSH3^C (Kreise für die Spezies mit *trans*Pro238, Dreiecke für die mit *cis*Pro238) mit den Varianten SH3^C P238A in rot. Alle Messungen wurden in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4 bei 15 °C durchgeführt. Nach definierten Entfaltungsdauern in 2,9 M GdmCl wurden die Proteine durch eine weitere Verdünnung in 0,48 M GdmCl rückgefaltet und die Fluoreszenzzunahme oberhalb von 320 nm aufgezeichnet (Anregung 280 nm). Für alle Entfaltungsdauern wurden mindestens acht Kinetiken gemittelt und durch den Angleich von Exponentialfunktionen ausgewertet. Die Auswertungen der Amplitudenauftragungen sind in Tabelle A 6 zusammengefasst.

SH3^C entfaltet schnell, ebenfalls mit den gleichen Raten, die aus den direkten Fluoreszenzkinetiken erhalten wurden ($\approx 4 \text{ s}^{-1}$). Mit längerer Entfaltungsdauer ($\geq 10 \text{ s}$) nimmt die Amplitude der schnellen Rückfaltungsreaktion und somit die Anzahl der Moleküle, die schnell die native Struktur einnehmen können (etwa 8 s^{-1} , Abbildung A 5), wieder leicht ab (Abbildung 3-22c). Dies wird durch Prolyl-isomerisierung im denaturierten Zustand verursacht und ist in Einklang mit der prolinlimitierten Faltungsphase bei den direkten Rückfaltungsexperimenten (Abbildung 3-3c und d).

GgSH3^C zeigt zwei konformationelle Rückfaltungsphasen (Abbildung 3-3d) und entsprechend waren auch die Rückfaltungsreaktionen nach unterbrochener Entfaltung zweiphasig, mit einer schnellen (etwa 15 s⁻¹) und einer langsamen Spezies (ungefähr 5 s⁻¹, Abbildung A 5d), die jedoch beide nahezu identisch entfalten. Mit Raten von 2,5 s⁻¹ und 4 s⁻¹, die aus den Zunahmen der Rückfaltungsamplituden (Abbildung 3-22d) erhalten werden, folgt die Entfaltung von GgSH3^C den Raten aus den direkten Entfaltungsexperimenten. Diese beiden Phasen wurden den beiden Spezies mit *trans*Pro238 (Abbildung 3-22d, Kreise, schnelle Rückfaltung) und *cis*Pro238 (Abbildung 3-22d, Dreiecke, langsame Rückfaltung) zugeordnet (vgl. Abbildung 3-3). In Übereinstimmung mit diesen Daten hat die Substitution P238A in humaner SH3^C keine Auswirkungen auf die Faltung (Abbildung 3-22c). In GgSH3^C hingegen fehlt die langsamere Faltungsphase der *cis*Pro238 Spezies (Abbildung 3-22d, Abbildung A 5c und d). Die Abnahme der Amplitude dieser Rückfaltungsreaktionen nach längerer Entfaltungsdauer reflektiert Prolylisomerisierung im denaturierten Protein.

Für das Zweidomänenprotein SH3^N-SH3^C könnten derartige unterbrochene Entfaltungsexperimente Hinweise auf Domäneninteraktionen geben (Abbildung 3-23), da in dem Ausgangszustand alle Wechselwirkungen zwischen den beiden Domänen vorhanden sind. Bei Entfaltungspulsen von wenigen Sekunden (≤ 3 s) entfaltet nur SH3^C, wohingegen SH3^N im Wesentlichen nativ gefaltet bleibt.

Generell zeigen die Amplitudenverläufe der aufgezeichneten Rückfaltungsreaktionen das gleiche Verhalten wie für die isolierten Domänen (Abbildung 3-22c und d, Abbildung 3-23a und b). SH3^C entfaltet innerhalb weniger Sekunden, die Amplitude der schnellen Rückfaltung steigt somit in diesem Zeitbereich stark an und es ergeben sich Entfaltungsraten von 1 s⁻¹ (Mensch) und 3 s⁻¹ (Huhn). Je länger der Entfaltungspuls durchgeführt wird, desto weniger Moleküle können schnell zurückfalten, da Prolylisomerisierungen im denaturierten Protein stattfinden und entsprechend sinkt die Rückfaltungsamplitude leicht in einer prolinlimitierten Reaktion. Gleichzeitig entfaltet auch die SH3^N Domäne beider Spezies. Die P238A Variation beeinflusst das Verhalten der SH3^N-SH3^C Proteine nicht (Abbildung 3-23a und b Abbildung A 5e und f).

Auffällig ist, dass für GgSH3^N-SH3^C nur eine Rückfaltungsreaktion für SH3^C beobachtet wird, die der Rückfaltung der *trans*Pro238 Spezies entspricht, obwohl die Versuche mit der isolierten C-terminalen Domäne eindeutig gezeigt hatten, dass die Rückfaltung von GgSH3^C mit *trans* oder *cis*Pro238 unterschiedlich schnell verläuft (Abbildung 3-22d und Abbildung A 5). Daraus folgt, dass in GgSH3^N-SH3^C entweder kein *cis/trans* Gleichgewicht an Pro238 existiert, oder dass die Rückfaltung der Spezies mit *cis*Pro238 verändert ist.

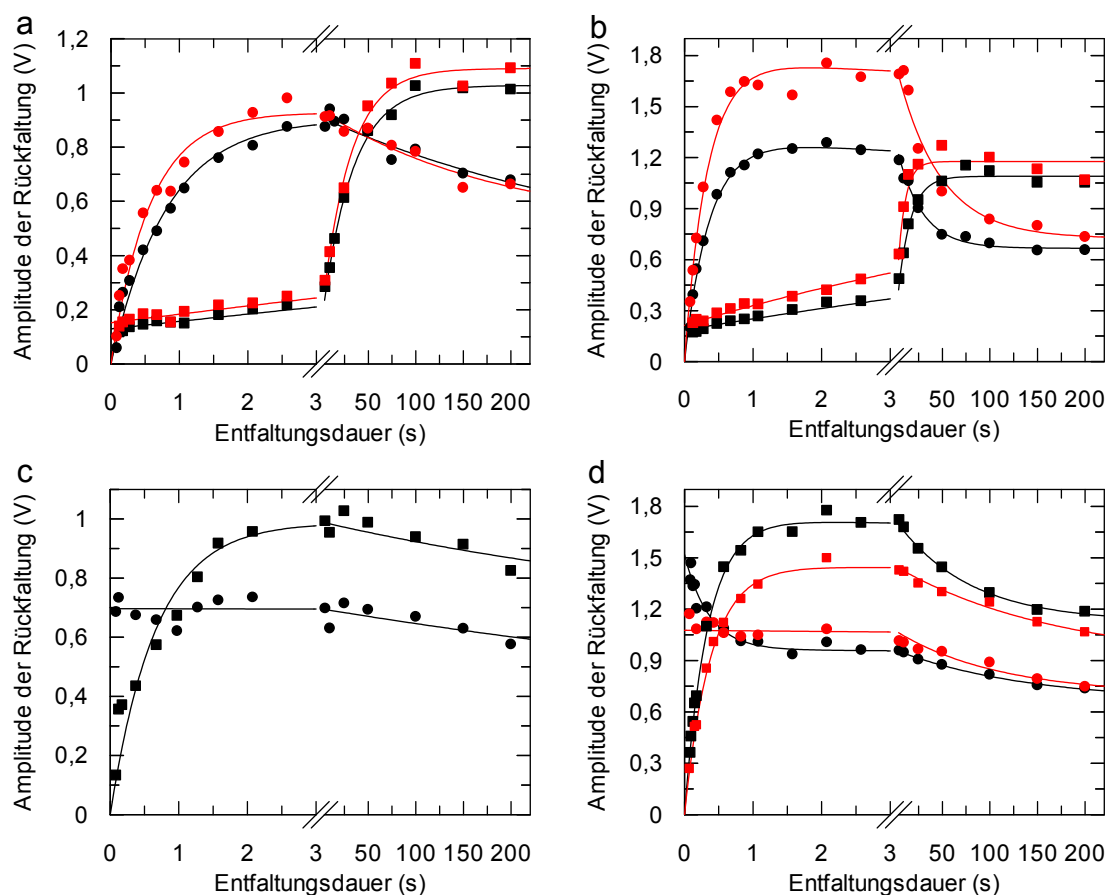


Abbildung 3-23: Unterbrochene Entfaltung von SH3^N-SH3^C und Aufzeichnung der Domäneninteraktionen

Aufgetragen ist die Amplitude der Rückfaltung als Funktion der Entfaltungsdauer in 3,0 M GdmCl, pH 7,4 für (a) HsSH3^N-SH3^C, (b) GgSH3^N-SH3^C und den Varianten P238A in rot. Die Amplitude der Rückfaltung als Funktion der Entfaltungsdauer in 100 mM Glycin, 3,0 M GdmCl, pH 2 ist für (c) HsSH3^N-SH3^C und (d) GgSH3^N-SH3^C (Variante GgSH3^N-SH3^C P238A in rot) dargestellt. Nach sechsfacher Verdünnung wurde die Rückfaltung aller Proteine in 100 mM Kaliumphosphat, 0,5 M GdmCl, pH 7,4 bei 15 °C durchgeführt. Die Fluoreszenzzunahme oberhalb von 320 nm wurde aufgezeichnet (Anregung 280 nm). Für alle Entfaltungsdauern wurden mindestens acht Kinetiken gemittelt und durch den Angleich von Exponentialfunktionen ausgewertet. Die Auswertungen der Amplitudenauftragungen sind in Tabelle A 6 zusammengefasst.

Bei den bisherigen Faltungsstudien ausgehend von langzeit denaturiertem Protein konnte zunächst die *trans*Pro238 Spezies der C-terminale Domäne falten ($\approx 12 \text{ s}^{-1}$), bevor in dem zweiten Schritt die Moleküle mit *cis*Pro238 und SH3^N ihre native Struktur einnahmen ($\approx 5 \text{ s}^{-1}$ bzw. 2 s^{-1}). Beide Faltungsreaktionen von GgSH3^C verlaufen also schneller als die Faltung von SH3^N und somit konnte GgSH3^C weitgehend unbeeinflusst von SH3^N falten.

Nach kurzen Entfaltungsdauern ist die Situation jedoch anders. Da SH3^N nur langsam entfaltet ($\approx 0,03 \text{ s}^{-1}$) findet hier die Rückfaltung von GgSH3^C in Anwesenheit von noch nativer SH3^N statt. Es sind somit im Prinzip von Anfang an die Voraussetzungen dafür gegeben, dass die faltende SH3^C-Domäne mit

nativer SH3^N interagieren kann. Ob eine derartige Interaktion tatsächlich und abhängig von der Konformation an Pro238 stattfindet, kann aus diesem Experiment nicht sicher gefolgert werden, da die *cis*→*trans* Isomerisierung an Pro238 in SH3^C und die Entfaltung von SH3^N etwa gleich schnell ablaufen. Somit entstehen andere Voraussetzungen für die Rückfaltung von SH3^C.

Um die Entfaltung von SH3^N zu beschleunigen und so die Überlagerung mit der Isomerisierung an Pro238 aufzuheben, wurden die Entfaltungsbedingungen verändert. Für kleine Proteine ist die Entfaltung bei niedrigem pH-Wert auf Grund der resultierenden positiven Überschussladung beschleunigt. Dies gilt auch für die beiden SH3-Domänen. Wird der Entfaltungspuls nicht bei 3 M GdmCl, pH 7,4 sondern bei 3 M GdmCl, pH 2 durchgeführt, entfaltet GgSH3^N innerhalb von 2 s, GgSH3^C bereits in der Totzeit der Mischung vollständig (Abbildung A 6a und b).

Auf das humane Zweidomänenprotein HsSH3^N-SH3^C angewendet, wird nach einem pH-Sprung beobachtet, dass beide Domänen unabhängig voneinander ent- und rückfalten (Abbildung 3-23c, Abbildung A 6c). Dieses Ergebnis bestätigt die bisherigen Befunde, dass die beiden SH3-Domänen im humanen Protein unabhängig voneinander vorliegen.

Anders verhält sich SH3^N-SH3^C aus dem Huhn. Hier zeigt dieses Experiment deutlich, dass Domäneninteraktionen zwischen SH3^N und SH3^C existieren (Abbildung 3-23d und Abbildung A 6d). Solange SH3^N gefaltet vorliegt, faltet SH3^C mit großer Amplitude zurück. Die Rückfaltungsamplitude von SH3^C nimmt jedoch mit der gleichen Kinetik ab, mit der SH3^N entfaltet ($\approx 3 \text{ s}^{-1}$). Dies zeigt unmittelbar, dass die Faltung und damit verbunden die Fluoreszenz von SH3^C in GgSH3^N-SH3^C vom Faltungszustand von SH3^N abhängt. Eine derartige Beeinflussung ist am einfachsten durch Domäneninteraktionen zu erklären. In der Variante GgSH3^N-SH3^C P238A sind diese Wechselwirkungen vollständig aufgehoben und man beobachtet keinen Einfluss von SH3^N auf die Rückfaltungsamplitude von SH3^C mehr (Abbildung 3-23d).

Diese Wechselwirkung zwischen SH3^N und SH3^C führt zu einer leichten Stabilisierung von SH3^C und damit zu einer Verschiebung des *cis/trans* Gleichgewichts hin zu *cis*Pro238, da nur in dieser Konformation die Domänen miteinander interagieren können. Diese Stabilisierung durch Interaktion von SH3^C mit der noch gefalteten SH3^N Domäne beschleunigt vermutlich die Rückfaltung. Dies könnte erklären, warum nach unterbrochener Entfaltung bei pH 7,4 nur eine Rückfaltungsreaktion aufgezeichnet werden konnte (Abbildung 3-23b und Abbildung A 5f). Solange SH3^N gefaltet vorliegt, bildet diese Domäne vermutlich eine Art Faltungsgerüst für SH3^C und die Moleküle mit *cis*Pro238 können ähnlich schnell rückfalten wie die Moleküle mit *trans*Pro238.

3.1.3.3 Ein kinetisches Modell für die Regulation von c-CrkII durch Prolylisomerisierung im nativen Zustand

Die erste Beobachtung dieser Arbeit war, dass die Ligandenbindung an c-CrkII aus Mensch und Huhn unterschiedlich reguliert wird. Das humane Protein liegt nahezu immer in einer offenen Form vor, die hoch-affin mit dem Peptidliganden C3G₁₈ interagiert. c-CrkII aus dem Huhn dagegen kann in zwei unterschiedlichen Zuständen vorkommen. Mit *cis*Pro238 interagieren die beiden SH3-Domänen und die Affinität von SH3^N gegenüber Liganden ist verringert. *trans*Pro238 führt dazu, dass die beiden SH3-Domänen unabhängig voneinander vorliegen und die Bindungsstelle für Liganden auf SH3^N frei zugänglich ist. Die *cis*-Konformation an Pro238 führt dabei jedoch nicht zu einer vollständigen Inhibition der Bindung, sondern auch dieser Zustand kann mit dem Peptidliganden assoziieren, was zu einem Boxmodell führte, um die Interaktion von GgSH3^N-SH3^C mit Liganden mechanistisch zu beschreiben (Abbildung 3-11b). Da im denaturierten Zustand eines Proteins ein *cis/trans* Gleichgewicht an Prolinen existiert und für GgSH3^C gezeigt wurde, dass die Domäne sowohl mit *trans*Pro238 als auch mit *cis*Pro238 falten kann (Abbildung 3-3d), folgt der Faltungsprozess von c-CrkII ebenfalls einem Boxmodell. Die Kombination von Faltung und Funktion (Ligandenbindung) führt somit zu einem Sechs-Spezies-Doppelboxmodell (Abbildung 3-24).

Um zu überprüfen, ob die experimentell bestimmten Daten mit diesem Modell kompatibel sind, wurden kinetische Simulationen durchgeführt. Dafür wurden zwei Vereinfachungen eingeführt. Da nur SH3^N mit dem C3G-Peptid wechselwirkt und zudem deutlich langsamer faltet als SH3^C wurde in dem Modell nur die Faltung von SH3^N berücksichtigt. Diese läuft für die *cis*Pro238 und die *trans*Pro238 Spezies gleich ab ($k_3 = k_5$ und $k_4 = k_6$). Zudem wurden die prolinlimitierten Faltungsphasen mit niedriger Amplitude vernachlässigt und ausschließlich die Isomerisierung an Pro238 berücksichtigt.

Die mikroskopischen Ratenkonstanten, die die einzelnen Reaktionen des Modells beschreiben, wurden aus den experimentellen Daten ermittelt. Für die Faltung werden die Ergebnisse aus der Chevron-Analyse für GgSH3^N-SH3^C verwendet ($k_3 - k_6$, Abbildung 3-2, Tabelle A 1). Für die Ligandenbindung wurden die k_{on} und k_{off} Werte aus den Assoziationsstudien von GgSH3^N-SH3^C mit C3G₁₈ angenommen (k_9 und k_{10} , Abbildung 3-5, Tabelle 3-2). Diese Werte entsprechen der Bindung des Liganden durch die *cis*Pro238 Spezies. Für die *trans*Pro238 Form wurden die Werte der isolierten SH3^N-Domäne verwendet (k_{11} und k_{12}), die Liganden ohne Einschränkungen binden kann (vgl. Abbildung A 1). Zusammengefasst bedeutet dies, dass die Geschwindigkeitskonstanten für die horizon-

talen Reaktionen in Abbildung 3-24 aus den Faltungs- und Bindungsstudien gut bekannt sind (vgl. 3.1.1).

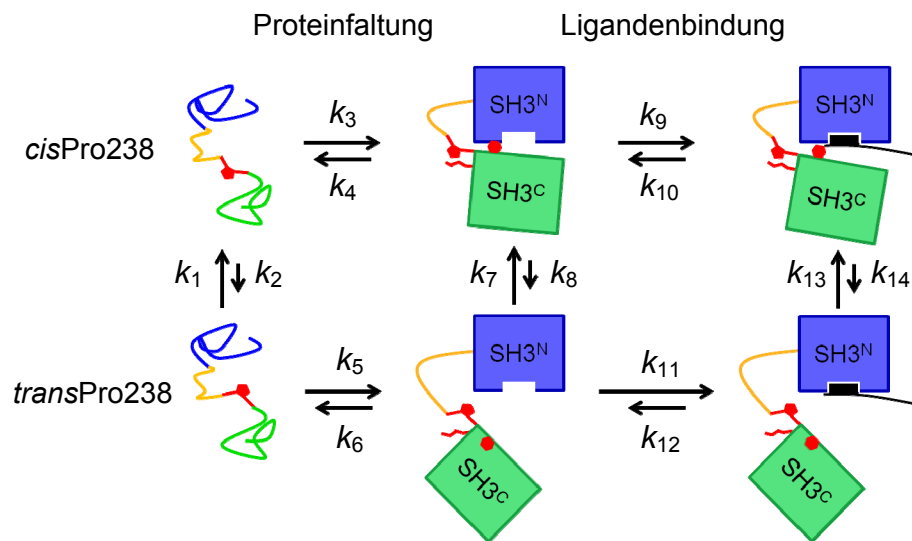


Abbildung 3-24: Doppelboxmodell zur Verknüpfung von Faltung und Funktion von GgSH3^N-SH3^C

Dargestellt sind die verschiedenen Zustände von GgSH3^N-SH3^C (entfaltet, nativ und im Komplex mit C3G₁₈) für jeweils die *cis*- und die *trans*Pro238 Spezies. In allen drei Zuständen existiert ein definiertes *cis/trans* Gleichgewicht an Pro238. Die mikroskopischen Ratenkonstanten (k_i), die das Modell beschreiben, sind angegeben.

Von besonderem Interesse sind jedoch die Raten der Prolylisomerisierung (*cis*→*trans*, k_{ct} und *trans*→*cis*, k_{tc}) in den drei Zuständen denaturiertes Protein, natives Protein und Protein-Ligand-Komplex (vertikale Reaktionen in Abbildung 3-24). Über diese Geschwindigkeitskonstanten wird das jeweilige *cis/trans* Gleichgewicht definiert (Gleichung 22).

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\textit{cis}]}{[\textit{trans}]} = \frac{k_{tc}}{k_{ct}} \quad 22$$

K_{eq}	Gleichgewichtskonstante
$[\textit{cis}]$	Anteil der Moleküle mit <i>cis</i> Pro
$[\textit{trans}]$	Anteil der Moleküle mit <i>trans</i> Pro
k_{tc}	Geschwindigkeitskonstante der <i>trans</i> → <i>cis</i> Isomerisierung (s^{-1})
k_{ct}	Geschwindigkeitskonstante der <i>cis</i> → <i>trans</i> Isomerisierung (s^{-1})

Für das denaturierte Protein wurde das *cis/trans* Gleichgewicht aus den Daten für isolierte GgSH3^C bestimmt, da in diesem Protein die *cis*Pro238 und die *trans*Pro238 Spezies getrennt zurückfalten. Aus den relativen Rückfaltungsamplituden konnte der *cis*-Anteil an Pro238 im entfaltenen Protein zu 11 % bestimmt werden (Abbildung 3-4b). Die Rate für die *cis*→*trans* Isomerisierung (k_2) im denaturierten Zustand ist aus den Doppelmischexperimenten (unterbrochene

Entfaltung, Abbildung 3-22d) zugänglich. Hier wird die Abnahme der Rückfaltungsamplitude der *cis*Pro238 Spezies (langsamere Rückfaltung, niedrigere Amplitude) von der *cis*→*trans* Isomerisierung an Pro238 dominiert und es ergibt sich ein Wert von $k_{ct} = k_2 = 0,035 \text{ s}^{-1}$. Aus dem *cis*-Anteil im denaturierten Protein (11 %) und der Rate k_2 kann mit Hilfe von Gleichung 22 die Rate der *trans*→*cis* Isomerisierung im entfalteten Protein $k_{tc} = k_1 = 0,004 \text{ s}^{-1}$ berechnet werden. Diese Werte stimmen gut mit den Daten überein, die für die Prolylisomerisierung in einem Tetrapeptid mit der gleichen Sequenz um Pro (GPF) beschrieben wurden ⁽¹⁴⁸⁾. Dies zeigt, dass Prolylisomerisierungsraten in entfalteten Proteinen nur von den unmittelbar benachbarten Aminosäureresten bestimmt werden.

Die Verdrängung des AEDANS-markierten Peptids im Verlauf der Rückfaltung von GgSH3^N-SH3^C zeigte bereits, dass anders als im entfalteten Zustand, im nativ gefalteten Protein *cis*Pro238 bevorzugt ist (Abbildung 3-11a). Die Verknüpfung des Faltungszustands mit der Ligandenbindung verdeutlichte dies (Abbildung 3-21a und d). Mit Hilfe des Vergleichs mit den Werten für die P238A Variante und für die isolierte SH3^N-Domäne (Abbildung 3-21b und d, Tabelle A 6) ist es möglich, den *cis*-Anteil von Pro238 im gefalteten Protein zu bestimmen. Diese beiden Bindungsexperimente erlauben es, die Gesamtamplitude der Assoziationsreaktion zu bestimmen. In beiden Fällen liegt ausschließlich der offene, hoch-affine Zustand vor und die Bindung führt zu einer Amplitude von etwa 0,80 V ± 0,04 V. Mit 0,5 µM Protein, 2 µM C3G₁₈ und einem K_D -Wert von 0,5 µM entspricht der Endwert von 0,80 V etwa 76 % Komplexbildung (Gleichung 12). Für GgSH3^NSH3^C wird ein Endwert von 0,41 V ± 0,03 V bestimmt, was somit ungefähr 39 % Komplexbildung entspricht. Diese 39 % setzen sich aus der Bindung von C3G₁₈ an die hoch-affine *trans*Pro238 Spezies und an die niedrig-affine *cis*Pro238 Spezies zusammen. Wie bereits ausgeführt, führen 0,5 µM GgSH3^N-SH3^C und 2 µM C3G₁₈ mit einem $K_D = 0,5 \text{ µM}$ zu 76 % Komplexbildung (für *trans*Pro238), für *cis*Pro238 ($K_D = 3,6 \text{ µM}$) zu 33 % Komplex. Diese Werte sind nur Näherungswerte, da sich 0,5 µM Protein auf die beiden Formen *cis*- und *trans*Pro238 aufteilen. Da die *cis/trans* Verteilung im nativen Protein jedoch nicht bekannt ist, stehen die exakten Proteinkonzentrationen zur Berechnung der prozentualen Komplexbildung nicht zur Verfügung. Die absolute Konzentration der beiden Spezies kann sich jedoch nur geringfügig ändern (maximal um 0,5 µM), wodurch auch die Komplexbildung ebenfalls nur minimal beeinflusst wird und die berechneten Werte somit für die Bestimmung des *cis*-Anteils im nativen Protein verwendet werden können.

Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Affinitäten ergibt sich gemäß Gleichung 23 ein *cis*-Anteil in nativ gefaltetem GgSH3^N-SH3^C von 86 % ± 5 % und ein *trans*-Anteil von 14 % ± 5 %. Die Fehlerangabe ist dabei eine Ab-

schätzung entsprechend der Ungenauigkeiten der Endwerte aus den Amplitudenauftragungen (Abbildung 3-21b und d).

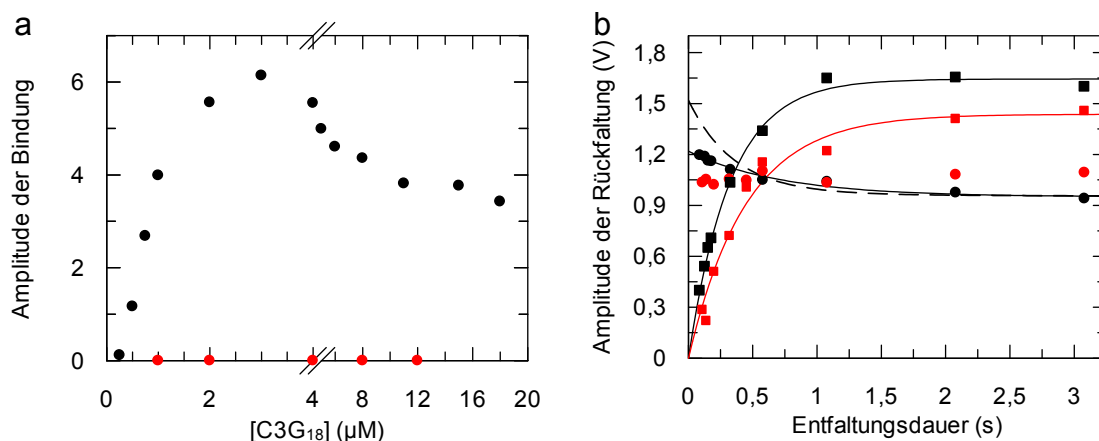
$$0,76 \cdot x + 0,33 \cdot (1 - x) = 0,39 \quad \mathbf{23}$$

x Anteil an *trans*Pro238 im gefalteten Protein

Im gleichen Experiment liefert die Abnahme der Amplitude der Ligandenbindung bei langer Rückfaltungsdauer (Abbildung 3-21d) Informationen über die Rate der Prolylisomerisierung im nativen Protein. In den Ausgangsbedingungen dieses Versuchs liegt GgSH3^N-SH3^C entfaltet vor und Pro238 nimmt damit größtenteils die *trans*-Konformation ein. Da die Abnahme der Bindungsamplitude mit zunehmender Rückfaltungsdauer durch die *trans*→*cis* Isomerisierung an Pro238 bestimmt wird, können aus dem Amplitudenverlauf und dem *cis/trans* Gleichgewicht die Geschwindigkeitskonstanten $k_7 = 0,007 \text{ s}^{-1}$ und $k_8 = 0,0013 \text{ s}^{-1}$ im kinetischen Mechanismus (Abbildung 3-24) bestimmt werden.

Die *cis* und *trans* Formen von GgSH3^N-SH3^C unterscheiden sich in ihrer Affinität gegenüber dem Peptidliganden C3G₁₈. Da GgSH3^N-SH3^C mit *trans*Pro238 mit höherer Affinität mit dem Peptid interagiert, muss in Anwesenheit des Liganden das Gleichgewicht hin zur *trans*Pro238 Spezies verschoben werden. Diese Beobachtung wurde experimentell durch eine langsame, prolinlimitierte Bindungsphase für GgSH3^N-SH3^C gemacht (Abbildung 3-10a).

Diese langsame Phase reflektiert die unterschiedlichen Affinitäten der *cis*- und der *trans*Pro238 Spezies und muss daher von der Ligandenkonzentration abhängig sein. Abbildung 3-25a zeigt die Amplitude dieser prolinlimitierten Bindungsreaktion. Solange die Ligandenkonzentration niedriger ist als der K_D -Wert der *cis*Pro238 Spezies wird nur wenig GgSH3^N-SH3^C mit *cis*Pro238 den Komplex mit C3G₁₈ bilden und daher findet auch nur eine geringe Gleichgewichtsverschiebung hin zu *trans*Pro238 statt. Mit steigender C3G₁₈-Konzentration nimmt diese Verschiebung zu, bis die Konzentration dem K_D -Wert für GgSH3^N-SH3^C mit *cis*Pro238 entspricht. Unter diesen Bedingungen sind die prolinlimitierte Bindung und die damit verbundene Gleichgewichtsverschiebung am größten. Wenn die Ligandenkonzentration weiter erhöht wird, nimmt die Amplitude der prolinlimitierten Bindungsreaktion wieder ab, da nun immer mehr Ligand in der schnellen Bindungsreaktion (*stopped-flow*) auch mit der *cis*Pro238 Spezies interagiert. Diese Gleichgewichtsverschiebung wird durch die Isomerisierung an Pro238 verursacht und tritt in der P238A Variante folglich nicht auf (Abbildung 3-25a). Vermutlich führt Prolylisomerisierung im Protein-Ligand-Komplex zu keiner Fluoreszenzänderung. Zusammen mit den Ergebnissen aus 3.1.1 bedeutet dieses Verhalten, dass die Bindung eines Liganden durch GgSH3^N-SH3^C tatsächlich nach einem Boxmodell verläuft.


 Abbildung 3-25: *cis/trans* Gleichgewichtsverschiebung durch Ligandenbindung

In (a) ist die Amplitude der prolinlimitierten Ligandenbindung an 1 μM Protein als Funktion der Ligandenkonzentration aufgetragen ($GgSH3^N-SH3^C$ schwarz, $GgSH3^N-SH3^C$ P238A rot; Anregung 295 nm, Emission 336 nm). *cis*Pro238 abhängige Domäneninteraktion in $GgSH3^N-SH3^C$, um das *cis/trans* Gleichgewicht im Protein-Ligand-Komplex zu bestimmen, wurde durch unterbrochene Entfaltung bestimmt (b). Quadrate geben die Werte für $SH3^N$ in $GgSH3^N-SH3^C$ wieder, Kreise die Werte für $SH3^C$. In rot sind die Ergebnisse für die Variante $GgSH3^N-SH3^C$ P238A dargestellt. Die Amplitude der Rückfaltung in Abwesenheit von $C3G_{18}$ (aus Abbildung 3-23d) ist als unterbrochene Linie eingetragen. Alle Versuche wurden in 100 mM Kaliumphosphat pH 7,4 bei 15 °C durchgeführt. Der Entfaltungspuls in (b) wurde ausgehend von 33 μM Protein und 66 μM $C3G_{18}$ in 100 mM Glycin, 3,0 M GdmCl, pH 2 durchgeführt. Die finalen Bedingungen waren 0,5 μM Protein, 1 μM $C3G_{18}$ in 100 mM Kaliumphosphat, 0,5 M GdmCl, pH 7,4. Die Fluoreszenzzunahme oberhalb von 320 nm wurde aufgezeichnet (Anregung 280 nm). Für alle Entfaltungsdauern wurden mindestens acht Kinetiken gemittelt und durch den Angleich von Exponentialfunktionen ausgewertet. Die Auswertungen der Amplitudenauftragungen sind in Tabelle A 6 zusammengefasst.

Im geschlossenen Zustand von $GgSH3^N-SH3^C$ (mit *cis*Pro238) ist die Fluoreszenz von $SH3^C$ durch Interaktionen mit $SH3^N$ deutlich erhöht. Dies führte zu der Beobachtung, dass die Rückfaltungsamplitude von $SH3^C$ mit der gleichen Kinetik abnimmt, mit der $SH3^N$ in $GgSH3^N-SH3^C$ entfaltet (Abbildung 3-23d). Bei diesem Experiment wurde $GgSH3^N-SH3^C$ in 3 M GdmCl pH 2 kurzzeit (≤ 100 ms) entfaltet, wodurch $SH3^N$ überwiegend nativ gefaltet blieb, $SH3^C$ jedoch vollständig denaturiert wurde. Mit längerer Entfaltungsdauer (≥ 2 s) entfaltet auch $SH3^N$ und die Amplitude der Rückfaltung von $SH3^C$ ist deutlich verringert. Diese Abnahme der Rückfaltungsamplitude von $SH3^C$ wurde einem *cis*-Anteil an Pro238 von 86 % zugeordnet.

Um die Gleichgewichtsverschiebung von *cis*Pro238 im nativen Protein hin zu *trans*Pro238 im Protein-Ligand-Komplex zu bestimmen (vgl. Abbildung 3-25a), wurde nun $GgSH3^N-SH3^C$ mit einem Überschuss an $C3G_{18}$ inkubiert, bis sich das *cis/trans* Gleichgewicht an Pro238 eingestellt hatte. Ausgehend von diesem Zustand wurde unterbrochene Entfaltung (Entfaltungspuls bei 3 M GdmCl, pH 2) durchgeführt. Wie im ligandenfreien Zustand des Proteins (Abbildung 3-23d)

zeigt sich, dass die Amplitude der Rückfaltung von SH3^C in GgSH3^N-SH3^C von dem Faltungszustand von SH3^N abhängt (Abbildung 3-25b). Die aufgezeichnete Rückfaltungsrate war bei allen Entfaltungsdauern konstant (Abbildung A 7b). Der Effekt (erhöhte Rückfaltungsamplitude von SH3^C in Anwesenheit gefalteter SH3^N) ist jedoch deutlich schwächer ausgeprägt, nachdem GgSH3^N-SH3^C mit einem Überschuss an C3G₁₈ präinkubiert wurde und bestätigt, dass durch Bindung von C3G₁₈ die *trans*Pro238 Spezies von GgSH3^N-SH3^C bevorzugt wird. Die P238A Variante zeigte diese Beeinflussung der Rückfaltungsamplitude von SH3^C durch gefaltete SH3^N nicht, da die Gly237-Ala238 Peptidbindung immer in *trans*-Konformation und GgSH3^N-SH3^C P238A somit permanent offen vorliegt. Da in diesem Zustand keine Domäneninteraktionen zwischen SH3^N und SH3^C aufgebaut werden können, wird die Rückfaltungsamplitude von SH3^C nicht beeinflusst. Dies gilt für GgSH3^N-SH3^C P238A alleine und für GgSH3^N-SH3^C P238A in Komplex mit C3G₁₈ (Abbildung 3-23d und Abbildung 3-25b).

Die Amplitude der Rückfaltung von SH3^C in Abhängigkeit des Faltungszustands von SH3^N in GgSH3^N-SH3^C nimmt um $0,56 \pm 0,05$ V ab (Abbildung 3-23d), was entsprechend der Analyse der Bindung als Funktion der Rückfaltungsdauer (Abbildung 3-21d) einem *cis*Pro238-Anteil von 86 % entspricht. Wird GgSH3^N-SH3^C mit einem Überschuss an C3G₁₈ präinkubiert, beträgt die Abnahme der Rückfaltungsamplitude von SH3^C nur noch $0,27 \pm 0,02$ V (Abbildung 3-25b). Aus der Differenz der beiden Amplituden ($0,29$ V) und dem *cis*Pro238-Anteil im nativen Protein (86 %) ergibt sich ein *cis*Pro238-Anteil im Protein-Ligand-Komplex von 41 %.

Die mikroskopischen Ratenkonstanten der Isomerisierung im peptidgebundenen Zustand können aus diesem Gleichgewicht und der makroskopischen Geschwindigkeitskonstante der Ligandenbindung nach manueller Mischung berechnet werden (Abbildung 3-25a). Da diese Bindungsreaktion durch Prolylisomerisierung limitiert wird, ist sie unabhängig von der Ligandenkonzentration (Abbildung A 7a) und beträgt etwa $0,008$ s⁻¹. Dieser Wert entspricht der Summe der mikroskopischen Ratenkonstanten $k_{13} + k_{14}$ aus dem Modell in Abbildung 3-24. Die *cis/trans* Verteilung von 41/59 führt gemäß Gleichung 22 zu Werten von $k_{13} = 0,0032$ s⁻¹ und $k_{14} = 0,0048$ s⁻¹.

3.1.3.4 Kinetische Simulation der Faltung und Funktion von c-CrkII aus dem Huhn

Ausgehend von den Analysen der Doppelmischexperimente in 3.1.3.3 und den ermittelten mikroskopischen Ratenkonstanten wurden theoretische Berechnungen zur Faltung und zur Interaktion von GgSH3^N-SH3^C mit C3G₁₈ durchgeführt. Alle verwendeten Parameter sind zur Übersicht in Tabelle A 7 zusammengefasst.

Um zu überprüfen, ob das Sechs-Spezies-Doppelboxmodell in Abbildung 3-24 die Faltung und Funktion von c-CrkII aus dem Huhn tatsächlich beschreiben kann, wurden Simulationen mehrerer Schlüsselexperimente durchgeführt (Abbildung 3-27). Dabei wird die zeitliche Änderung jeder einzelnen Spezies des Modells durch eine Differentialgleichung beschrieben (Gleichung 16 - 21). Um die Daten direkt mit den experimentellen Daten vergleichen zu können, wurden die berechneten Änderungen für die Protein-Ligand-Komplexe (mit *cis*Pro238 und *trans*Pro238) addiert.

In Abwesenheit von C3G₁₈ (0 μM) kann auf diese Weise zunächst die Faltungsreaktion analysiert werden (Abbildung 3-26). Dabei wird deutlich, wie die Population mit *trans*Pro238 nach der konformationellen Faltung in die *cis*Pro238 Spezies umgewandelt wird.

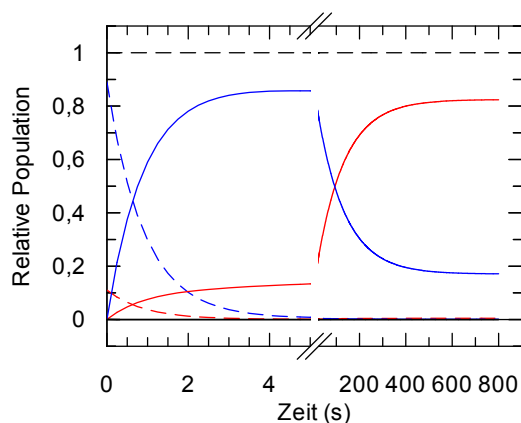


Abbildung 3-26: Simulation der Rückfaltung von GgSH3^N-SH3^C

Der berechnete Zeitverlauf der Faltung und Prolylisomerisierung von *trans*Pro238 nach *cis*Pro238 ist dargestellt. In blau ist die *trans*Pro238 Spezies gezeigt, in rot die *cis*Pro238 Spezies (unterbrochene Linie - entfaltetes Protein, durchgezogene Linie – natives Protein). Die schwarze, unterbrochene Linie entspricht der Summe aller Spezies in dem Modell.

Die somit erhaltenen relativen Populationen der sechs Spezies als Funktion der Rückfaltungsdauer sind experimentell nicht zugänglich. Sie wurden als Startwerte für die Berechnung der Ligandenbindung an definierte Faltungszustände verwendet (Abbildung 3-27a). Da die Assoziationsreaktion bei 2 μM Peptid (ent-

spricht den experimentellen Bedingungen in Abbildung 3-21d) 100-mal schneller abläuft als die konformationelle Faltung, können die beiden Prozesse sehr gut voneinander getrennt werden.

Die berechnete Amplitude der Bindung von C3G₁₈ als Funktion der Rückfaltungsdauer von GgSH3^N-SH3^C folgt den experimentell bestimmten Daten sehr gut (Abbildung 3-27a). In einer ersten, schnellen Reaktion nimmt die Amplitude der Bindung stark zu, was der konformationellen Faltung von SH3^N entspricht. Nach etwa zehn Sekunden beginnt die Amplitude jedoch wieder abzunehmen, da durch die voranschreitende *trans*→*cis* Isomerisierung an Pro238 der geschlossene, niedrig-affine Zustand eingenommen wird, der von schwachen Domäneninteraktionen bestimmt wird.

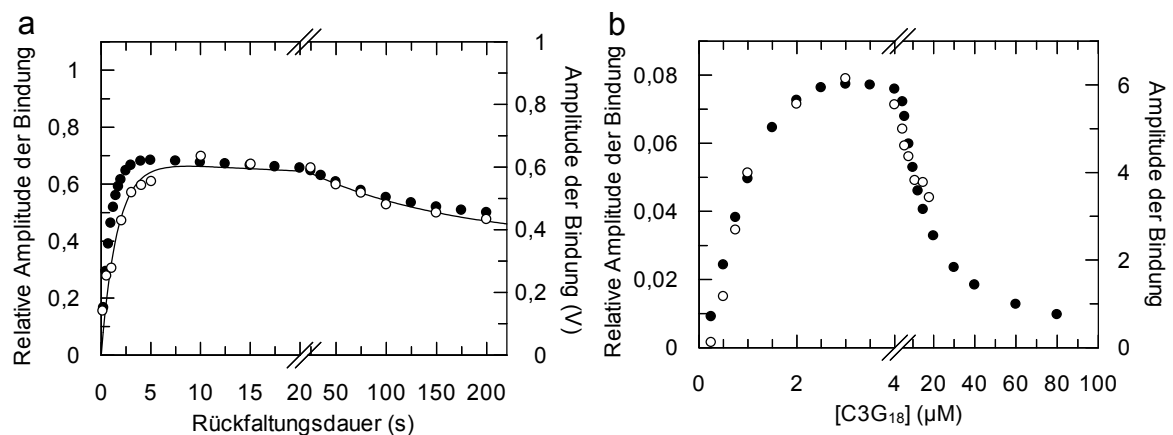


Abbildung 3-27: Berechnete Daten zur Interaktion von GgSH3^N-SH3^C mit C3G₁₈

Die berechnete Amplitude der Bindung als Funktion der Rückfaltungsdauer (ausgefüllte Kreise) für 0,5 µM GgSH3^N-SH3^C und 2 µM C3G₁₈ ist in (a) dargestellt (mit der linken Ordinate assoziiert). Die berechnete Amplitude der prolinlimitierten Bindung in Abhängigkeit der Peptidkonzentration (ausgefüllte Kreise) ist in (b) aufgetragen (mit der linken Ordinate assoziiert). Die jeweiligen experimentellen Daten (aus Abbildung 3-21d und Abbildung 3-25a) sind als offene Kreise dargestellt und jeweils mit der rechten Ordinate assoziiert.

Die präferenzielle Bindung des Peptidliganden an die offene, hoch-affine Form von GgSH3^N-SH3^C mit *trans*Pro238 führt zu einer Gleichgewichtsverschiebung von *cis*Pro238 (im nativen Protein) zu *trans*Pro238 (im Protein-Ligand-Komplex) während der Interaktion mit Liganden. Das Ausmaß der Verschiebung und die Amplitude der aufgezeichneten Reaktion sind daher von der Ligandenkonzentration abhängig (Abbildung 3-27b und Abbildung 3-28). Je mehr Ligand anwesend ist, desto stärker wird die *trans* Spezies bevorzugt. Allerdings ist die Verschiebung nicht vollständig, sondern nähert sich lediglich einem Wert von etwa 60 % *trans*Pro238 an (Abbildung 3-25b, Abbildung 3-27a und Abbildung 3-28). Da oberhalb des K_D -Wertes für die *cis*Pro238 Spezies ($K_D = 3,6 \mu\text{M}$) auch diese zu einem Großteil in der schnellen Assoziationsreaktion (*stopped-flow*

Messung) mit Liganden interagiert, nimmt die Amplitude der prolinlimitierten Reaktion ab. Auch dabei stimmen die berechneten Werte nach einem Sechs-Spezies-Doppelboxmodell mit den experimentellen Daten sehr gut überein (Abbildung 3-27b).

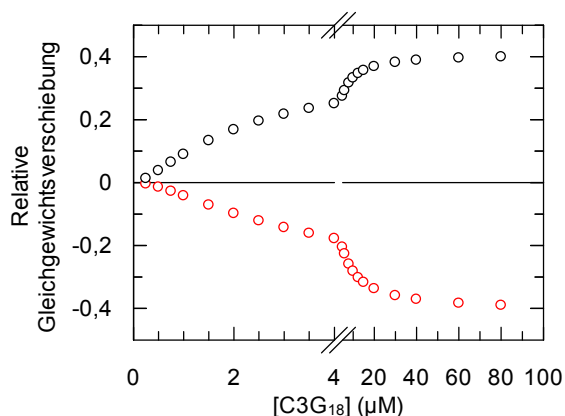


Abbildung 3-28: Relative *cis/trans* Gleichgewichtsverschiebung als Funktion der Ligandenkonzentration

Aufgetragen sind die berechneten Werte der *cis/trans* Gleichgewichtsverschiebung (nach 800 s Assoziationsdauer) als Funktion der Peptidkonzentration. Schwarze Kreise zeigen die Zunahme der *trans*Pro238 Spezies mit steigender Ligandenkonzentration, rote Kreise die Abnahme der *cis*Pro238 Population.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Doppelmischexperimente, dass SH3^N-SH3^C aus Mensch und Huhn in der Tat unterschiedlich reguliert sind. Dieses vereinfachte System (ohne SH2-Domäne) kann in Bezug auf Prolyliso-merisierung im nativen Zustand auch auf das Gesamtprotein c-CrkII übertragen werden (vgl. 3.1.1 und Abbildung A 2). Die berechneten mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten konnten in dem Sechs-Spezies-Doppelboxmodell (Abbildung 3-24) verwendet werden, um Schlüsselexperimente durch theoretische Berechnungen zu bestätigen. Alle Teilpopulationen des Modells und die *cis/trans* Gleichgewichte in allen Faltungszuständen sind dabei notwendig, um die experimentellen Daten zu bestätigen. Daher ist das Modell die einfachste Beschreibung dafür, wie in c-CrkII aus dem Huhn während der Faltung das *cis/trans* Verhältnis von 11/89 im denaturierten Protein zu 86/14 im gefalteten Protein verschoben wird. Die Energie für diese Gleichgewichtsverschiebung wird dabei durch schwache Domäneninteraktionen bereitgestellt (Abbildung 3-23d). Durch Interaktion mit einem Liganden wird das Verhältnis zu 41/59 verschoben (Abbildung 3-25b), was dem Gleichgewicht in der isolierten SH3^C-Domäne entspricht (Abbildung 3-22d). Das Aufheben der Domänenassoziation ist daher nicht mit einer Entfaltungsreaktion verknüpft, sondern führt zu einem offenen Zustand in dem sich die beiden SH3-Domänen wie zwei isolierte Proteine verhalten.

3.1.4 Tyrosin-Phosphorylierung von c-CrkII

Die bisherigen Ergebnisse konzentrierten sich auf die Regulation von c-CrkII durch Prolylisomerisierung. Wie beschrieben (1.5) kann c-CrkII jedoch auch spezifisch an zwei Tyrosinresten phosphoryliert und dadurch autoinhibiert werden (196, 208). Da eine der beiden Phosphorylierungsstellen im Linkerbereich zwischen den SH3-Domänen liegt (an Position 222) ist es vorstellbar, dass die Modifikation dieses Restes Auswirkungen auf die Regulation durch Prolylisomerisierung am Ende des Linkers hat. Um mögliche Zusammenhänge dieser beiden Regulationsebenen zu überprüfen wurde c-CrkII *in vitro* durch ein Fragment der Abelson-Kinase (Abl-Kinasedomäne, Abl-KD) phosphoryliert und die Auswirkungen auf die Stabilität, die Faltung und die Ligandenbindung analysiert.

3.1.4.1 c-CrkII wird durch die Abl-Kinase spezifisch phosphoryliert

Phosphorylierung von c-CrkII an Tyr222 führt zu einer Autoinhibition des Proteins, da das pTyr222-Motiv intramolekular mit der Bindungsstelle für pTyr-Proteine der SH2-Domäne interagiert (196, 199). Dadurch wird die Signalaufnahme durch SH2 unterbunden. Über Effekte auf die Signalweitergabe durch SH3^N ist nur wenig bekannt. Es ist jedoch vorstellbar, dass durch die Umstrukturierung des Linkers auch die Ligandenbindungsstelle für polyPro-Motive auf SH3^N verborgen wird. Für die zweite Phosphorylierungsstelle, Tyr252, wurde vorgeschlagen, dass die posttranslationale Modifikation dieses Restes zu einer Transaktivierung der Abl-Kinase führt (208). Um die Effekte der Tyrosinphosphorylierung genauer zu untersuchen, wurden Varianten mit jeweils nur einer Phosphorylierungsstelle hergestellt. c-CrkII Y252F kann nur noch an dem ersten Tyr modifiziert werden (c-CrkII P1), c-CrkII Y222F nur noch an dem zweiten Tyr (c-CrkII P2).

Die Phosphorylierung an Tyr222 führt zu einer Umlagerung des Linkers, die die gesamte Proteinstruktur von c-CrkII betrifft (Abbildung 3-29a). Besonders die Beweglichkeit des flexiblen Linkers wird stark verringert und das Protein dadurch deutlich kompakter. In Kombination mit den zusätzlich eingebrachten Ladungen führt die spezifische Phosphorylierung dazu, dass die phosphorylierte Form von c-CrkII (pCrkII) ein verändertes Laufverhalten bei nativer Polyacrylamid-gelelektrophorese (PAGE) aufweist. Dadurch kann native PAGE verwendet werden, um die Kinetik der Phosphorylierung von c-CrkII aufzuzeichnen (Abbildung 3-29b).

Unter den gewählten Bedingungen ist gereinigte Abl-KD in der Lage einen 100-fachen molaren Überschuss an c-CrkII vollständig zu phosphorylieren.

Bereits nach 30 min ist nur noch die Bande für pCrkII sichtbar, die Bande für unphosphoryliertes c-CrkII komplett verschwunden (Abbildung 3-29b). Ein ähnliches Verhalten wird für c-CrkII P1 beobachtet. Auch diese Variante, die nur das erste Tyr trägt, das modifiziert wird, wird unter den gleichen Bedingungen vollständig phosphoryliert. Allerdings ist der Umsatz verlangsamt und auch nach 60 min ist noch ein geringer Anteil an unphosphoryliertem Protein detektierbar (Abbildung 3-29b). Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass pTyr252, wie in der Literatur beschrieben, trans-aktivierend auf die Abl-Kinase wirkt. Die Variante, die an Tyr252 nicht phosphoryliert werden kann, wird somit an Tyr222 langsamer phosphoryliert.

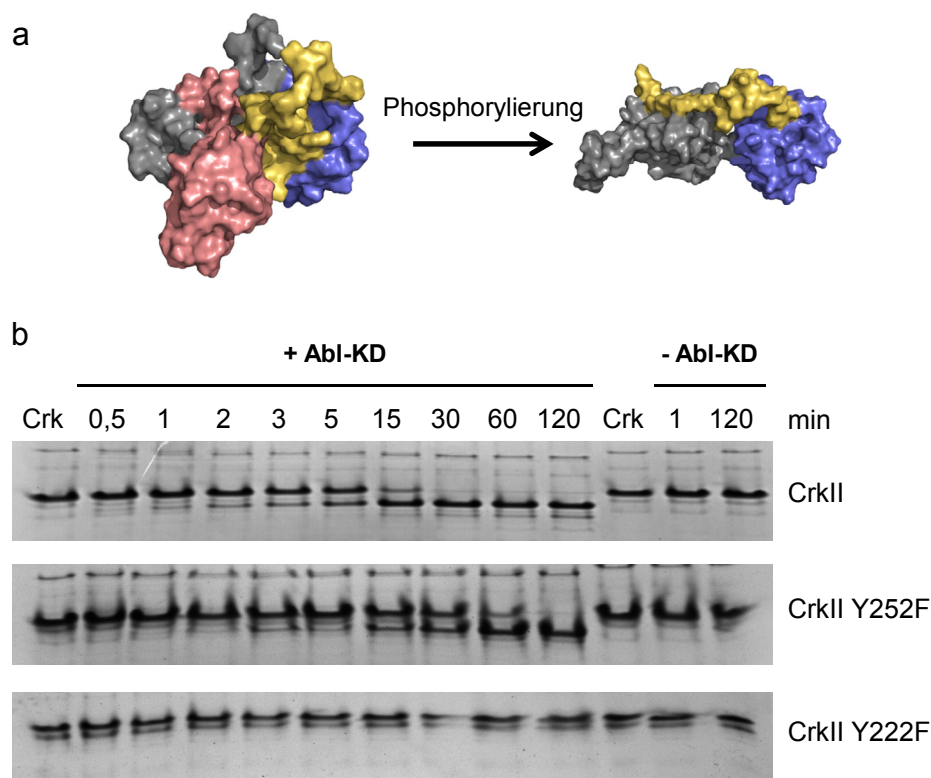


Abbildung 3-29: Phosphorylierung von humanem c-CrkII

Gezeigt sind (a) die NMR-Strukturen von humanem c-CrkII (PDB: 2EYZ⁽¹⁹⁶⁾) und pCrkII (PDB: 2DVJ⁽¹⁹⁶⁾) in der Oberflächendarstellung. SH2 ist grau, SH3^N blau, SH3^C rot und der Linkerbereich gelb gefärbt. Die Abbildungen wurden mit PyMol erstellt⁽¹⁴⁴⁾. In (b) ist die Kinetik der Phosphorylierung von c-CrkII durch Abl-KD gezeigt. 10 μ M der jeweiligen Proteinvariante in 20 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, pH 7,6, 1 mM DTT, 1 mM ATP wurden bei 25 °C in An- oder Abwesenheit von 0,1 μ M Abl-KD inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und die Phosphorylierung durch Zugabe von 20 mM EDTA abgestoppt. Anschließend wurden die Proben durch native PAGE analysiert.

Ist hingegen nur Tyr252 als Phosphorylierungsstelle vorhanden (c-CrkII P2), ändert sich unter den gewählten Bedingungen das Laufverhalten bei nativer PAGE nicht (Abbildung 3-29b). Da die native PAGE bei pH 9 durchgeführt wird, weist das unmodifizierte Protein eine hohe negative Ladung auf. Daher ist die

Ladungsänderung durch Phosphorylierung an einem Tyr ohne gleichzeitige Strukturänderung vermutlich nicht ausreichend, um das Laufverhalten während nativer PAGE zu verändern. Da das Fehlen der Phosphorylierungsstelle an Tyr252 jedoch die Kinetik der Modifikation an Tyr222 beeinflusst, ist davon auszugehen, dass Tyr252 unter den gewählten Bedingungen phosphoryliert wurde. Warum c-CrkII Y252F bei nativer PAGE als Doppelbande läuft ist unklar.

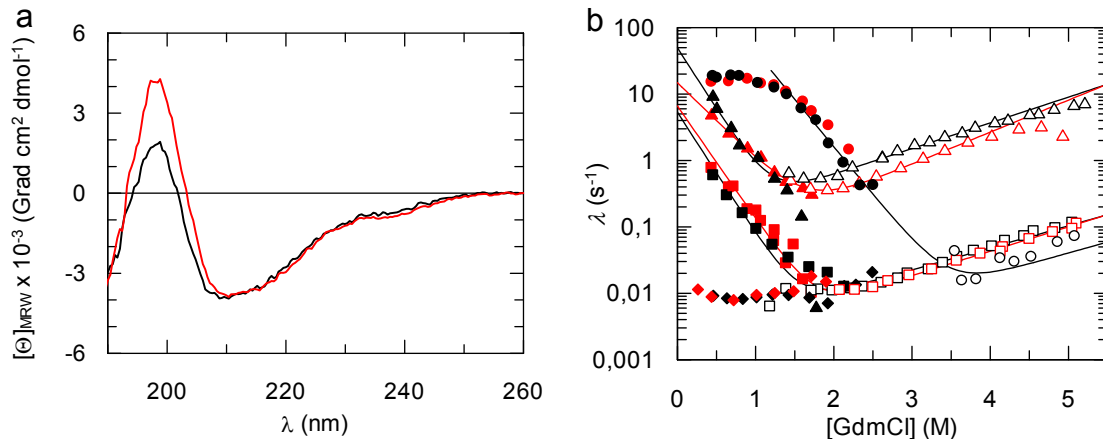


Abbildung 3-30: Auswirkung der Phosphorylierung von humanem c-CrkII auf die Struktur und die Stabilität

Die molare Elliptizität pro Aminosäure ist in (a) für die humanen Proteine c-CrkII (schwarz) und pCrkII (rot) gezeigt. Gemessen wurde mit 5 μM Protein in 10 mM Kaliumphosphat, pH 7,4 bei 15 $^{\circ}\text{C}$. Die Raten der Ent- und Rückfaltung (ausgefüllte und offene Symbole) sind in (b) für die gleichen Proteine und mit den Farben wie in (a) dargestellt. Kreise geben die Faltungsraten von SH2, Quadrate die von SH3^N und Dreiecke die von SH3^C wieder. Gemessen wurde mit 0,5 μM Protein in 100 mM Kaliumphosphat, 0 – 6 M GdmCl, pH 7,4 bei 15 $^{\circ}\text{C}$. Die Fluoreszenz wurde nach Anregung bei 280 nm oberhalb von 320 nm (*stopped-flow*) oder bei 330 nm (manuelle Mischung) aufgezeichnet. *Stopped-flow* Kinetiken wurden sechsmal gemessen, gemittelt und durch den Angleich von Exponentialfunktionen ausgewertet. Die Chevron-Auswertung wurde nach einem Zwei-Zustands-Modell durchgeführt (Tabelle A 8).

Im Einklang mit den NMR-Analysen zu pCrkII und dem veränderten Laufverhalten der Proteinvarianten bei nativer PAGE zeigen die fern-UV CD-Spektren, dass die Phosphorylierung von humanem c-CrkII zu einer stärkeren Strukturierung führt (Abbildung 3-30a). Dies drückt sich in einem stärker positiven CD-Signal im Wellenlängenbereich zwischen 190 nm und 200 nm aus. Unstrukturierte Bereiche zeigen bei 195 nm ein negatives CD-Signal. Vermutlich wird die Beweglichkeit des Linkers durch die Interaktion mit SH2 deutlich eingeschränkt und das CD-Signal bei 195 nm dadurch stärker positiv. Der Circular dichroismus im Bereich von 208 nm bis 225 nm wird durch die Sekundärstruktur eines Proteins dominiert. Hier zeigen sich keine phosphorylierungsabhängigen Änderungen.

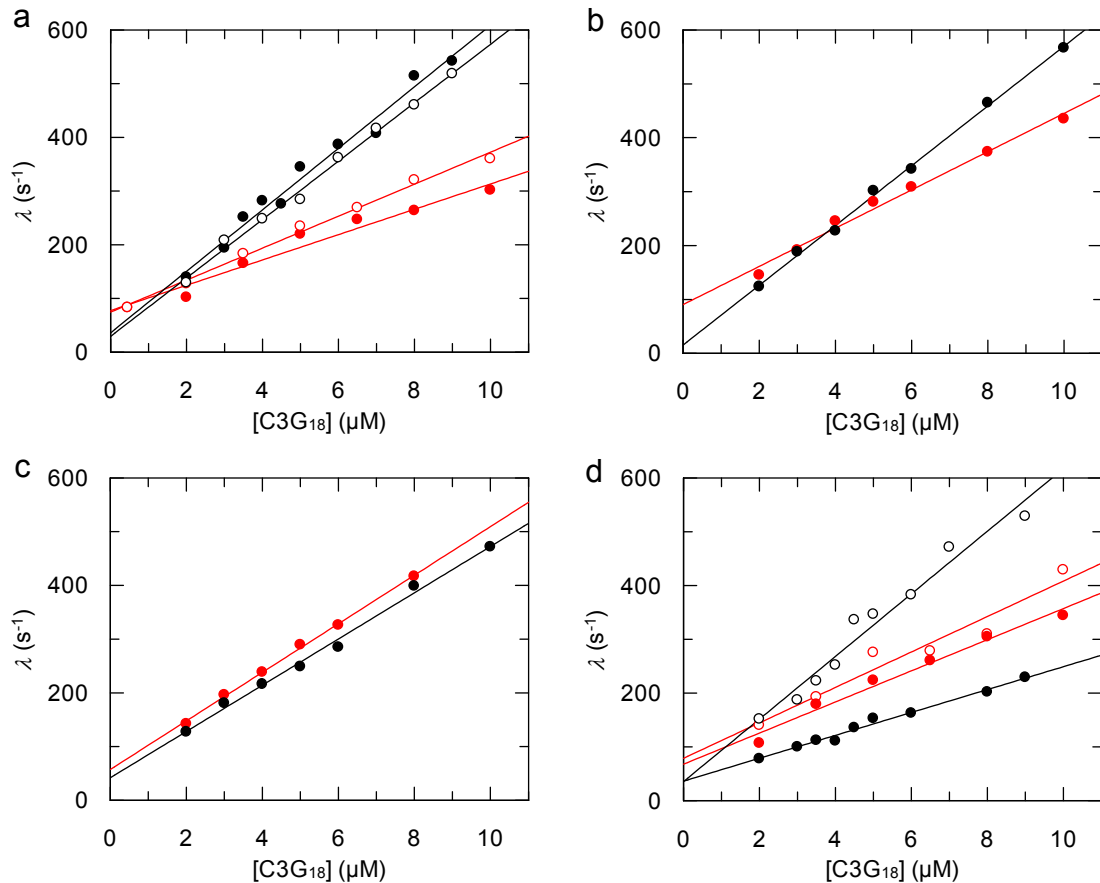
Werden die Faltungskinetiken und die Stabilität des phosphorylierten Proteins betrachtet, fällt auf, dass SH3^C in pCrkII leicht stabilisiert wird, relativ zu SH3^C in c-CrkII. Die verlangsamte Entfaltung von SH3^C in p-CrkII (Abbildung 3-30b, rote Dreiecke) weist auf eine Stabilisierung des nativen Zustands hin. Der Effekt ist jedoch sehr gering. Da die Faltungsstudien unter Hochsalzbedingungen durchgeführt wurden ($\geq 0,5$ M GdmCl) ist anzunehmen, dass elektrostatische Effekte durch Phosphorylierung bei den Faltungsexperimenten nur geringe Einflüsse auf die Ergebnisse haben.

3.1.4.2 Einfluss der Tyrosin-Phosphorylierung an c-CrkII auf die Ligandenbindung durch SH3^N

Durch die Phosphorylierung interagiert pTyr222 aus dem Linkerbereich zwischen den beiden SH3-Domänen mit der pTyr-Bindungsstelle in SH2 und verhindert dadurch die Signalaufnahme durch c-CrkII (Abbildung 3-29a). Ob gleichzeitig auch die Signalweiterleitung durch SH3^N in pCrkII betroffen ist, ist unklar. Die bisherigen Daten zu pCrkII stammen aus NMR-Analysen. Dabei wurde ein verkürztes Konstrukt von *HsCrkII* verwendet, das zwar den Linker nach SH3^N bis Position 229 einschließt, dem jedoch die gesamte SH3^C-Domäne fehlt. Zudem wurde nicht das C3G-Peptid verwendet, sondern ein Peptid, das von einem anderen physiologischen Bindungspartner stammt, der mit niedrigerer Affinität mit c-CrkII interagiert ⁽¹⁹⁶⁾.

Hier sollten die Vollängenproteine c-CrkII aus Mensch und Huhn durch Abl-KD *in vitro* phosphoryliert werden, um die Assoziation von C3G₁₈ mit verschiedenen Proteinvarianten zu untersuchen (Abbildung 3-31). Für humanes pCrkII wurden zwei Effekte beobachtet. Zum Einen ist die Rate der Assoziation mit C3G₁₈ (k_{on}) verlangsamt und liegt mit $23 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ im gleichen Bereich wie die Rate der Assoziation von C3G₁₈ mit dem niedrig-affinen Zustand (mit *cis*Pro238) von c-CrkII aus dem Huhn (Tabelle 3-5). Zum Anderen ist die Dissoziationsrate (k_{off}) erhöht.

Da die Phosphorylierung von *HsCrkII* auf die Assoziation mit C3G₁₈ ähnliche Auswirkungen hat wie die *cis*-Konformation an Pro238 in *GgCrkII*, sollte überprüft werden, ob durch Phosphorylierung des humanen Proteins eine prolinabhängige Regulation induziert wird. Dafür wurde die Variante *HsCrkII* P238A phosphoryliert und die Bindung an das C3G-Peptid gemessen (Abbildung 3-31a). *Hs*-pCrkII P238A interagiert mit C3G₁₈ nahezu identisch wie das phosphorylierte Wildtypprotein (Tabelle 3-5). Dies deutet daraufhin, dass die nach Phosphorylierung von *HsCrkII* beobachtete Verschlechterung der Bindung von C3G₁₈ nicht durch eine Kopplung an den individuellen, isomeren Zustand an Pro238 verursacht wird.


 Abbildung 3-31: Assoziation von pCrkII mit C3G₁₈

Dargestellt ist die Interaktion von C3G₁₈ mit (a) HsCrkII (ausgefüllte Kreise), HsCrkII P238A (offene Kreise), (b) HsCrkII Y252F, (c) HsCrkII Y222F und (d) GgCrkII (ausgefüllte Kreise) sowie GgCrkII P238A (offene Kreise). Die jeweiligen phosphorylierten Proteinvarianten sind in rot dargestellt. Die Experimente wurden in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4 bei 15 °C durchgeführt (Anregung 295 nm, Emission oberhalb von 320 nm). Für jede C3G₁₈-Konzentration wurden mindestens acht Kinetiken aufgenommen, gemittelt und durch den Angleich von Exponentialfunktionen an die Daten ausgewertet. Durch lineare Regression wurde aus den Ratenauftragungen k_{on} und k_{off} für alle Varianten bestimmt (Tabelle 3-5).

Um die Frage zu beantworten, welche Auswirkungen die einzelnen Phosphorylierungen (an Tyr222 und an Tyr252) auf die Ligandenbindung haben, wurden die Varianten Hs-pCrkII P1 und Hs-pCrkII P2 ebenfalls analysiert (Abbildung 3-31b und c, Tabelle 3-5). Als Referenzen wurden dabei die jeweiligen unphosphorylierten Varianten analysiert. Für die Variante HsCrkII P1 werden die gleichen Effekte beobachtet wie für das Wildtypprotein. Im phosphorylierten Zustand ist k_{on} erniedrigt und k_{off} erhöht. Dabei ist die Verlangsamung der Assoziation nicht so stark ausgeprägt wie in pCrkII. HsCrkII P2 hingegen bindet in unphosphorylierter und in phosphorylierter Form gleich gut an C3G₁₈. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Autoinhibition von c-CrkII durch die Interaktion von pTyr222 mit der Bindungsstelle auf SH2 verursacht wird.

Diese intramolekulare Bindung führt zu einer Umstrukturierung des Linkerbereichs zwischen den SH3-Domänen und verdeckt die Ligandenbindungsstelle auf SH3^N, wodurch sowohl die Assoziations- als auch die Dissoziationsrate beeinflusst werden. Allerdings ist der beobachtete Effekt auf pCrkII damit nicht vollständig zu erklären. Es ist vorstellbar, dass durch die Phosphorylierung an Tyr252 (pCrkII P2) weitere Interaktionen eines pTyr-Motivs mit regulatorisch wichtigen Bereichen von c-CrkII ausgebildet werden, sobald dieses Motiv durch eine pTyr222-abhängige Umlagerung in räumliche Nähe einer bisher unbekanntenen Bindungsstelle gebracht wird ⁽²⁰⁹⁾. Dies bleibt jedoch spekulativ, da für das phosphorylierte Gesamtprotein (inklusive SH3^C-Domäne) keine Strukturdaten zur Verfügung stehen.

Tabelle 3-5: Parameter aus den Bindungsexperimenten von pCrkII mit C3G₁₈

Proteinvariante		k_{off} (s ⁻¹)	k_{on} (μM ⁻¹ s ⁻¹)	$k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ (μM)
Homo sapiens	CrkII	36 ± 16	57 ± 3	0,63
	pCrkII	77 ± 9	24 ± 1	3,21
	CrkII P237A	29 ± 10	54 ± 2	0,54
	pCrkII P237A	74 ± 6	30 ± 1	2,47
	CrkII P1	15 ± 7	55 ± 1	0,27
	pCrkII P1	90 ± 10	36 ± 2	2,50
	CrkII P2	42 ± 9	43 ± 2	0,98
	pCrkII P2	57 ± 5	45 ± 1	1,27
Gallus gallus	CrkII	36 ± 5	21 ± 1	1,71
	pCrkII	72 ± 13	27 ± 2	2,67
	CrkII P237A	35 ± 22	58 ± 4	0,60
	pCrkII P237A	95 ± 25	28 ± 4	3,39

Tabelle 3-5 fasst die Parameter aus den Bindungsstudien zu den verschiedenen pCrkII Varianten zusammen (Abbildung 3-29). Die Raten der Assoziation (k_{on}) und der Dissoziation (k_{off}) sowie der daraus resultierende K_{D} -Wert ($k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$) sind angegeben. Die Fehlerangaben sind die Standardfehler der linearen Regression. Alle Ergebnisse wurden in unabhängigen Experimenten reproduziert.

Die Phosphorylierung von *Hs*CrkII führt zu einem Bindungsverhalten, das ähnlich zu der niedrig-affinen Spezies von c-CrkII aus dem Huhn ist (mit *cis*Pro238). Es gibt jedoch keine Hinweise darauf, dass *Hs*-pCrkII durch Prolyl-isomerisierung reguliert wird. In weiterführenden Experimenten wurden auch das Volllängenprotein c-CrkII aus dem Huhn, sowie die P238A Variante phosphoryliert und die Kinetik der Bindung an C3G₁₈ analysiert (Abbildung 3-31d). In *Gg*-pCrkII bleibt die Rate der Assoziation nahezu unverändert zu dem unmodifizierten Protein, k_{off} ist ähnlich stark erhöht wie in *Hs*-pCrkII. Die Variante

Gg-pCrkII P238A verhält sich sehr ähnlich zu dem phosphorylierten Wildtypprotein *Gg*-pCrkII (Abbildung 3-31d).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Phosphorylierung von c-CrkII nicht nur die Signalaufnahme durch SH2 beeinflusst, sondern dass auch die Signalweiterleitung durch SH3^N verändert wird. pCrkII liegt daher wirklich in einem autoinhibierten Zustand vor, in dem die Adapterfunktion des Proteins insgesamt unterdrückt wird. Besonders interessant ist die Beobachtung, dass *Gg*-pCrkII und *Gg*-pCrkII P238A nahezu identische Affinitäten gegenüber C3G₁₈ aufweisen. Die Raten der Assoziation mit C3G₁₈ verlaufen für die Wildtypproteine c-CrkII sowie die Varianten c-CrkII P238A nahezu identisch (Abbildung 3-31a und d, rote Symbole). Vermutlich wird c-CrkII hauptsächlich durch Phosphorylierung reguliert. Die beschriebene Prolylisomerisierung an Pro238 im Protein aus dem Huhn (3.1.1, 3.1.2, 3.1.3) dient womöglich als Ebene der zusätzlichen Feinregulation des unphosphorylierten Proteins.

3.2 Regulation von Cyclophilin D

Prolylisomerisierung ist seit langem als geschwindigkeitsbestimmender Schritt vieler Proteinfaltungsreaktionen bekannt (vgl. 3.1.1). Desweiteren kann Prolylisomerisierung im nativen Zustand eines Proteins verwendet werden, um dessen Funktion zu regulieren (vgl. 3.1.3). Es gibt in der Natur daher Enzyme, die diese Schritte beschleunigen (vgl. 1.4), um im zellulären Kontext möglichst schnell funktionale Proteine zu erhalten und um ebenso schnell auf äußere Einflüsse reagieren zu können und Signale in dem nötigen Zeitrahmen weiterzuleiten.

3.2.1 Mitochondriales Cyclophilin D

Mitochondriales Cyclophilin D (mCypD) wurde 1996 als Bestandteil der mitochondrialen Permeabilitätspore (mPTP) identifiziert ⁽²¹⁰⁾. Neben mCypD werden der Adeninnukleotidtransporter und der Phosphattransporter als weitere Bestandteile dieser Pore diskutiert. Durch Deletionsexperimente konnte jedoch nur mCypD als essentieller Bestandteil der Pore bestätigt werden ^(174, 175). Vermutlich ist die mPTP ein Multiproteinkomplex. Unkontrolliertes Öffnen der Pore führt zu einem nicht-selektiven Ausstrom von Ca^{2+} und wird häufig nach oxidativer Schädigung von Geweben beobachtet (z.B. nach Schlaganfällen oder Herzinfarkten). Unkontrolliertes Öffnen der mPTP führt zu vollständigem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und nekrotischem Zelltod. 2012 beobachtete die Gruppe von Ute Moll, dass das Tumorsuppressorprotein p53 in der Matrix von Mitochondrien mit mCypD interagiert und die mPTP dadurch geöffnet wird ⁽¹⁷⁸⁾. Durch *pull-down*-Experimente konnte dabei die Interaktionsfläche auf p53 kartiert werden. Es wurde gezeigt, dass die DNA-Bindedomäne von p53 (p53-DBD) für die Wechselwirkungen mit mCypD verantwortlich ist.

3.2.2 Das Tumorsuppressorprotein p53

p53 ist eines der wichtigsten Tumorsuppressorproteine und hauptsächlich als Transkriptionsfaktor bekannt. Durch Bindung regulatorischer DNA-Bereiche stimuliert p53 die Expression von p21, das wiederum mit der cyclinabhängigen Kinase 2 (Cdk2) interagiert und diese inhibiert. Solange Cdk2 durch p21 inaktiviert wird, ist die Zellteilung arretiert, da der G1-S Übergang während der Mitose verhindert wird. Zahlreiche Mutationen sind bekannt, die dazu führen, dass p53 nicht mehr an DNA binden kann und somit die Expression von p21 nicht induziert wird. Liegt kein Inhibitor für Cdk2 vor, findet unkontrollierte Zellteilung statt, was schließlich zur Bildung von Tumoren führt ⁽²¹¹⁾.

Neben der Funktion als Transkriptionsfaktor wurde p53 auch in der Matrix von Mitochondrien gefunden, wo es als proapoptotischer Faktor wirkt⁽²¹²⁾. Stress-situationen wie DNA-Schädigung, Hypoxie oder oxidative Schädigung führen dazu, dass cytosolisches p53 in der mitochondrialen Matrix akkumuliert und dort unabhängig von der Funktion als Transkriptionsfaktor mit Proteinen der anti- und proapoptotischen Bcl-2 Familien interagiert. p53 ist in diesem Signalweg direkt an der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, der Freisetzung von Caspasen und dem Chromatinabbau beteiligt⁽¹⁷⁹⁾.

3.2.3 Prolylisomeraseaktivität von mCypD

Im Rahmen einer Kooperation mit den Gruppen von Professor Ute Moll und Professor Markus Seeliger an der State University of New York in Stony Brook sollten die Grundlagen der Interaktion von p53 mit mCypD analysiert werden. mCypD ist das mitochondriale Homolog zu CypA. Die physiologische Wirkung von Prolylisomerasen besteht in der Katalyse der Faltung neusynthetisierter Proteine, sowie der Ausbildung regulatorischer Komplexe mit anderen Proteinen.

Um zu überprüfen, ob p53 die Prolylisomeraseaktivität von mCypD moduliert, wurde zunächst die Katalyse der Prolylisomerisierung in kurzen Peptiden und in faltenden Proteinsubstraten untersucht (Abbildung 3-32). Dafür wurde ein Tetrapeptid verwendet, das am N-Terminus mit einem Aminobenzoylrest (Abz) und am C-Terminus mit einer para-Nitroanilin-Gruppe (pNA) markiert ist (Abz-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA)⁽¹⁴⁸⁾. Der *cis*-Anteil der Prolylbindung ist dabei abhängig von den Lösungsmittelbedingungen. In einer wasserfreien Lösung aus 0,55 M LiCl/TFE ist die *cis*-Konformation bevorzugt, in wässriger Lösung dagegen die *trans*-Konformation. Solange die Prolylbindung des Peptids in *cis* vorliegt, löscht pNA effektiv die Abz-Fluoreszenz. Nimmt die Prolylbindung die *trans*-Konformation ein, entfernt sich der pNA-Rest von der Abz-Gruppe und die resultierende Fluoreszenzzunahme ist ein direktes Maß für die *cis*→*trans* Isomerisierung. Die Gleichgewichtsverschiebung wird bei dem Test durch einen Lösungsmittelsprung von LiCl/TFE in den wässrigen Messpuffer ausgelöst und die Fluoreszenzzunahme aufgezeichnet (Abbildung 3-32a).

Um die Aktivität gegenüber einem Proteinsubstrat zu analysieren, wurde die isolierte N2 Domäne des Gen-3-Proteins des Phagen fd (N2) verwendet. Die Rückfaltung dieses Proteins ist durch die Isomerisierung eines einzigen Prolinrestes (Pro161) limitiert. Die *trans*→*cis* Isomerisierung während der Rückfaltung von N2 führt zu einer Fluoreszenzerhöhung^(200, 201). Es wurde eine Variante von N2 verwendet, die ein Leu vor Pro161 und zusätzlich die stabilisierende Sequenzvariation Q129H trägt (LP-N2)⁽²¹³⁾.

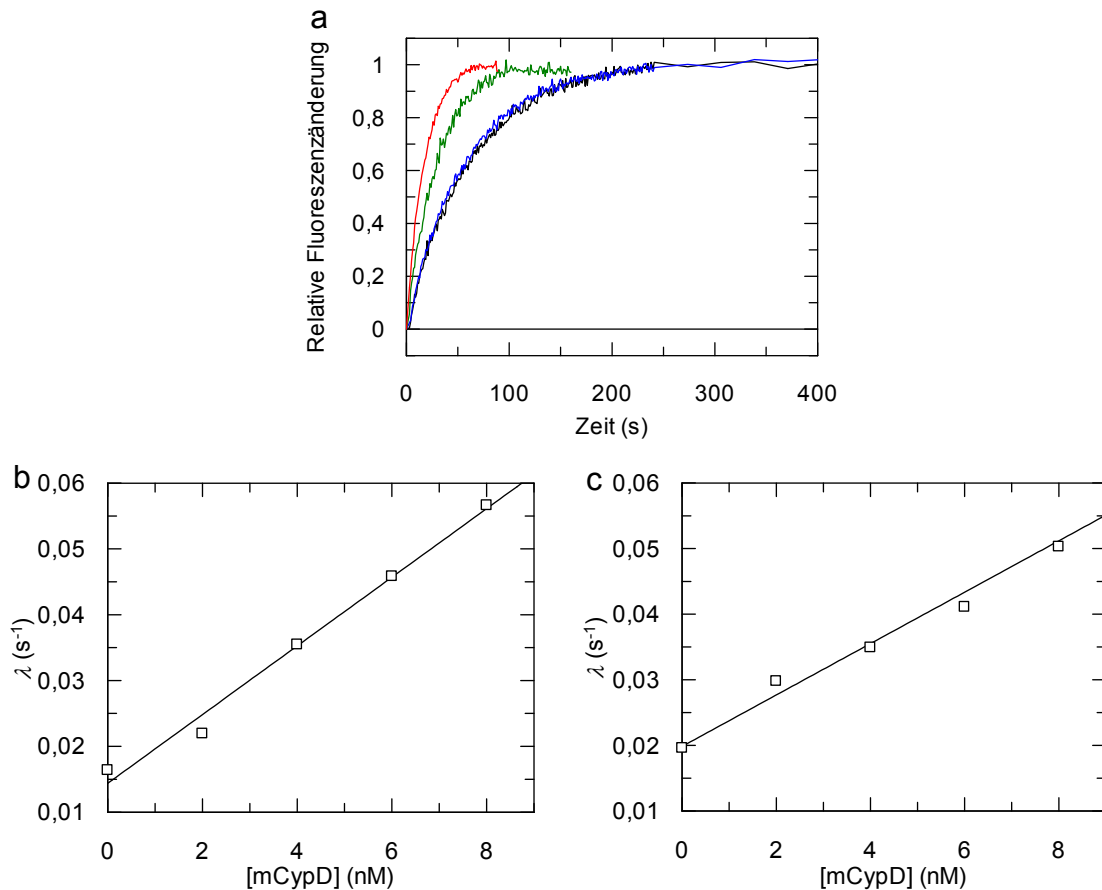


Abbildung 3-32: PPlase-Aktivität von mCypD gegenüber Peptiden und Proteinen

Aufgetragen ist (a) die relative Fluoreszenzänderung von Abz-AFPF-pNA nach einem Lösungsmittelsprung in Anwesenheit von 0 nM mCypD (schwarz), 2 nM mCypD (blau), 6 nM mCypD (grün) und 8 nM mCypD (rot). Die gemessenen Kinetiken wurden durch den Angleich von Exponentialfunktionen ausgewertet. Die apparente Rate der Prolylisomerisierung als Funktion der mCypD-Konzentration ist in (b) für das Substrat Abz-AFPF-pNA (Anregung 316 nm, Emission 416 nm) und in (c) für LP-N2 (Anregung 280 nm, Emission 340 nm) dargestellt. Durch lineare Regression wurde k_{kat}/K_M bestimmt (Tabelle 3-6). Alle Versuche wurden in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4 bei 15 °C durchgeführt.

Die Experimente zur PPlase-Aktivität von mCypD zeigen, dass sowohl kurze Peptide (Abbildung 3-32b), als auch rückfaltende Proteine (Abbildung 3-32c) als Substrate erkannt werden. mCypD katalysiert die Prolylisomerisierung in beiden Substraten mit einer hohen katalytischen Effizienz, die vergleichbar zu der Aktivität von CypA ist. Dieser Befund kann durch die hohe Sequenzidentität der beiden Enzyme erklärt werden.

In der Literatur ist beschrieben, dass die katalytische Aktivität von mCypD für das Öffnen der mPTP notwendig ist. Dabei wurde eine Variante von mCypD in *cypd*^{-/-} Zellen exprimiert, die katalytisch inaktiv ist ⁽²¹⁴⁾, mCypD R68G (die Nummerierung bezieht sich immer auf das hier verwendete Konstrukt von mCypD 30-207). Die Anwesenheit dieser Variante konnte den mCypD *knock-out* nicht retten und die mPTP konnte nicht geöffnet werden ⁽¹⁷⁵⁾.

Für Cyclophiline ist eine weitere katalytisch inaktive Variante bekannt, die die Substitution H139Q enthält ⁽²¹⁴⁾. Beide Proteinvarianten (mCypD R68G und mCypD H139Q) sind relativ zu mCypD destabilisiert, aber unter den experimentellen Bedingungen stabil gefaltet (Abbildung A 8a). mCypD R68G weist weder gegenüber Peptiden noch gegenüber Proteinen Prolylisomeraseaktivität auf (Abbildung A 8b, Tabelle 3-6). Für das Protein mCypD H139Q konnte eine deutlich verringerte katalytische Effizienz gegenüber dem Peptidsubstrat detektiert werden, die Prolylisomerisierung während der Faltung von LP-N2 wird von mCypD H139Q nicht beschleunigt (Abbildung A 8c, Tabelle 3-6).

Tabelle 3-6: Katalytische Effizienz von mCypD gegenüber verschiedenen Substraten

	k_{kat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)	
	Abz-AFPF-pNA	LP-N2
mCypD	5200	3900
mCypD R68G	7	30
mCypD H139Q	200	36
mCypD + 0,2 µM p53-DBD	4300	-
mCypD + 5 µM p53-DBD	3900	n. b.

Tabelle 3-6 fasst die Aktivität von mCypD gegenüber dem Tetrapeptid Abz-AFPF-pNA, sowie dem Proteinsubstrat LP-N2 zusammen. Die katalytische Effizienz k_{kat}/K_M wurde durch lineare Regression der gemessenen Raten als Funktion der mCypD-Konzentration bestimmt (Abbildung 3-32 und Abbildung 3-33). (-) gibt wieder, dass die Aktivität unterhalb des Detektionslimits lag, (n. b.) dass die Aktivität nicht bestimmt wurde. Alle Ergebnisse wurden in unabhängigen Experimenten reproduziert.

In vivo Studien zeigten, dass mitochondriales p53 mit mCypD wechselwirkt und dadurch die mPTP geöffnet wird ⁽¹⁷⁸⁾. Daher wurden die PPlase-Tests auch in Anwesenheit von p53-DBD durchgeführt, um zu untersuchen, welche Auswirkung die Interaktion von p53 mit mCypD auf die Isomeraseaktivität hat (Abbildung 3-33). Da die Bindungsstelle für mCypD in p53 auf die DNA-Binde-domäne eingegrenzt werden konnte, wurde ein Konstrukt von p53-DBD verwendet, das bereits in früheren Studien eingesetzt worden war, um die Interaktion von p53-DBD mit Hsp90 zu charakterisieren ⁽²⁰²⁾. Mittlerweile konnte durch *pull-down*-Experimente mit verkürzten p53-DBD Varianten eine Feinkartierung durchgeführt werden, die zeigt, dass der Sequenzbereich zwischen den Positionen 150 und 200 von p53 notwendig ist für die Interaktion mit mCypD. Ebenfalls in *pull-down* Experimenten konnte gezeigt werden, dass die beiden katalytisch inaktiven Varianten von mCypD nicht mit p53-DBD interagieren (Daten aus der Gruppe von Professor Moll). Diese Beobachtung bedeutet, dass

die katalytisch wichtigen Reste Arg68 und His139 in mCypD essentiell wichtig sind für die spezifische Wechselwirkung zwischen mCypD und p53-DBD, oder aber, dass p53-DBD selbst ein Substrat für mCypD ist.

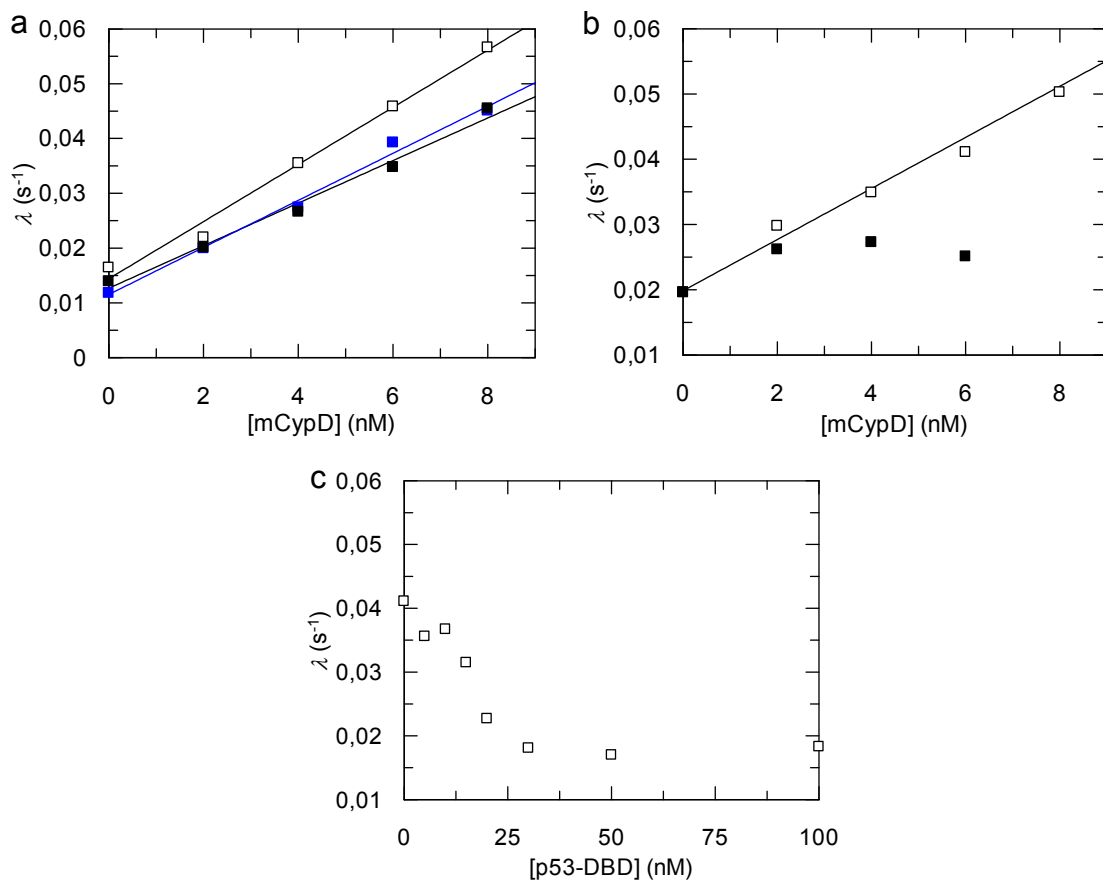


Abbildung 3-33: Einfluss von p53-DBD auf die Isomeraseaktivität von mCypD

Aufgetragen ist die apparente Rate der Prolylisomerisierung als Funktion der mCypD-Konzentration für die Substrate (a) Abz-AFPF-pNA und (b) LP-N2 für mCypD alleine (offene Quadrate), mCypD in Anwesenheit von 200 nM p53-DBD (ausgefüllte Quadrate) und 5 μ M p53-DBD (blaue Quadrate in (a)). Die Rate der Isomerisierung in LP-N2 in Gegenwart von 6 nM mCypD und in Anwesenheit steigender Konzentrationen an p53-DBD ist in (c) gezeigt. Alle Experimente wurden in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4 bei 15 °C durchgeführt. Die gemessenen Fluoreszenzkinetiken wurden durch Angleich von Exponentialfunktionen ausgewertet. Durch lineare Regression (a) und (b) wurde $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ bestimmt (Tabelle 3-6).

Bei den Messungen der Isomeraseaktivität von mCypD gegenüber dem Peptidsubstrat zeigte sich deutlich, dass in Anwesenheit von 200 nM p53-DBD die Aktivität leicht abnimmt (Abbildung 3-33a). Eine weitere Erhöhung der p53-DBD Konzentration auf bis zu 5 μ M führt zu keiner weiteren Verschlechterung. Für das rückfaltende Protein LP-N2 dagegen wird die PPIase-Aktivität von mCypD durch 200 nM p53-DBD praktisch vollständig inhibiert (Abbildung 3-33b).

Diese Beobachtung ist überraschend, da aus zellbiologischen Analysen gefolgert wurde, dass p53 mCypD aktiviert und dass diese Aktivierung zum Öffnen der mPTP führt. Die verwendeten Substrate, das Tetrapeptid Abz-AFPF-

pNA und LP-N2, sind beide artifizielle Testsysteme und daher ist es möglich, dass p53 auf CypD *in vivo* eine andere Wirkung hat. Wichtiger ist jedoch, dass p53-DBD deutliche Effekte auf die PPlase-Aktivität von mCypD hat.

Der Effekt von p53-DBD auf die PPlase-Aktivität ist gegenüber dem Proteinsubstrat deutlich stärker ausgeprägt als gegenüber dem Peptid. Daher wurde LP-N2 verwendet, um die Konzentrationsabhängigkeit der Interaktion zwischen p53-DBD und mCypD genauer zu analysieren (Abbildung 3-33c). Bei konstanter mCypD-Konzentration wurde die Konzentration an p53-DBD schrittweise erhöht und die apparente Rate der Prolylisomerisierung während der Rückfaltung von LP-N2 bestimmt. Die Tatsache, dass ein drei- bis vierfacher Überschuss an p53-DBD über mCypD ausreichend ist, um den vollständigen Effekt auf die PPlase-Aktivität zu erzielen (Abbildung 3-33c), deutet darauf hin, dass eine gerichtete und hoch-affine Interaktion zwischen p53-DBD und mCypD stattfindet.

3.2.4 Spezifische Interaktion zwischen p53-DBD und mCypD

Bezüglich der Aktivität von mCypD wurde gezeigt, dass ein geringer Überschuss an p53-DBD ausreichend ist, um den maximalen Effekt auf die PPlase-Aktivität auszuüben. Die Interaktion der beiden Partner muss also mit hoher Affinität stattfinden. Durch den inhibitorischen Effekt von p53-DBD auf mCypD ist es naheliegend, dass sich die Interaktionsfläche auf mCypD in der Nähe des aktiven Zentrums befindet. Um zu testen, ob dies tatsächlich der Fall ist, wurde ein Experiment durchgeführt, das auf der Inhibition von Cyclophilin durch Cyclosporin A (CsA) beruht.

CsA ist ein zyklisches Undekapeptid, das im aktiven Zentrum von mCypD bindet (Abbildung 3-34a) und daher in der Lage ist, die Aktivität von mCypD vollständig zu inhibieren ⁽²¹⁵⁾. Die Inhibition von mCypD durch CsA für das Substrat Abz-AFPF-pNA ist in Abbildung 3-34b dargestellt. Dabei zeigt sich, dass ein vierfacher Überschuss an CsA über mCypD ausreichend ist, um das Enzym vollständig zu inhibieren.

Dies beruht auf der hohen Affinität von CsA für Cyclophiline ⁽¹⁴³⁾. Ein exakter K_D -Wert für mCypD und CsA ist jedoch nicht bekannt. Um die Affinität genau zu bestimmen, wurden Assoziationskinetiken gemessen, die die Bindung von CsA an mCypD widerspiegeln (Abbildung 3-34c). Da die intrinsische Fluoreszenz von mCypD bei der Bindung von CsA zunimmt, kann diese Sonde sehr gut verwendet werden, um die Bindungsreaktion zu analysieren. Dieser kinetische Ansatz ist deutlich zuverlässiger als die Bestimmung von sehr hohen Affinitäten (niedrigen K_D -Werten) durch Gleichgewichtstitrationen.

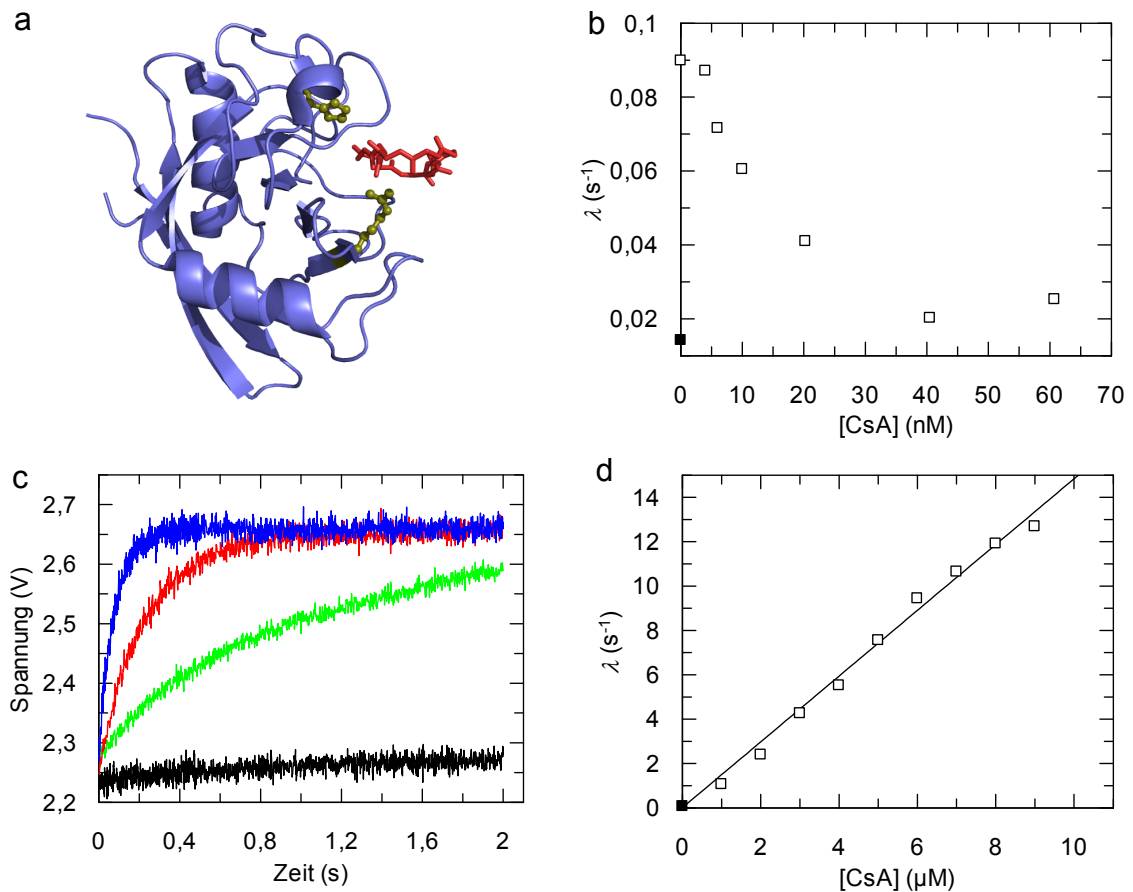


Abbildung 3-34: Interaktion zwischen mCypD und CsA

Dargestellt ist (a) der Komplex von mCypD (blau) und CsA (rot). Die katalytisch wichtigen Reste Arg68 und His139 sind in olivgrün als Stäbchen und Kugeln gezeigt (PDB: 2Z6W⁽²¹⁶⁾). Die Abbildung wurde mit PyMol erstellt⁽¹⁴⁴⁾. (b) zeigt die Abnahme der apparenten Rate der Prolylisomerisierung in Abz-AFPF-pNA in Anwesenheit von 10 nM mCypD und steigender CsA-Konzentration (offene Quadrate). Die Rate der unkatalysierten Reaktion ist als ausgefülltes Quadrat dargestellt (Anregung 316 nm, Emission 416 nm). Die Zunahme der Fluoreszenz (Anregung 280 nm, Emission oberhalb von 305 nm) als Funktion der Zeit ist in (c) dargestellt für 250 nM mCypD + 0 μM CsA (schwarz), + 1 μM CsA (grün), + 3 μM CsA (rot) und + 9 μM CsA (blau). Die Kinetiken wurden durch den Angleich von Exponentialfunktionen ausgewertet und die apparente Rate (der Assoziation – offene Quadrate oder der Dissoziation – ausgefülltes Quadrat) als Funktion der CsA-Konzentration aufgetragen (d). Durch lineare Regression wurden die Werte für k_{on} und k_{off} bestimmt. Alle Versuche wurden in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4 bei 15 °C durchgeführt.

Die apparenten Raten der Assoziation nehmen linear mit der CsA-Konzentration zu (Abbildung 3-34d). Durch lineare Regression können daraus die Werte für $k_{\text{on}} = 1,48 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ und $k_{\text{off}} = 0,0072 \text{s}^{-1}$ ermittelt werden. Auf diese Weise kann der K_{D} -Wert für mCypD und CsA zu etwa 5 nM bestimmt werden. Diese hohe Affinität stimmt sehr gut mit Abschätzungen der Affinität von CypA (cytosolisches Homolog von mCypD) für CsA überein und erklärt die starke Inhibition von mCypD durch CsA.

Aufgrund der deutlichen Inhibition von mCypD durch einen geringen Überschuss an p53-DBD (Abbildung 3-33c) ist anzunehmen, dass die Interaktion zwischen den beiden Proteinen mit hoher Affinität stattfindet. Wenn diese Annahme stimmt und wenn p53-DBD, wie vorgeschlagen, in der Nähe des aktiven Zentrums bindet, dann sollte p53-DBD in der Lage sein CsA aus dem aktiven Zentrum von mCypD zu verdrängen. Um dies zu testen, wurde der Peptid-Test als Auslesereaktion verwendet. CsA inhibiert mCypD vollständig, auch gegenüber dem Tetrapeptid. p53-DBD hingegen verringert die Aktivität von mCypD gegenüber Abz-AFPF-pNA nur um etwa 25 %. Um auf eine mögliche Verdrängung von CsA aus dem aktiven Zentrum von mCypD hin zu testen, wurde mCypD durch CsA teilweise inhibiert und die Katalyse der Prolylisomerisierung in Abz-AFPF-pNA mit steigender p53-DBD-Konzentration gemessen (Abbildung 3-35).

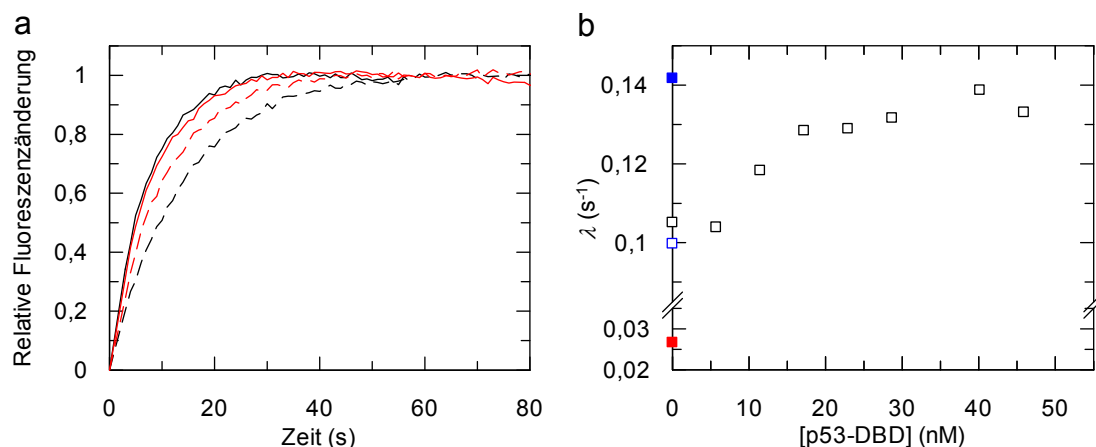


Abbildung 3-35: Konkurrenz von p53-DBD und CsA um die Bindungsstelle an mCypD

(a) Fluoreszenzänderung durch *cis*→*trans* Prolylisomerisierung in Abz-AFPF-pNA in Anwesenheit von 12 nM mCypD (schwarze Linie), 12 nM mCypD + 5 nM CsA (schwarz, unterbrochene Linie), 12 nM mCypD + 5 nM CsA + 5 nM p53-DBD (rot, unterbrochene Linie) und 12 nM mCypD + 5 nM CsA + 22 nM p53-DBD (rote Linie). Durch Angleich von Exponentialfunktionen an die Daten ergeben sich die apparenten Raten der Prolylisomerisierung (b) in Anwesenheit von 12 nM mCypD, 5 nM CsA und zunehmender Konzentration an p53-DBD (Quadrate). Die Rate der unkatalysierten (rot, ausgefülltes Quadrat), der katalysierten (12 nM mCypD, blau, ausgefülltes Quadrat), sowie der inhibierten Reaktion (12 nM CypD + 5 nM CsA, blau, offenes Quadrat) sind ebenfalls gezeigt. Alle Versuche wurden in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4 bei 15 °C durchgeführt (Anregung 316 nm, Emission 416 nm).

Die Fluoreszenzkinetiken zeigen deutlich, dass mCypD durch CsA zu einem gewissen Maß inhibiert wird (Abbildung 3-35a) und dass diese Inhibition durch zunehmende Konzentrationen an p53-DBD aufgehoben werden kann. Die ermittelten Raten der Prolylisomerisierung in Anwesenheit konstanter Konzentrationen an mCypD und CsA und zunehmender Konzentration an p53-DBD zeigen dabei den Verlauf einer Bindungskurve (Abbildung 3-35b).

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass p53-DBD in der Lage ist CsA aus dem Komplex mit mCypD zu verdrängen. Die einfachste Erklärung dafür ist, dass die beiden Komponenten zumindest teilweise an die gleiche Interaktionsfläche auf mCypD binden. Es wurde bereits gezeigt, dass der Effekt von p53-DBD auf mCypD unterschiedlich stark ausgeprägt ist, je nachdem ob ein kurzes Peptid oder ein Proteinsubstrat von mCypD umgesetzt werden soll (Abbildung 3-33a und b). Auch bei hohen Konzentration an p53-DBD bleibt ein Großteil der Aktivität von mCypD gegenüber kurzen Peptiden erhalten, was daraufhin deutet, dass p53-DBD zwar in der Nähe des aktiven Zentrums von mCypD bindet, jedoch nicht wie CsA das aktive Zentrum des Enzyms vollständig blockiert. Durch diese Nähe zum katalytischen Zentrum wird vermutlich die Zugänglichkeit für globuläre Proteine stark eingeschränkt und das Modellsubstrat LP-N2 kann daher nicht mehr umgesetzt werden.

Aufbauend auf diese Ergebnisse wurden NMR-Titrations mit markiertem mCypD durchgeführt (in der Gruppe von Professor Seeliger). Vorläufige Ergebnisse zeigen Verschiebungen einzelner Peaks, die Aminosäuren in der Nähe des aktiven Zentrums zugeordnet werden können (Abbildung 3-36a).

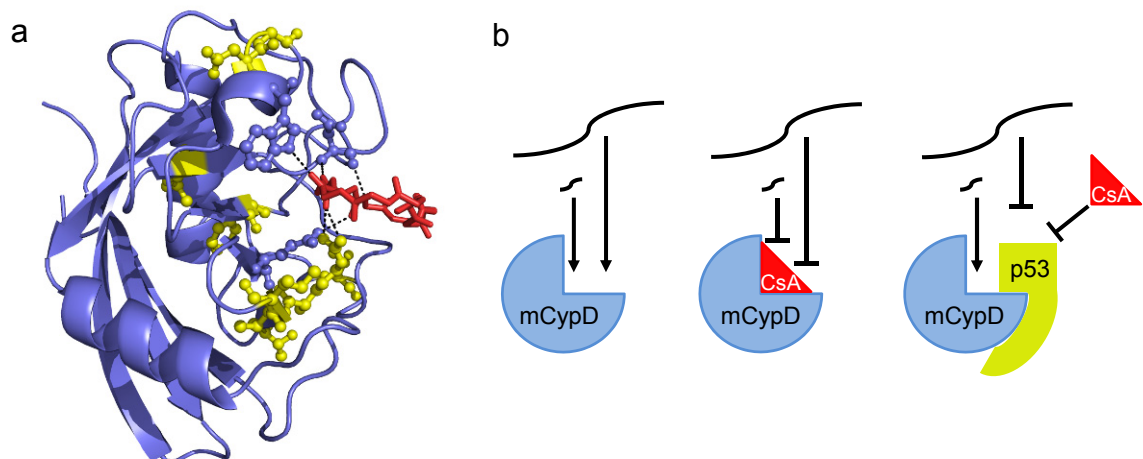


Abbildung 3-36: Strukturelle Interpretation der Interaktion zwischen mCypD und p53

Der Komplex zwischen mCypD und CsA ist in (a) gezeigt (PDB: 2Z6W⁽²¹⁶⁾). Reste die mit CsA (rot) interagieren, sind als Stäbchen dargestellt, Reste, die bei ersten Titrationsexperimenten Peakverschiebungen nach Zugabe von p53-DBD zeigten, sind gelb gefärbt. Die Abbildung wurde mit PyMol erstellt⁽¹⁴⁴⁾. Das vorgeschlagene Modell für die Interaktion zwischen mCypD und p53 ist in (b) visualisiert. Es gibt die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums von mCypD für Peptid- und Proteinsubstrate wieder, sowie die Effekte von CsA und p53.

Diese vorläufigen Ergebnisse aus den NMR-Titrations sind in Einklang mit den Daten aus den Aktivitätstests. Neben sterischen Effekten, die eine gleichzeitige Bindung von CsA und p53-DBD an mCypD verhindern ist festzuhalten, dass Arg68, das für die Aktivität von mCypD entscheidend ist (Abbildung A 8b,

Tabelle 3-6), sowohl mit CsA direkte Kontakte ausbildet, als auch mit p53-DBD interagiert und eine deutliche Peakverschiebung zeigt.

Zusammen führen die bisherigen Daten zu einem Modell (Abbildung 3-36b), das p53 als eine Art Selektivitätsfilter für mCypD beschreibt. Im freien Zustand ist mCypD aktiv gegenüber Peptid- und Proteinsubstraten (Abbildung 3-32). Diese Aktivität wird durch die hoch-affine Bindung von CsA im aktiven Zentrum des Enzyms vollständig inhibiert (Abbildung 3-34). Die zusätzliche Anwesenheit von p53-DBD führt dazu, dass CsA verdrängt wird (Abbildung 3-35). Zum Einen sind vermutlich sterische Effekte für die Verdrängung verantwortlich, zum Anderen teilen sich CsA und p53 offenbar Bereiche der Interaktionsfläche auf mCypD. p53 liegt dabei nicht wie CsA genau im aktiven Zentrum, sondern umrandet es vielmehr (Abbildung 3-36a). Dadurch wird die Zugänglichkeit für Proteinsubstrate eingeschränkt, die Aktivität gegenüber kurzen Peptiden bleibt jedoch größtenteils erhalten (Abbildung 3-33).

Bisher sind keine Substrate von mCypD bekannt, die für das Öffnen der mPTP wichtig sind, jedoch ist beschrieben, dass die katalytische Aktivität von mCypD für die Porenöffnung benötigt wird⁽¹⁷⁵⁾. Möglicherweise muss Prolylisomerisierung in flexiblen Bereichen von Proteinen stattfinden, was zu weitreichenden strukturellen Umlagerungen führen kann (vgl. 3.1), damit die Pore geöffnet wird. Solche flexiblen Strukturelemente könnten als Substrate erkannt und umgesetzt werden, während p53 an mCypD gebunden ist.

Durch das Öffnen der mPTP wird nekrotischer Zelltod ausgelöst, mCypD muss folglich nicht weiter als Proteinfaltungshelfer in der mitochondrialen Matrix wirken. Diese Steuerung der zeitlichen Selektivität für verschiedene, physiologisch relevante Aufgaben von mCypD kann dabei durch die Interaktion mit p53 etabliert werden.

3.3 Anpassung von PPlasen an die Umwelt – Leben unter extremen Bedingungen

Die Lebensräume auf der Erde sind extrem vielfältig. Neben dem gemäßigten Klima stellen andauernde Trockenheit (Wüstenregionen), extreme Hitze (Geysire), aber auch permanenter Frost (Antarktis) oder hoher Druck (in der Tiefsee) aus unserem Blickwinkel eine große Herausforderung für die dort lebenden Organismen dar. Dennoch findet man in sämtlichen Bereichen der Erde Lebewesen (meist Einzeller), die sich an solche Umgebungen angepasst haben. Proteine aus diesen Organismen sind für die biotechnologische Industrie interessant, um stabilere und effizientere Prozessentwicklungen durchzuführen. Auch in der Grundlagenforschung wird viel mit Proteinen aus Extremophilen gearbeitet, um ein besseres Verständnis darüber zu erhalten, wie einzelne Aminosäuren die Proteinstabilität und -faltung beeinflussen. In den Organismen ist natürlich das gesamte Proteom an die gegebenen Umweltbedingungen angepasst.

Zahlreiche Studien beschreiben die Unterschiede zwischen homologen Proteinen aus mesophilen und thermophilen Bakterien und zusammen mit gerichteter Evolution unter Laborbedingungen konnten grundlegende Erkenntnisse über die Stabilisierung von Proteinen erarbeitet werden ⁽²¹⁷⁻²¹⁹⁾. Über die physiologische Wirkung der Anpassung an die Umwelt ist jedoch weniger bekannt. Neben der Stabilität muss auch die katalytische Aktivität von Enzymen erhalten bleiben oder bei Enzymen aus psychrophilen Organismen sogar verbessert werden, da die Raten chemischer Reaktionen mit der Temperatur abnehmen. Dies wird häufig durch das Aufheben nicht-kovalenter, stabilisierender Wechselwirkungen erreicht, wodurch die Flexibilität eines Enzyms erhöht wird ⁽²²⁰⁾. Um derartige Anpassungseffekte und die daraus resultierende physiologische Bedeutung zu analysieren, stellen Faltungshelferproteine eine sehr interessante Klasse an Enzymen dar, da deren Aktivität Auswirkungen auf das gesamte Proteom hat.

In Bakterien sind besonders die Faltungshelfersysteme GroEL/ES, DnaK/J und Triggerfaktor bekannt. GroEL/ES ist das bakterielle Homolog zu den eukaryotischen Proteinen Hsp60 und Hsp10, DnaK/J ist homolog zu Hsp70. Die Bedeutung dieser Enzyme spiegelt sich in ihrer Klassifizierung als Hitzeschockproteine (*heat shock protein*, Hsp) wider. Diese beiden Systeme arbeiten ATP-abhängig. GroEL/ES verwendet die hydrolytische Spaltung von ATP zu ADP als eine Art molekulare Zeitschaltuhr, wobei die Dissoziation von GroES und GroEL abhängig von der ATP-Hydrolyse ist. Dadurch ist sichergestellt, dass fehlgefaltete Proteine im Inneren von GroEL das Enzym nicht blockieren, sondern ein regelmäßiges Öffnen und Schließen dafür sorgt, dass

immer wieder neue Substrate in den faltungsbegünstigenden Innenraum gelangen können ⁽²²¹⁾.

DnaK/J weist im ATP gebundenen Zustand eine hohe Affinität gegenüber Substraten auf, die sehr dynamisch mit dem Chaperon assoziieren und wieder dissoziieren können. Nach Hydrolyse von ATP zu ADP ist der DnaK-Substrat-Komplex deutlich stabiler und die Rate der Dissoziation k_{off} ist in diesem Zustand stark erniedrigt ⁽²²²⁾.

Das dritte bakterielle System, Triggerfaktor, unterscheidet sich von GroEL/ES und DnaK/J dadurch, dass es ATP-unabhängig arbeitet und bisher kein eukaryotisches Homolog bekannt ist. Triggerfaktor ist ein Dreidomänenprotein und besteht aus einer Ribosomenbindedomäne, einer Chaperondomäne und einer Prolylisomerasedomäne vom FKBP-Typ ⁽²²³⁾. Durch die Ribosomenbindestelle interagiert in Zellen nahezu jedes Triggerfaktor-Molekül mit einem Ribosom und stellt somit das erste Chaperon dar, mit dem naszierende Polypeptidketten interagieren. Diese werden bei Austritt aus dem Ribosom von der Chaperondomäne erkannt, gebunden und vor Aggregation geschützt ⁽²²⁴⁾. Die Anwesenheit einer Prolylisomerasedomäne deutet daraufhin, dass Prolylisomerisierung als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Proteinfaltung in Bakterien offenbar ein Problem darstellen kann.

3.3.1 Triggerfaktor aus *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125

2010 beobachtete die Gruppe von Georges Feller (Universität Lüttich, Belgien), dass Triggerfaktor aus *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 (*Ph*) bei niedrigen Temperaturen (4 °C) das am stärksten exprimierte Chaperon in diesem Organismus ist. Insgesamt konnte in dieser Studie ein Drittel der überexprimierten Proteine allgemein dem Stoffwechselweg der Proteinbiosynthese, von der Transkription bis zur Faltung, zugeordnet werden ⁽²²⁵⁾.

Die erhöhte zelluläre Konzentration an Triggerfaktor ist vermutlich notwendig, um ausreichend Chaperonaktivität zu gewährleisten, da die Expression der beiden anderen Systeme DnaK und GroEL bei niedrigen Temperaturen stark verringert ist. Dabei bindet Triggerfaktor vermutlich neusynthetisierte Proteine, verhindert einen vorzeitigen hydrophoben Kollaps (*hydrophobic collapse*) und schützt sie somit vor Aggregation bis genug Faltungsinformation durch ausreichend Kettenlänge verfügbar ist und die Proteine korrekt falten können. Zusätzlich zu der Chaperonaktivität ist vermutlich auch die Prolylisomeraseaktivität von Triggerfaktor wichtig. Wie alle chemischen Reaktionen wird auch die Proteinfaltung mit sinkender Temperatur langsamer. Prolylisomerisierung ist als kritischer Schritt der Proteinfaltung bekannt und durch die starke Temperatur-

abhängigkeit der Rotation um eine partielle Doppelbindung kommt der Katalyse dieser Reaktion besonders bei niedrigen Temperaturen eine große Bedeutung zu.

Um die physiologische Bedeutung der Anpassung von Triggerfaktor an die Umweltbedingungen zu erarbeiten, wurden in Zusammenarbeit mit Georges Feller und Amandine Godin-Roulling (Universität Lüttich, Belgien) homologe Triggerfaktoren aus verschiedenen Bakterien hinsichtlich ihrer Chaperon- und PPlase-Aktivität untersucht. Dazu wurden die Proteine aus den Bakterien *Pseudoalteromonas haloplanktis* (*Ph*, psychrophil), *Escherichia coli* (*Ec*, mesophil) und *Thermotoga maritima* (*Tm*, thermophil) verwendet, um einen möglichst großen Temperaturbereich der natürlichen Habitate einzuschließen.

3.3.2 Chaperonaktivität und Substratbindung

Die Chaperonaktivität von Faltungshelferenzymen kann *in vitro* mittels verschiedener Testsysteme analysiert werden. Diese Untersuchungen wurden von A. Godin-Roulling durchgeführt. Viele Proteine können nicht ohne Helferproteine zurückfalten, wenn sie von hohen GdmCl-Konzentrationen schnell zu sehr niedrigen GdmCl-Konzentrationen verdünnt werden und aggregieren folglich irreversibel während der Rückfaltung. Diese Aggregation kann über Lichtstreuung beobachtet werden. A. Godin-Roulling konnte zeigen, dass die Aggregation der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) während der Rückfaltung durch *EcTF* und *TmTF* sehr effektiv verhindert wird. *PhTF* hingegen zeigt nahezu keine Chaperonaktivität bei 20 °C. Wird die Verdünnung von GAPDH auf Eis durchgeführt (nahezu keine Aggregation) und die Reaktionstemperatur anschließend langsam auf 15 °C erhöht, zeigen *EcTF* und *TmTF* das gleiche Verhalten wie bei 20 °C. *PhTF* kann unter diesen Bedingungen die Aggregation von GAPDH um etwa 20 min verzögern.

Bei diesen Untersuchungen wird lediglich die Fähigkeit Aggregation zu verhindern dokumentiert, man erhält jedoch keine Informationen, ob GAPDH korrekt gefaltet vorliegt. Um zu testen, ob TF in der Lage ist die produktive Proteinfaltung zu fördern, können Aktivitätstests für GAPDH anstelle der Streulichtmessungen durchgeführt werden. Dabei zeigen die drei homologen TFs deutliche Unterschiede. *PhTF*, der die Aggregation nicht verhindern konnte, kann die produktive Faltung von GAPDH etwas verbessern. *EcTF* verhindert die Aggregation von GAPDH und führt zu 30 % Aktivitätsrückgewinnung, wohingegen *TmTF* zwar vor Aggregation schützt, jedoch keine GAPDH-Reaktivierung nachgewiesen werden konnte. Unter den experimentellen Bedingungen (15 °C) stellt *PhTF* folglich ein Faltungshelferenzym dar, *TmTF* schützt lediglich vor

Aggregation. TF aus dem mesophilen Bakterium *E. coli* vereint diese beiden Aktivitäten, indem Proteine vor irreversibler Aggregation geschützt und gleichzeitig die produktive Faltung gefördert werden.

Der Chaperontest mit GAPDH als Substrat ist nur in einem sehr eingeschränkten Temperaturbereich möglich. Daher wurde ein weiteres Substrat verwendet, säuredenaturiertes GFP (*green fluorescent protein*). Verdünnung von säuredenaturiertem GFP in Puffer mit neutralem pH initiiert die Rückfaltung des Proteins. Der Chaperontest mit GFP wurde von A. Godin-Roulling wie für GAPDH bei 15 °C durchgeführt. Zusätzlich wurden die Aktivitäten der einzelnen TFs auch bei Temperaturen bestimmt, die die natürlichen Lebensbedingungen der drei Bakterienstämme besser wiedergeben sollten (5 °C für *PhTF*, 37 °C für *EcTF* und 50 °C für *TmTF*). Für die Experimente bei 15 °C zeigte sich das gleiche Verhalten wie gegenüber GAPDH als Substrat. Ein Überschuss an *PhTF* und *EcTF* erhöht den Anteil an nativ gefaltetem Protein. Auch gegenüber GFP weist *EcTF* die höchste Aktivität auf, relativ zu der Rückfaltung in Abwesenheit von Faltungshelfern. Bei Temperaturen, die nahe an den Lebensbedingungen von psychophilen, mesophilen und thermophilen Bakterien liegen, zeigte sich, dass *PhTF* die Ausbeute an nativem GFP bei 5 °C nicht beeinflusst. Erst bei zehnfachem Überschuss an *PhTF* gegenüber GFP zeigt sich eine etwas höhere Rückfaltungseffizienz. *EcTF* ist bei 37 °C und geringem Überschuss (zwei- bis dreifacher molarer Überschuss) in der Lage die Menge an gefaltetem GFP fast zu verdoppeln. Je höher jedoch der Überschuss von *EcTF* über GFP wird, desto niedriger wird die Ausbeute, was die bivalente Funktion von *EcTF* widerspiegelt. In *EcTF* sind die Funktionen eines Faltungshelfers mit denen eines Aggregationsunterdrückers (durch feste Bindung, *holdase*) vereint.

Bereits ein dreifacher Überschuss an *TmTF* über GFP führt zu verringerter Faltungseffizienz (bei 15 °C und 50 °C). Jedoch wurde beobachtet, dass die gleichzeitige Anwesenheit von *TmTF* und GroEL/ES die Faltungseffizienz stark erhöhte. Weitere Experimente zeigten, dass *TmTF* und GroEL/ES offenbar gemeinsam an der Faltung des Modellproteins GFP beteiligt sind. *TmTF* hält das Substrat zunächst in einem faltungskompetenten Zustand bevor es zur weiteren Faltung an GroEL/ES weitergegeben wird. Interessant dabei ist, dass *EcTF* offenbar nicht mit GroEL/ES kooperativ an der Faltung von Proteinen beteiligt ist, da in Anwesenheit beider Chaperone die Rückfaltung von GFP weniger effizient abläuft, weil die beiden Systeme vermutlich um die Substrate konkurrieren.

Eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der drei homologen TFs sind die chemisch unterschiedlichen Bindungsstellen für entfaltete Proteine und die daraus resultierenden Affinitäten gegenüber Molekülen mit exponierten hydrophoben Oberflächen. Mittels Titrationen der drei Enzyme mit

ANS, einem Molekül, das spezifisch an hydrophobe Flächen bindet, zeigte A. Godin-Roulling, dass *TmTF* offenbar mehr hydrophobe Oberflächen exponiert als *PhTF* und *EcTF*. Chaperondomänen weisen allgemein hydrophobe Oberflächen auf, um mit teilgefalteten Proteinen, die noch nicht alle hydrophoben Reste im Inneren ihrer Struktur verborgen haben, zu interagieren. Diese Ergebnisse wurden durch isothermale Titrations Kalorimetrie (ITC) mit einem entfalteten Proteinsubstrat (α -Casein) ergänzt. *EcTF* und *TmTF* binden α -Casein mit hoher Affinität ($K_D \approx 2,5 \mu\text{M}$ für beide TFs). Für *PhTF* konnte auf diese Weise keine Bindungskonstante bestimmt werden, da die Interaktion der Chaperondomäne mit Substraten vermutlich zu schwach ist.

3.3.3 Prolylisomeraseaktivität von Triggerfaktor

Ergänzend zu der Chaperonaktivität wurde auch die Prolylisomeraseaktivität der drei TFs untersucht. Diese Analysen wurden von mir durchgeführt. Um die Aktivität von Prolylisomerasen zu bestimmen, stehen optimierte Protokolle zur Verfügung und verschiedene Isomerasen können dadurch gut miteinander verglichen werden. Generell gibt es zwei Gruppen von Substraten, kurze Peptide und Proteinsubstrate. Kurze Peptide bilden keine Sekundärstrukturen aus und werden somit vermutlich nur vom aktiven Zentrum der zu untersuchenden PPlase erkannt und gebunden. Daher sind kurze Peptide sehr gut geeignet, um die Sequenzspezifität von PPlasen aufzuklären. In vorangehenden Arbeiten wurden Tetrapeptide und Pentapeptide der allgemeinen Formeln Abz-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA und Abz-Ala-Ala-Pro-Xaa-Ala-pNA (Xaa steht für jede beliebige proteinogene Aminosäure) verwendet, um die Spezifität der drei Isomerasefamilien in Bezug auf die Position vor und nach Pro zu untersuchen^(148, 149). Bei diesen Peptiden ist der Anteil an *cis*Pro in wasserfreien Bedingungen (0,55 M LiCl/TFE) erhöht. Durch die *cis*-Konformation an Pro befinden sich die Aminobenzoylgruppe (Abz) und die para-Nitroanilingruppe (pNA) in räumlicher Nähe zueinander und die Abz-Fluoreszenz wird durch pNA gelöscht. In wässrigen Bedingungen wird die *trans*-Konformation der Prolylbindung bevorzugt und die pNA-Gruppe entfernt sich von dem Abz-Rest. Die Zunahme der Abz-Fluoreszenz als Funktion der Zeit nach einem Lösungsmittelsprung entspricht daher der *cis*→*trans* Isomerisierung an Pro.

PPlasen mit Chaperondomänen verwenden diese, um Substrate in der Nähe des aktiven Zentrums anzureichern. Vermutlich sind fünf Aminosäuren nicht ausreichend um von Chaperondomänen erkannt zu werden und die Aktivität gegenüber Peptiden wird durch die Verknüpfung einer PPlase-Domäne mit einer Chaperondomäne nicht beeinflusst. Daher konnten kurze Peptide verwendet

werden, um die Sequenzspezifität von Isomerasen mit Chaperondomäne in Bezug auf die Aminosäure vor und nach Pro zu analysieren^(149, 213). In anderen Arbeiten wurde eindrucksvoll erarbeitet, dass die Anwesenheit einer Chaperondomäne die Aktivität von PPlasen gegenüber Proteinsubstraten mehr als 1000-fach erhöhen kann und dabei gleichzeitig die Sequenzspezifität der Isomerasedomäne aufhebt⁽²²⁶⁾. Durch Anreicherung an der Chaperondomäne wird die lokale Substratkonzentration in der Nähe des katalytischen Zentrums so stark erhöht, dass nicht mehr der Substratumsatz, sondern der Transfer von der Chaperondomäne zum aktiven Zentrum in der Isomerasedomäne limitierend wird. Dieser Transport ist sehr effizient und kann durch eine sehr hohe Dynamik der Assoziation und Dissoziation zwischen Chaperondomäne und entfaltetem Proteinsubstrat erklärt werden⁽¹⁰⁷⁾. Interessant dabei ist, dass der Einbau einer Chaperondomäne in eine PPlase, die natürlicherweise keine Chaperondomäne hat, die Aktivität gegenüber Proteinen stark erhöhen kann⁽²²⁷⁾.

Da Triggerfaktor aus einer Ribosomenbindedomäne, einer PPlase-Domäne und einer Chaperondomäne besteht, können hier die Peptidsubstrate verwendet werden, um die Spezifität der homologen Proteine zu bestimmen. Proteinsubstrate können herangezogen werden, um die Situation in der Zelle besser wiederzugeben.

Zunächst sollte die Sequenzspezifität der drei TFs untersucht werden. Abbildung 3-37a zeigt die Zunahme der Abz-Fluoreszenz in Abz-AAPF-pNA nach einem Lösungsmittelsprung in wässrige Bedingungen in Ab- und Anwesenheit von TF. Bereits aus dieser Auftragung wird deutlich, dass sich die drei TFs in ihrer Aktivität sehr stark unterscheiden. Werden die apparenten Raten der Prolylisomerisierung als Funktion der TF-Konzentration aufgetragen (Abbildung 3-37b) wird diese Beobachtung noch deutlicher. Da die beobachtete Rate linear mit der Enzymkonzentration zunimmt, liegt die Substratkonzentration vermutlich weit unterhalb von K_M und damit entspricht die Steigung der Regressionsgeraden der katalytischen Effizienz k_{kat}/K_M .

Alle drei TFs zeigen dabei die FKBP-typische, ausgeprägte Sequenzspezifität⁽²¹³⁾. Peptide mit hydrophoben Resten vor Pro stellen gute Substrate für TF dar, wohingegen solche mit negativ geladenen Resten vor Pro nur mit niedriger Aktivität umgesetzt werden (Abbildung 3-37c)⁽¹⁴⁸⁾. Da die Position nach Pro generell die gleichen Effekte zeigt⁽¹⁴⁹⁾, allerdings deutlich schwächer ausgeprägt, wurde in dieser Arbeit nur die Position vor Pro analysiert.

Um die Aktivität der drei homologen Isomerasen gegenüber einem Proteinsubstrat zu untersuchen wurde eine Bibliothek von N2 verwendet. N2 ist eine Domäne aus dem Gen-3-Protein des Phagen fd. Pro161 liegt in einer exponierten Schleife und die Konformation an Pro161 (*cis* oder *trans*) ist

entscheidend für die Stabilität des Proteins. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Rückfaltung von N2 ist die *trans*→*cis* Isomerisierung an Pro161. Die *trans*→*cis* Isomerisierung ist mit einer Fluoreszenzzunahme verbunden, die eine geeignete Sonde für die Katalyse durch PPlasen darstellt^(200, 201, 213). Es wurden Varianten von N2 mit unterschiedlichen Aminosäuren vor Pro161 und der zusätzlichen, stabilisierenden Aminosäuresubstitution Q129H verwendet (XP-N2, Abbildung 3-37d).

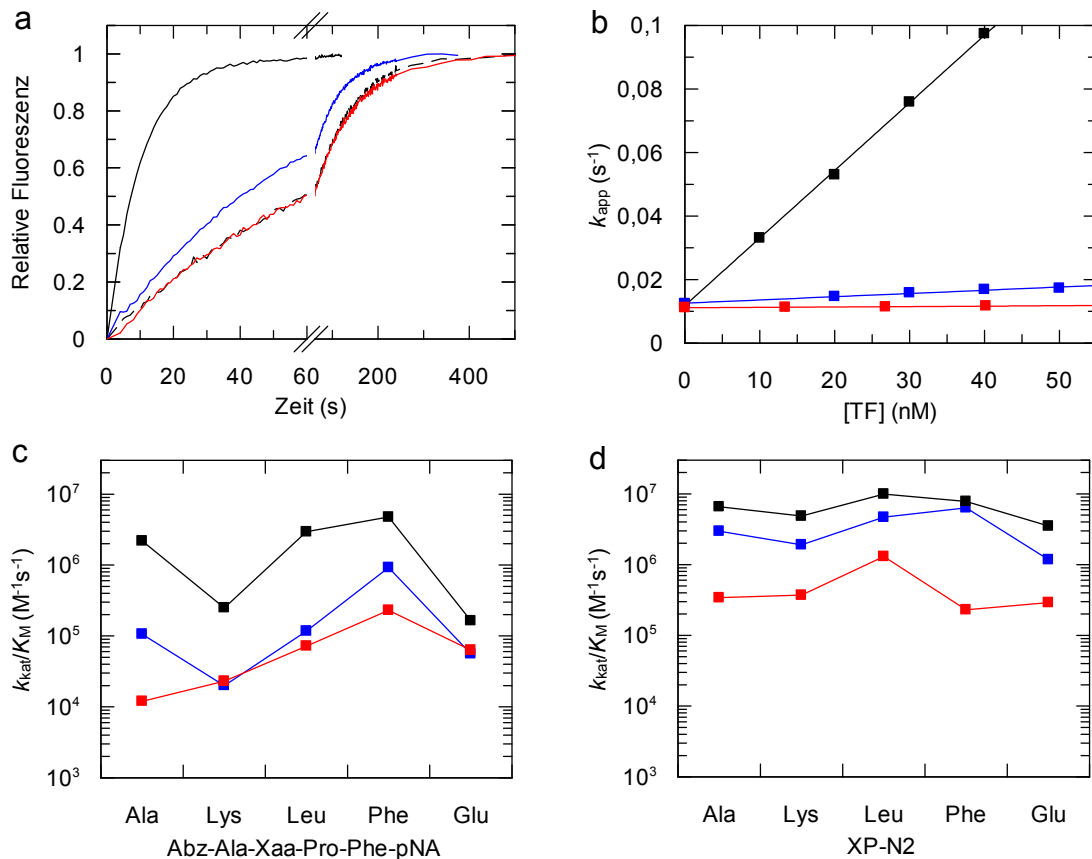


Abbildung 3-37: Sequenzspezifität von Triggerfaktor

Dargestellt sind die Fluoreszenzänderungen nach einem Lösungsmittelsprung von LiCl/TFE in Messpuffer für Abz-AAPF-pNA (a) in Abwesenheit einer Isomerase (unterbrochene Linie) und in Anwesenheit von 40 nM TF (*Ph*TF blau, *Ec*TF schwarz, *Tm*TF rot). (b) zeigt die Auftragung der gemessenen Raten der Prolylisomerisierung in Abz-AAPF-pNA als Funktion der Enzymkonzentration mit Farben wie in (a). (c) und (d) geben die katalytische Effizienz gegenüber Peptiden und Proteinen (XP-N2) mit unterschiedlichen Resten vor Prolin wieder. Alle Versuche wurden in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,5, 1 mM EDTA bei 15 °C durchgeführt. Die numerischen Werte für k_{kat}/K_M sind in Tabelle A 9 und Tabelle A 10 zusammengefasst.

Alle drei Enzyme weisen gegenüber XP-N2 eine hohe katalytische Effizienz auf, die durch das Zusammenspiel der Chaperondomäne, zur Erkennung und Anreicherung teilgefalteter Proteine, und der Isomerasedomäne erklärt werden kann. Wie bereits beschrieben wird die in den Peptidtests beobachtete Sequenzspezifität durch die Chaperondomäne weitgehend aufgehoben (Abbildung 3-37d).

Um die Frage zu beantworten, ob TFs aus unterschiedlichen Organismen durch unterschiedliche katalytische Aktivitäten der PPlase-Domänen an die jeweiligen Lebensbedingungen angepasst sind, wurden zunächst die Peptidtests auch bei niedrigerer (5 °C) und höherer (25 °C) Temperatur durchgeführt (Abbildung 3-38). Eine weitere Erhöhung der Temperatur ist nicht möglich, da sonst die unkatalysierte Isomerisierung zu schnell abläuft und nach manueller Mischung nicht mehr aufgezeichnet werden kann.

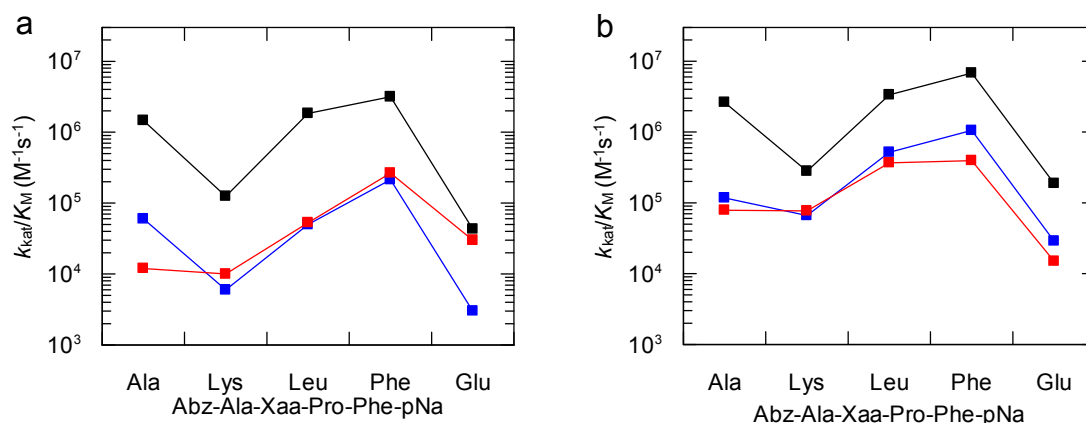


Abbildung 3-38: Katalytische Effizienz gegenüber Peptiden bei 5 °C und 25 °C

Aufgetragen ist die katalytische Effizienz gegenüber Peptiden mit unterschiedlichen Aminosäureresten vor Prolin für *PhTF* (blau), *EcTF* (schwarz) und *TmTF* (rot) bei (a) 5 °C und (b) 25 °C. Alle Versuche wurden in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,5, 1 mM EDTA bei 5 °C oder 25 °C durchgeführt. Die numerischen Werte für k_{kat}/K_M sind in Tabelle A 9 zusammengefasst.

Sowohl bei niedriger, als auch bei höherer Temperatur zeigen die drei homologen TFs das bekannte Spezifitätsprofil mit einer klaren Präferenz für hydrophobe Reste vor Prolin. Der Unterschied in der absoluten Aktivität zwischen 5 °C und 25 °C ist bei den einzelnen Peptiden unterschiedlich stark ausgeprägt. Tendenziell wird die Aktivität gegenüber Substraten mit geladenen Resten vor Pro (Lys und Glu) am deutlichsten von der Reaktionstemperatur beeinflusst. (Abbildung 3-38).

XP-N2 wurde bisher als Proteinsubstrat für den PPlase-Test verwendet, da von diesem Protein eine Bibliothek mit unterschiedlichen Resten vor Prolin zur Verfügung steht. N2 ist jedoch nicht thermostabil und die meisten Varianten weisen einen Übergangsmittelpunkt bei thermischer Denaturierung von etwa 32 °C auf. Somit sind Messungen bei 25 °C mit N2 nur bedingt möglich, weil unter diesen Bedingungen das Protein bereits deutlich destabilisiert ist. Daher wurde für temperaturabhängige Aktivitätsbestimmungen gegenüber einem Proteinsubstrat RCM-T1 (reduzierte und Carboxymethylierte Ribonuklease T1 mit den Substitutionen S54G P55N) verwendet (Abbildung 3-39).

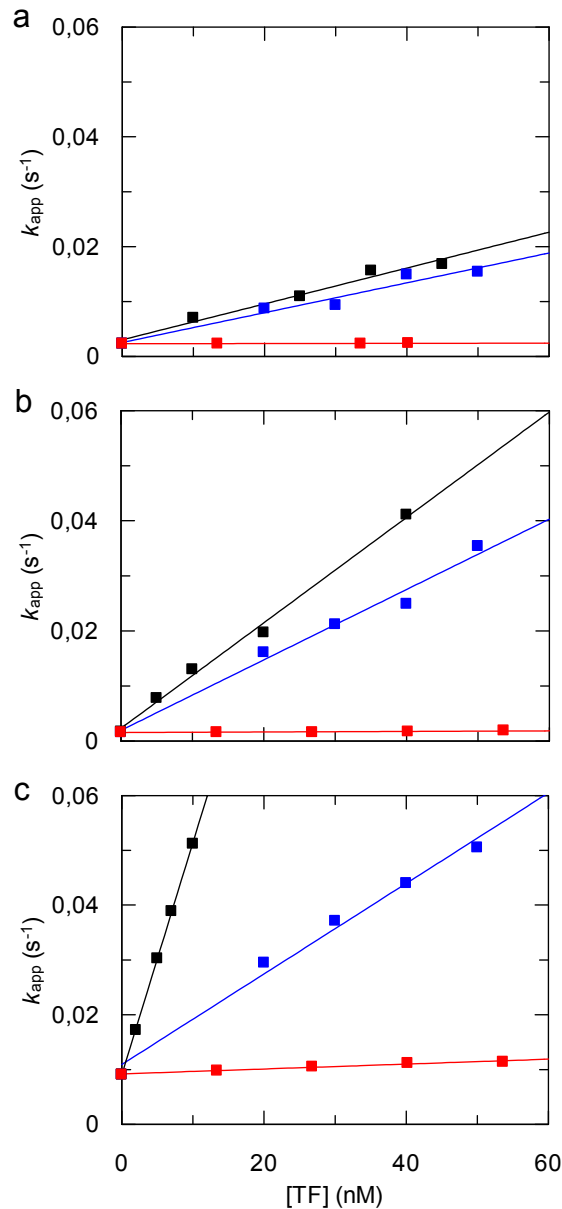


Abbildung 3-39: Katalyse der Rückfaltung von RCM-T1

Aufgetragen sind die apparenten Raten der Prolylisomerisierung an Pro39 in RCM-T1 in Abhängigkeit der TF-Konzentration bei (a) 5 °C, (b) 15 °C und (c) 25 °C für *PhTF* (blau), *EcTF* (schwarz) und *TmTF* (rot). Die Versuche wurden in 100 mM Tris/HCl, pH^{RT} 7,8 durchgeführt. Die aus den Steigungen ermittelten k_{kat}/K_M -Werte sind in Tabelle A 11 zusammengefasst.

Die Rückfaltung von 80 % der Moleküle von RCM-T1 wird durch die *trans*→*cis* Isomerisierung an Pro39 limitiert. Durch die Modifikation der reduzierten Cysteine kann RNaseT1 unter nativen Bedingungen nicht falten und stellt somit ein permanent entfaltetes Proteinsubstrat dar. Unter Hochsalzbedingungen (2 M NaCl) wird jedoch die elektrostatische Abstoßung der Acetyl-Gruppen soweit abgeschwächt, dass RCM-T1 in seine native Konformation falten kann. Somit kann der Isomerasetest ohne Denaturierungsmittelrückstände durchgeführt werden.

Die Aktivität aller drei TFs nimmt mit der Reaktionstemperatur zu (Abbildung 3-39) und *EcTF* weist unter allen untersuchten Bedingungen die höchste katalytische Effizienz auf. Je niedriger die Temperatur wird, desto ähnlicher werden sich allerdings *EcTF* und *PhTF*, sodass sie bei 5 °C die Rückfaltung von RCM-T1 nahezu mit der gleichen Effizienz beschleunigen (Abbildung 3-39a). *TmTF* zeigt selbst bei 25 °C eine Aktivität, die nur knapp oberhalb des Detektionslimits liegt (Abbildung 3-39c).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse zu TFs aus verschiedenen Bakterien, dass die Aktivitäten dieser Faltungshelferenzyme an die Umweltbedingungen angepasst sind. Bei niedrigen Temperaturen ist besonders die Katalyse langsamer Schritte der Proteinfaltung wichtig. In *P. haloplanktis* wird ausreichend PPlase-Aktivität erzeugt, sodass *PhTF* selbst bei niedrigen Temperaturen noch eine gute enzymatische Aktivität aufweist. Zudem ist die Expression bei 4 °C stark erhöht. Diese Art der Kälteschockantwort wird eher selten bei psychrophilen Organismen beobachtet. Die Chaperonaktivität von *PhTF* ist niedrig und somit auch angepasst an den Lebensraum, da bei niedrigen Temperaturen entfaltete Proteine weniger aggregationsanfällig sind und daher diese Aktivität von geringerer Bedeutung ist.

An Faltungshelfer aus mesophilen Organismen wie *E. coli* werden komplexere Anforderungen gestellt. Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, dass *EcTF* Substrate sowohl vor Aggregation schützt, als auch Prolylisomerisierung hoch-effizient beschleunigt. Die Anpassung von *EcTF* an gemäßigte Temperaturen erfolgt durch eine ausgeprägte Bifunktionalität. Dabei arbeitet *EcTF* hocheffizient als Faltungshelferenzym und gleichzeitig als Prolylisomerase.

Die Aufgaben für TF aus dem hyperthermophilen Bakterium *T. maritima* sind überschaubarer. Bei hohen Temperaturen laufen Proteinfaltungsreaktionen sehr schnell ab. Auch Prolylisomerisierung ist eine stark temperaturabhängige Reaktion, die schon bei 50 °C im Bereich weniger Sekunden abläuft. Bei der optimalen Wachstumstemperatur von *T. maritima* (etwa 80 °C) sollte sie daher die Proteinfaltung kaum noch verlangsamen. Gerade bei hohen Temperaturen sind jedoch teilgefaltete Proteine extrem aggregationsanfällig. Um den nötigen Schutz zu gewährleisten benötigt *TmTF* folglich sehr gute Chaperoneigenschaften. Durch ausgeprägte hydrophobe Oberflächen interagiert *TmTF* hochaffin mit entfaltenen Proteinen und bindet diese. Die Ergebnisse aus den Chaperontests deuten an, dass durch die Bindung an *TmTF* die Aggregation aber auch die Faltung von Substratproteinen nahezu vollständig verhindert werden. Erst der Transfer von gebundenen Substraten zu GroEL/ES führt zur Strukturausbildung hin zur nativen Konformation. Für die Aufgaben von *TmTF* ist die PPlase-Aktivität vermutlich nur selten notwendig und daher auch nur schwach ausgeprägt.

4 Zusammenfassende Diskussion

Seit langem ist Prolylisomerisierung als möglicher geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Proteinfaltung bekannt ⁽¹⁰⁰⁾. Anfangs galt dabei die Annahme, dass jedes Prolin in gefalteten Proteinen eine einheitliche Konformation, *cis* oder *trans*, einnimmt. In den vergangenen 15 Jahren wurden einige Beispiele dafür gefunden, dass einzelne Proline in gefalteten Proteinen sowohl in *cis*, als auch in *trans* vorliegen können, wodurch eine strukturelle Heterogenität entsteht ⁽¹¹²⁾. Über die physiologische Bedeutung solcher *cis/trans* Gleichgewichte an Prolin ist allerdings nur wenig bekannt. Seit kurzem werden erste Beispiele dafür gefunden, dass Prolylisomerisierung im nativen Zustand nicht nur lokale Heterogenitäten in ein Protein einführt, sondern auch weitreichende, strukturelle Umlagerungen bewirken kann, die für die Funktion und die Regulation des Proteins von großer Bedeutung sind ⁽²²⁸⁾. Eines dieser Beispiele ist das Signaladapterprotein c-CrkII ⁽¹¹⁶⁾. Überexpression dieses Proteins führt zur Entstehung verschiedener Krebsarten ⁽¹⁹²⁾.

4.1 Prolylisomerisierung als molekulares Gedächtnis bei der Regulation von c-CrkII Proteinen

Für c-CrkII aus dem Huhn wurde bei NMR-Analysen eine Heterogenität an Pro238 am Anfang von SH3^C beobachtet und vorgeschlagen, dass dessen *cis/trans* Isomerisierung zur Regulation der Proteinaktivität verwendet wird. Das aufgestellte Modell beschreibt, dass GgCrkII mit *cis*Pro238 einen geschlossenen, autoinhibierten Zustand einnimmt, in dem die beiden SH3-Domänen SH3^N und SH3^C miteinander wechselwirken und dadurch die Ligandenbindestelle auf SH3^N durch SH3^C blockiert wird. Mit *trans*Pro238 dagegen liegen die beiden Domänen unabhängig voneinander vor und SH3^N ist frei zugänglich für Liganden ^(116, 117).

Kinetische Faltungsstudien liefern keine Hinweise auf feste Domäneninteraktionen in den Proteinen der beiden Spezies Mensch und Huhn. Dies bedeutet, dass SH3^N und SH3^C in SH3^N-SH3^C keiner thermodynamischen Kopplung unterliegen, die beiden Domänen in dem Zweidomänenprotein also nicht vor Entfaltung geschützt werden. Dies gilt für die Proteine beider Spezies, Mensch und Huhn.

Es zeigt sich, dass HsSH3^N-SH3^C mit dem Liganden ähnlich schnell assoziiert wie die isolierte SH3^N-Domäne, das Protein also nicht durch die Anwesenheit von SH3^C inhibiert wird. In GgSH3^N-SH3^C hingegen läuft die Bindung in zwei Phasen ab. Die schnelle Reaktion stimmt dabei mit der Bindung des Liganden durch isolierte SH3^N überein. Die verlangsamte Phase konnte auf die Anwesen-

heit von Pro238 zurückgeführt werden und wurde durch die P238A Substitution eliminiert. Auf das humane Protein hatte diese Substitution keine Auswirkungen.

In den Proteinvarianten SH3^N-SH3^C P238A ist die Gly237-Ala238 Peptidbindung in der *trans*-Konformation arretiert. Daraus folgt, dass die verlangsamte Assoziationsreaktion von GgSH3^N-SH3^C von der *cis*Pro238 Spezies verursacht wird. Die *cis*-Konformation an Pro238 induziert dabei jedoch keinen vollständig autoinhibierten Zustand, wie aus NMR-Experimenten vorgeschlagen, sondern führt lediglich zu einer niedrig-affinen Form von GgSH3^N-SH3^C. Im humanen Protein liegt Pro238 nahezu ausschließlich in *trans*-Konformation vor und die Ligandenbindestelle auf SH3^N ist somit in HsSH3^N-SH3^C immer zugänglich.

In SH3^N-SH3^C aus dem Huhn ist die Bindung von C3G₁₈ an SH3^N mit dem *cis/trans* Gleichgewicht an Pro238 in SH3^C energetisch gekoppelt. Daher tritt in GgSH3^N-SH3^C eine prolinlimitierte Bindungsphase auf und umgekehrt wird während der Faltung von GgSH3^N-SH3^C genug Energie bereitgestellt, um C3G₁₈ in einer Pro238-abhängigen Reaktion partiell von der Bindungsstelle zu verdrängen. Eine derartige Kopplung tritt beim humanen Protein nicht auf. Diese Experimente zeigen also, dass c-CrkII aus Mensch und Huhn unterschiedlich reguliert werden. Das humane Protein liegt in einem permanent aktiven Zustand mit *trans*Pro238 vor, wohingegen das Protein aus dem Huhn in einem offenen, hoch-affinen Zustand (mit *trans*Pro238) und einem geschlossenen, niedrig-affinen, aber nicht autoinhibierten Zustand (mit *cis*Pro238) vorliegt. Die Faltung von GgCrkII begünstigt dabei die *cis*-Konformation an Pro238, durch Bindung eines Liganden wird das Gleichgewicht hin zu *trans*Pro238 verschoben. Da beide Formen von GgSH3^N-SH3^C (mit *cis* und *trans*Pro238) mit Liganden wechselwirken können, und da im Protein-Ligand-Komplex das *cis/trans* Gleichgewicht verschoben wird, wurde ein Vier-Spezies-Boxmodell vorgeschlagen, um die Interaktion von GgCrkII mit Liganden zu beschreiben.

Interessant ist, dass dies nicht für das humane Protein gilt, obwohl die beiden Proteine eine sehr hohe Sequenzhomologie aufweisen. Kreuzvarianten an den Resten in SH3^C, die sich zwischen den beiden Spezies unterscheiden, zeigen, dass der Rest an Position 239, direkt nach dem regulatorisch wichtigen Pro238 die Stabilität und die Faltung von SH3^C beeinflusst. Durch die I239F Substitution konnte in HsSH3^C ebenfalls eine *cis/trans* Heterogenität an Pro238 erzeugt werden, die jedoch nicht zu einer Pro238-abhängigen Regulation von HsCrkII führte.

Ein weiterer Sequenzunterschied befindet sich an Position 272 (Val im Protein aus dem Mensch, Met in dem Protein aus dem Huhn). Kreuzvariationen dieses Rests beeinflussten die Stabilität von SH3^C nicht, jedoch wurde im humanen Protein (HsSH3^C V272M) eine Faltungsheterogenität induziert, ähnlich

der *cis/trans*Pro238-abhängigen Heterogenität in *GgSH3^C* und *HsSH3^C* I239F. Dies bedeutet, dass auch mit Ile239 prinzipiell die *cis* und *trans*-Konformationen an Pro238 zugänglich sind, wenn sich an Position 272 ein Met befindet.

Die Kombination der beiden Substitutionen I239F und V272M in *HsSH3^N*-*SH3^C* führte schließlich dazu, dass sich diese Variante hinsichtlich ihrer Faltung und Affinität zu Liganden genauso verhält, wie das Wildtypprotein *SH3^N*-*SH3^C* aus dem Huhn. Es konnte also auch im humanen Protein *HsSH3^N*-*SH3^C* eine regulatorische Prolylisomerisierung an Pro238 etabliert werden und dabei zwei Reste identifiziert werden, die für diese Regulation essentiell notwendig sind.

Diese Ergebnisse stellen ein neues Beispiel dafür dar, wie ein Signal, das durch die Konformation eines spezifischen Prolinrests verursacht wird, über weite Strecken innerhalb eines Proteins kommuniziert wird. Ähnliche Beobachtungen wurden für das Gen-3-Protein des Phagen fd gemacht, bei dem die Konformation eines Prolins an die Interaktionsfläche zwischen zwei Domänen weitergeleitet wird. Dies geschieht durch lokale Entfaltung des Linkerbereichs zwischen den Domänen, da ein H-Brückennetzwerk aufgebrochen wird, wenn das regulatorisch wichtige Prolin in *trans*-Konformation vorliegt.

Eine systematische Substitutionsanalyse in dem humanen Protein mit dem neu etablierten Prolinschalter (*HsSH3^N*-*SH3^C_{PS}*) gab Aufschluss darüber, wie in c-CrkII der isomere Zustand an Pro238 innerhalb von *SH3^C* weitergeleitet wird. Die erhaltenen Funktionsdaten wurden auf der Basis der verfügbaren NMR-Strukturen für *GgSH3^C* interpretiert ⁽¹¹⁷⁾. Es zeigt sich deutlich, dass die Seitenkette von Leu234 im Linkerbereich vor Pro238 notwendig ist, um mit dem Pyrrolidinring von Pro238 zu interagieren, wenn die Prolylbindung in *cis*-Konformation vorliegt. Alle anderen Positionen zwischen 230 und 237 sind nicht essentiell für die regulatorische Weiterleitung der Prolylisomerisierung in c-CrkII, ändern aber ihre Orientierung im Protein in Abhängigkeit von der Konformation der Prolylbindung an Pro238.

Die *cis*-Konformation einer Prolylbindung ist intrinsisch instabiler als die *trans*-Konformation und daher kann die *cis*-Form an Pro238 nur eingenommen werden, wenn sie relativ zur *trans*-Konformation stabilisiert wird. Die Energie, die benötigt wird, damit im nativen Zustand von c-CrkII aus dem Huhn *cis*Pro238 bevorzugt wird, hat verschiedene, molekulare Ursachen. Zunächst muss sich an der Position nach Pro238 ein Phe befinden. Dadurch wird zwar die Nettostabilität der gesamten *SH3^C*-Domäne verringert, allerdings nimmt der energetische Unterschied zwischen *cis* und *trans*Pro238 ab, da vor allem die *trans* Form destabilisiert wird. Somit wird das Gleichgewicht hin zu *cis*Pro238 verschoben.

Besonders wichtig ist die Interaktion von Leu234 mit dem Pyrrolidinring von Pro238, wenn Pro238 in *cis*-Konformation vorliegt, sowie die Orientierung der

Seitenkette von Phe239 (Abbildung 4-1). Beide Reste werden direkt durch die Isomerisierung der Prolylbindung an Pro238 beeinflusst. Mit *trans*Pro238 zeigt der Rest Phe239 ins Innere von SH3^C und ist nahezu rechtwinklig zu Trp276 orientiert, dem zentralen Rest des hydrophoben Kerns dieser Domäne. Die aromatische Seitenkette von Phe239 ist sterisch anspruchsvoll und drückt dabei den Faltblattstrang, der zu Met272 führt und den Linkerbereich vor Pro238 (230 - 237) auseinander (Abbildung 4-1), was zusätzlich dadurch begünstigt wird, dass die Interaktion zwischen Leu234 und Pro238 aufgehoben wird. Diese beiden Bereiche sind wie antiparallele β -Stränge H-verbrückt, wenn Pro238 in *cis*-Konformation vorliegt (Abbildung 4-1b) und Phe239 dadurch aus der globulären Faltung der Domäne herausklappt. Die lokal optimierte Faltung stabilisiert vermutlich die Spezies mit *cis*Pro238. Die Gesamtstabilität der SH3^C-Domäne ist in diesem Zustand jedoch etwas geringer als mit *trans*Pro238, die vermutlich durch Wechselwirkungen zweier π -Elektronensysteme bestimmt wird und daher ist in der isolierten Domäne *trans*Pro238 gegenüber *cis*Pro238 leicht favorisiert mit einem *cis/trans* Gleichgewicht von etwa 40/60.

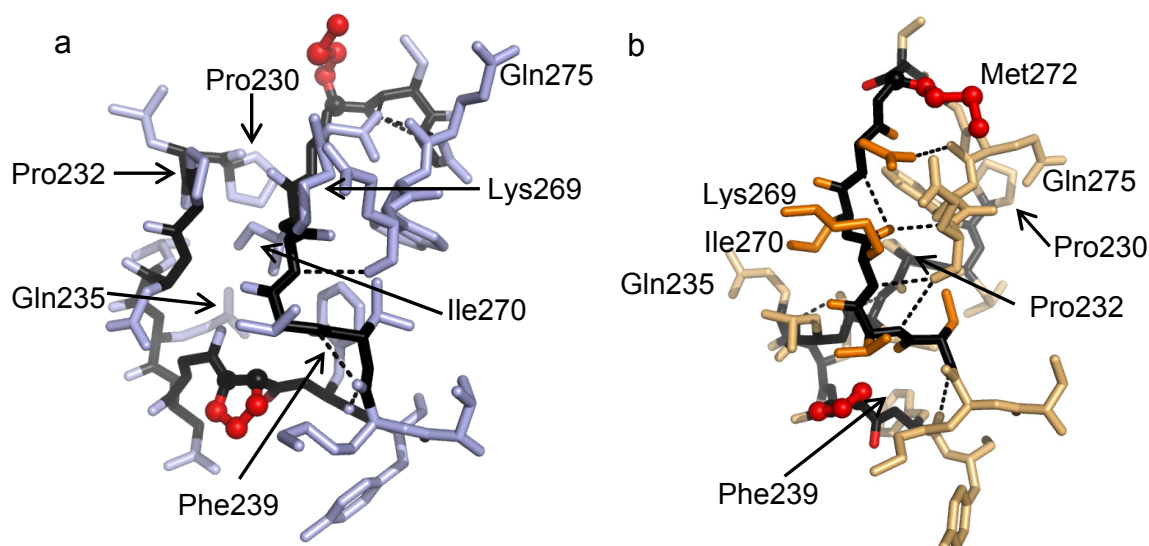


Abbildung 4-1: *cis/trans*Pro238-abhängiges H-Brückennetzwerk

Dargestellt sind die Bereiche um Pro238 und um Met272 von GgSH3^C mit (a) *trans*Pro238 (PDB: 2L3Q⁽¹¹⁷⁾) und (b) *cis*Pro238 (PDB: 2L3P⁽¹¹⁷⁾). Reste vor Met272, die variiert wurden sind dunkler, Pro238 und Met272 rot gefärbt. Das Peptidrückgrat der variierten Reste ist in schwarz dargestellt. H-Brücken sind als unterbrochene Linien eingezeichnet. Die Orientierung der Proteine ist in beiden Teilabbildungen identisch. Die Abbildungen wurden mit PyMol erstellt⁽¹⁴⁴⁾.

Diese Verbrückung von zwei Faltblattsträngen, die in der Aminosäuresequenz weit voneinander entfernt sind, erinnert an die β -Strangkomentation wie sie bei der Assemblierung bakterieller Pili beobachtet wird. Dabei wird ein β -Strang der Pilusuntereinheit i_{+1} verwendet, um die Faltung der Untereinheit i zu

vervollständigen und dabei die Verlängerung eines Pilus und den Zusammenhalt der einzelnen Piliinmoleküle zu ermöglichen^(229, 230).

Im Zweidomänenprotein GgSH3^N-SH3^C kann SH3^C intramolekular mit SH3^N wechselwirken wenn Pro238 in der *cis*-Konformation vorliegt wodurch sich die beiden SH3-Domänen in GgSH3^N-SH3^C Pro238-abhängig beeinflussen. Nach kurzen Entfaltungspulsen ändern sich die Amplitude und vermutlich auch die Rate der Rückfaltung von SH3^C in Abhängigkeit des Faltungszustands von SH3^N. Die Struktur von SH3^N wird durch Prolylisomerisierung an Pro238 nicht beeinflusst und dient somit als Gerüst für die Etablierung intramolekularer Wechselwirkungen.

Bindungsstudien zeigten, dass insbesondere Substitutionen im Kettenbereich, der auf Met272 hinführt, die Domäneninteraktion stören. Für die Varianten V267G, T268G und I270G ist die molekulare Interpretation eingeschränkt, da diese Substitutionen die gesamte SH3^C-Domäne stark destabilisieren. Die Substitution von Lys269 hingegen verändert die Stabilität von SH3^C nicht, aber schwächt die Domäneninteraktionen stark ab. Entsprechendes gilt für Gln297 am C-Terminus der Domäne.

Zusammen zeigen die Substitutionsanalysen, dass, zusätzlich zu Phe239 und Met272, der Kettenbereich 267-271 in SH3^C, der C-Terminus der Domäne und Leu234 im Linkerbereich essentiell wichtig sind, um das *cis/trans* Isomerisierungssignal von Pro238 an die Substratbindestelle in SH3^N zu kommunizieren. Diese Interpretationen werden durch die Analyse der wichtigen Resten in dem Zweidomänenprotein ergänzt. Dafür wurde die NMR-Struktur von GgSH3^N-SH3^C herangezogen⁽¹¹⁷⁾, die die Interaktion von SH3^N und SH3^C mit *cis*Pro238 zeigt (Abbildung 4-2). In Übereinstimmung mit den durchgeführten Bindungsstudien zeigen besonders die Reste Lys269 und Gln297 ausgeprägte Interaktionen zu SH3^N. Diese Interaktionen sind so schwach, dass keine gegenseitige Stabilisierung der beiden Domänen beobachtet werden konnte. Sie sind jedoch ausreichend, um die Affinität gegenüber Liganden zu verschlechtern. Ebenso die Verbrückung des Linkers mit den Resten vor Met272 wird dadurch verdeutlicht (vgl. Abbildung 4-1). Wie das Motiv Pro-Glu-Pro (217-219) an der Regulation beteiligt ist, kann aus der Struktur jedoch nicht erschlossen werden.

Doppelmischexperimente zu Faltung und Funktion ermöglichen es Reaktionsintermediate zu analysieren und die Raten der Prolylisomerisierung im entfalteten Protein, im nativen Zustand, sowie im Protein-Ligand-Komplex zu ermitteln. In Kombination mit kinetischen Simulationen zeigt sich, dass die Faltung und die Ligandenbindung in GgCrkII durch ein Sechs-Spezies-Doppelboxmodell verknüpft sind (Abbildung 3-24). In allen drei Zuständen (denaturiert,

nativ und im Komplex mit Liganden) besteht dabei ein definiertes *cis/trans* Gleichgewicht an Pro238.

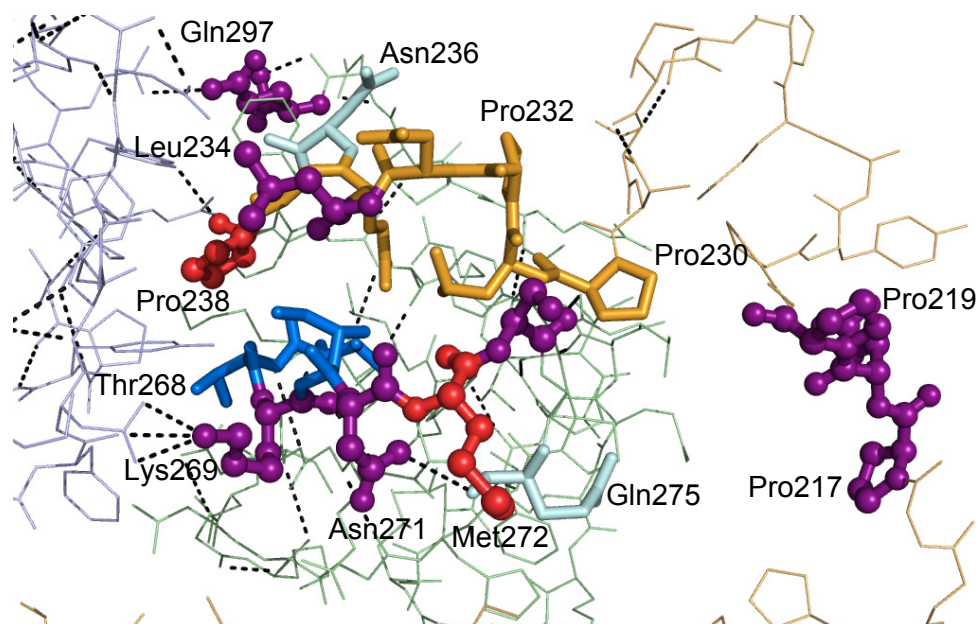


Abbildung 4-2: Strukturelle Interpretation der Domäneninteraktion in GgSH3^N-SH3^C

Dargestellt ist ein Ausschnitt von GgSH3^N-SH3^C (PDB: 2L3S⁽¹¹⁷⁾) als Linien mit SH3^N (hellblau), SH3^C (hellgrün) und dem Linker (beige). Die analysierten Reste sind als Stäbchen gezeigt, besonders wichtige Reste zusätzlich als Kügelchen. Die analysierten Reste sind nach ihrer Wichtigkeit für die Pro238-abhängige Regulation gefärbt, mit rot für Pro238 und Met272, violett für Reste die essentiell sind für die Regulation, blau für Reste, die für die Gesamtstabilität wichtig sind, dunkelgelb für Reste mit verringerter Gleichgewichtsverschiebung und türkis für Reste, die unwichtig sind für die Regulation. Die Abbildung wurde mit PyMol erstellt⁽¹⁴⁴⁾.

Im denaturierten Zustand liegt das *cis/trans* Gleichgewicht bei etwa 11/89, die *trans*-Form ist also stark begünstigt. Nachdem die konformationelle Faltung abgeschlossen ist, assoziieren SH3^N und SH3^C in einer kinetisch nicht auflösbaren Reaktion miteinander. Durch diese Assoziationsreaktion wird das *cis/trans* Gleichgewicht von 40/60 in der isolierten SH3^C-Domäne zu 86/14 im geschlossenen Zustand von GgSH3^N-SH3^C verschoben. Für diese Verschiebung ist eine Energie von etwa 4 kJ/mol notwendig, die in Form von beschleunigter Rückfaltung von SH3^C mit *cis*Pro238 in Anwesenheit gefalteter SH3^N beobachtet werden kann.

Wie beschrieben ändert sich die Struktur des Linkerbereichs deutlich durch Prolylisomerisierung an Pro238. In der Mitte dieses Linkers befindet sich Tyr222, das durch die Abelson-Kinase spezifisch phosphoryliert werden kann. Um zu überprüfen, ob diese Phosphorylierung in humanem c-CrkII eine regulatorische Prolylisomerisierung induziert, wurden die unphosphorylierte und die phosphorylierte Form von HsCrkII, sowie die entsprechenden Formen mit der P238A Substitution analysiert. Es ergaben sich allerdings keine Hinweise auf

eine Kopplung zwischen Phosphorylierung und Prolylisomerisierung. Die gleichen Experimente für die Proteine aus dem Huhn zeigten, dass nach Phosphorylierung an Tyr222 die Bindung an C3G₁₈ unabhängig von Pro238 verläuft. Vermutlich wird c-CrkII hauptsächlich durch Phosphorylierung reguliert. Prolylisomerisierung an Pro238 dient im Protein aus dem Huhn damit als zusätzliche Feinregulation im unphosphorylierten Zustand. Die Kombination der dafür nötigen Reste Phe239 und Met272 ist einzigartig für das Protein aus dem Huhn.

4.2 p53 als Spezifitätsmodul für mitochondriales Cyclophilin

Am Beispiel von c-CrkII wurde gezeigt, dass Prolylisomerisierung im nativen Zustand eines Proteins eine Regulationsmöglichkeit darstellt, um zwischen zwei Zuständen mit unterschiedlicher physiologischer Bedeutung hin- und herzuschalten. Davon betroffen ist nicht nur die lokale Umgebung des zu isomerisierenden Prolins, sondern es können auch weitreichende strukturelle Umlagerungen innerhalb einer Proteindomäne ausgelöst werden, die dann sogar in andere Domänen kommuniziert werden können. Neben der Aufgabe als Proteinfaltungshelfer, kommt Prolylisomerasen mit zunehmendem Verständnis über Prolylisomerisierungen in nativen Proteinen noch eine weitere Bedeutung zu. Sie ermöglichen es, dass Signalweiterleitungsprozesse, die durch Prolylisomerisierung an- und abgeschaltet werden, in ihrem Zeitverlauf moduliert werden können, damit lebende Zellen optimal auf äußere Einflüsse reagieren können.

In der Matrix von Mitochondrien ist nur eine PPlase bekannt, mCypD, die entsprechend in der Lage sein muss, verschiedene Aufgaben gleichzeitig zu erfüllen. In dieser Arbeit konnten zwei Aspekte erarbeitet werden, die erklären können, wie mCypD die Faltung von Proteinen in der mitochondrialen Matrix unterstützt und gleichzeitig eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätspore (mPTP) einnimmt. Beides ist nur durch die sehr hohe katalytische Aktivität von mCypD möglich ($k_{\text{kat}}/K_M \geq 4000 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Dabei differenziert mCypD wahrscheinlich kaum zwischen Substraten, die sich in der Größe oder der Aminosäuresequenz um Prolin unterscheiden. In Abwesenheit äußerer Stressoren ist die Hauptfunktion von mCypD vermutlich, als Proteinfaltungshelfer zu wirken.

Sind Zellen jedoch oxidativem Stress ausgesetzt, wird cytosolisches p53 in die Matrix von Mitochondrien transloziert, um dort Apoptose einzuleiten. Unter extremen Bedingungen führt die Anwesenheit von p53 in Mitochondrien sogar zu nekrotischem Zelltod, wodurch auch benachbarte Zellen geschädigt werden. Histologisch wird Nekrose als Plaque toter Zellen in der Größe mehrerer Quadratzentimeter beobachtet. Hauptauslöser von Nekrose nach oxidativer Schädigung ist das unkontrollierte Öffnen der mPTP, wodurch erst die Mito-

chondrien anschwellen und platzen, bevor schließlich die ganze Zelle unkontrolliert abstirbt und das Cytoplasma in den Extrazellularraum freigesetzt wird.

Hier konnte die Interaktion zwischen p53 und mCypD mit gereinigten Komponenten *in vitro* nachvollzogen werden. Es zeigt sich, dass p53 hoch-affin und damit gerichtet an mCypD bindet. Da der bekannte Inhibitor CsA durch diese Wechselwirkung aus dem aktiven Zentrum von mCypD verdrängt wird, findet die Bindung von p53 vermutlich in der Nähe des katalytischen Zentrums statt. Dies wird von vorläufigen NMR-Titrations (durchgeführt in der Gruppe von Professor Seeliger) bestätigt, die deutliche Peakverschiebungen am Rand des aktiven Zentrums von mCypD zeigen. Die Bindung von p53 an mCypD verringert dabei die Aktivität gegenüber einem Proteinsubstrat vollständig, nicht jedoch gegenüber einem Tetrapeptid.

Diese Beobachtung führt zu einem Modell, das p53 als Selektivitätsfilter oder Spezifitätsmodul für mCypD beschreibt. Die Translokation von p53 in die Matrix von Mitochondrien tritt nach Zellschädigung auf und leitet das Absterben der Zellen ein. Daher muss mCypD unter diesen Umständen nicht länger als Proteinfaltungshelfer wirken. Möglicherweise schirmt p53 das aktive Zentrum von mCypD durch hoch-affine Bindung vor einem Großteil der normalen Substrate ab. Nur die Substrate, die für die Öffnung der mPTP benötigt werden, können weiterhin von mCypD erkannt und umgesetzt werden. Dieses noch spekulative Modell wird von der Beobachtung unterstützt, dass die PPlaseaktivität von mCypD essentiell ist, um die mPTP zu öffnen.

Diese Ergebnisse zeigen, wie unterschiedliche Möglichkeiten der Regulation von Proteinaktivitäten nach einem Baukastenprinzip kombiniert werden können. Eine entscheidende Rolle dabei spielt die subzelluläre Lokalisation eines Proteins, die sich, abhängig von den äußeren Umständen ändern kann. Durch die Lokalisation von p53 in die mitochondriale Matrix ergibt sich folglich ein neues Interaktom und p53 wirkt als allosterischer Inhibitor auf die Faltungshelferfunktion von mCypD. Gleichzeitig führt die Inhibition dieser Funktion von mCypD aber auch zu einer relativen Aktivierung der mCypD-abhängigen Porenöffnung durch die Etablierung einer p53-vermittelten Substratspezifität und -selektivität.

4.3 Die Bedeutung von Prolylisomerasen bei der Anpassung von Bakterien an unterschiedliche Lebensräume

mCypD ist eine kritische Komponente des nekrotischen Zelltods. In einem weiteren Teilprojekt dieser Arbeit konnte gezeigt werden, wie PPlasen auch das Überleben von Zellen unter extremen Bedingungen sicherstellen. Dazu wurde in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Dr. Georges Feller die Anpassung der prokaryotischen PPlase Triggerfaktor (TF) an unterschiedliche Lebensbe-

dingungen untersucht. TF ist ein Dreidomänenprotein und aus einer Ribosomenbindedomäne, einer Chaperondomäne und einer PPlase-Domäne vom FKBP-Typ aufgebaut. Alle drei Domänen sind dabei notwendig, um die Funktionalität von TF zu gewährleisten. Durch die Bindung an Ribosomen ist TF in Bakterien das erste Chaperon, das mit neusynthetisierten Proteinen interagiert. Diese Bindung an entfaltete Proteine und die PPlase-Aktivität weisen unterschiedliche Charakteristika auf, die dem jeweiligen Lebensraum angepasst sind.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse zur Anpassung von TF an die natürlichen Lebensbedingungen, dass bei niedriger Temperatur besonders die PPlase-Aktivität, weniger die Chaperonaktivität wichtig ist. Unter moderaten Bedingungen ist es für Bakterien notwendig Aggregation zu unterdrücken und produktive Faltung durch die Beschleunigung langsamer Faltungsreaktionen zu fördern. Diese beiden Eigenschaften sind in TF aus *E. coli* vereint und machen das Enzym daher zu einem effizienten, bivalenten Faltungshelferprotein. Bei hohen Temperaturen dagegen kommt dem Schutz vor Aggregation die größte Bedeutung zu. TF aus *T. maritima* bietet diesen Schutz durch feste Bindung entfalteter Proteine, bevor diese an GroEL/ES weitergegeben werden, um in diesem Inneren falten zu können.

4.4 Zusammenfassende Schlussfolgerungen

Über die allosterische Regulation von Proteinen ist viel bekannt und an Modellsystemen konnten unterschiedliche Mechanismen auf molekularer Ebene erklärt werden. Das wohl bekannteste Lehrbuchbeispiel ist Hämoglobin. Die Interaktion einer Untereinheit mit O₂ löst dabei Strukturumlagerungen in den anderen drei Untereinheiten aus, die dadurch von der niedrig-affinen, gespannten Form (*tense*, T-Zustand) in die hoch-affine, entspannte Form (*relaxed*, R-Zustand) übergehen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, wie Prolylisomerisierung als molekulares Gedächtnis bei der allosterischen Regulation von Proteinen verwendet werden kann. Durch die Interaktion mit Bindungspartnern wird in dem Signaladapterprotein c-CrkII aus dem Huhn das Gleichgewicht von dem T-Zustand (mit *cis*Pro) in einer prolinabhängigen Reaktion hin zu dem hoch-affinen R-Zustand (mit *trans*Pro) verschoben. Selbst nachdem das ursprüngliche Eingangssignal wieder abgebaut wurde, erinnert sich das Protein noch daran und bleibt für eine gewisse Zeit in dem R-Zustand. Die Signalkaskade wird also weiterhin aufrecht erhalten und erst durch die intrinsisch langsame *trans*→*cis* Isomerisierung an einem spezifischen Prolin abgeschaltet, wobei das Protein wieder in den T-Zustand übergeht. Dieser Zustand wird in GgCrkII durch die an Pro238 gekoppelte Umstrukturierung des hydrophoben Kerns der C-terminalen SH3-Domäne stabili-

siert, da nur durch diese veränderte Domänenfaltung intramolekulare Wechselwirkungen zur N-terminalen SH3-Domäne etabliert werden können. Diese diffizilen Unterschiede im Faltungszustand des R- und des T-Zustands werden im Wesentlichen durch veränderte H-Brückennetzwerke erreicht und sind ausreichend um das *cis/trans* Gleichgewicht an Pro238 in Richtung der energetisch ungünstigen *cis*-Konformation zu verschieben.

Nicht immer ist Prolylisomerisierung im nativen Zustand von Proteinen mit diesem Gedächtniseffekt verknüpft. Um prolinabhängige Strukturveränderungen von der intrinsisch langsamen Rotation um eine partielle Doppelbindung zu entkoppeln, gibt es in der Natur eine Vielzahl von Enzymen, die diese Reaktion beschleunigen. Es wurde gezeigt, dass diese Enzyme als Faltungshelferproteine, sowie als Helfer bei der Regulation von Proteinen wirken können. Die Faltungshelferfunktionen sind dabei an die jeweiligen Umweltbedingungen angepasst und unterscheiden sich stark zwischen psychrophilen und hyperthermophilen Organismen. Wirken PPlasen regulatorisch auf andere Proteine, so müssen die Enzyme selbst reguliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass dabei verschiedene Regulationsmöglichkeiten wie einzelne Module kombiniert werden können. So fungiert in Mitochondrien p53 vermutlich als Spezifitätsmodul für mCypD.

Zusammenfassend gibt diese Arbeit Einblicke auf molekularer Ebene, wie Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung verwendet werden kann, um die Aktivität von Proteinen durch weitreichende, strukturelle Umorganisationen und das Aufbrechen intramolekularer Wechselwirkungen zu regulieren. Davon sind hauptsächlich lokale H-Brückennetzwerke betroffen, die einen großen Beitrag zur Energetik und Kinetik der Proteinfaltung leisten. An der Regulation durch Prolylisomerisierung im nativen Zustand eines Proteins können auch Prolylisomerasen beteiligt sein, die wiederum selbst Teil eines großen Regulationsnetzwerks sind.

5 Zusammenfassung

Das proto-onkogene Signaladapterprotein c-CrkII ist modular aus drei Domänen aufgebaut, SH2-SH3^N-SH3^C. NMR-Analysen zeigten, dass Pro238 in c-CrkII aus dem Huhn sowohl in *cis* als auch in *trans* Konformation vorliegen kann. Es wurde vorgeschlagen, dass diese konformationelle Heterogenität verwendet wird, um die Affinität gegenüber Liganden zu regulieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob ein derartiges *cis/trans* Gleichgewicht auch in dem homologen Protein aus dem Mensch existiert.

Durch die Analyse der Faltung und der Interaktion mit einem Peptidliganden konnte gezeigt werden, dass c-CrkII aus Mensch und Huhn unterschiedlich reguliert werden. Das humane Protein liegt permanent aktiv vor und die beiden SH3-Domänen interagieren nicht miteinander. In c-CrkII aus dem Huhn dagegen existieren zwei distinkte Zustände, die von der Konformation der Prolylbindung an Pro238 abhängen. Mit *trans*Pro238 liegt GgCrkII aktiv vor und SH3^N bindet Liganden mit hoher Affinität, mit *cis*Pro238 dagegen interagiert SH3^C mit SH3^N und verringert dadurch die Affinität für nachgelagerte Interaktionspartner. Allerdings stellt diese Form keinen vollständig autoinhibierten, sondern eher einen niedrig-affinen Zustand dar.

In einer Substitutionsanalyse konnte dieses unterschiedliche Bindungsverhalten auf zwei Sequenzunterschiede zwischen den Proteinen der beiden Spezies zurückgeführt werden. Durch die simultane Substitution der Reste Ile239 und Val272 (im humanen Protein) durch Phe und Met (wie im Protein aus dem Huhn) konnte auch in *HsCrkII* ein Pro238-abhängiges Bindungsverhalten etabliert werden.

Mit einer weiteren Serie von Aminosäureaustauschen in dem humanen Protein mit dem artifiziellen Prolinschalter konnten Reste identifiziert werden, die notwendig sind, damit SH3^N und SH3^C in Abhängigkeit der Konformation an Pro238 miteinander interagieren. Das Signal, das durch die Isomerisierung an Pro238 generiert wird, wird sowohl in den Linker hin zu SH3^N als auch zu Met272 in SH3^C weitergeleitet. Diese intramolekulare Signaltransduktion wird dabei durch die veränderten sterischen Ansprüche der *cis* und der *trans* Prolylbindung an Pro238 bestimmt. Zum einen wird dadurch Leu234, das *cis*Pro238 direkt kontaktiert, im *trans*Pro238 Zustand von der jetzt anders orientierten Prolylbindung selbst verdrängt. Dies führt zu einer Auflockerung des Linkerbereichs vor Pro238. Dadurch entsteht genug Freiraum, damit Phe239 in das Innere von SH3^C klappen kann und dort Druck auf Val267 ausübt. Dieses Val befindet sich am Anfang des β -Stranges, der zu Met272 führt und der Phe239-induzierte Druck wird vermutlich entlang dieses Faltblattes zu Met272 propagiert. Dass das lösungsmittlexponierte Met272 an der Spitze einer Schleife zwischen zwei Falt-

blattsträngen notwendig ist, damit c-CrkII prolinabhängig reguliert wird, wurde gezeigt. Es bleibt allerdings unklar, warum diese Art der Regulation mit Val272 anstelle von Met nicht möglich ist.

Durch detaillierte, kinetische Analysen konnte die Energetik der regulatorischen Prolylisomerisierung in GgCrkII aufgeklärt werden. Mit Doppelmischexperimenten war es möglich die Faltung mit der Funktion von c-CrkII zu verknüpfen. Dabei konnten die mikroskopischen Raten der Prolylisomerisierung im entfalteten Protein, im nativen Zustand, sowie im Protein-Ligand-Komplex bestimmt werden. In Kombination mit kinetischen Simulationen wurde gezeigt, dass der Faltungsprozess und schwache Domäneninteraktionen genug Energie aufbringen, um das *cis/trans* Gleichgewicht an Pro238 von 11/89 im entfalteten Protein zu 86/14 im nativen Protein zu verschieben. Durch die Bindung eines Liganden wird dieses Gleichgewicht zu 41/59 verschoben. Es findet dabei keine lokale Entfaltung statt, sondern die beiden SH3-Domänen liegen vielmehr entkoppelt vor, wie zwei unabhängige Proteine. Die Re-Isomerisierung an Pro238 bestimmt dabei die Lebensdauer des offenen, hoch-affinen Zustands von GgCrkII und wirkt somit als molekulares Gedächtnis der Regulation.

Die zweite Möglichkeit der Regulation von c-CrkII beruht auf spezifischer Tyrosinphosphorylierung, insbesondere an Tyr222 im Linkerbereich zwischen den beiden SH3-Domänen. Durch die Analyse der Faltung und der Stabilität der *in vitro* phosphorylierten Proteinen, sowie der Interaktion von Liganden mit SH3^N konnte gezeigt werden, dass Phosphorylierung und Prolylisomerisierung zwei unabhängige Regulationsmechanismen für c-CrkII darstellen. Die Proteine aus dem Mensch und aus dem Huhn unterscheiden sich dabei nicht.

Prolylisomerisierung ist eine intrinsisch langsame Reaktion und es existieren viele Enzyme, die diese Umlagerung beschleunigen und dadurch an der Regulation von Proteinaktivitäten beteiligt sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, wie die mitochondriale Prolylisomerase mCypD durch die gerichtete Interaktion mit p53 reguliert wird. Diese Regulation ist notwendig, um die mitochondriale Permeabilitätspore zu öffnen, was schließlich zu Nekrose führt. Durch die Bindung von p53 an mCypD in der Nähe des aktiven Zentrums zeigt mCypD eine ausgeprägte Substratspezifität. p53 wirkt dabei als allosterischer Inhibitor der generellen Proteinfaltungshelferfunktion von mCypD und aktiviert das Enzym gleichzeitig für Substrate, die zur Porenöffnung notwendig sind.

Am Beispiel des Triggerfaktors konnte erarbeitet werden, wie Prolylisomerasen an der Anpassung von Bakterien an extreme Lebensbedingungen beteiligt sind. Es wurde gezeigt, dass bei niedrigen Temperaturen besonders die Prolylisomeraseaktivität wichtig ist. Unter moderaten Bedingungen übt Triggerfaktor zwei Funktionen aus. Neben der hohen Aktivität als Prolylisomerase

wird auch die Aggregation von Proteinen verhindert. Diese beiden Funktionen sind in Triggerfaktor aus *E. coli* vereint. Bei hohen Temperaturen ist Prolylisomerisierung so stark beschleunigt, dass sie keinen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Proteinfaltung mehr darstellt. Daher ist die Prolylisomeraseaktivität von Triggerfaktor aus dem hyperthermophilen Organismus *T. maritima* nur schwach ausgeprägt, dagegen ist das Enzym aber in der Lage die Aggregation von Proteinen hocheffizient zu verhindern.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, wie Prolylisomerisierung im nativen Zustand von Proteinen verwendet werden kann, um durch weitreichende, strukturelle Umlagerungen die Aktivität eines Proteins zu regulieren. An den Beispielen von mitochondrialem Cyclophilin und bakteriellem Triggerfaktor wurde zudem erarbeitet, wie Prolylisomerasen an derartigen, regulatorischen Prozessen beteiligt sein können und dabei sicherstellen, dass lebende Zellen schnell auf äußere Einflüsse reagieren können.

6 Summary

c-CrkII is a proto-oncogenic three-domain signal adapter protein that consists of a SH2-domain followed by two SH3-domains (SH3^N and SH3^C). NMR-studies revealed a *cis/trans* heterogeneity at Pro238 at the beginning of SH3^C in the protein from chicken, and it was suggested that isomerization at this residue is used to regulate the affinity of SH3^N towards ligands. The aim of this work was to investigate if the same mechanism is used by the homologous human protein.

Analysis of the folding process and the association with a peptide ligand showed that c-CrkII proteins from human and chicken are regulated differently. While human c-CrkII is permanently active and the two SH3-domains show no interactions, the protein from chicken adopts two distinct states. With *trans*Pro238 GgCrkII exists in an open state and SH3^N is accessible for ligands. In contrast the affinity for ligands is reduced but not abolished with *cis*Pro238 due to weak domain interactions between SH3^N and SH3^C.

This different behavior of the two proteins could be traced back to two amino acid differences. Simultaneous substitutions of Ile239 and Val272 (in human c-CrkII) by Phe and Met (from chicken c-CrkII) led to the same Pro238-dependent binding characteristics in human c-CrkII as observed for the wild type protein from chicken.

Another series of amino acid substitutions in the human protein with the artificially established proline switch was able to identify further residues that are necessary for the interaction between SH3^N and SH3^C in a Pro238-dependent manner. Isomerization at Pro238 generates a signal that is communicated into the linker towards SH3^N as well as to Met272 in SH3^C. This intramolecular signal transduction is explained best by the different steric requirements of the *cis* and the *trans* conformer of the prolyl bond itself. The *trans*Pro238 bond prohibits direct contact of Leu234 with the pyrrolidin ring. This perturbs the contact area between the linker and SH3^C and allows Phe239 to flip into the hydrophobic core of the domain. In this state the aromatic ring of Phe239 exhibits pressure on Val267 at the beginning of a β -strand leading to Met272, thus communicating the isomeric signal along this β -strand to Met272. The molecular reason for the necessity of Met at the tip of a solvent exposed loop for the Pro238-dependent regulation of c-CrkII remains elusive.

The energetics of this regulatory prolyl isomerization in GgCrkII could be resolved by a detailed, kinetic analysis. A set of double-mixing experiments was performed to link the folding state of c-CrkII to its biological function. The microscopic rate constants of prolyl isomerization at Pro238 in the denatured protein, the native protein and the protein-ligand-complex were determined and used in subsequent kinetic simulations. It was shown that the process of protein folding

and weak domain interactions provide enough energy to shift the *cis/trans* equilibrium at Pro238 from 11/89 in the denatured state to 86/14 in the native protein. Upon ligand binding the equilibrium is shifted to 41/59. In the *trans* state the two SH3-domains are disengaged and act as two independent entities. The lifetime of this open state is determined by the slow *trans*→*cis* re-isomerization at Pro238. This reaction thereby functions as a molecular memory during the regulation of GgCrkII.

The second regulatory mechanism of c-CrkII occurs via specific tyrosine phosphorylation, in particular at Tyr222 in the linker between the two SH3-domains. This phosphorylated Tyr binds intramolecularly to SH2 and inhibits signal uptake. Analysis of the folding and ligand binding of the *in vitro* phosphorylated proteins to SH3^N revealed that phosphorylation and prolyl isomerization regulate the function of c-CrkII independently. The phosphorylated proteins from man and chicken show the same behavior.

Prolyl isomerization is an intrinsically slow process and many enzymes accelerate this reaction. At the same time they are involved in the regulation of protein function. In a further part of this work the interaction of mitochondrial Cyclophilin (mCypD) and p53 was characterized. Binding of p53 to mCypD is necessary to open the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) and to trigger necrosis. p53 specifically binds to mCypD in the vicinity of the active site leading to a pronounced substrate specificity of the enzyme. The results of this work point to a bivalent function of p53 in the matrix of mitochondria. As an allosteric inhibitor, p53 suppresses the role of mCypD as a protein folding helper. At the same time it appears to activate the enzyme for substrates that are crucial for opening of the mPTP.

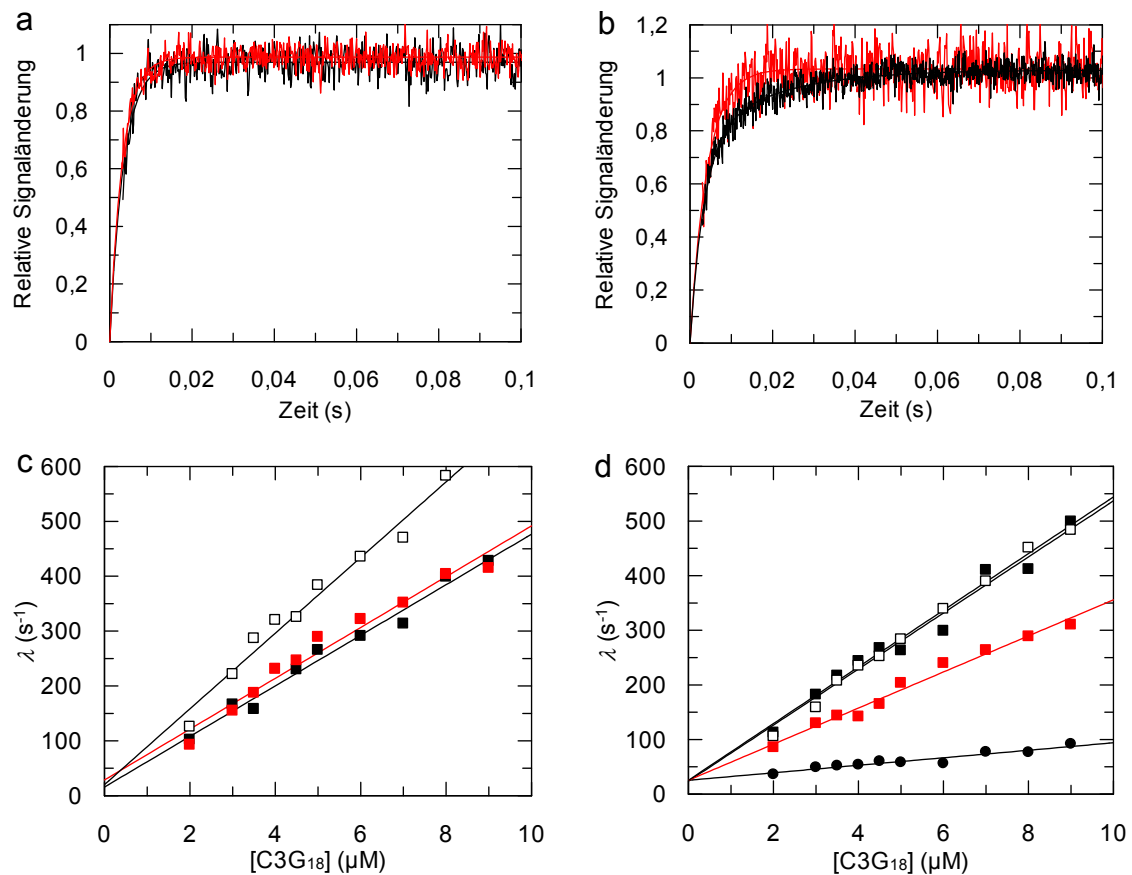
Another prolyl isomerase, trigger factor, was used to analyze the role of these enzymes in the adaptation of bacteria to different temperatures. At low temperatures the activity as prolyl isomerase is very important. With increasing temperature trigger factor also has to repress protein aggregation. This results in the dual function of trigger factor from *E. coli* that combines a highly active prolyl isomerase domain with a chaperone domain that effectively reduces protein aggregation. The rate of prolyl isomerization increases with temperature and therefore is no longer a rate limiting step during protein folding at temperatures higher than 60 °C. Accordingly, trigger factor from the hyperthermophilic bacterium *T. maritima* shows virtually no activity as prolyl isomerase but suppresses protein aggregation completely.

Together the data from this work show how native-state prolyl isomerization can be used to induced long-range structural changes and how such conformational reorganizations can be employed to regulate protein function. Additionally,

the present study provides evidence for the involvement of prolyl isomerases in the modulation of this regulatory mechanism. This large class of enzymes ensures that living cells can respond to changes in their environment in a time controlled manner.

7 Anhang

7.1 Unterstützende Abbildungen

Abbildung A 1: Bindung von C3G₁₈ an SH3^N-SH3^C bei 4,5 °C

Exemplarische Assoziationskinetiken und der Kurvenanpassung mit Exponentialfunktionen von 6 μM C3G₁₈ mit 0,5 μM SH3^N-SH3^C (schwarz) und SH3^N-SH3^C P238A (rot) sind für die humanen (a) und die Protein aus dem Huhn (b) aufgetragen. (c) und (d) zeigen die Abhängigkeit der Assoziationsgeschwindigkeit von der Peptidkonzentration für jeweils das menschliche und das Hühnerprotein mit SH3^N (offene Quadrate), SH3^N-SH3^C (ausgefüllte Quadrate) und der P238A Varianten in rot. Die durch *cisPro238* verlangsamte Phase ist durch ausgefüllte Kreise dargestellt. Lineare Regression ergibt k_{on} ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) und k_{off} (s^{-1}). Diese Werte sind in Tabelle A 2 zusammengefasst. Gemessen wurde mit je 0,5 μM Protein in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4, 4,5 °C und aufsteigender Peptidkonzentration. Die integrale Fluoreszenz oberhalb von 320 nm wurde nach Anregung bei 295 nm aufgezeichnet. Alle Messungen wurden mindestens achtmal unter identischen Bedingungen durchgeführt und gemittelt.

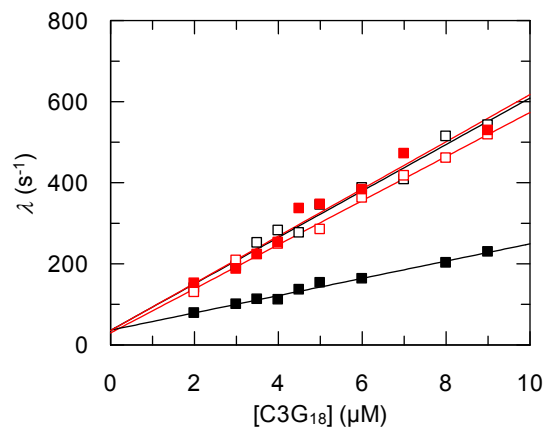


Abbildung A 2: Bindung von C3G_{18} an c-CrkII

Aufgetragen sind die apparenten Raten der Assoziation von C3G_{18} an das Volllängenprotein c-CrkII aus dem Menschen (offene Quadrate) und aus dem Huhn (ausgefüllte Quadrate), sowie die jeweiligen Varianten P238A (rot). Gemessen wurde mit je $0,5 \mu\text{M}$ Protein in 100 mM Kaliumphosphat, $\text{pH } 7,4$, $15 \text{ }^\circ\text{C}$ und aufsteigender Peptidkonzentration. Die integrale Fluoreszenz oberhalb von 320 nm wurde nach Anregung nach 295 nm detektiert. Durch lineare Regression an die Ratenkonstanten wurden k_{on} und k_{off} bestimmt (Tabelle 3-2).

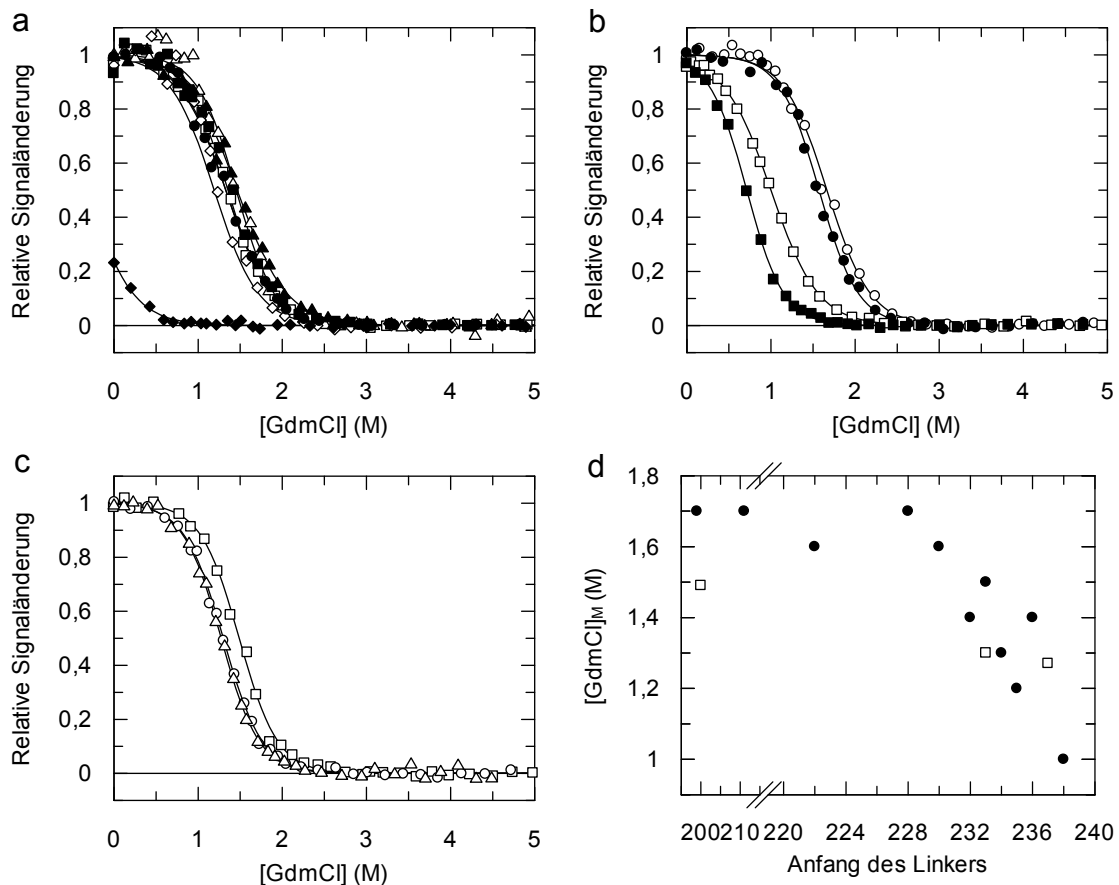


Abbildung A 3: Stabilität der isolierten SH3^C-Domäne mit unterschiedlicher Linkerlänge

Dargestellt sind die relativen Signaländerungen bei der Entfaltung durch GdmCl für (a) *Hs233SH3^C* (offene Quadrate), *Hs234SH3^{C*}* (offene Dreiecke), *Hs235SH3^{C*}* (offene Rauten), *Hs236SH3^{C*}* (ausgefüllte Kreise), *Hs237SH3^{C*}* (ausgefüllte Quadrate), *Hs238SH3^C* P238A (ausgefüllte Dreiecke) und *Hs240SH3^C* (ausgefüllte Rauten), für (b) *Hs229SH3^{C*}* (offene Kreise), *Hs229SH3^C* P230A P232A (ausgefüllte Kreise), *Hs239SH3^C* (offene Quadrate) und *Hs239SH3^C* I239G (ausgefüllte Quadrate) und für (c) *Gg200SH3^C* (offene Quadrate), *Gg233SH3^C* (offene Kreise) und *Gg237SH3^C* (offene Dreiecke). (*) zeigt an, dass die jeweilige Variante von Tatjana Theer im Rahmen ihrer Bachelorarbeit analysiert wurde. Durch Analyse der Daten nach einem Zwei-Zustands-Modell wurde die Stabilität bestimmt (Tabelle 3-3). Alle Experimente wurden mit 0,5 μ M Protein in 100 mM Kaliumphosphat, 0 – 5 M GdmCl, pH 7,4 bei 15 °C durchgeführt (Anregung 280 nm, Emission 330 nm). In (d) ist die Korrelation des Übergangsmittelpunkts [GdmCl]_M mit der Linkerlänge (dargestellt als die erste Position der jeweiligen Proteinvariante) aufgetragen.

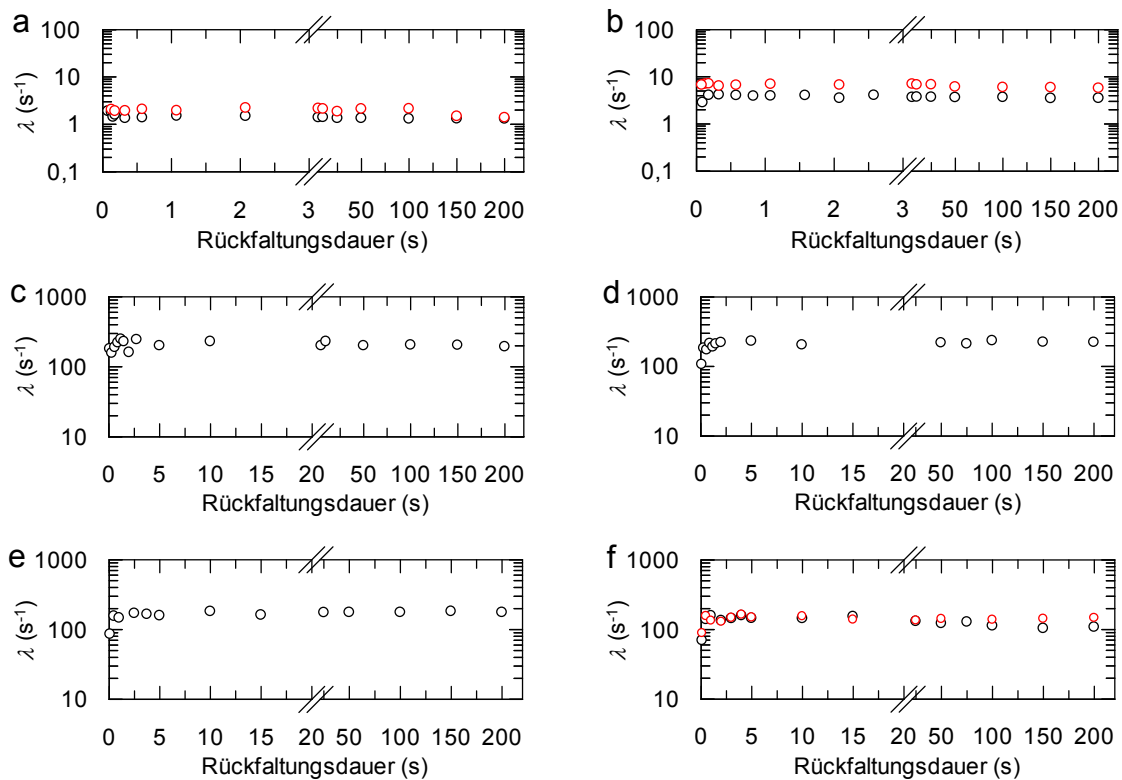


Abbildung A 4: Raten der Entfaltung oder Ligandenbindung nach unterbrochener Rückfaltung

Aufgetragen sind die Raten der Entfaltung als Funktion der Rückfaltungsdauer (vgl. Abbildung 3-20) für (a) $HsSH3^N-SH3^C$ und (b) $GgSH3^N-SH3^C$. Die Varianten P238A sind in rot dargestellt. Die apparente Rate der Assoziation mit $2 \mu M$ C3G₁₈ nach definierten Rückfaltungsdauern (vgl. Abbildung 3-21) ist aufgetragen für (c) $HsSH3^N$, (d) $GgSH3^N$, (e) $HsSH3^N-SH3^C$, sowie für (f) $GgSH3^N-SH3^C$ und $GgSH3^N-SH3^C$ P238A (rot). Alle Versuche wurden ausgehend von vollständig denaturiertem Protein durchgeführt. Die Fluoreszenzänderung von $0,5 \mu M$ Protein in 100 mM Kaliumphosphat, $\text{pH } 7,4$ bei $15 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde oberhalb von 320 nm aufgezeichnet (Anregung bei 280 nm für Faltungsexperimente, Anregung bei 295 nm für Bindungsstudien).

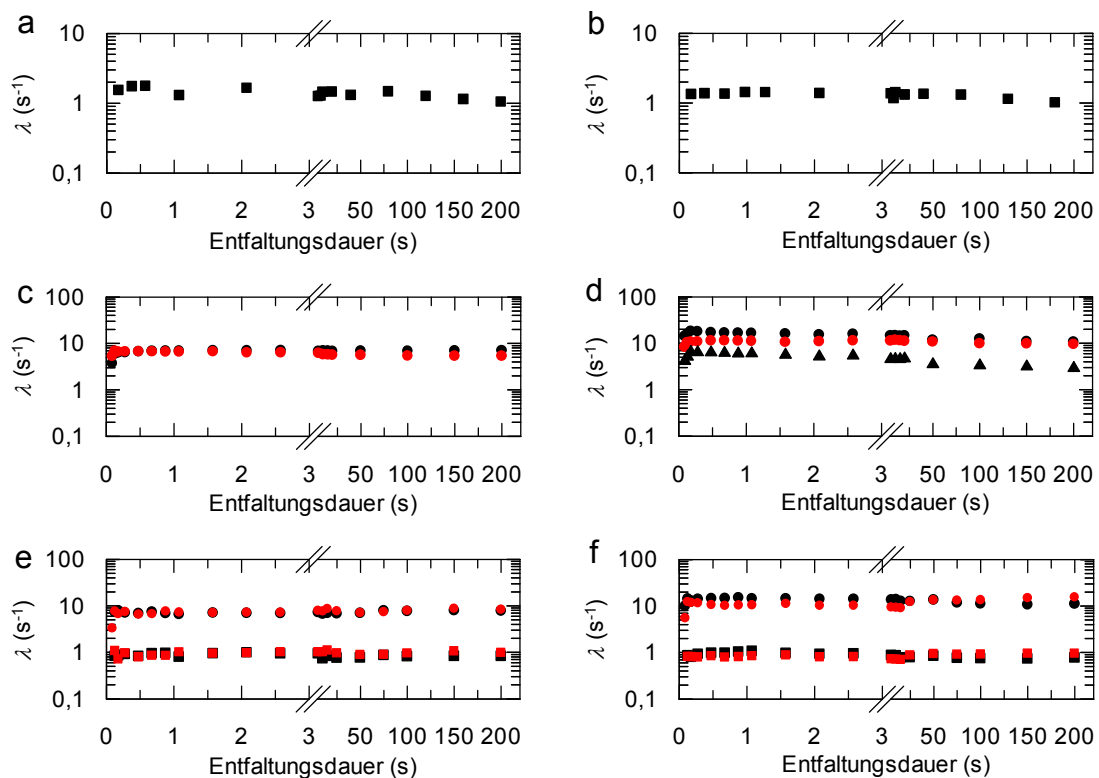


Abbildung A 5: Raten der Rückfaltung nach unterbrochener Entfaltung bei pH 7,4

Gezeigt sind die Raten der aufgezeichneten Rückfaltungsreaktionen nach definierten Entfaltungsdauern für (a) $HsSH3^N$, (b) $GgSH3^N$, (c) $HsSH3^C$, (d) $GgSH3^C$, (e) $HsSH3^N-SH3^C$ und (f) $GgSH3^N-SH3^C$ (vgl. Abbildung 3-22 und Abbildung 3-23a und b). Ergebnisse für die Varianten P238A sind immer in rot dargestellt. Raten für $SH3^N$ sind als Quadrate, für $SH3^C$ als Kreise dargestellt. Die Rückfaltungsraten von $GgSH3^C$ mit *cis*Pro238 sind als Dreiecke gezeigt. Alle Versuche wurden mit einer finalen Proteinkonzentration von $0,5 \mu\text{M}$ in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4 bei $15 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Für jede Entfaltungsdauer wurden mindestens acht Messungen unter identischen Bedingungen durchgeführt und gemittelt (Anregung 280 nm , Emission oberhalb von 320 nm).

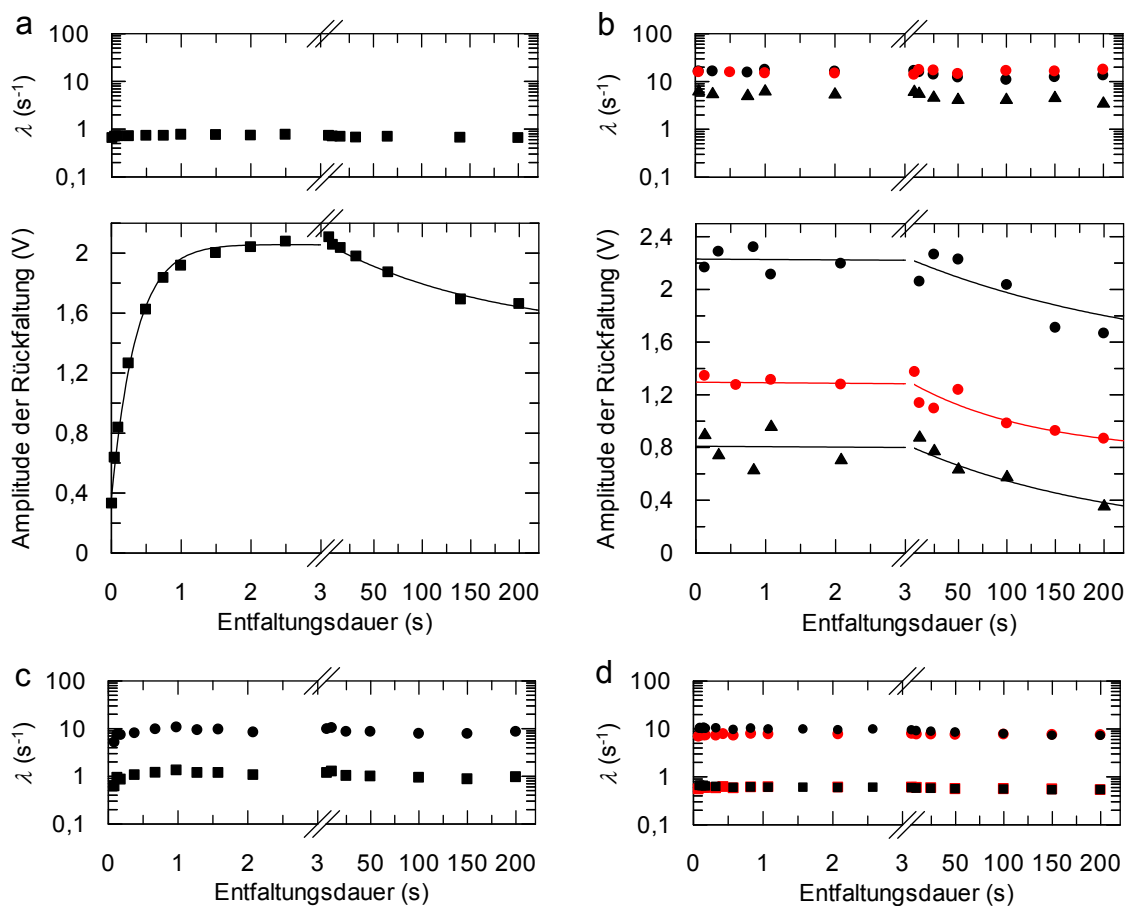


Abbildung A 6: Analyse der Rückfaltung nach unterbrochener Entfaltung bei pH 2,0

In (a) sind die Raten (oben) und die Amplituden (unten) der Rückfaltung von $GgSH3^N$ als Funktion der Entfaltungsdauer gezeigt, in (b) die entsprechenden Ergebnisse für $GgSH3^C$ und $GgSH3^C$ P238A (rot). Die Rückfaltungsreaktion der Spezies mit *cis*Pro238 ist dabei durch Dreiecke dargestellt. Die Auswertungen der Amplitudenverläufe sind in Tabelle A 6 zusammengefasst. Die Raten der Rückfaltung nach definierten Entfaltungsdauern für die Zweidomänenproteine (vgl. Abbildung 3-23c und d) sind für (c) $HsSH3^N-SH3^C$ und (d) $GgSH3^N-SH3^C$ aufgetragen als Quadrate (für $SH3^N$) und Kreise (für $SH3^C$) mit den Ergebnissen für die P238A Variante in rot. Der Entfaltungspuls wurde bei diesem Experiment in 100 mM Glycin, 3 M GdmCl, pH 2 bei 15 °C durchgeführt. Die Kinetik der Rückfaltung von 0,5 μ M Protein in 100 mM Kaliumphosphat, 0,48 M GdmCl, pH 7,4 bei 15 °C wurde als integrale Fluoreszenz oberhalb von 320 nm aufgezeichnet (Anregung bei 280 nm). Für jede Entfaltungsdauer wurden mindestens acht Messungen unter identischen Bedingungen durchgeführt und gemittelt.

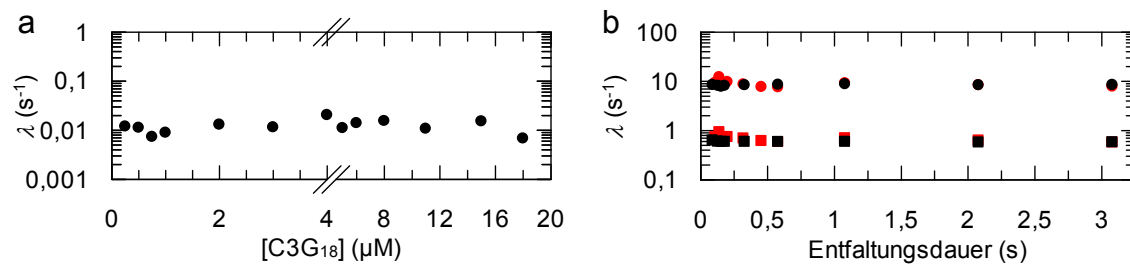


Abbildung A 7: Auftragung der Raten der Experimente um den *cis*Pro238 Anteil im nativen Protein und im Protein-Ligand-Komplex zu bestimmen

Gezeigt sind (a) die Raten der Pro238-limitierten Bindung von C3G₁₈ an 1 μM GgSH3^N-SH3^C (in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4 bei 15 °C, Anregung 295 nm, Emission 336 nm) als Funktion der C3G₁₈-Konzentration (vgl. Abbildung 3-25a), sowie (b) die Raten der Rückfaltung von 0,5 μM GgSH3^N-SH3^C (Variante P238A in rot) in 100 mM Kaliumphosphat, 0,5 M GdmCl, pH 7,4 bei 15 °C nach Sättigung mit C3G₁₈ und Entfaltungspulsen in 100 mM Glycin, 3 M GdmCl, pH 2 bei 15 °C (vgl. Abbildung 3-25b). Die Raten für SH3^N sind als Quadrate, für SH3^C als Kreise dargestellt.

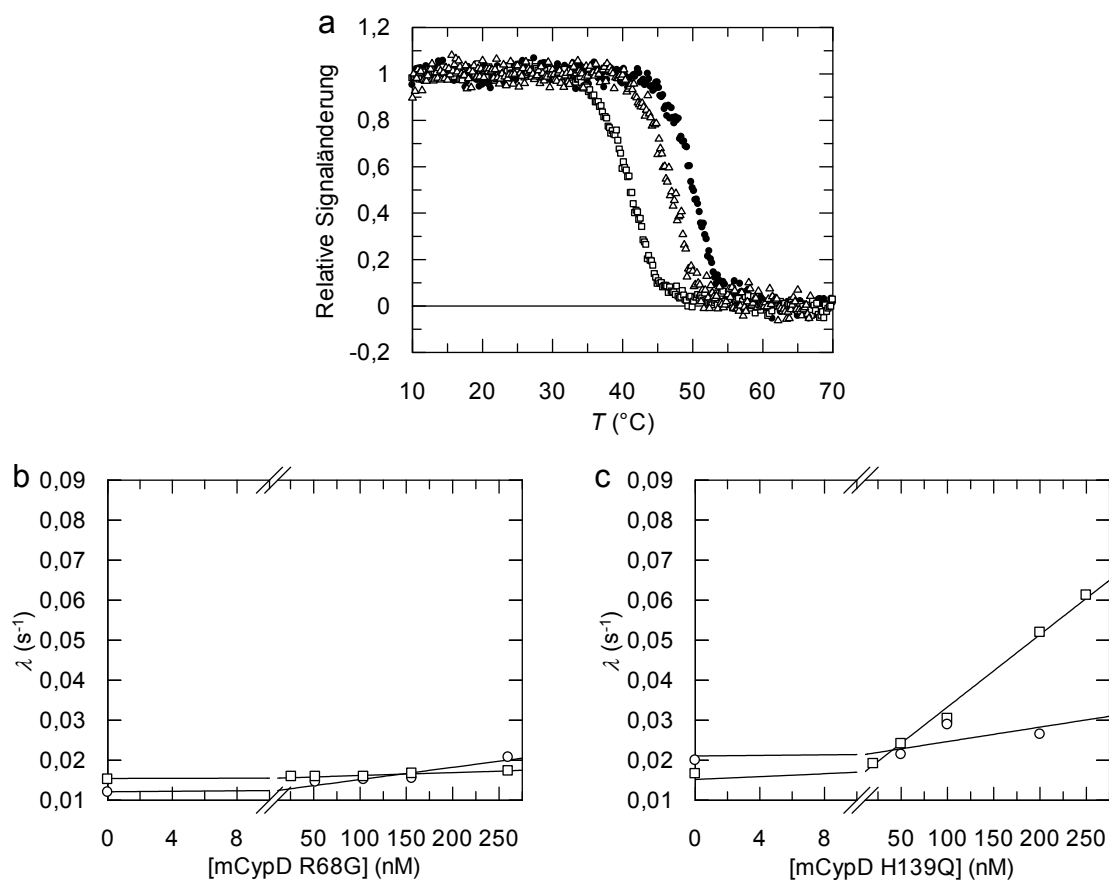


Abbildung A 8: Stabilität und Aktivität der katalytisch inaktiven Varianten von mCypD

Die thermisch induzierte Entfaltung von mCypD (ausgefüllte Kreise, $T_M^{app} = 50,2$ °C), mCypD R68G (offene Quadrate, $T_M^{app} = 41,0$ °C) und mCypD H139Q (offene Dreiecke, $T_M^{app} = 46,8$ °C) ist in (a) gezeigt. Die Entfaltung wurde über die Änderung des CD-Signals bei 222 nm gemessen. Da die Denaturierung nicht reversibel verläuft, können lediglich apparente Übergangsmittelpunkte T_M^{app} angegeben werden. Die Rate der Prolylisomerisierung in Abz-AFPF-pNA (Quadrate) und in LP-N2 (Kreise) in Anwesenheit zunehmender Konzentration an Enzym ist aufgetragen für (b) mCypD R68G und (c) mCypD H139Q. Die Aktivität wurde in 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,4 bei 15 °C bestimmt. k_{kat}/K_M wurde durch lineare Regression ermittelt (Tabelle 3-6).

7.2 Unterstützende Tabellen

Tabelle A 1: Parameter aus den Faltungskinetiken

	Proteinvariante	Domäne	$k_{\text{NU}} (\text{s}^{-1})$	$m_{\text{NU}} (\text{M}^{-1})$	$k_{\text{UN}} (\text{s}^{-1})$	$m_{\text{UN}} (\text{M}^{-1})$	$[\text{GdmCl}]_{\text{M}} (\text{M})$	$\Delta G^{15^\circ\text{C}} (\text{kJ mol}^{-1})$	$m (\text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1})$	β_{T}	
<i>Homo sapiens</i>	isolierte	SH3 ^N	0,0027	0,77	2,89	-2,97	1,87	16,71	8,96	0,80	
	isolierte	SH3 ^C	0,0465	1,04	19,95	-2,70	1,62	14,52	8,97	0,72	
	isolierte SH3 ^C	P238A	0,0573	1,05	23,22	-2,93	1,51	14,38	9,52	0,74	
	isolierte SH3 ^C	I239F		0,2231	0,90	47,33	-3,29	1,28	12,83	10,02	0,79
				0,1707	0,98	4,17	-1,91	1,11	7,66	6,93	0,66
	isolierte SH3 ^C	V272M		0,0709	0,94	14,50	-2,07	1,77	12,75	7,22	0,69
				0,0525	1,02	3,62	-2,03	1,39	10,14	7,31	0,66
	isolierte SH3 ^C	I239F V272M		0,1754	1,07	32,70	-2,79	1,35	12,53	9,25	0,72
				0,2103	1,01	6,23	-3,09	0,83	8,12	9,83	0,75
		SH3 ^N -SH3 ^C									
	wt	SH3 ^N	0,0026	0,69	1,82	-2,44	2,09	15,69	7,51	0,78	
		SH3 ^C	0,0291	1,17	17,47	-2,52	1,74	15,33	8,83	0,68	
	P238A	SH3 ^N	0,0022	0,73	2,31	-2,54	2,13	16,67	7,83	0,78	
		SH3 ^C	0,0979	0,89	19,38	-2,66	1,49	12,67	8,50	0,75	
	I239F	SH3 ^N	0,0025	0,69	2,54	-2,75	2,01	16,58	8,24	0,80	
		SH3 ^C	0,3216	0,81	42,10	-3,46	1,14	11,68	10,23	0,81	
	V272M	SH3 ^N	0,0015	0,79	1,83	-2,51	2,16	17,03	7,90	0,76	
		SH3 ^C	0,0611	0,93	30,82	-3,15	1,53	14,91	9,77	0,77	
	I239F V272M	SH3 ^N	0,0010	0,90	1,67	-2,38	2,26	17,77	7,86	0,73	
		SH3 ^C	0,1372	1,05	23,05	-2,58	1,41	12,28	8,70	0,71	
P238A I239F V272M	SH3 ^N	0,0016	0,85	1,44	-2,57	1,99	16,30	8,18	0,75		
	SH3 ^C	0,1560	1,14	32,35	-2,95	1,31	12,78	9,79	0,72		

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle A 1

Proteinvariante	Domäne	$k_{\text{NU}} (\text{s}^{-1})$	$m_{\text{NU}} (\text{M}^{-1})$	$k_{\text{UN}} (\text{s}^{-1})$	$m_{\text{UN}} (\text{M}^{-1})$	$[\text{GdmCl}]_{\text{M}} (\text{M})$	$\Delta G^{15\text{ }^\circ\text{C}} (\text{kJ mol}^{-1})$	$m (\text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1})$	β_{T}	
Gallus gallus	isolierte	SH3 ^N	0,0039	0,83	2,69	-2,64	1,88	15,66	8,31	0,76
	isolierte	SH3 ^C	0,1957	0,94	40,50	-3,17	1,30	12,77	9,87	0,71
			0,1925	0,95	5,67	-3,17	0,82	8,13	9,88	0,77
	isolierte SH3 ^C	P238A	0,2694	0,96	58,88	-3,92	1,11	12,91	11,68	0,80
	isolierte SH3 ^C	F239I	0,0406	1,07	17,95	-2,67	1,63	14,59	8,96	0,71
			0,0375	1,10	4,26	-1,89	1,58	11,34	7,16	0,63
	isolierte SH3 ^C	M272V	0,1791	0,98	43,45	-3,03	1,37	13,16	9,61	0,76
			0,1616	1,00	16,03	-3,03	1,14	11,01	9,66	0,75
	isolierte SH3 ^C	F239I M272V	0,0353	1,10	13,44	-2,33	1,73	14,24	8,22	0,68
	SH3 ^N -SH3 ^C									
	wt	SH3 ^N	0,0052	0,74	2,03	-2,55	1,82	14,29	7,87	0,78
		SH3 ^C	0,1928	0,97	43,60	-3,32	1,26	12,99	10,28	0,78
	P238A	SH3 ^N	0,0050	0,74	4,21	-3,21	1,71	16,14	9,45	0,81
		SH3 ^C	0,2159	1,01	42,93	-3,37	1,21	12,68	10,49	0,77
	F239I	SH3 ^N	0,0045	0,78	2,07	-2,50	1,87	14,69	7,86	0,76
		SH3 ^C	0,0581	0,94	27,37	-2,98	1,57	14,75	9,38	0,76
	M272V	SH3 ^N	0,0026	0,93	1,62	-2,45	1,91	15,42	8,09	0,73
		SH3 ^C	0,1717	0,96	43,39	-3,59	1,21	13,25	10,94	0,79
	F239I M272V	SH3 ^N	0,0018	1,02	2,10	-2,69	1,90	16,91	8,89	0,73
SH3 ^C		0,0361	1,08	16,65	-2,55	1,69	14,69	8,68	0,70	

Alle Parameter aus den Faltungsanalysen aus 3.1.1 sind in Tabelle A 1 zusammengefasst. Die jeweilige Spezies, die Proteinvariante und die jeweilige Domäne sind angegeben. Aus den Chevron-Auftragungen wurden die mikroskopischen Raten der Ent- (k_{NU}) und Rückfaltung (k_{UN}) in Abwesenheit von Denaturierungsmittel sowie die dazugehörigen Kooperativitätsparameter (m_{NU} , m_{UN}) berechnet. Daraus ergeben sich der kinetische Kooperativitätsparameter m , die freie Enthalpie der Entfaltung bei 15 °C $\Delta G^{15\text{ }^\circ\text{C}}$, die GdmCl-Konzentration am Übergangsmittelpunkt $[\text{GdmCl}]_{\text{M}}$ und der Tanford-Wert β_{T} als Maß für die Lösungsmittelzugänglichkeit des Übergangszustandes.

Tabelle A 2: Parameter der Ligandenbindung bei 4,5 °C

	Proteinvariante	k_{on} ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	$k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ (μM)
Homo sapiens	isolierte SH3 ^N	69 ± 3	20 ± 15	0,29
	SH3 ^N -SH3 ^C	46 ± 2	16 ± 10	0,34
	P238A	46 ± 3	29 ± 15	0,62
Gallus gallus	isolierte SH3 ^N	52 ± 1	25 ± 8	0,49
	SH3 ^N -SH3 ^C	51 ± 3	24 ± 15	0,46
		6,9 ± 0,7	25 ± 7	3,68
	P238A	33 ± 2	25 ± 9	0,77

In Tabelle A 2 sind die Parameter aus den Bindungsstudien bei 4,5 °C (Abbildung A 1) zusammengefasst. Die Spezies und die jeweilige Proteinvariante sind angegeben. Durch lineare Regression der apparenten Assoziationsraten in Abhängigkeit der Ligandenkonzentration wurden k_{on} ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) und k_{off} (s^{-1}) ermittelt. Fehlerangaben sind die Standardfehler aus dieser Analyse. Alle Ergebnisse wurden in unabhängigen Experimenten reproduziert. Der Quotient $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ entspricht der Bindungskonstante K_{D} (μM).

Tabelle A 3: Parameter der Faltungsanalysen zu den SH3^C-Domänen mit unterschiedlicher Linkerlänge

Variante von SH3 ^C		k_{NU} (s ⁻¹)	m_{NU} (M ⁻¹)	k_{UN} (s ⁻¹)	m_{UN} (M ⁻¹)	[GdmCl] _M (M)	$\Delta G^{15\text{ °C}}$ (kJ mol ⁻¹)	m (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	β_{T}
<i>Homo sapiens</i>	200	0,0465	1,04	19,95	-2,70	1,62	14,52	8,97	0,72
	222	0,0777	0,89	34,00	-3,33	1,44	14,57	10,13	0,79
	229*	0,0392	1,08	21,15	-2,69	1,67	15,07	9,03	0,71
	229 PAPA	0,0867	0,95	37,83	-3,54	1,36	14,56	10,73	0,79
	233	0,1454	0,94	25,41	-3,54	1,15	12,37	10,73	0,79
	234*	0,0991	0,97	22,46	-3,11	1,33	13,00	9,77	0,76
	235*	0,1287	0,88	22,65	-3,29	1,24	12,39	9,99	0,79
	236*	0,1151	0,93	19,57	-3,14	1,26	12,30	9,75	0,77
	237*	0,1979	1,09	29,10	-3,05	1,20	11,96	9,93	0,74
	238 P238A	0,1381	0,90	33,44	-3,25	1,32	13,15	9,94	0,78
	239	0,0956	1,09	15,91	-3,43	1,13	12,25	10,83	0,76
	239 I239G	0,3284	1,22	0,51	-3,00	0,10	1,04	10,12	0,71
240	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gallus gallus</i>	200 <i>transPro238</i>	0,2315	0,89	41,72	-3,27	1,25	12,44	9,98	0,79
	<i>cisPro238</i>	0,1649	0,99	7,71	-3,57	0,84	9,21	10,94	0,78
	233 <i>transPro238</i>	0,2301	1,03	30,90	-2,45	1,41	11,74	8,33	0,70
	<i>cisPro238</i>	0,2209	1,07	5,19	-1,90	1,01	7,56	7,11	0,64
	237	0,1979	1,09	29,10	-3,05	1,20	12,00	9,93	0,74

Die jeweilige Spezies, die Proteinvariante und die jeweilige Domäne sind angegeben. Aus den Chevron-Auftragungen (Abbildung 3-12 und Abbildung 3-13) wurden die mikroskopischen Raten der Ent- (k_{NU}) und Rückfaltung (k_{UN}) in Abwesenheit von Denaturierungsmittel sowie die dazugehörigen Kooperativitätsparameter (m_{NU} , m_{UN}) berechnet. Daraus ergeben sich der kinetische Kooperativitätsparameter m , die freie Enthalpie der Entfaltung bei 15 °C $\Delta G^{15\text{ °C}}$, die GdmCl-Konzentration am Übergangsmittelpunkt $[\text{GdmCl}]_{\text{M}}$ und der Tanford-Wert β_{T} als Maß für die Lösungsmittelzugänglichkeit des Übergangszustandes. Varianten, die mit (*) gekennzeichnet sind, wurden von Tatjana Theer im Rahmen ihrer Bachelorarbeit untersucht, die von mir betreut wurde. (-) Es war keine Auswertung der Daten möglich.

Tabelle A 4: Parameter der Faltungsanalysen der $HsSH3^N$ - $SH3^C_{PS}$ Varianten mit Sequenzvariationen im Linkerbereich vor Pro238

	Proteinvariante	Domäne	k_{NU} (s^{-1})	m_{NU} (M^{-1})	k_{UN} (s^{-1})	m_{UN} (M^{-1})	$[GdmCl]_M$ (M)	$\Delta G^{15^\circ C}$ ($kJ\ mol^{-1}$)	m ($kJ\ mol^{-1}\ M^{-1}$)	β_T
$HsSH3^N$ - $SH3^C$ 1239F V272M	N233A	$SH3^N$	0,0013	0,90	1,10	-2,40	2,05	16,15	7,89	0,73
		$SH3^C$	0,1305	1,10	20,55	-2,44	1,43	12,12	8,48	0,69
	L234A	$SH3^N$	0,0014	0,88	2,24	-2,99	1,90	17,67	9,23	0,77
		$SH3^C$	0,2068	0,95	30,09	-3,70	1,07	11,93	11,14	0,80
	Q235A	$SH3^N$	0,0015	0,90	1,84	-2,64	2,01	17,04	8,49	0,75
		$SH3^C$	0,1096	1,09	33,98	-2,63	1,54	13,74	8,90	0,71
	N236A	$SH3^N$	0,0018	0,86	1,56	-2,53	2,00	16,21	8,12	0,75
		$SH3^C$	0,2140	0,92	28,49	-3,17	1,20	11,72	9,80	0,78
	G237A	$SH3^N$	0,0012	0,97	1,50	-2,41	2,11	17,08	8,11	0,71
		$SH3^C$	0,1654	0,98	25,71	-2,81	1,33	12,09	9,08	0,74

Die jeweilige Spezies, die Proteinvariante und die jeweilige Domäne sind angegeben. Aus den Chevron-Auftragungen (Abbildung 3-14) wurden die mikroskopischen Raten der Ent- (k_{NU}) und Rückfaltung (k_{UN}) in Abwesenheit von Denaturierungsmittel sowie die dazugehörigen Kooperativitätsparameter (m_{NU} , m_{UN}) berechnet. Daraus ergeben sich der kinetische Kooperativitätsparameter m , die freie Enthalpie der Entfaltung bei 15 °C $\Delta G^{15^\circ C}$, die GdmCl-Konzentration am Übergangsmittelpunkt $[GdmCl]_M$ und der Tanford-Wert β_T als Maß für die Lösungsmittelzugänglichkeit des Übergangszustandes.

Tabelle A 5: Parameter der Faltungsanalysen der $HsSH3^N$ - $SH3^C_{PS}$ Varianten mit Sequenzvariationen im Faltblattstrang zu Met272

Proteinvariante	Domäne	k_{NU} (s ⁻¹)	m_{NU} (M ⁻¹)	k_{UN} (s ⁻¹)	m_{UN} (M ⁻¹)	[GdmCl] _M (M)	$\Delta G^{15^\circ C}$ (kJ mol ⁻¹)	m (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	β_T	
HsSH3 ^N -SH3 ^C I239F V272M	V267G	SH3 ^N	0,0015	0,92	1,61	-2,56	2,01	16,71	8,34	0,74
		SH3 ^C	-	-	-	-	-	-	-	-
	T268G	SH3 ^N	0,0013	0,92	1,42	-2,37	2,13	16,77	7,87	0,72
		SH3 ^C	-	-	-	-	-	-	-	-
	K269A	SH3 ^N	0,0020	0,77	1,87	-2,73	1,95	16,39	8,39	0,78
		SH3 ^C	0,1707	0,99	21,71	-2,36	1,45	11,61	8,02	0,70
	I270G	SH3 ^N	0,0020	0,85	2,48	-2,82	1,94	17,06	8,80	0,77
		SH3 ^C	-	-	-	-	-	-	-	-
	N271A	SH3 ^N	0,0015	0,89	1,43	-2,40	1,08	16,44	7,89	0,73
		SH3 ^C	0,2262	1,02	12,90	-2,73	1,08	9,69	8,98	0,73
	S273G	SH3 ^N	0,0014	0,91	1,75	-2,51	2,08	17,08	8,20	0,73
		SH3 ^C	0,1159	1,04	17,96	-3,06	1,23	12,08	9,83	0,75
	Q275A	SH3 ^N	0,0012	0,93	1,47	-2,58	2,02	17,04	8,42	0,73
		SH3 ^C	0,2742	1,01	34,69	-3,37	1,11	11,60	10,50	0,77
	Q297E	SH3 ^N	0,0015	0,90	1,94	-2,64	2,02	17,17	8,48	0,75
		SH3 ^C	0,1184	1,11	30,81	-2,84	1,41	13,32	9,46	0,72

Die jeweilige Spezies, die Proteinvariante und die jeweilige Domäne sind angegeben. Aus den Chevron-Auftragungen (Abbildung 3-16) wurden die mikroskopischen Raten der Ent- (k_{NU}) und Rückfaltung (k_{UN}) in Abwesenheit von Denaturierungsmittel sowie die dazugehörigen Kooperativitätsparameter (m_{NU} , m_{UN}) berechnet. Daraus ergeben sich der kinetische Kooperativitätsparameter m , die freie Enthalpie der Entfaltung bei 15 °C $\Delta G^{15^\circ C}$, die GdmCl-Konzentration am Übergangsmittelpunkt $[GdmCl]_M$ und der Tanford-Wert β_T als Maß für die Lösungsmittelzugänglichkeit des Übergangszustandes. (-) Es konnten keine Faltungskinetiken aufgezeichnet werden.

Tabelle A 6: Parameter aus den Analysen der Doppelmischexperimente

Proteinvariante and Experiment	schnelle Reaktion/ konformationelle Faltung			langsame Reaktion/ Prolin-limitierte Faltung			
	λ_1 (s ⁻¹)	a_1 (V)	α_1 (%)	λ_2 (s ⁻¹)	a_2 (V)	α_2 (%)	
unterbrochene Rückfaltung							
<i>HsSH3^C</i>	6,09	1,02	59	0,035	0,72	41	
<i>HsSH3^C P238A</i>	5,83	0,98	64	0,010	0,55	36	
<i>HsSH3^N-SH3^C</i>	7,98	0,51	55	0,042	0,41	45	
<i>HsSH3^N-SH3^C P238A</i>	8,20	0,50	59	0,012	0,35	41	
<i>GgSH3^C</i>	9,00	1,39	68	0,026	0,66	32	
<i>GgSH3^C P238A</i>	7,47	1,29	70	0,028	0,56	30	
<i>GgSH3^N-SH3^C</i>	2,53	0,46	75	0,048	0,15	25	
<i>GgSH3^N-SH3^C P238A</i>	5,72	0,39	61	0,020	0,25	39	
unterbrochene Rückfaltung + Ligandenbindung							
<i>HsSH3^N</i>	1,56	0,54	75	0,026	0,18	25	
<i>HsSH3^N-SH3^C</i>	1,03	0,62	68	0,045	0,29	32	
<i>GgSH3^N</i>	1,15	0,53	72	0,010	0,21	28	
<i>GgSH3^N-SH3^C</i>	0,62	0,62		0,007	-0,26		
<i>GgSH3^N-SH3^C P238A</i>	1,32	0,50	64	0,018	0,28	36	
unterbrochene Entfaltung (pH 7.4)							
<i>HsSH3^C</i>	1,19	2,64	100	0,004	-1,00	38	
<i>HsSH3^C P238A</i>	1,37	2,75	100	0,009	-0,67	24	
<i>HsSH3^N</i>	0,02	0,97	100				
<i>HsSH3^N-SH3^C</i>	SH3 ^N	0,03	0,90	100			
	SH3 ^C	1,22	0,91	100	0,003	-0,54	60
<i>HsSH3^N-SH3^C P238A</i>	SH3 ^N	0,03	0,94	100			
	SH3 ^C	1,74	0,94	100	0,005	-0,44	47
<i>GgSH3^C</i>	<i>cisPro238</i>	4,02	0,92	100	0,035	-0,61	66
	<i>transPro238</i>	2,52	2,33	100	0,006	-0,48	21
<i>GgSH3^C P238A</i>		3,97	1,81	100	0,017	-0,40	22
<i>GgSH3^N</i>		0,05	0,75	100			
<i>GgSH3^N-SH3^C</i>	SH3 ^N	0,08	0,91	100			
	SH3 ^C	2,79	1,31	100	0,038	-0,64	49
<i>GgSH3^N-SH3^C P238A</i>	SH3 ^N	0,13	0,96	100			
	SH3 ^C	3,02	1,78	100	0,022	-1,05	59

Fortsetzung von Tabelle A 6 auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle A 6

Proteinvariante and Experiment	schnelle Reaktion/ konformationelle Faltung			langsame Reaktion/ Prolin-limitierte Faltung		
	λ_1 (s ⁻¹)	a_1 (V)	α_1 (%)	λ_2 (s ⁻¹)	a_2 (V)	α_2 (%)
unterbrochene Entfaltung (pH 2)						
<i>Hs</i> SH3 ^N -SH3 ^C		SH3 ^N	1,50	0,99	100	0,002 -0,37 37
		SH3 ^C				0,001 -0,44
<i>Gg</i> SH3 ^C		<i>cis</i> Pro238				0,005 -0,71
		<i>trans</i> Pro238				0,004 -0,81
<i>Gg</i> SH3 ^C P238A						0,008 -0,55
<i>Gg</i> SH3 ^N	2,68	2,07	100	0,006	-0,60	29
<i>Gg</i> SH3 ^N -SH3 ^C		SH3 ^N	2,96	1,73	100	0,013 -0,60 35
		SH3 ^C	2,79	-0,56		0,007 -0,30
<i>Gg</i> SH3 ^N -SH3 ^C P238A		SH3 ^N	2,62	1,45	100	0,006 -0,56 39
		SH3 ^C				0,009 -0,38
unterbrochene Entfaltung (pH 2) + C3G₁₈						
<i>Gg</i> SH3 ^N -SH3 ^C		SH3 ^N	3,08	1,64		
		SH3 ^C	1,37	-0,27		
<i>Gg</i> SH3 ^N -SH3 ^C P238A		SH3 ^N	2,23	1,44		

Tabelle A 6 fasst die numerischen Ergebnisse der Amplitudenverläufe aller Doppelmischexperimente (vgl. 3.1.3) zusammen. Das jeweilige Experiment, das analysierte Protein sowie die Domäne, die das Signal der Auslesereaktion verursachte sind angegeben. Die Verläufe wurden durch Angleich von Exponentialfunktionen ausgewertet. Die somit erhaltenen Raten λ_i und die entsprechenden Amplituden a_i sind angegeben. Der prozentuale Anteil der einzelnen Amplituden an der aufgezeichneten Gesamtreaktion α_i ist in Prozent angegeben.

Tabelle A 7: Verwendete Parameter für die theoretischen Berechnungen zur Interaktion von GgSH3^N-SH3^C und C3G₁₈

mikroskopische Ratenkonstante	berechneter Wert	Quellexperiment
k_1	0,004 s ⁻¹	Prolylisomerisierung im entfalteten Protein GgSH3 ^C
k_2	0,035 s ⁻¹	Prolylisomerisierung im entfalteten Protein GgSH3 ^C
k_3	1,1 s ⁻¹	Chevron-Auswertung von GgSH3 ^N -SH3 ^C
k_4	0,0061 s ⁻¹	Chevron-Auswertung von GgSH3 ^N -SH3 ^C
k_5	1,1 s ⁻¹	Chevron-Auswertung von GgSH3 ^N -SH3 ^C
k_6	0,0061 s ⁻¹	Chevron-Auswertung von GgSH3 ^N -SH3 ^C
k_7	0,007 s ⁻¹	Funktionsgekoppelter Rückfaltungstest
k_8	0,00133 s ⁻¹	Funktionsgekoppelter Rückfaltungstest
k_9	16 μM ⁻¹ s ⁻¹ · [C3G ₁₈]	Assoziation von GgSH3 ^N -SH3 ^C mit C3G ₁₈
k_{10}	42 s ⁻¹	Assoziation von GgSH3 ^N -SH3 ^C mit C3G ₁₈
k_{11}	71 μM ⁻¹ s ⁻¹ · [C3G ₁₈]	Assoziation von GgSH3 ^N mit C3G ₁₈
k_{12}	50 s ⁻¹	Assoziation von GgSH3 ^N mit C3G ₁₈
k_{13}	0,0032 s ⁻¹	Rate der Prolylisomerisierung und Gleichgewichtsverschiebung durch Ligandenbindung
k_{14}	0,0048 s ⁻¹	Rate der Prolylisomerisierung und Gleichgewichtsverschiebung durch Ligandenbindung

Tabelle A 7 fasst alle Parameter zusammen, die für kinetische Simulationen verwendet wurden. Die mikroskopische Ratenkonstante gemäß einem Sechs-Spezies-Doppelboxmodell (Abbildung 3-24), der ermittelte Wert, sowie das entsprechende Experiment sind angegeben.

Tabelle A 8: Parameter aus der Faltungsanalyse von *HsCrkII* und *Hs-pCrkII*

Domäne		k_{NU} (s ⁻¹)	m_{NU} (M ⁻¹)	k_{UN} (s ⁻¹)	m_{UN} (M ⁻¹)	[GdmCl] _M (M)	$\Delta G^{15\text{ °C}}$ (kJ mol ⁻¹)	m (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	β_{T}
<i>HsCrkII</i>	SH2	-	-	-	-	-	-	-	-
	SH3 ^N	0,0023	0,766	5,33	-4,21	1,56	18,6	11,9	0,85
	SH3 ^C	0,1036	0,893	49,6	-4,23	1,20	14,8	12,3	0,83
<i>pCrkII</i>	SH2	-	-	-	-3,31	-	-	-	-
	SH3 ^N	0,0015	0,847	6,63	-3,91	1,76	20,1	11,4	0,82
	SH3 ^C	0,0314	1,111	14,8	-2,64	1,64	14,7	8,99	0,70

Tabelle A 8 fasst die Parameter der Faltungsanalyse aus Abbildung 3-30b zusammen. Die mikroskopischen Raten der Ent- (k_{NU}) und Rückfaltung (k_{UN}) in Abwesenheit von Denaturierungsmittel sowie die dazugehörigen Kooperativitätsparameter (m_{NU} , m_{UN}) wurden nach einem Zwei-Zustands-Modell berechnet. Daraus ergeben sich der kinetische Kooperativitätsparameter m , die freie Enthalpie der Entfaltung bei 15 °C $\Delta G^{15\text{ °C}}$, die GdmCl-Konzentration am Übergangsmittelpunkt $[\text{GdmCl}]_{\text{M}}$ und der Tanford-Wert β_{T} als Maß für die Lösungsmittelzugänglichkeit des Übergangszustandes. (-) Es konnten keine Werte bestimmt werden, da die Faltung nicht nach einem Zwei-Zustands-Modell verläuft.

Tabelle A 9: Katalytische Effizienz der untersuchten Triggerfaktoren gegenüber Peptidsubstraten bei unterschiedlichen Temperaturen

TF	Temperatur	$k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ (mM ⁻¹ s ⁻¹) Abz-AXPF-pNA				
		Ala	Lys	Leu	Phe	Glu
<i>PhTF</i>	5 °C	60	6	50	213	3
	15 °C	106	20	117	924	56
	25 °C	117	66	517	1052	29
<i>Ec TF</i>	5 °C	1467	125	1840	3153	43
	15 °C	2190	249	2950	4740	164
	25 °C	2630	280	3342	6820	188
<i>TmTF</i>	5 °C	12	10	53	266	30
	15 °C	12	23	72	230	63
	25 °C	79	77	336	396	15

Tabelle A 9 gibt die katalytische Effizienz ($k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$) gegenüber Peptidsubstraten für die TFs aus verschiedenen Organismen bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen an. Die Werte wurden für die Erstellung der Abbildung 3-37 und Abbildung 3-38 verwendet.

Tabelle A 10: Katalytische Effizienz der untersuchten Triggerfaktoren bei 15 °C gegenüber dem Proteinsubstrat N2 mit unterschiedlichen Aminosäureresten vor Pro161

	k_{kat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹) XP-N2				
	Ala	Lys	Leu	Phe	Glu
<i>PhTF</i>	2962	1908	4666	6325	1175
<i>EcTF</i>	6566	4844	9928	7810	3508
<i>TmTF</i>	340	370	1300	230	290

Tabelle A 10 gibt die katalytische Effizienz (k_{kat}/K_M) gegenüber dem Modellprotein XP-N2 für die TFs aus verschiedenen Organismen bei 15 °C an. Die Werte wurden für Erstellung der Abbildung 3-37 verwendet.

Tabelle A 11: Katalytische Effizienz der untersuchten Triggerfaktoren gegenüber RCM-T1 bei unterschiedlichen Temperaturen

	k_{kat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)	
	Temperatur	RMC-T1
<i>PhTF</i>	5 °C	272
	15 °C	639
	25 °C	826
<i>EcTF</i>	5 °C	327
	15 °C	958
	25 °C	4236
<i>TmTF</i>	5 °C	2
	15 °C	5
	25 °C	44

Tabelle A 11 gibt die katalytische Effizienz (k_{kat}/K_M) der untersuchten TFs gegenüber RCM-T1 bei 5 °C, 15 °C und 25 °C an. Die Werte wurden durch lineare Regression der apparenten Raten als Funktion der Enzymkonzentration (Abbildung 3-39) erhalten.

7.3 Verwendete Oligodesoxyribonukleotide

T7-Promotor	5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'
T7-Terminator	5' - GTT ATG CTA GTT ATT GCT CA - 3'
His ₆ -SUMO_Ndel (+)	5' - GGG AAT TCC ATA TGG GCA GCA GCC ATC ATC - 3'
SUMO_Bsal (-)	5' - GGA TCC TGA GGT CTC TAC CAC CAA T - 3'
c-CrkII aus dem Mensch	
HsCrkII_AS1_Bsal (+)	5' - ATG GTC TCT TGGT ATG GCG GGC AAC TTC GAC - 3'
HsCrkII_AS304_BamHI (-)	5' - CGG GAT CCT CAG CTG AAG TCC TCA TCG GG - 3'
SH2_BamHI (-)	5' - CGG GAT CCT CAA CTA CCC TGC CTG GAT CTG - 3'
SH3N_Bsal (+)	5' - ATG GTC TCT TGGT AGT GGA GTG ATT CTC AGG CAG - 3'
SH3N_BamHI (-)	5' - CGG GAT CCT CAC GAT ACT GAG GCG GAG GCA - 3'
233SH3C_Bsal (+)	5' - ATG GTC TCT TGG TAA CCT CCA GAA TGG GCC CA - 3'
cCrkII_P238A+	5' - GCC ATA TAT GCC AGG GTT ATC CAG AAG - 3'
cCrkII_P238A-	5' - CCC ATT CTG GAG GTT AGG GAG CG - 3'
cCrkII_I239F+	5' - CCC TTT TAT GCC AGG GTT ATC CAG AAG - 3'
cCrk_Y222F+	5' - TTC GCC CAA CCC AGC GTC AAC ACT C - 3'
cCrk_Y222F-	5' - GGG CCC AGG CTC CGG CCC A - 3'
Hs_Y252F+	5' - TTC GAC AAG ACA GCC TTG GCT T - 3'
Hs_Y252F-	5' - GGC ATT GGG GAC TCG CTT CT - 3'
BE-SUMO_(-)	5' - ACC ACC AAT CTG TTC TCT GTG AGC C - 3'
200fISH3C_BE_(+)	5' - GCT CTG ATT GGA GGT AAC CAG GAG GGT TCC CAC CCA CAG CCA - 3'
222SH3C_BE_(+)	5' - GCC CAA CCC AGC GTC AAC ACT CCG CTC CCT AAC CT - 3'
240SH3C_BE_(+)	5' - TAT GCC AGG GTT ATC CAG AAG CGA GTC CCC AAT GCC - 3'
238ASH3C_BE_(+)	5' - GCC ATA TAT GCC AGG GTT ATC CA - 3'
239SH3C_BE_(+)	5' - ATA TAT GCC AGG GTT ATC CAG A - 3'
Hs229SH3CPAPA(+)	5' - ACT GCG CTC GCT AAC CTC CAG - 3'
HS231SH3C	5' - CTC CCT AAC CTC CAG AAT GGG - 3'
HsCrk_V272M(+)	5' - ATG AGT GGT CAG TGG GAA GG - 3'
HsCrk_V272M(-)	5' - ATT AAT CTT CGT AAC CTT TAC CAG - 3'
Hs_PLP_AAA_(+)	5' - ACT GCG GCC GCT AAC CTC CAG A - 3'
Hs_PLP_AAA_(-)	5' - GTT GAC GCT GGG TTG GGC ATA - 3'
Hs_I270G_VM_(+)	5' - GGT AAT ATG AGT GGT CAG TGG GAA - 3'
Hs_I270G_VM_()	5' - CTT CGT AAC CTT TAC CAG CTC ACC - 3'
Hs_AFM_(+)	5' - GCC TTT TAT GCC AGG GTT ATC CAG AAG - 3'
PEP_AAA_(-)	5' - GCG GCG GCT GGG CCC TAT GC - 3'
PEP_AAA_(+)	5' - CCC ACC CAG TGG CTG TGG GT - 3'
HsFM_N271A(+)	5' - ATT GCT ATG AGT GGT CAG TGG GAA - 3'
HsFM_V267G(-)	5' - CTT TAC CAG CTC ACC GAC CTC - 3'
HsFM_V267G(+)	5' - GGT ACG AAG ATT AAT ATG AGT GGT C - 3'
HsFM_T268G(+)	5' - GTT GGG AAG ATT AAT ATG AGT GGT C - 3'
HsFM_K269A(+)	5' - GTT ACG GCG ATT AAT ATG AGT GGT - 3'
Hs_233 (-)	5' - TAG GGA GCG GAG TGT TGA CGC - 3'

Hs_N233A (+)	5' - GCC CTC CAG AAT GGG CCC TTT TAT - 3'
Hs_L234A (+)	5' - AAC GCC CAG AAT GGG CCC TTT TAT - 3'
Hs_Q235A (+)	5' - AAC CTC GCG AAT GGG CCC TTT TAT - 3'
Hs_N236A (+)	5' - AAC CTC CAG GCT GGG CCC TTT TAT - 3'
Hs_G237 (+)	5' - AAC CTC CAG AAT GCG CCC TTT TAT - 3'
Hs_297 (-)	5' - ATC CAG CAG ACG GAC ATG TGT GAA - 3'
Hs_Q297E (+)	5' - GAA CAG AAT CCC GAT GAG GAC TTC - 3'
Hs_Q275A (+)	5' - ATG AGT GGT GCG TGG GAA GGG GAG - 3'
Hs_S273G (+)	5' - ATG GGT GGT CAG TGG GAA GGG GAG - 3'
c-CrklI aus dem Huhn	
GgCrk_1_Bsal_(+)	5' - ATG GTC TCT TGG TAT GGC AGG GCA ATT CGA TAG - 3'
GgCrk_126_Bsal_(+)	5' - ATG GTC TCT TGG TAG CGG CGT TAT TCT GCG TCA - 3'
GgCrk_233_Bsal_(+)	5' - ATG GTC TCT TGG TAA TCT GCA AAA TGG TCC GTT C - 3'
GgCrk_240_Bsal_(+)	5' - ATG GTC TCT TGG TTA TGC CCG TGT CAT CCA AAA AC - 3'
GgCrk_305_BamHI_(-)	5' - AAA ACC CGG ATG AGG ATT TCA GCT AAG GAT CCC G - 3'
GgCrk_126_BamHI_(-)	5' - TTA GCC GTT CTC GTC AAA ACA GCT AAG GAT CCC G - 3'
GgCrk_199_BamHI_(-)	5' - TCC GAG TAG CGC TTC AGT TTC TTA AGG ATC CCG - 3'
Gg_P238A_(+)	5' - GCG TTC TAT GCC CGT GTC ATC - 3'
Gg_F239I_(+)	5' - CCG ATC TAT GCC CGT GTC ATC - 3'
Gg_238_(-)	5' - ACC ATT TTG CAG ATT CGG CAG - 3'
Gg_M271V(+)	5' - GTG TCG GGG CAG TGG GAA GGT GA - 3'
Gg_M271V(-)	5' - GTT GAT TTT AGT CAC TTT GAC CAG TT - 3'
Abelson-Kinase	
65Abl_Bsal(+)	5' - ATG GTC TCT TGG TTT GCA CTG TAT GAT TTT GTG GC - 3'
534Abl_BamHI(-)	5' - CGG GAT CCT TAG GTC CTC GTC TTG GTG GGC AG - 3'
mitochondriales Cyclophilin D	
CypD_Bsal_(+)	5' - ATG GTC TCT TGG TTG CAG CAA GGG CTC CGG - 3'
CypD_BamHI_(-)	5' - CGG GAT CCT TAT TAG CTC AAC TGG CCA CAG TC - 3'
CypD_R68G_(+)	5' - GGG GTG ATC CCT TCC TTC ATG - 3'
CypD_R68G_(-)	5' - GTG GAA GGT GGA GCC TTT GTA - 3'
CypD_H139Q_(+)	5' - CAA GTT GTG TTC GGT CAC GTC - 3'
CypD_H139Q_(-)	5' - CTT GCC ATC CAA CCA GTC TGT - 3'

8 Abkürzungsverzeichnis

AEDANS	5-(((Acetylamino)ethyl)amino)naphthalin-1-sulfonsäure
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
CD	Circulardichroismus
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
cCMP	Cytidin 2'3'-cyclisches Monophosphat
ΔC_p	Wärmekapazitätsänderung während der Entfaltung eines Proteins bei konstantem Druck
Crk	<i>chicken tumor virus 10 regulator of kinase</i>
c-CrkII	zelluläres CrkII
Cyp	Cyclophilin
d	Schichtdicke
ddH ₂ O	doppelt destilliertes H ₂ O
dNTP	Desoxyribonukleotid
<i>DpnI</i>	Restriktionsendonuklease I aus <i>Diplococcus pneumoniae</i>
DTT	Dithiothreitol
dYT	double yeast-tryptone-Medium
<i>Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>
ϵ_λ	molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ
EDTA	N,N,N',N'-Ethyldiamintetraacetat-Dinatriumsalz
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
GdmCl	Guanidiniumchlorid
<i>Gg</i>	<i>Gallus gallus</i>
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
<i>Hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
k_{app}	apparente Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion
k_{on}	mikroskopische Rate der Assoziation
k_{off}	mikroskopische Rate der Dissoziation
K_D	Dissoziationskonstante
Km	Kanamycin
λ	apparente Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion

mCypD	mitochondriales Cyclophilin D
mPTP	<i>mitochondrial permeability transition pore</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>Ph</i>	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>
pNa	para-Nitroanilin
PNK	Polynukleotidkinase
R	Allgemeine Gaskonstante
RNase A	Ribonuklease A
RNase T1	Ribonuklease T1
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehung pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Senp2	<i>Sentrin-specific protease 2</i>
SH2	<i>Src homology domain 2</i>
SH3	<i>Src homology domain 3</i>
SH3 ^C	C-terminale SH3-Domäne von c-CrkII
SH3 ^N	N-terminale SH3-Domäne von c-CrkII
SUMO	<i>small ubiquitin like modifier</i>
TAE-Puffer	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphinhydrochlorid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Triggerfaktor
<i>Tm</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
Tricin	N-(Tris(hydroxymethyl)-methyl)glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T4-PNK	Polynukleotidkinase des Bakteriophagen T4
T_M	Mittelpunkt des thermischen Entfaltungsübergangs
$[\theta]_{MRW}$	molare Elliptizität pro Aminosäure ($\text{Grad}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$)
U	Unit (Enzymmenge, die unter Standardbedingungen einen Umsatz von 1 μmol Substrat pro min erzeugt)
v/v	Volumen / Volumen

Abkürzungsverzeichnis

w/v	Gewicht / Volumen
wt	Wildtyp (Protein mit unveränderter Aminosäuresequenz)

Aminosäuren wurden mit dem üblichen Ein- oder Drei-Buchstabencode, Nukleotide mit dem Einbuchstabencode abgekürzt.

9 Publikationsliste

Die folgende Liste fasst die Veröffentlichungen zusammen, an denen ich während meiner Doktorarbeit mitgewirkt habe (auch im Rahmen von Kooperationen ohne direkten Bezug zu meiner Doktorarbeit). Gleichberechtigte Autoren sind durch (*) gekennzeichnet.

Schmidpeter, P. A., Jahreis, G., Geitner, A. J. & Schmid, F. X. (2011). Prolyl isomerases show low sequence specificity toward the residue following the proline. *Biochemistry* **50**, 4796-803.

Feiler, C., Fisher, A. C., Boock, J. T., Marrichi, M. J., Wright, L., **Schmidpeter, P. A.**, Blankenfeldt, W., Pavelka, M. & DeLisa, M. P. (2013). Directed evolution of Mycobacterium tuberculosis beta-lactamase reveals gatekeeper residue that regulates antibiotic resistance and catalytic efficiency. *PLoS One* **8**, e73123.

Schmidpeter, P. A. & Schmid, F. X. (2014). Molecular determinants of a regulatory prolyl isomerization in the signal adapter protein c-CrkII. *ACS chemical biology* **9**, 1145-1152.

Godin-Roulling, A.*, **Schmidpeter, P. A.***, Schmid, F. X. & Feller, G. Functional adaptations of the bacterial chaperone trigger factor to extreme environmental temperatures. (*eingereicht*)

Weitere Veröffentlichungen in Vorbereitung:

Schmidpeter, P. A. & Schmid, F. X. Native-state prolyl isomerization as molecular memory during c-CrkII signaling. (*in Vorbereitung*)

Schmidpeter, P. A. & Schmid, F. X. Phosphorylation and prolyl isomerization independently regulate the adapter functions of c-CrkII. (*in Vorbereitung*)

Schmidpeter, P. A., Ries, L. K., Theer, T. & Schmid, F. X. Long range structural effects of *cis/trans* prolyl isomerization in c-CrkII. (*in Vorbereitung*)

Jakob R. P., Koch J. R., Burmann B. M., **Schmidpeter P. A.**, Hunkeler M., Hiller S., Schmid F. X. & Maier T. PrsA protects substrates in a dimeric cage. (*in Vorbereitung*)

10 Literaturverzeichnis

1. Chiti, F., and Dobson, C.M. (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease, *Annual review of biochemistry* 75, 333-366.
2. Kakizuka, A. (1998) Protein precipitation: a common etiology in neurodegenerative disorders?, *Trends in genetics : TIG* 14, 396-402.
3. Morimoto, R.I. (2008) Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging, *Genes & development* 22, 1427-1438.
4. Perutz, M.F. (1999) Glutamine repeats and neurodegenerative diseases: molecular aspects, *Trends in biochemical sciences* 24, 58-63.
5. Sumner, J.B. (1926) The Isolation and Crystallization of the enzyme Urease: Preliminary Paper, *Journal of Biological Chemistry* 69, 435-441.
6. Manchester, K.L. (2004) The crystallization of enzymes and virus proteins: laying to rest the colloidal concept of living systems, *Endeavour* 28, 25-29.
7. Corey, R.B., and Pauling, L. (1953) Fundamental dimensions of polypeptide chains, *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 141, 10-20.
8. Mirsky, A.E., and Pauling, L. (1936) On the Structure of Native, Denatured, and Coagulated Proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 22, 439-447.
9. Pauling, L. (1948) The interpretation of some chemical properties of hemoglobin in terms of its molecular structure, *Stanford medical bulletin* 6, 215-222.
10. Pauling, L., and Corey, R.B. (1951) Configuration of polypeptide chains, *Nature* 168, 550-551.
11. Du Vigneaud, V., Ressler, C., and Trippett, S. (1953) The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin, *The Journal of biological chemistry* 205, 949-957.
12. Turner, R.A., Pierce, J.G., and Du Vigneaud, V. (1951) The desulfurization of oxytocin, *The Journal of biological chemistry* 193, 359-361.
13. Ryle, A.P., and Sanger, F. (1955) Disulphide interchange reactions, *The Biochemical journal* 60, 535-540.
14. Ryle, A.P., Sanger, F., Smith, L.F., and Kitai, R. (1955) The disulphide bonds of insulin, *The Biochemical journal* 60, 541-556.
15. Kendrew, J.C., Bodo, G., Dintzis, H.M., Parrish, R.G., Wyckoff, H., and Phillips, D.C. (1958) A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis, *Nature* 181.
16. Perutz, M.F., Rossmann, M.G., Cullis, A.F., Muirhead, H., Will, G., and North, A.C. (1960) Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis, *Nature* 185.
17. Anson, M.L., and Mirsky, A.E. (1930) Protein Coagulation and Its Reversal : The Preparation of Insoluble Globin, Soluble Globin and Heme, *The Journal of general physiology* 13, 469-476.
18. Anson, M.L. (1939) The Denaturation of Proteins by Detergents and Bile Salts, *Science* 90, 256-257.
19. Lumry, R., and Eyring, H. (1954) Conformation Changes of Proteins, *The Journal of Physical Chemistry* 58, 110-120.
20. Levinthal, C.J. (1968) Are there pathways for protein folding?, *J. Chim. Phys.* 65, 44-45.
21. Epstein, C.J., Goldberger, R.F., and Anfinsen, C.B. (1963) The genetic control of tertiary protein structure: studies with model systems., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 28, 439-449.
22. Goldberger, R.F., Epstein, C.J., and Anfinsen, C.B. (1963) Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rate liver, *Journal of Biological Chemistry* 238, 628-635.

23. Haber, E., and Anfinsen, C.B. (1961) Regeneration of enzyme activity by air oxidation of reduced subtilisin-modified ribonuclease, *The Journal of biological chemistry* 236, 422-424.
24. Cornforth, J.W., Cornforth, R.H., Donninger, C., Popjak, G., Ryback, G., and Schroepfer, G.J., Jr. (1963) Stereospecific insertion of hydrogen atom into squalene from reduced nicotinamide-adenine dinucleotides, *Biochemical and biophysical research communications* 11, 129-134.
25. Cornforth, J.W., Cornforth, R.H., Donninger, C., Popjak, G., Ryback, G., and Schroepfer, G.J. (1966) Studies on the biosynthesis of cholesterol. XVII. The asymmetric synthesis of a symmetrical molecule, *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 163, 437-464.
26. Cornforth, J.W. (1976) Asymmetry and enzyme action, *Science* 193, 121-125.
27. Hauptman, H. (1986) The Direct Methods of X-ray Crystallography, *Science* 233, 178-183.
28. Karle, J. (1986) Recovering phase information from intensity data, *Science* 232, 837-843.
29. Nagayama, K., Wuthrich, K., Bachmann, P., and Ernst, R.R. (1977) Two-dimensional J-resolved ¹H n.m.r. spectroscopy for studies of biological macromolecules, *Biochemical and biophysical research communications* 78, 99-105.
30. Kumar, A., Ernst, R.R., and Wuthrich, K. (1980) A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules, *Biochemical and biophysical research communications* 95, 1-6.
31. Ernst, R.R. (1992) Nobel Lecture. Nuclear magnetic resonance Fourier transform spectroscopy, *Bioscience reports* 12, 143-187.
32. Meyer, W.L., Fischer, E.H., and Krebs, E.G. (1964) Activation of Skeletal Muscle Phosphorylase B Kinase by Ca, *Biochemistry* 3, 1033-1039.
33. Hartwell, L.H. (2002) Nobel Lecture. Yeast and cancer, *Bioscience reports* 22, 373-394.
34. Hunt, T. (2002) Nobel Lecture. Protein synthesis, proteolysis, and cell cycle transitions, *Bioscience reports* 22, 465-486.
35. Nurse, P.M. (2002) Nobel Lecture. Cyclin dependent kinases and cell cycle control, *Bioscience reports* 22, 487-499.
36. Agre, P. (2004) Nobel Lecture. Aquaporin water channels, *Bioscience reports* 24, 127-163.
37. MacKinnon, R. (2004) Nobel Lecture. Potassium channels and the atomic basis of selective ion conduction, *Bioscience reports* 24, 75-100.
38. Lefkowitz, R.J. (2013) A brief history of G-protein coupled receptors (Nobel Lecture), *Angew Chem Int Ed Engl* 52, 6366-6378.
39. Kobilka, B. (2013) The structural basis of G-protein-coupled receptor signaling (Nobel Lecture), *Angew Chem Int Ed Engl* 52, 6380-6388.
40. Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains, *Science* 181, 223-230.
41. Dill, K.A. (1990) Dominant forces in protein folding, *Biochemistry* 29, 7133-7155.
42. Makhatadze, G.I., and Privalov, P.L. (1995) Energetics of protein structure, *Advances in Protein Chemistry* 47, 307-425.
43. Lazaridis, T., Archontis, G., and Karplus, M. (1995) Enthalpic contribution to protein stability: Insights from atom-based calculations and statistical mechanics, *Advances in Protein Chemistry* 47, 231-306.
44. Kauzmann, W. (1959) Some factors in the interpretation of protein denaturation, *Adv Protein Chem* 14, 1-63.
45. Tanford, C. (1978) The hydrophobic effect and the organization of living matter, *Science* 200, 1012-1018.

46. Hermann, R.B. (1972) Theory of hydrophobic bonding. II. Correlation of hydrocarbon solubility in water with solvent cavity surface area, *The Journal of Physical Chemistry* 76, 2754-2759.
47. Chothia, C. (1974) Hydrophobic bonding and accessible surface area in proteins, *Nature* 248, 338-339.
48. Reynolds, J.A., Gilbert, D.B., and Tanford, C. (1974) Empirical correlation between hydrophobic free energy and aqueous cavity surface area, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71, 2925-2927.
49. Dill, K.A., and Chan, H.S. (1997) From Levinthal to pathways to funnels, *Nature Structural Biology* 4, 10-19.
50. Fleming, P.J., and Rose, G.D. (2005) Do all backbone polar groups in proteins form hydrogen bonds?, *Protein science : a publication of the Protein Society* 14, 1911-1917.
51. Blaber, M., Lindstrom, J.D., Gassner, N., Xu, J., Heinz, D.W., and Matthews, B.W. (1993) Energetic cost and structural consequences of burying a hydroxyl group within the core of a protein determined from Ala-->Ser and Val-->Thr substitutions in T4 lysozyme, *Biochemistry* 32, 11363-11373.
52. Marqusee, S., Robbins, V.H., and Baldwin, R.L. (1989) Unusually stable helix formation in short alanine-based peptides, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 5286-5290.
53. Spek, E.J., Olson, C.A., Shi, Z., and Kallenbach, N.R. (1999) Alanine Is an Intrinsic α -Helix Stabilizing Amino Acid, *Journal of the American Chemical Society* 121, 5571-5572.
54. Rohl, C.A., Chakraborty, A., and Baldwin, R.L. (1996) Helix propagation and N-cap propensities of the amino acids measured in alanine-based peptides in 40 volume percent trifluoroethanol, *Protein science : a publication of the Protein Society* 5, 2623-2637.
55. Ramakrishnan, C., and Ramachandran, G.N. (1965) Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations. II. Allowed conformations for a pair of peptide units, *Biophysical journal* 5, 909-933.
56. Zhou, A.Q., O'Hern, C.S., and Regan, L. (2011) Revisiting the Ramachandran plot from a new angle, *Protein science : a publication of the Protein Society* 20, 1166-1171.
57. Ohgushi, M., and Wada, A. (1983) 'Molten-globule state': a compact form of globular proteins with mobile side-chains, *FEBS letters* 164, 21-24.
58. Dolgikh, D.A., Kolomiets, A.P., Bolotina, I.A., and Ptitsyn, O.B. (1984) 'Molten-globule' state accumulates in carbonic anhydrase folding, *FEBS letters* 165, 88-92.
59. Kuwajima, K. (1989) The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure, *Proteins* 6, 87-103.
60. Ptitsyn, O.B., Pain, R.H., Semisotnov, G.V., Zerovnik, E., and Razgulyaev, O.I. (1990) Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding, *FEBS letters* 262, 20-24.
61. Ewbank, J.J., and Creighton, T.E. (1991) The molten globule protein conformation probed by disulphide bonds, *Nature* 350, 518-520.
62. Kiefhaber, T., Labhardt, A.M., and Baldwin, R.L. (1995) Direct NMR evidence for an intermediate preceding the rate-limiting step in the unfolding of ribonuclease A, *Nature* 375, 513-515.
63. Baldwin, R.L., Frieden, C., and Rose, G.D. (2010) Dry molten globule intermediates and the mechanism of protein unfolding, *Proteins* 78, 2725-2737.
64. Baldwin, R.L. (2007) Energetics of protein folding, *J Mol Biol* 371, 283-301.
65. Schmid, F.X. (1992) Kinetics of unfolding and refolding of single-domain proteins, In *Protein folding* (Creighton, T.E., Ed.) 1 ed., pp 197-241, Freeman, New York.

66. Epstein, H.F., Schechter, A.N., Chen, R.F., and Anfinsen, C.B. (1971) Folding of staphylococcal nuclease: kinetic studies of two processes in acid renaturation, *J Mol Biol* 60, 499-508.
67. Ikai, A., and Tanford, C. (1971) Kinetic evidence for incorrectly folded intermediate states in the refolding of denatured proteins, *Nature* 230, 100-102.
68. Tanford, C., Aune, K.C., and Ikai, A. (1973) Kinetics of unfolding and refolding of proteins. 3. Results for lysozyme, *J Mol Biol* 73, 185-197.
69. Garel, J.R., Nall, B.T., and Baldwin, R.L. (1976) Guanidine-unfolded state of ribonuclease A contains both fast- and slow-refolding species, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 1853-1857.
70. Nall, B.T., Garel, J.R., and Baldwin, R.L. (1978) Test of the extended two-state model for the kinetic intermediates observed in the folding transition of ribonuclease A, *J Mol Biol* 118, 317-330.
71. Schindler, T., Herrler, M., Marahiel, M.A., and Schmid, F.X. (1995) Extremely rapid folding in the absence of intermediates: the cold-shock protein from *Bacillus subtilis*, *Nature Structural Biology* 2, 663-673.
72. Perl, D., Welker, C., Schindler, T., Schröder, K., Marahiel, M.A., Jaenicke, R., and Schmid, F.X. (1998) Conservation of rapid two-state folding in mesophilic, thermophilic, and hyperthermophilic cold shock proteins, *Nature Structural Biology* 5, 229-235.
73. Jacob, M., Holtermann, G., Perl, D., Reinstein, J., Schindler, T., Geeves, M.A., and Schmid, F.X. (1999) Microsecond folding of the cold shock protein measured by a pressure-jump technique, *Biochemistry* 38, 2882-2891.
74. Fersht, A.R. (1995) Optimization of rates of protein folding: the nucleation-condensation mechanism and its implications, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 10869-10873.
75. Kragelund, B.B., Hojrup, P., Jensen, M.S., Schjorling, C.K., Juul, E., Knudsen, J., and Poulsen, F.M. (1996) Fast and one-step folding of closely and distantly related homologous proteins of a four-helix bundle family, *J Mol Biol* 256, 187-200.
76. Baldwin, R.L. (1996) Why is protein folding so fast?, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 2627-2628.
77. Plaxco, K.W., Spitzfaden, C., Campbell, I.D., and Dobson, C.M. (1996) Rapid refolding of a proline-rich all-beta-sheet fibronectin type III module, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 10703-10706.
78. Hagen, S.J., Hofrichter, J., Szabo, A., and Eaton, W.A. (1996) Diffusion-limited contact formation in unfolded cytochrome c: estimating the maximum rate of protein folding, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 11615-11617.
79. Burton, R.E., Huang, G.S., Daugherty, M.A., Fullbright, P.W., and Oas, T.G. (1996) Microsecond protein folding through a compact transition state, *J Mol Biol* 263, 311-322.
80. Kato, S., Shimamoto, N., and Utiyama, H. (1982) Identification and characterization of the direct folding process of hen egg-white lysozyme., *Biochemistry* 21, 38-43.
81. Schmid, F.X. (1983) Mechanism of folding of ribonuclease A. Slow refolding is a sequential reaction via structural intermediates, *Biochemistry* 22, 4690-4696.
82. Kuwajima, K. (1977) A folding model of alpha-lactalbumin deduced from the three-state denaturation mechanism, *Journal of molecular biology* 114, 241-258.
83. Schmid, F.X., and Blaschek, H. (1981) A native-like intermediate on the ribonuclease A folding pathway. 2. Comparison of its properties to native ribonuclease A., *Eur. J. Biochem.* 114, 111-117.

84. Schmid, F.X. (1986) Fast-folding and slow-folding forms of unfolded proteins, In *Enzyme Structure Part L* (Hirs, C.H.W., and Timasheff, S.N., Eds.) 1 ed., pp 71-82, Academic Press, New York.
85. Jaenicke, R. (1999) Stability and folding of domain proteins, *Progress in biophysics and molecular biology* 71, 155-241.
86. Han, J.H., Batey, S., Nickson, A.A., Teichmann, S.A., and Clarke, J. (2007) The folding and evolution of multidomain proteins, *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 319-330.
87. Jaenicke, R., and Lilie, H. (2000) Folding and association of oligomeric and multimeric proteins, *Adv. Protein Chem.* 53, 329-+.
88. Acharya, A.S., and Taniuchi, H. (1982) Implication of the structure and stability of disulfide intermediates of lysozyme on the mechanism of renaturation, *Molecular and cellular biochemistry* 44, 129-148.
89. Creighton, T.E. (1984) Pathways and mechanisms of protein folding, *Advances in biophysics* 18, 1-20.
90. Freedman, R.B. (1989) Protein disulfide isomerase: multiple roles in the modification of nascent secretory proteins, *Cell* 57, 1069-1072.
91. Brandts, J.F., Halvorson, H.R., and Brennan, M. (1975) Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues, *Biochemistry* 14, 4953-4963.
92. Cook, K.H., Schmid, F.X., and Baldwin, R.L. (1979) Role of proline isomerization in folding of ribonuclease A at low temperatures., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 6157-6161.
93. Kiefhaber, T., Quaas, R., Hahn, U., and Schmid, F.X. (1990) Folding of Ribonuclease T₁. 1. Existence of multiple unfolded states created by proline isomerization, *Biochemistry* 29, 3053-3061.
94. Maki, K., Ikura, T., Hayano, T., Takahashi, N., and Kuwajima, K. (1999) Effects of proline mutations on the folding of staphylococcal nuclease, *Biochemistry* 38, 2213-2223.
95. Schmid, F.X. (2005) Prolyl isomerization in protein folding, In *Protein Folding Handbook*, pp 916-945, WILEY-VCH, Weinheim.
96. Stewart, D.E., Sarkar, A., and Wampler, J.E. (1990) Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures, *Journal of molecular biology* 214, 253-260.
97. Pal, D., and Chakrabarti, P. (1999) Cis peptide bonds in proteins: residues involved, their conformations, interactions and locations, *J Mol Biol* 294, 271-288.
98. Schmid, F.X., and Baldwin, R.L. (1979) Detection of an early intermediate in the folding of ribonuclease A by protection of amide protons against exchange, *J. Mol. Biol.* 135, 199-215.
99. Rehage, A., and Schmid, F.X. (1982) Fast- and slow-refolding forms of unfolded ribonuclease A differ in tyrosine fluorescence, *Biochemistry* 21, 1499-1505.
100. Schmid, F.X., Grafl, R., Wrba, A., and Beintema, J.J. (1986) Role of proline peptide bond isomerization in unfolding and refolding of ribonuclease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 83, 872-876.
101. Lu, K.P., Finn, G., Lee, T.H., and Nicholson, L.K. (2007) Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer, *Nat Chem Biol* 3, 619-629.
102. Gething, M.J., and Sambrook, J. (1992) Protein folding in the cell, *Nature* 355, 33-45.
103. Freedman, R.B., Hirst, T.R., and Tuite, M.F. (1994) Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding, *Trends in biochemical sciences* 19, 331-336.
104. Galat, A. (1993) Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins, *European journal of biochemistry / FEBS* 216, 689-707.
105. Schmid, F.X. (1993) Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions, *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 22, 123-142.

106. Göthel, S.F., and Marahiel, M.A. (1999) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts, *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 55, 423-436.
107. Zoldak, G., and Schmid, F.X. (2011) Cooperation of the prolyl isomerase and chaperone activities of the protein folding catalyst SlyD, *J Mol Biol* 406, 176-194.
108. Kovermann, M., Zierold, R., Haupt, C., Low, C., and Balbach, J. (2011) NMR relaxation unravels interdomain crosstalk of the two domain prolyl isomerase and chaperone SlyD, *Biochimica et biophysica acta* 1814, 873-881.
109. Hartl, F.U., Bracher, A., and Hayer-Hartl, M. (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis, *Nature* 475, 324-332.
110. Hartl, F.U. (2011) Chaperone-assisted protein folding: the path to discovery from a personal perspective, *Nature medicine* 17, 1206-1210.
111. Kim, Y.E., Hipp, M.S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2013) Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis, *Annual review of biochemistry* 82, 323-355.
112. Andreotti, A.H. (2003) Native state proline isomerization: An intrinsic molecular switch, *Biochemistry* 42, 9515-9524.
113. Hoffmann-Thoms, S., Jakob, R.P., and Schmid, F.X. (2014) Energetic Communication between Functional Sites of the Gene-3-Protein during Infection by Phage fd, *J Mol Biol*.
114. Eckert, B., Martin, A., Balbach, J., and Schmid, F.X. (2005) Prolyl isomerization as a molecular timer in phage infection, *Nature structural & molecular biology* 12, 619-623.
115. Martin, A., and Schmid, F.X. (2003) A proline switch controls folding and domain interactions in the gene-3-protein of the filamentous phage fd, *J Mol Biol* 331, 1131-1140.
116. Sarkar, P., Reichman, C., Saleh, T., Birge, R.B., and Kalodimos, C.G. (2007) Proline cis-trans isomerization controls autoinhibition of a signaling protein, *Molecular cell* 25, 413-426.
117. Sarkar, P., Saleh, T., Tzeng, S.R., Birge, R.B., and Kalodimos, C.G. (2011) Structural basis for regulation of the Crk signaling protein by a proline switch, *Nat Chem Biol* 7, 51-57.
118. Markley, J.L., Williams, M.N., and Jardetzky, O. (1970) Nuclear magnetic resonance studies of the structure and binding sites of enzymes. XII. A conformational equilibrium in staphylococcal nuclease involving a histidine residue, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 65, 645-651.
119. Fox, R.O., Evans, P.A., and Dobson, C.M. (1986) Multiple conformations of a protein demonstrated by magnetization transfer NMR spectroscopy, *Nature* 320, 192-194.
120. Chazin, W.J., Kördel, J., Drakenberg, T., Thulin, E., Brodin, P., Grundström, T., and Forsén, S. (1989) Proline isomerism leads to multiple folded conformations of calbindin D9k: direct evidence from two-dimensional NMR spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2195-2198.
121. Kördel, J., Forsén, S., Drakenberg, T., and Chazin, W.J. (1990) The rate and structural consequences of proline cis-trans isomerization in calbindin D9k: NMR studies of the minor (cisPro43)isoform and the Pro43Gly mutant., *Biochemistry* 29, 4400-4409.
122. Feng, Y., Hood, W.F., Forgey, R.W., Abegg, A.L., Caparon, M.H., Thiele, B.R., Leimgruber, R.M., and McWherter, C.A. (1997) Multiple conformations of a human interleukin-3 variant, *Protein science : a publication of the Protein Society* 6, 1777-1782.

123. Higgins, K.A., Craik, D.J., Hall, J.G., and Andrews, P.R. (1988) Cis-trans isomerization of the proline residue in insulin studied by ^{13}C NMR spectroscopy, *Drug Design and Delivery* 3, 159-170.
124. Brazin, K.N., Mallis, R.J., Fulton, D.B., and Andreotti, A.H. (2002) Regulation of the tyrosine kinase Itk by the peptidyl-prolyl isomerase cyclophilin A, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 1899-1904.
125. Mallis, R.J., Brazin, K.N., Fulton, D.B., and Andreotti, A.H. (2002) Structural characterization of a proline-driven conformational switch within the Itk SH2 domain, *Nat Struct Biol* 9, 900-905.
126. Martin, A., and Schmid, F.X. (2003) The folding mechanism of a two-domain protein: folding kinetics and domain docking of the gene-3-protein of phage fd, *J. Mol. Biol.* 329, 599-610.
127. Martin, A., and Schmid, F.X. (2003) A proline switch controls folding and domain interactions in the gene-3-protein of the filamentous phage fd, *J. Mol. Biol.* 331, 1131-1140.
128. Eckert, B., Martin, A., Balbach, J., and Schmid, F.X. (2005) Prolyl isomerization as a molecular timer in phage infection, *Nature Structural & Molecular Biology* 12, 619-623.
129. Weininger, U., Jakob, R.P., Eckert, B., Schweimer, K., Schmid, F.X., and Balbach, J. (2009) A remote prolyl isomerization controls domain assembly via a hydrogen bonding network, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 12335-12340.
130. Ranganathan, R., Lu, K.P., Hunter, T., and Noel, J.P. (1997) Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent, *Cell* 89, 875-886.
131. Lu, K.P., Hanes, S.D., and Hunter, T. (1996) A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis, *Nature* 380, 544-547.
132. Lu, P.J., Zhou, X.Z., Liou, Y.C., Noel, J.P., and Lu, K.P. (2002) Critical role of WW domain phosphorylation in regulating phosphoserine binding activity and Pin1 function, *The Journal of biological chemistry* 277, 2381-2384.
133. Zhou, X.Z., Kops, O., Werner, A., Lu, P.J., Shen, M., Stoller, G., Kullertz, G., Stark, M., Fischer, G., and Lu, K.P. (2000) Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins, *Molecular cell* 6, 873-883.
134. Stukenberg, P.T., and Kirschner, M.W. (2001) Pin1 acts catalytically to promote a conformational change in Cdc25, *Molecular cell* 7, 1071-1083.
135. Bernis, C., Vigneron, S., Burgess, A., Labbe, J.C., Fesquet, D., Castro, A., and Lorca, T. (2007) Pin1 stabilizes Emi1 during G2 phase by preventing its association with SCF(beta-trcp), *EMBO reports* 8, 91-98.
136. Xu, Y.X., and Manley, J.L. (2007) The prolyl isomerase Pin1 functions in mitotic chromosome condensation, *Molecular cell* 26, 287-300.
137. Wulf, G.M., Ryo, A., Wulf, G.G., Lee, S.W., Niu, T., Petkova, V., and 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, *The EMBO journal* 20, 3459-3472.
138. Liou, Y.C., Ryo, A., Huang, H.K., Lu, P.J., Bronson, R., Fujimori, F., Uchida, T., Hunter, T., and Lu, K.P. (2002) Loss of Pin1 function in the mouse causes phenotypes resembling cyclin D1-null phenotypes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 1335-1340.
139. Suizu, F., Ryo, A., Wulf, G., Lim, J., and Lu, K.P. (2006) Pin1 regulates centrosome duplication, and its overexpression induces centrosome amplification, chromosome instability, and oncogenesis, *Molecular and cellular biology* 26, 1463-1479.

140. Fischer, G., Bang, H., and Mech, C. (1984) Nachweis einer Enzymkatalyse für die cis-trans-Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden, *Biomed.Biochim.Acta* 43, 1101-1111.
141. Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., and Schmid, F.X. (1989) Cyclophilin and peptidyl-prolyl-cis/trans-isomerase are probably identical proteins, *Nature* 337, 476-478.
142. Takahashi, N., Hayano, T., and Suzuki, M. (1989) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin, *Nature* 337, 473-475.
143. Handschumacher, R.E., Harding, M.W., Rice, J., Drugge, R.J., and Speicher, D.W. (1984) Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A, *Science* 226, 544-547.
144. DeLano, W.L. (2003) The PyMOL molecular graphics system, In *DeLano Scientific LLC*, DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.
145. Ottiger, M., Zerbe, O., Guntert, P., and Wuthrich, K. (1997) The NMR solution conformation of unligated human cyclophilin A, *J Mol Biol* 272, 64-81.
146. Van Duyne, G.D., Standaert, R.F., Karplus, P.A., Schreiber, S.L., and Clardy, J. (1991) Atomic structure of FKBP-FK506, an immunophilin-immunosuppressant complex, *Science* 252, 839-842.
147. Mueller, J.W., Link, N.M., Matena, A., Hoppstock, L., Ruppel, A., Bayer, P., and Blankenfeldt, W. (2011) Crystallographic proof for an extended hydrogen-bonding network in small prolyl isomerases, *J Am Chem Soc* 133, 20096-20099.
148. Zoldak, G., Aumüller, T., Lucke, C., Hritz, J., Oostenbrink, C., Fischer, G., and Schmid, F.X. (2009) A library of fluorescent peptides for exploring the substrate specificities of prolyl isomerases, *Biochemistry* 48, 10423-10436.
149. Schmidpeter, P.A., Jahreis, G., Geitner, A.J., and Schmid, F.X. (2011) Prolyl isomerases show low sequence specificity toward the residue following the proline, *Biochemistry* 50, 4796-4803.
150. Wang, P., and Heitman, J. (2005) The cyclophilins, *Genome biology* 6, 226.
151. Nigro, P., Pompilio, G., and Capogrossi, M.C. (2013) Cyclophilin A: a key player for human disease, *Cell death & disease* 4, e888.
152. Yang, H., Chen, J., Yang, J., Qiao, S., Zhao, S., and Yu, L. (2007) Cyclophilin A is upregulated in small cell lung cancer and activates ERK1/2 signal, *Biochemical and biophysical research communications* 361, 763-767.
153. Qi, Y.J., He, Q.Y., Ma, Y.F., Du, Y.W., Liu, G.C., Li, Y.J., Tsao, G.S., Ngai, S.M., and Chiu, J.F. (2008) Proteomic identification of malignant transformation-related proteins in esophageal squamous cell carcinoma, *Journal of cellular biochemistry* 104, 1625-1635.
154. Semba, S., and Huebner, K. (2006) Protein expression profiling identifies cyclophilin A as a molecular target in Fhit-mediated tumor suppression, *Molecular cancer research : MCR* 4, 529-538.
155. Choi, K.J., Piao, Y.J., Lim, M.J., Kim, J.H., Ha, J., Choe, W., and Kim, S.S. (2007) Overexpressed cyclophilin A in cancer cells renders resistance to hypoxia- and cisplatin-induced cell death, *Cancer research* 67, 3654-3662.
156. Calhoun, C.C., Lu, Y.C., Song, J., and Chiu, R. (2009) Knockdown endogenous CypA with siRNA in U2OS cells results in disruption of F-actin structure and alters tumor phenotype, *Molecular and cellular biochemistry* 320, 35-43.
157. Yu, X., Harris, S.L., and Levine, A.J. (2006) The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein, *Cancer research* 66, 4795-4801.
158. An, P., Wang, L.H., Hutcheson-Dilks, H., Nelson, G., Donfield, S., Goedert, J.J., Rinaldo, C.R., Buchbinder, S., Kirk, G.D., O'Brien, S.J., and Winkler, C.A. (2007) Regulatory polymorphisms in the cyclophilin A gene, PPIA, accelerate progression to AIDS, *PLoS pathogens* 3, e88.

159. Endrich, M.M., and Gehring, H. (1998) The V3 loop of human immunodeficiency virus type-1 envelope protein is a high-affinity ligand for immunophilins present in human blood, *European journal of biochemistry / FEBS* 252, 441-446.
160. Manel, N., Hogstad, B., Wang, Y., Levy, D.E., Unutmaz, D., and Littman, D.R. (2010) A cryptic sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells, *Nature* 467, 214-217.
161. Patient, R., Hourieux, C., Sizaret, P.Y., Trassard, S., Sureau, C., and Roingard, P. (2007) Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking, *Journal of virology* 81, 3842-3851.
162. Tellinghuisen, T.L., Foss, K.L., Treadaway, J.C., and Rice, C.M. (2008) Identification of residues required for RNA replication in domains II and III of the hepatitis C virus NS5A protein, *Journal of virology* 82, 1073-1083.
163. Tian, X., Zhao, C., Zhu, H., She, W., Zhang, J., Liu, J., Li, L., Zheng, S., Wen, Y.M., and Xie, Y. (2010) Hepatitis B virus (HBV) surface antigen interacts with and promotes cyclophilin a secretion: possible link to pathogenesis of HBV infection, *Journal of virology* 84, 3373-3381.
164. Shaw, M.L., Stone, K.L., Colangelo, C.M., Gulcicek, E.E., and Palese, P. (2008) Cellular proteins in influenza virus particles, *PLoS pathogens* 4, e1000085.
165. Liu, X., Sun, L., Yu, M., Wang, Z., Xu, C., Xue, Q., Zhang, K., Ye, X., Kitamura, Y., and Liu, W. (2009) Cyclophilin A interacts with influenza A virus M1 protein and impairs the early stage of the viral replication, *Cellular microbiology* 11, 730-741.
166. Liu, X., Zhao, Z., Xu, C., Sun, L., Chen, J., Zhang, L., and Liu, W. (2012) Cyclophilin A restricts influenza A virus replication through degradation of the M1 protein, *PLoS one* 7, e31063.
167. Tegeder, I., Schumacher, A., John, S., Geiger, H., Geisslinger, G., Bang, H., and Brune, K. (1997) Elevated serum cyclophilin levels in patients with severe sepsis, *Journal of clinical immunology* 17, 380-386.
168. Dear, J.W., Leelahavanichkul, A., Aponte, A., Hu, X., Constant, S.L., Hewitt, S.M., Yuen, P.S., and Star, R.A. (2007) Liver proteomics for therapeutic drug discovery: inhibition of the cyclophilin receptor CD147 attenuates sepsis-induced acute renal failure, *Critical care medicine* 35, 2319-2328.
169. Zeng, R.Z., Kim, H.G., Kim, N.R., Lee, H.Y., Jung, B.J., Ko, M.Y., Lee, S.Y., and Chung, D.K. (2010) Protein expression changes in human monocytic THP-1 cells treated with lipoteichoic acid from *Lactobacillus plantarum* and *Staphylococcus aureus*, *Molecules and cells* 29, 585-594.
170. Rassow, J., Mohrs, K., Koidl, S., Barthelmess, I.B., Pfanner, N., and Tropschug, M. (1995) Cyclophilin 20 is involved in mitochondrial protein folding in cooperation with molecular chaperones Hsp70 and Hsp60, *Mol. Cell Biol.* 15, 2654-2662.
171. Matouschek, A., Rospert, S., Schmid, K., Glick, B.S., and Schatz, G. (1995) Cyclophilin catalyzes protein folding in yeast mitochondria, *Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.* 92, 6319-6323.
172. Kokoszka, J.E., Waymire, K.G., Levy, S.E., Sligh, J.E., Cai, J., Jones, D.P., MacGregor, G.R., and Wallace, D.C. (2004) The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore, *Nature* 427, 461-465.
173. Basso, E., Fante, L., Fowlkes, J., Petronilli, V., Forte, M.A., and Bernardi, P. (2005) Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D, *The Journal of biological chemistry* 280, 18558-18561.
174. Baines, C.P., Kaiser, R.A., Sheiko, T., Craigen, W.J., and Molkenin, J.D. (2007) Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death, *Nature cell biology* 9, 550-555.
175. Baines, C.P., Kaiser, R.A., Purcell, N.H., Blair, N.S., Osinska, H., Hambleton, M.A., Brunskill, E.W., Sayen, M.R., Gottlieb, R.A., Dorn, G.W., Robbins, J., and

- Molkentin, J.D. (2005) Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death, *Nature* 434, 658-662.
176. Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., and Tsujimoto, Y. (2005) Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death, *Nature* 434, 652-658.
177. Lin, D.T., and Lechleiter, J.D. (2002) Mitochondrial targeted cyclophilin D protects cells from cell death by peptidyl prolyl isomerization, *The Journal of biological chemistry* 277, 31134-31141.
178. Vaseva, A.V., Marchenko, N.D., Ji, K., Tsirka, S.E., Holzmann, S., and Moll, U.M. (2012) p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis, *Cell* 149, 1536-1548.
179. Vaseva, A.V., and Moll, U.M. (2009) The mitochondrial p53 pathway, *Biochimica et biophysica acta* 1787, 414-420.
180. Lopez-Illasaca, M., Schiene, C., Kullertz, G., Tradler, T., Fischer, G., and Wetzker, R. (1998) Effects of FK506-binding protein 12 and FK506 on autophosphorylation of epidermal growth factor receptor, *The Journal of biological chemistry* 273, 9430-9434.
181. Ng, K.K., and Weis, W.I. (1998) Coupling of prolyl peptide bond isomerization and Ca²⁺ binding in a C-type mannose-binding protein, *Biochemistry* 37, 17977-17989.
182. Thiele, A., Krentzlin, K., Erdmann, F., Rauh, D., Hause, G., Zerweck, J., Kilka, S., Posel, S., Fischer, G., Schutkowski, M., and Weiwad, M. (2011) Parvulin 17 promotes microtubule assembly by its peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity, *J Mol Biol* 411, 896-909.
183. Lu, P.J., Zhou, X.Z., Shen, M., and Lu, K.P. (1999) Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules, *Science* 283, 1325-1328.
184. Zhou, X.Z., Lu, P.J., Wulf, G., and Lu, K.P. (1999) Phosphorylation-dependent prolyl isomerization: a novel signaling regulatory mechanism, *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 56, 788-806.
185. Mayer, B.J., Hamaguchi, M., and Hanafusa, H. (1988) A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C, *Nature* 332, 272-275.
186. Sadowski, I., Stone, J.C., and Pawson, T. (1986) A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps, *Molecular and cellular biology* 6, 4396-4408.
187. Matsuda, M., Tanaka, S., Nagata, S., Kojima, A., Kurata, T., and Shibuya, M. (1992) Two species of human CRK cDNA encode proteins with distinct biological activities, *Molecular and cellular biology* 12, 3482-3489.
188. Feller, S.M. (2001) Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles, *Oncogene* 20, 6348-6371.
189. Miller, C.T., Chen, G., Gharib, T.G., Wang, H., Thomas, D.G., Misek, D.E., Giordano, T.J., Yee, J., Orringer, M.B., Hanash, S.M., and Beer, D.G. (2003) Increased C-CRK proto-oncogene expression is associated with an aggressive phenotype in lung adenocarcinomas, *Oncogene* 22, 7950-7957.
190. Linghu, H., Tsuda, M., Makino, Y., Sakai, M., Watanabe, T., Ichihara, S., Sawa, H., Nagashima, K., Mochizuki, N., and Tanaka, S. (2006) Involvement of adaptor protein Crk in malignant feature of human ovarian cancer cell line MCAS, *Oncogene* 25, 3547-3556.
191. Wang, L., Tabu, K., Kimura, T., Tsuda, M., Linghu, H., Tanino, M., Kaneko, S., Nishihara, H., and Tanaka, S. (2007) Signaling adaptor protein Crk is indispensable for malignant feature of glioblastoma cell line KMG4, *Biochemical and biophysical research communications* 362, 976-981.

192. Nishihara, H., Tanaka, S., Tsuda, M., Oikawa, S., Maeda, M., Shimizu, M., Shinomiya, H., Tanigami, A., Sawa, H., and Nagashima, K. (2002) Molecular and immunohistochemical analysis of signaling adaptor protein Crk in human cancers, *Cancer letters* 180, 55-61.
193. Tsuda, M., and Tanaka, S. (2012) Roles for crk in cancer metastasis and invasion, *Genes & cancer* 3, 334-340.
194. Beer, D.G., Kardia, S.L., Huang, C.C., Giordano, T.J., Levin, A.M., Misek, D.E., Lin, L., Chen, G., Gharib, T.G., Thomas, D.G., Lizyness, M.L., Kuick, R., Hayasaka, S., Taylor, J.M., Iannettoni, M.D., Orringer, M.B., and Hanash, S. (2002) Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma, *Nature medicine* 8, 816-824.
195. Pezeshkpour, G.H., Moatamed, F., Lewis, M., Hoang, B., Rettig, M., and Mortazavi, F. (2013) CRK SH3N Domain Diminishes Cell Invasiveness of Non-Small Cell Lung Cancer, *Genes & cancer* 4, 315-324.
196. Kobashigawa, Y., Sakai, M., Naito, M., Yokochi, M., Kumeta, H., Makino, Y., Ogura, K., Tanaka, S., and Inagaki, F. (2007) Structural basis for the transforming activity of human cancer-related signaling adaptor protein CRK, *Nature structural & molecular biology* 14, 503-510.
197. Feller, S.M., Knudsen, B., and Hanafusa, H. (1994) c-Abl kinase regulates the protein binding activity of c-Crk, *The EMBO journal* 13, 2341-2351.
198. Escalante, M., Courtney, J., Chin, W.G., Teng, K.K., Kim, J.I., Fajardo, J.E., Mayer, B.J., Hempstead, B.L., and Birge, R.B. (2000) Phosphorylation of c-Crk II on the negative regulatory Tyr222 mediates nerve growth factor-induced cell spreading and morphogenesis, *The Journal of biological chemistry* 275, 24787-24797.
199. Rosen, M.K., Yamazaki, T., Gish, G.D., Kay, C.M., Pawson, T., and Kay, L.E. (1995) Direct demonstration of an intramolecular SH2-phosphotyrosine interaction in the Crk protein, *Nature* 374, 477-479.
200. Jakob, R.P., and Schmid, F.X. (2008) Energetic coupling between native-state prolyl isomerization and conformational protein folding, *J Mol Biol* 377, 1560-1575.
201. Jakob, R.P., and Schmid, F.X. (2009) Molecular determinants of a native-state prolyl isomerization, *J Mol Biol* 387, 1017-1031.
202. Hagn, F., Lagleder, S., Retzlaff, M., Rohrberg, J., Demmer, O., Richter, K., Buchner, J., and Kessler, H. (2011) Structural analysis of the interaction between Hsp90 and the tumor suppressor protein p53, *Nature structural & molecular biology* 18, 1086-1093.
203. Schägger, H., and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Analytical Biochemistry* 166, 368-379.
204. Pace, C.N. (1986) Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves, *Methods in enzymology* 131, 266-280.
205. Santoro, M.M., and Bolen, D.W. (1988) Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants, *Biochemistry* 27, 8063-8068.
206. Tanford, C. (1968) Protein denaturation, *Adv Protein Chem* 23, 121-282.
207. Wu, X., Knudsen, B., Feller, S.M., Zheng, J., Sali, A., Cowburn, D., Hanafusa, H., and Kuriyan, J. (1995) Structural basis for the specific interaction of lysine-containing proline-rich peptides with the N-terminal SH3 domain of c-Crk, *Structure* 3, 215-226.
208. Sriram, G., Reichman, C., Tunceroglu, A., Kaushal, N., Saleh, T., Machida, K., Mayer, B., Ge, Q., Li, J., Hornbeck, P., Kalodimos, C.G., and Birge, R.B. (2011)

- Phosphorylation of Crk on tyrosine 251 in the RT loop of the SH3C domain promotes Abl kinase transactivation, *Oncogene* 30, 4645-4655.
209. Anafi, M., Rosen, M.K., Gish, G.D., Kay, L.E., and Pawson, T. (1996) A potential SH3 domain-binding site in the Crk SH2 domain, *The Journal of biological chemistry* 271, 21365-21374.
210. Crompton, M., Virji, S., and Ward, J.M. (1998) Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore, *European journal of biochemistry / FEBS* 258, 729-735.
211. Gartel, A.L., Serfas, M.S., and Tyner, A.L. (1996) p21--negative regulator of the cell cycle, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* 213, 138-149.
212. Marchenko, N.D., Zaika, A., and Moll, U.M. (2000) Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling, *The Journal of biological chemistry* 275, 16202-16212.
213. Jakob, R.P., Zoldak, G., Aumuller, T., and Schmid, F.X. (2009) Chaperone domains convert prolyl isomerases into generic catalysts of protein folding, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 20282-20287.
214. Scholz, C., Maier, P., Dolinski, K., Heitman, J., and Schmid, F.X. (1999) R73A and H144Q mutants of the yeast mitochondrial cyclophilin Cpr3 exhibit a low prolyl isomerase activity in both peptide and protein-folding assays, *FEBS letters* 443, 367-369.
215. Harding, M.W., and Handschumacher, R.E. (1988) Cyclophilin, a primary molecular target for cyclosporine. Structural and functional implications, *Transplantation* 46, 29S-35S.
216. Kajitani, K., Fujihashi, M., Kobayashi, Y., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., and Miki, K. (2008) Crystal structure of human cyclophilin D in complex with its inhibitor, cyclosporin A at 0.96-Å resolution, *Proteins* 70, 1635-1639.
217. Schindler, T., Graumann, P.L., Perl, D., Ma, S., Schmid, F.X., and Marahiel, M.A. (1999) The family of cold shock proteins of *Bacillus subtilis*. Stability and dynamics in vitro and in vivo, *The Journal of biological chemistry* 274, 3407-3413.
218. Perl, D., Mueller, U., Heinemann, U., and Schmid, F.X. (2000) Two exposed amino acid residues confer thermostability on a cold shock protein, *Nat Struct Biol* 7, 380-383.
219. Perl, D., and Schmid, F.X. (2001) Electrostatic stabilization of a thermophilic cold shock protein, *J Mol Biol* 313, 343-357.
220. Feller, G. (2013) Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology, *Scientifica* 2013, 512840.
221. Saibil, H.R., Fenton, W.A., Clare, D.K., and Horwich, A.L. (2013) Structure and allostery of the chaperonin GroEL, *J Mol Biol* 425, 1476-1487.
222. Popp, S., Packschies, L., Radzwill, N., Vogel, K.P., Steinhoff, H.J., and Reinstein, J. (2005) Structural dynamics of the DnaK-peptide complex, *J Mol Biol* 347, 1039-1052.
223. Stoller, G., Rucknagel, K.P., Nierhaus, K.H., Schmid, F.X., Fischer, G., and Rahfeld, J.U. (1995) A ribosome-associated peptidyl-prolyl cis/trans isomerase identified as the trigger factor, *The EMBO journal* 14, 4939-4948.
224. Scholz, C., Stoller, G., Zarnt, T., Fischer, G., and Schmid, F.X. (1997) Cooperation of enzymatic and chaperone functions of trigger factor in the catalysis of protein folding, *The EMBO journal* 16, 54-58.
225. Piette, F., D'Amico, S., Struvay, C., Mazzucchelli, G., Renaut, J., Tutino, M.L., Danchin, A., Leprince, P., and Feller, G. (2010) Proteomics of life at low temperatures: trigger factor is the primary chaperone in the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125, *Molecular microbiology* 76, 120-132.

226. Knappe, T.A., Eckert, B., Schaarschmidt, P., Scholz, C., and Schmid, F.X. (2007) Insertion of a chaperone domain converts FKBP12 into a powerful catalyst of protein folding, *J Mol Biol* 368, 1458-1468.
227. Geitner, A.J., and Schmid, F.X. (2012) Combination of the human prolyl isomerase FKBP12 with unrelated chaperone domains leads to chimeric folding enzymes with high activity, *J Mol Biol* 420, 335-349.
228. Hoffmann-Thoms, S., Jakob, R.P., and Schmid, F.X. (2014) Energetic communication between functional sites of the gene-3-protein during infection by phage fd, *J Mol Biol* 426, 1711-1722.
229. Puorger, C., Eidam, O., Capitani, G., Erilov, D., Grutter, M.G., and Glockshuber, R. (2008) Infinite kinetic stability against dissociation of supramolecular protein complexes through donor strand complementation, *Structure* 16, 631-642.
230. Walczak, M.J., Puorger, C., Glockshuber, R., and Wider, G. (2014) Intramolecular donor strand complementation in the E. coli type 1 pilus subunit FimA explains the existence of FimA monomers as off-pathway products of pilus assembly that inhibit host cell apoptosis, *J Mol Biol* 426, 542-549.

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Franz X. Schmid bedanken. Danke Franz, für die gute Ausbildung, Deine Unterstützung, das interessante Thema und alle Freiheiten das Thema nach meinen Vorstellungen zu bearbeiten.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei meinen Mentoren Prof. Dr. Wulf Blankenfeldt und Prof. Dr. Olaf Stemmann für ihre Diskussionsbereitschaft und ihre Hilfe bedanken. Ihren Einsatz über die jährlichen Mentoratstreffen hinaus schätze ich sehr.

Ich danke auch Prof. Dr. Ute Moll und Prof. Dr. Markus Seeliger, sowie ihren gesamten Gruppen, für eine sehr interessante Kooperation. In zahlreichen Gesprächen konnten viele unterschiedliche Aspekte und Thesen diskutiert werden, was nicht zu letzt durch ihre großzügige Gastfreundschaft während meiner Aufenthalte erleichtert wurde.

Desweiteren danke ich Prof. Dr. Georges Feller und Amandine Godin-Roulling für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Besonderen Dank spreche ich meiner Kollegin Johanna Koch aus für unzählige Diskussionen und Ratschläge, sowie für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Ihr und meinen ehemaligen KollegenInnen Anne-Juliane Geitner, Stephanie Hoffmann-Thoms, Stefan Lorenz und Gabriel Zoldak danke ich für die immer gute Atmosphäre im Labor und die unterhaltsamen und abwechslungsreichen Kaffeepausen.

Für ihre Mitarbeit an verschiedenen Projekten in Form von Forschungsmodulen, Bachelorarbeiten und Masterarbeiten bedanke ich mich bei Christine Baumgärtel, Tatjana Theer, Lisa Wagner, Maximilian Sauer und Philipp Schmid. Besonders dankbar bin ich Lena Ries, die mich nach ihrer Bachelorarbeit auch während ihrer Masterarbeit als Betreuer ertragen durfte. Ihr Einsatz im Labor, auch über ihre Projekte hinaus, und die sehr gute Freundschaft zwischen uns waren und sind eine sehr große Hilfe.

Meiner Familie gilt großer Dank dafür, dass sie während meines Studiums und meiner Doktorandenzeit immer zu mir standen und an mich geglaubt haben.

(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

(§ 8 S. 2 Nr. 6 PromO)

Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung hinsichtlich der eigenständigen Anfertigung der Dissertation unterzogen werden kann.

(§ 8 S. 2 Nr. 8 PromO)

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

(§ 8 S. 2 Nr. 9 PromO)

Ich habe die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades anderweitig eingereicht und habe auch nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden.

(§ 8 S. 2 Nr. 10 PromO)

Hiermit erkläre ich, dass ich keine Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern in Anspruch genommen habe und auch künftig nicht nehmen werde.

Bayreuth, den 11.06.2014