

Strukturelle und phylogenetische Analyse des Parvulins NmPin aus *Nitrosopumilus maritimus*

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie
an der

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

vorgelegt von **Christoph Lederer**
aus **Regensburg**
Datum der Abgabe **06.06.2012**

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente
wurden am Institut für

Strukturelle und Medizinische Biochemie

der

Fakultät für Biologie

der

Universität Duisburg-Essen

durchgeführt.

Dekan:

Prof. Dr. rer. nat. Bernd Sures

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. Peter Bayer
2. Prof. Dr. rer. nat. Raphael Stoll

Tag der mündlichen Prüfung: 25.09.2012

*"Ein wenig Weisheit ist schon möglich;
aber diese selige Sicherheit fand ich an allen
Dingen: dass sie lieber noch auf den Füßen
des Zufalls-tanzen."*

(Friedrich Nietzsche – „Also sprach Zarathustra“ , 1883)

Für meine liebe Mutter

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	8
Tabellenverzeichnis.....	10
Abkürzungsverzeichnis.....	11
1 Einleitung.....	12
1.1 Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen (PPIasen)	12
1.2 Nomenklatur der Parvuline.....	15
1.3 Parvuline	16
1.3.1 Prokaryotische Parvuline	16
1.3.2 Humane Parvuline	19
1.3.3 Parvuline in Pflanzen	21
1.3.4 Parvuline in Pilzen	22
1.3.5 Molekularer Mechanismus der PPIase-Reaktion durch Parvuline.....	23
1.4 Archaeale Phylogenie	26
1.4.1 Zwischen <i>Eury-</i> und <i>Crenarchaeota</i>	27
1.5 Aufgabenstellung.....	29
2 Materialien und Methoden.....	30
2.1 Geräte.....	30
2.2 Kits	31
2.3 Chemikalien.....	31
2.4 Medien und Lösungen	32
2.5 Verbrauchsmaterial	34
2.6 Enzyme und Antikörper.....	36
2.7 Oligonukleotide und Vektoren	37
2.8 Software.....	38
2.9 DNA-basierte Methoden.....	39
2.9.1 Anzucht genetisch veränderter <i>E.coli</i>	39
2.9.2 Bestimmung der Zelldichte durch Photometrie.....	39
2.9.3 Plasmidvektorpräparation.....	39
2.9.4 DNA-Restriktion mittels Restriktionsenzymen	39
2.9.5 Fragmentlängenanalyse mittels Agarose-Gel	40
2.9.6 Gelextraktion	40
2.9.7 Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels PCR	40
2.9.8 Ligation.....	41
2.9.9 Herstellung kompetenter Zellen	41
2.9.10 Transformation	42
2.10 Proteinbiochemische Methoden	43
2.10.1 Expressionstest.....	43
2.10.2 Expression von unmarkiertem Protein.....	43
2.10.3 Expression von markiertem Protein mittels Spar-Präp	44
2.10.4 Zellaufschluss.....	44

Inhaltsverzeichnis

2.10.5	Affinitätschromatographie mittels GST-tag.....	45
2.10.6	Proteinkonzentrationsbestimmung	46
2.10.7	PreScission-Verdau.....	46
2.10.8	Gelfiltration.....	46
2.10.9	Gelfiltration mit vorgeschalteter GSH-Säule	47
2.10.10	Diskontinuierliche SDS-PAGE	47
2.10.11	Semi-Dry Western-Blot.....	48
2.10.12	Dot-Blot.....	49
2.11	Phylogenie.....	50
2.11.1	Übersicht über das PPIase-Repertoire der Prokaryoten.....	50
2.11.2	Suche nach archaealen Parvulinen des Par10-Typs	50
2.11.3	Vergleich der Konserviertheit benachbarter Genprodukte	50
2.11.4	Phylogenie prokaryotischer sdPars	51
2.11.5	Maschinelles Lernen	52
2.12	NMR-Spektroskopie	53
2.12.1	Probenvorbereitung.....	53
2.12.2	Messbedingungen	53
2.12.3	Prozessierung.....	56
2.12.4	Strukturrechnung.....	56
3	Ergebnisse	58
3.1	Phylogenetische Untersuchungen.....	59
3.1.1	PPIase-Repertoire der Archaea.....	59
3.1.2	Single domain Parvuline (sdPar).....	62
3.1.3	Genomischer Kontext der archaealen Parvulingene	63
3.1.4	Konserviertheit des Parvulingens.....	65
3.1.5	Phylogenetische Berechnungen	65
3.1.6	Bioinformatische Ansätze.....	69
3.2	Klonierung und Reinigung von NmPin.....	71
3.3	NMR-Spektroskopie	73
3.3.1	Selektive Demarkierung einzelner Aminosäuren.....	73
3.3.2	Zuordnung des Proteinrückgrats (<i>backbone assignment</i>).....	76
3.3.3	Zuordnung der Seitenketten	80
3.3.4	Aromaten, Amide, Cystein-HG	82
3.3.5	Wasserstoffbrücken-Donoren.....	84
3.4	Strukturrechnung.....	87
3.4.1	Cyana 3.0	87
3.4.2	Water refinement.....	91
3.4.3	Stereobilder.....	93
3.4.4	Oberflächen und elektrostatisches Potential.....	94
3.4.5	Protonentransport-gekoppelte Elektronentransportkette	96
3.5	Proteinbiochemie	99

Inhaltsverzeichnis

4	Diskussion	100
4.1	Bioinformatische Analysen	100
4.1.1	Archaeale Phylogenie	100
4.1.2	Erweiterungsmöglichkeiten für <i>Thaumarchaeota</i> 1.a	102
4.1.3	PPIase-Repertoire der <i>Archaea</i>	103
4.1.4	Bioinformatische Trennung archaealer und bakterieller Parvuline	104
4.2	Strukturvergleiche	107
4.2.1	NmPin verglichen mit CsPin.....	107
4.2.2	NmPin verglichen mit PrsA und Par10 (bakterielle Parvuline).....	109
4.2.3	Potentielles Ladungsnetzwerk des katalytischen Zentrums	113
4.3	Ist NmPin ein Membranprotein?	115
4.4	Ausblick.....	118
5	Zusammenfassung / abstract	119
5.1	Zusammenfassung	119
5.2	Abstract	120
6	Anhang	121
	Literaturverzeichnis	127
	Danksagung	138
	Lebenslauf	140
	Eidesstattliche Erklärungen	141

auf der CD enthalten:

- **vollständiger MLP-Baum mit Beschriftungs-Datei**
- **input- und output-Dateien der Strukturrechnung mit Cyana 3.0**
- **input- und output-Dateien des *water refinements* mit YASARA**
- **alle RMSD-Werte der fertigen Struktur**
- **pdf-Datei dieser Arbeit**

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Prolyl-Isomerisierung	13
Abbildung 1.2: Immunophilinstrukturen mit gebundenen Liganden	14
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Parvuline aus Bakterien.....	16
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der humanen Parvuline.....	19
Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der pflanzlichen Parvuline.....	22
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Parvuline aus Pilzen.....	23
Abbildung 1.7: Wasserstoffbrücken-Netzwerk im hPar14-Kristall.....	25
Abbildung 1.8: Schema der beiden dominierenden Archaeen-Reiche	26
Abbildung 2.1: DNA-Marker	34
Abbildung 2.2: Protein-Marker	34
Abbildung 2.3: SDS-PAGE-Analyse der Affinitätsreinigung des Antikörperserums:	36
Abbildung 2.4: Schematische Darstellung von pET41presc.	37
Abbildung 2.5: Schematischer Aufbau eines <i>Semi-Dry</i> -Blots.....	48
Abbildung 2.6: Schematische Darstellung eines <i>Dot</i> Blots	49
Abbildung 2.7: Cyana 3.0.....	57
Abbildung 3.1: Genomischer Kontext der archaealen Parvuline.....	64
Abbildung 3.2: Konserviertheit des archaealen Parvulinlocus.....	65
Abbildung 3.3: <i>Cut Off</i> -Datensatz Phylogenie	66
Abbildung 3.4: Kondensierter Blick auf den phylogenetischen Baum	67
Abbildung 3.5: Archaealer Zweig kombiniert mit genetischem Umfeld.....	68
Abbildung 3.6: <i>Support Vector Machine</i> (SVM) und <i>Random Forest</i> (RF)	69
Abbildung 3.7: Wichtigkeitsverteilung und Proteinlogo	70
Abbildung 3.8: Klonierung und Reinigung von NmPin	71
Abbildung 3.9: Primärsequenz und demarkiertes Lysin (¹⁵ N-HSQC- <i>overlay</i>).....	73
Abbildung 3.10: Grenzen der Demarkierungsexperimente (Histidin-Experimente).....	75
Abbildung 3.11: <i>Backbone Assignment</i>	77
Abbildung 3.12: N-Terminus von NmPin im HNCACB.....	78
Abbildung 3.13: Vollständig zugeordnetes ¹⁵ N-HSQC.....	79
Abbildung 3.14: Prinzip der Seitenkettenzuordnung (<i>side chain assignment</i>)	81
Abbildung 3.15: Beispielzuordnung der Seitenketten von I22	82
Abbildung 3.16: Zuordnung: Aromaten am Beispiel F69, Amide und Cystein HG.....	83
Abbildung 3.17: Wasserstoffbrücken-Donoren.....	85
Abbildung 3.18: Verwendetes Skript für Cyana 3.0.....	87
Abbildung 3.19 Homologie-Modell NmPin	88
Abbildung 3.20: NmPin-Ensemble nach Rechnung mit Cyana 3.0.....	89
Abbildung 3.21: Ramachandran Plot des NmPin-Ensembles	90
Abbildung 3.22: Ensemble und Durchschnittsstruktur nach <i>water refinement</i>	91
Abbildung 3.23: Stereobilder der finalen NmPin-Struktur.....	93
Abbildung 3.24: Oberflächen NmPin	94
Abbildung 3.25: Elektrostatisches Potential.....	95
Abbildung 3.26: Potentielle Elektronentransportkette.....	96
Abbildung 3.27: Konserviertheit der potentiellen Elektronentransportkette.....	97
Abbildung 3.28: Geringste Abstände in der potentiellen Elektronentransportkette.....	98
Abbildung 3.29: Western Blot-Analyse von NmPin-Lysat	99
Abbildung 4.1: Archaealer Zweig des MLP-Baums	100
Abbildung 4.2: MLP-Baum aus Guy <i>et al.</i> 2011	101
Abbildung 4.3: Mögliche Primer für weitere Analysen	103
Abbildung 4.4: Molekulare Ansicht der für die Trennung wichtigsten Reste	105
Abbildung 4.5: Projektion der wichtigsten Reste auf die molekulare Oberfläche	105
Abbildung 4.6: <i>Alignment</i> von CsPin und NmPin.....	107
Abbildung 4.7: Überlagerung der NmPin- und CsPin- <i>average</i> -Strukturen	107
Abbildung 4.8: Vergleich Ladungsnetzwerk (NmPin <i>vs.</i> CsPin).....	108
Abbildung 4.9: Vergleich: NmPin mit aktiven, bakteriellen Parvulin-Domänen.....	109
Abbildung 4.10: ESPPME-Vergleich zwischen PrsA und NmPin	111
Abbildung 4.11: Potentielle Elektronentransportketten in PrsA	112
Abbildung 4.12: Hinweise auf ein Netzwerk in der Literatur	113

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 4.13: ESPPME von NmPin und CsPin mit markiertem Cystein 8	115
Abbildung 4.14: Palmitylierungsvorhersage mittels CSS Palm 3.0	116
Abbildung 4.15: Abbildungsausschnitte Membranlokalisation	117
Abbildung 6.1: Erste phylogenetische Berechnung; <i>Enterobacteriales</i>	125
Abbildung 6.2: ¹⁵ N-HSQC-NOESY	126

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Begriffsklärung Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen	15
Tabelle 2.1: Liste verwendeter Geräte	30
Tabelle 2.2: Verwendete Kits	31
Tabelle 2.3: Verwendete Chemikalien.....	31
Tabelle 2.4: Verwendete Lösungen, Puffer und Medien	32
Tabelle 2.5: Prokaryotenstämme	35
Tabelle 2.6: Weitere Verbrauchsartikel.....	35
Tabelle 2.7: Verwendete Enzyme	36
Tabelle 2.8: Verwendete Oligo- und Polynukleotide.....	37
Tabelle 2.9: Software	38
Tabelle 2.10: Fragmentlänge und Agarosekonzentration.....	40
Tabelle 2.11: Verwendetes PCR-Programm.....	41
Tabelle 2.12: Schema Expressionstestbedingungen.....	43
Tabelle 2.13: Verwendetes GST-Reinigungsprotokoll (20 ml Säule).....	45
Tabelle 2.14: Gelfiltrationsprotokoll (Superdex 75 26/60).....	46
Tabelle 2.15: Auflistung der wichtigsten Pulse	54
Tabelle 2.16: Aufnahmeparameter NMR.....	55
Tabelle 3.1: Archaeale Parvuline	59
Tabelle 3.2: PPIase-Repertoire Archaea	61
Tabelle 3.3: sdPar-Sequenzen aus Metagenomen	62
Tabelle 3.4: NOE- <i>restraints</i>	90
Tabelle 3.5: RMSD-Werte (in Angström Å)	92
Tabelle 3.6: Abstände innerhalb der potentiellen Elektronentransportkette.....	98
Tabelle 4.1: Abstände innerhalb der Elektronentransportkette (PrsA).....	111
Tabelle 6.1: Archaeales PPIase-Repertoire (komplett)	121
Tabelle 6.2: Abkürzungsübersicht Abbildung 3.1	123

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Ala (A)	Alanin
ARMAN	archaeal R ichmond M ine a cidophilic n anoorganisms
Asp (D)	Aspartat
bzw.	beziehungsweise
¹³C	Kohlenstoff (markiert)
Cys (C)	Cystein
engl.:	englisch
et al.	(lat.: et alii, aliae, alium) = und andere
FKBP	FK 506 (Tacrolimus) B inde p roteine
FPLC	(engl.: f ast p rotein l iquid c hromatography) Flüssigphasenchromatographie
H₁	h elix 1, erste Helix des N-Terminus
¹H	Wasserstoff
His (H)	Histidin
hPar	h uman P arvulin (<i>Homo sapiens</i>)
HSP	(engl.: h eat s hock p rotein) = Hitzeschockprotein
kb/kB	k ilobases / k ilo- B asen
kDa	k ilo- D alton
kühlb.	kühlbar
lat.:	lateinisch
6M	6 molar (Mol/Liter)
m	Mol
¹⁵N	Stickstoff (markiert)
PCR	(engl.: p olymerase c hain r eaction) = Polymerasekettenreaktion
pdb-ID	Identifikationsnummer der P rotein D aten b ank
PDI	P rotein- D isulfid- I somerasen
PEG	P oly e thylenglykol
PPIase	P eptidyl- P rolyl-cis/trans- I somerase
Pro (P)	Prolin
RNA	(engl.: r ibonucleic a cid) = Ribonukleinsäure
16S	16 Svedberg; Maß der Sedimentationsgeschwindigkeit
s	Sekunde
S₁	s heet 1, erstes Faltblatt des N-Terminus
S	Schwefel
Ser (S)	Serin
ssu-rRNA	s mall s ubunit r ibosomal R NA Ribonukleinanteil der kleinen Ribosomenuntereinheit
TACK	T haumarchaeota, A igarchaeota, K orarchaeota, C renarchaeota
temp.	temperierbar
Thr (T)	Threonin
X_{aa}	a mino a cid (Aminosäure) X
ECL	e nhanced c hemiluminescence
mM	milli-molar (milli-Mol pro Liter)

1 Einleitung

Betrachtet man die belebte, organische Welt, so ergeben sich einige quasi universelle Gesetzmäßigkeiten. Die bekannteste unter ihnen ist wohl die Tatsache, dass Information in Form einer Triplett-Sequenz von vier verschiedenen Basen gespeichert und codiert wird: Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin (Watson und Crick 1953; Gamow und Ycas 1955). Die eindimensionale Abfolge dieser vier Basen enthält die Information für die darauf basierende, ebenfalls eindimensionale Abfolge der Aminosäuren. Eine weitere dieser universellen Gesetzmäßigkeiten stellt die Beobachtung dar, dass, nach dem Wechsel der Trägersubstanz von Nuklein- zu Aminosäuren, die Übersetzung dieser Information in eine Funktion durch die Addition der zweiten bzw. dritten Dimension erfolgt und nicht etwa durch chemische Modifikation. Diese Erkenntnis, welche zuerst von Hsien Wu (John T. Edsall 1955) gedacht und später von Pauling und Mirsky (Mirsky und Pauling 1936) publiziert wurde, war die Geburtsstunde der strukturellen Biochemie. Für viele kleine Proteine, wie zum Beispiel die Ribonuclease (Anfinsen 1973) sowie für katalytisch aktive RNA (Ribozyme), wie sie von Cech (Kelly Kruger *et al.* 1982) und Altman (Sidney Altman *et al.* 1986) in den 1980ern entdeckt wurde, reicht allein die sequenzielle Information zur Erlangung der korrekten dreidimensionalen Struktur aus (Anfinsens Dogma). Betrachtet man jedoch größere Proteine, fällt die Aussage des Levinthal'schen Paradoxons (Levinthal 1969), dass eine Faltung durch reines Ausprobieren der verschiedenen Konformationen auf Grund der riesigen Anzahl an Freiheitsgraden innerhalb eines Proteinmoleküls unrealistisch lange dauern würde, ins Gewicht. Um dieses Paradoxon aufzulösen verwendet die Zelle unter anderem sogenannte Chaperone (engl: Anstandsdame) (Laskey *et al.* 1978), welche die korrekte Faltung von Proteinen überwachen (Ellis 1987). Zusammen mit den *heat shock proteins* (HSP, Hitzeschockproteine) und den Lectin-Chaperonen bilden die Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI) und die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen (PPIasen), welche im Zentrum dieser Arbeit stehen, den größten Teil der molekularen Chaperone.

1.1 Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen (PPIasen)

Da, auf Grund sterischer Probleme, der trans-Zustand in prolinlosen Bindungen energetisch stark bevorzugt ist (Jorgensen und Gao 1988), sind erwartungsgemäß cis-Konformere dieser Bindungen extrem selten zu finden (Stewart *et al.* 1990). Wie in Abbildung 1.1 zu erkennen, sind die sterischen Verhältnisse in X_{aa}-Pro-Bindungen völlig anders. Die freien Energien der beiden Isomere unterscheiden sich nur geringfügig (Mücke und Schmid 1992). Dennoch befinden sich etwa neun von zehn Peptidyl-Prolyl-Bindungen in Oligopeptiden im trans-Zustand (Grathwohl und Wüthrich 1976). Während die meisten Faltungsprozesse im Millisekunden- bis

Sekundenbereich ablaufen (Göthel und Marahiel 1999), weist die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerisierung, auf Grund des partiellen Doppelbindungscharakters der C-N-Bindung, eine weitaus trägere Reaktivität von Minuten bis sogar Stunden auf. Wegen dieser Trägheit sind die cis/trans-Isomerisierungen von Peptidyl-Prolyl-Bindungen in Renaturierungsversuchen mit Prolin-enthaltenden Proteinen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Lang *et al.*; Kiefhaber *et al.* 1990) und können daher auch als Taktgeberreaktionen in Faltungsprozessen bezeichnet werden.

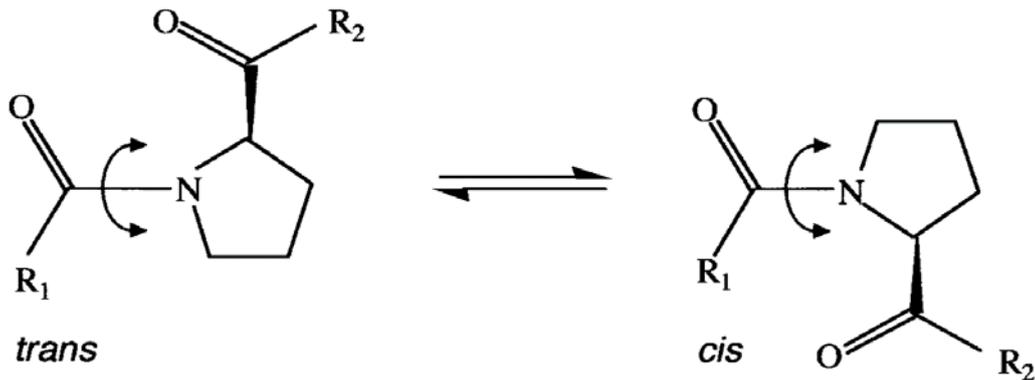


Abbildung 1.1: Prolyl-Isomerisierung

Schematische Darstellung der Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerisierung. R1 und R2 bezeichnen die fortlaufende Aminosäurekette (Göthel und Marahiel 1999).

1984 zeigte die Arbeitsgruppe Fischer, dass ein aus Schweinenieren angereichertes Protein die cis/trans-Isomerisierung in prolinhaltigen Peptiden katalysiert (Fischer *et al.* 1984). Wenig später beschrieb dieselbe Gruppe, dass dieses Enzym die Rückfaltung denaturierter Ribonuclease beschleunigt (Fischer und Bang 1985). Wie sich 1989 herausstellte, waren die fünf Jahre früher entdeckten Rezeptorproteine für das Immunsuppressivum Cyclosporin A (Handschumacher *et al.* 1984) und die von Fischer entdeckten Peptidyl-Prolyl-Cis/trans-Isomerasen Teil derselben Proteinfamilie (Fischer *et al.* 1989; Takahashi *et al.* 1989), den Cyclophilinen.

Die Suche nach dem Rezeptormolekül eines weiteren immunsupprimierenden Medikaments, des Polyketids FK506, führte ebenfalls 1989 zur Identifizierung der zweiten Klasse von PPIasen, den FK506 *binding proteins* (FKBPs; FK506-Bindeproteine) (Siekierka *et al.* 1989; Harding *et al.* 1989). Da sowohl Cyclophiline als auch FKBP Immunsuppressiva binden und zudem die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerisierung als katalytischen Mechanismus gemeinsam haben, wurden sie 1991 erstmals zusammengefasst und bilden seitdem die Immunophilinen (Schreiber 1991). Es existieren zahlreiche Cyclophilinen in beinahe allen Organismen und Geweben. Sie unterscheiden sich vor allem in ihrer Affinität für Cyclosporin A (Liu *et al.* 1991). Dessen Bindung sorgt in den Rezeptorproteinen für eine deutliche Veränderung der dreidimensionalen Struktur (Spitzfaden *et al.* 1992), welche über alle Organismen stark konserviert ist (Clubb *et al.* 1993). Wie in

Abbildung 1.2 (rechts) zu erkennen, beinhalten die Cyclophiline ein β -barrel (engl.: Fass) bestehend aus acht β -Faltblättern, die über *loop*-Regionen und drei α -Helices verbunden sind (Ke 1992).

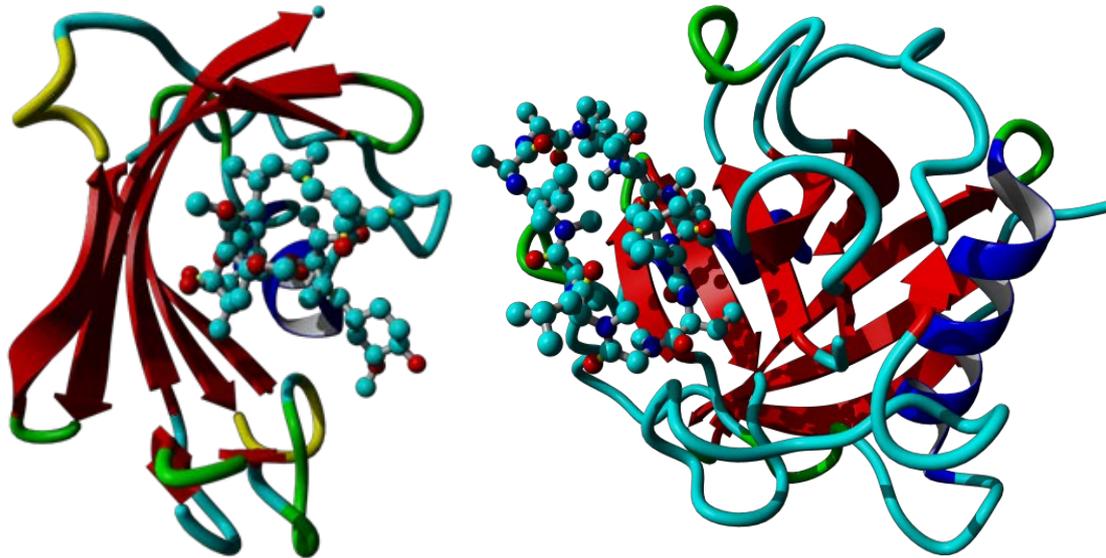


Abbildung 1.2: Immunophilinstrukturen mit gebundenen Liganden

Der **linke** Teil der Abbildung zeigt das humane, cytosolische FKBP12 in *ribbon*-Darstellung. Der Ligand Tacrolimus (FK506) ist in *ball and stick*-Darstellung zu sehen. Abgebildet ist die Kristallstruktur 1fkj (Wilson *et al.* 1995). Der **rechte** Teil der Abbildung zeigt die Kristallstruktur des humanen Cyclophilin A gebunden an seinen Inhibitor Cyclosporin A (pdb-ID: 1cwa; Mikol *et al.* 1996).

Die FKBP sind ebenfalls beinahe ubiquitär in der belebten Welt vorhanden (Kay 1996). Bei der Bindung seines Inhibitors verändert sich (wie auch bei den Cyclophilinen) die räumliche Struktur des aktiven Zentrums sehr stark, wie strukturelle Studien mit freien (Michnick *et al.* 1991) und gebundenem (van Duyne *et al.* 1991) FKBP zeigen. Abbildung 1.2 (links) zeigt die typische FKBP-Struktur mit gebundenem Tacrolimus. Zu sehen ist das große antiparallele Faltblatt, welches aus fünf Strängen besteht und große Teile des aktiven Zentrums bildet (Moore *et al.* 1991). Dieses große Faltblatt trägt zum großen Teil zu der strukturellen, nicht aber sequenziellen Ähnlichkeit bei, welche die FKBP mit der dritten Familie von Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen verbindet (Sekerina *et al.* 2000).

1994 wurde diese Familie durch zwei Veröffentlichungen von Rahfeld *et al.* (Rahfeld *et al.* 1994a, 1994b) bekannt, in denen die Entdeckung und Isolation einer 10,1 kDa kleinen PPIase aus *Escherichia coli* beschrieben wurde, die nicht zu den Immunophilinen gezählt werden konnte, da sie kein Immunsuppressivum bindet. Benannt wurden diese Isomerasen nach ihrem geringen Molekulargewicht, welches die zuerst entdeckten Vertreter aufwiesen – Parvulin (lat.: *parvus* = klein, winzig).

1.2 Nomenklatur der Parvuline

Über die Jahre haben sich verschiedene Begrifflichkeiten für dieselben Sachverhalte entwickelt und eingeschliffen, je nachdem aus welcher Quelle zitiert wird. Tabelle 1.1 weist auf einige für diese Arbeit wichtige Benennungsprobleme hin. Als Beispiel sei PPIID genannt, was sowohl für das periplasmatische Protein aus *E.coli*, sowie für das humane Cyclophilin-Gen stehen kann. Eine PPIIC-Typ-PPIase könnte nur der Benennung nach humanem Cyclophilin C, aber auch Par10 aus *E.coli* ähneln.

Tabelle 1.1: Begriffsklärung Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen

Bezeichnung	ppiC-Typ (Rotamase A, Parvulin- <i>fold</i>); ppiB-Typ (Cyclophilin- <i>fold</i>)	PPIA, PPIB, PPIIC, PPIID, PPIIE, PPIF, PPIG, PPIH	PpiD
Bedeutung	Unterscheidung der strukturellen Eigenschaften der PPIasen-Familien	Benennung der Genloci humaner Cyclophiline	Proteinprodukt des <i>E.coli</i> -Gens <i>ppiD</i> .
Herkunft	<i>Conserved Domain Database</i> (CDD)	HUGO <i>Gene Nomenclature Comitee</i> (HGNC)	Benennung nach zeitlicher Entdeckung; Par10 = <i>ppiC</i>

Da sich diese Arbeit hauptsächlich mit Parvulinen beschäftigt, wird im Text eine Ergänzung stehen, sollte nicht das Parvulin gemeint sein. Findet sich kein erläuternder Vermerk, so bezieht sich der verwendete Name auf das entsprechende Parvulin.

1.3 Parvuline

Nach der ersten Beschreibung dieser neuen Familie von Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen stellte sich schnell heraus, dass es Sequenzhomologe in nahezu allen Organismen gibt: von den prokaryotischen Vertretern, wie PrsA aus *Bacillus subtilis* (Jacobs *et al.* 1993) oder SurA aus *Escherichia coli* (Eisenstark *et al.* 1992), über denen aus Pilzen (Ess1 aus *Saccharomyces cerevisiae*; Hani *et al.* 1999) und Fruchtfliegen (Produkt des *dodo*-Gens aus *Drosophila melanogaster* Maleszka *et al.* 1996), bis hin zum wohl bekanntesten Vertreter der Parvuline, dem humanen Mitoseregulator Pin1 (Lu *et al.* 1996).

1.3.1 Prokaryotische Parvuline

Par10 aus *Escherichia coli* kann als Prototyp für die Parvuline verstanden werden. Strukturell weist das Protein die typische $\beta_3\alpha\beta_2\beta$ -Parvulinfaltung (Kühlewein *et al.* 2004) auf, obwohl es nur aus einer einzelnen Domäne besteht. Par10 isomerisiert Prolylbindungen in Tetrapeptiden effizienter (k_{cat}/K_m : $1.1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) als solche in ganzen Proteinen wie Ribonuklease (k_{cat}/K_m : $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), was den Schluss nahe legt, dass die zusätzlichen Domänen in anderen Parvulinen dazu dienen, die Interaktion mit Zielproteinen zu erleichtern (Scholz *et al.* 1997). Eines dieser Zielproteine könnte im Fall von Par10 die Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase sein, die sich mit der Isomerase einige Interaktionsflächen teilt (Malešević *et al.* 2010).

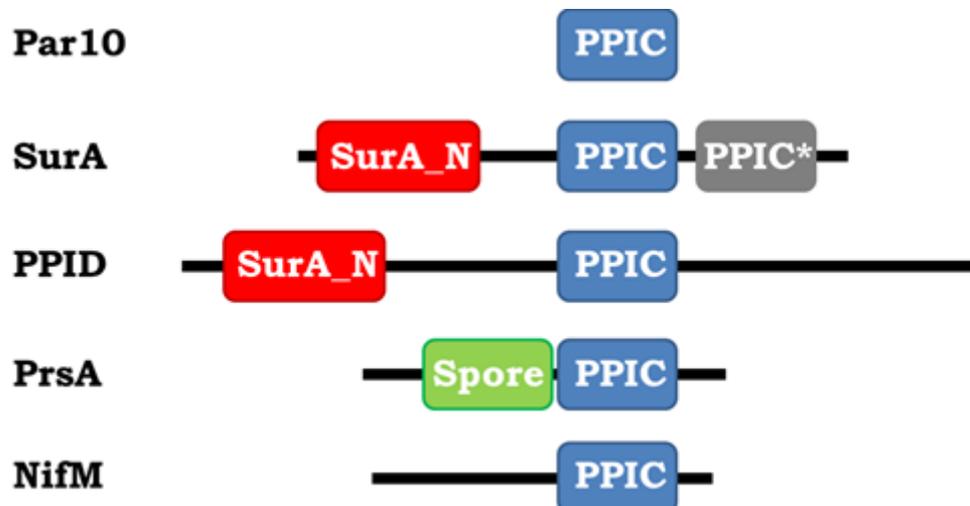


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Parvuline aus Bakterien

Die hier abgebildeten Proteine Par10, SurA und PPID sind aus *E. coli* abgeleitet. PrsA stammt aus *Bacillus subtilis*, NifM aus *Klebsiella pneumoniae*. Während Par10 nur aus der 10 kDa großen Isomerase-Domäne (**PPIC**) besteht, tragen die periplasmatischen Foldasen SurA und PPID je eine N-terminale SurA_N_3-Domäne (**SurA_N**). SurA besitzt als einziges Protein zwei Parvulin-Domänen, wobei die N-terminale Domäne nur strukturgebend ist und auch die C-terminale Domäne (**PPIC***) nicht in der Lage ist, Prolylbindungen zu isomerisieren. PrsA, welches in Firmicuten sehr verbreitet ist, trägt eine der Isomerase vorgelagerte spore_III_AE-Domäne (**Spore**). NifM, das an der Stickstofffixierung Teil hat, trägt ebenfalls eine C-terminale Isomerase-Domäne. Diese und die folgenden artgleichen Abbildungen wurden mit Hilfe der CD (*conserved domain*)-Datenbank angefertigt (Marchler-Bauer *et al.* 2011).

SurA (engl.: survive = überleben) trägt seinen Namen auf Grund seiner Erstbeschreibung als Protein, das für das Überleben des Bakteriums in der stationären Phase unabkömmlich ist (Tormo *et al.* 1990). Es ist ein Protein, das im periplasmatischen Spalt, also im Lumen zwischen äußerer und innerer Membran Gram-negativer Bakterien, für die richtige Faltung dort vorhandener Proteine (Lazar und Kolter 1996), vor allem Porine (Rouvière und Gross 1996), sorgt. Versuche mit Bakterien, die kein SurA exprimieren, ergaben, dass sich solche Bakterien permanent der durch σ^E ausgelösten extracytoplasmatischen Stressantwort ausgesetzt sehen (Missiakas *et al.* 1996). Für die Foldaseaktivität von SurA sind die beiden Tandem-artig angeordneten Parvulin-Domänen (Abbildung 1.3) nicht von Nöten, wie sich bei Experimenten gezeigt hat, bei denen der C-terminale Schwanz direkt an die SurA_N_3-Domäne fusioniert wurde (Behrens *et al.* 2001). Diese SurA_N_3-Domäne bindet eine Reihe prolinloser Peptide und scheint somit für die Proteininteraktion zuständig zu sein (Webb *et al.* 2001). Neben der Faltung von periplasmatischen Proteinen, ist SurA auch an der Pilusbildung (Justice *et al.* 2005) beteiligt und spielt dadurch eine Rolle bei der Ausbildung intrazellulärer, biotischer Gemeinschaften uropathogener *Escherichia coli* (Justice *et al.* 2006). Die Kristallstruktur von SurA (Bitto und McKay 2002) verdeutlicht, dass es sich bei SurA um ein zweiteiliges Enzym handelt: auf der einen Seite der für die Foldaseaktivität notwendige Kernkomplex, bestehend aus der N-terminalen Domäne und der N-terminal gelegenen Isomerase-Domäne, auf der anderen Seite die zweite, katalytisch inaktive, Parvulin-Domäne, welche peripher am Kernkomplex anhängt und für die Funktionalität des Proteins nicht maßgeblich ist (Bitto und McKay 2003). In den letzten Jahren wurden auch SurA-Homologe in weiteren Bakterien, wie *Salmonella* (Fardini *et al.* 2009) und *Neisseria* (Volokhina *et al.* 2011) untersucht. Dabei zeigten sich Unterschiede bei Kompensationsexperimenten, aber auch Übereinstimmungen wie zum Beispiel die Beteiligung an Stressantwort bei *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (Kenyon *et al.* 2010).

Genau wie SurA ist PpiD in das Netzwerk periplasmatischer Foldasen eingewoben (Matern *et al.* 2010). Das Protein wurde 1998 zuerst beschrieben und ist die einzige periplasmatische Foldase, die unter dem Einfluss von σ^{32} , dem Transkriptionsfaktor der cytoplasmatischen Hitzeschockreaktion, steht (Dartigalongue und Raina 1998). Der N-Terminus dieses 623 Aminosäuren großen Proteins ist in der inneren Membran verankert und ähnelt der SurA_N_3-Domäne von SurA, was zu einer überlappenden Substratspezifität zwischen PpiD und SurA führt (Stymest und Klappa 2008). Es wurden Interaktionen zwischen dem SecYEG-Translocon, welches in *E. coli* für den Transport sekretorischer Proteine aus dem Bakterium zuständig ist, und PPIID beschrieben (Antonova *et al.* 2008). Zwar trägt PpiD eine zentral im Protein gelegene PPIC-Typ-PPIase (Abbildung 1.3), die der üblichen Parvulinfaltung entspricht, jedoch

erwies sich diese Parvulindomäne *in vitro* als katalytisch inaktiv (Weininger *et al.* 2009).

Bereits 1991 wurde PrsA aus *Bacillus subtilis* als Protein des „späten Proteinexports“ identifiziert (Kontinen *et al.* 1991). Noch bevor es 1994 den Parvulinen zugerechnet wurde (Rahfeld *et al.* 1994a), war klar, dass es einen Anteil an der Faltung sekretierter Proteine trägt (Jacobs *et al.* 1993). PrsA ist ein Lipoprotein, dessen N-terminales Cystein mit einem Diacylglycerol verbunden ist, der das Protein in der Membran verankert. Die Bedeutung von PrsA für die korrekte Faltung extracytoplasmatischer Proteine wurde über das Modell α -Amylase (AmyQ) untersucht, welches sich in einer PrsA-defekten Zelllinie außerhalb des Bakteriums in missgefalteter Form anreichert (Hyryläinen *et al.* 2001). Diese Beobachtung legt nahe, dass PrsA zwar als Chaperon außerhalb der Membran dient, jedoch nicht für den Transport zuständig ist. Untersuchungen mit einer Reihe von mutierten PrsA-Proteinen zeigten, dass die Parvulindomäne zwar eine schwache katalytische Kraft besitzt, diese Isomerisierungsfähigkeit aber keinen Einfluss auf die Proteinfunktionalität hat (Vitikainen 2004). Das PrsA-Homolog PmpA aus *Lactococcus lactis* ist dem PrsA funktionell sehr ähnlich, besitzt jedoch keine PPIase-Domäne (Drouault *et al.* 2002). Bisher wurde die Struktur der Parvulindomäne von PrsA aus zwei Gram-positiven Bakterien gelöst. Diese sind nahezu identisch und unterscheiden sich nur in der Länge des S₁-H₁-loops, der in *Bacillus subtilis* (Tossavainen *et al.* 2006) sehr kurz, in *Staphylococcus aureus* (Heikkinen *et al.* 2009) lang und lysinreich ist.

NifM wurde bereits 1977 als Teil des großen Nitrogenase-Clusters beschrieben (Dixon *et al.* 1977; Merrick *et al.* 1978). 1986 stellte sich heraus, dass NifM verantwortlich dafür ist, eine aktive Form des Proteins NifH herzustellen. NifH wiederum ist das eisenhaltige Protein des Nitrogenasekomplexes von *Klebsiella pneumoniae* (Howard *et al.* 1986). Als Rahfeld *et al.* 1994 die Parvuline als dritte PPIase-Familie postulierten, waren die meisten NifM betreffenden Fragen bereits beantwortet. Die Zusammenarbeit zwischen NifH und NifM wurde im Jahr 2000 noch einmal durch ein *Yeast Two-Hybrid* System bestärkt (Petrova *et al.* 2000). Die Parvulindomäne von NifM wurde nie strukturell aufgeklärt, auch Aktivitätstests wurden nie durchgeführt. Jedoch scheint die Isomerisierungsaktivität als Vermittler der Stabilität und Aktivität von NifH als gegeben hingenommen zu werden. Diese Vermutung liegt nahe, da 2006 der Nachweis einer Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase-unabhängigen Mutante von NifH aus *Azotobacter vinelandii* eine Veröffentlichung wert war (Gavini *et al.* 2006).

Es soll hier noch erwähnt werden, dass die oben aufgezählten bakteriellen Parvuline keinesfalls die Einzigen sind. Gerade in den letzten Jahren wurden atypische Parvuline, durch die Untersuchung hypothetischer Proteine aus Organismen, welche nicht als Modellorganismus angesehen werden, bekannt. Ein Beispiel dafür ist Par27 aus *Bordetella pertussis* (Hodak *et al.* 2008), das als Dimer (Clantin *et al.* 2010) im Periplasma seines Wirts vorkommt. Im Periplasma Gram-negativer Bakterien sind

auch die SurA-ähnlichen LIC12922 aus dem Spirochaeten *Leptospira interrogans* (Giuseppe *et al.* 2011) sowie PEB4 und Cj1289 aus *Campylobacter jejuni*, unter denen zumindest PEB4 ein Dimer bildet (Kale *et al.* 2011), zu finden.

1.3.2 Humane Parvuline

Die mit großem Abstand bestuntersuchte PPIase ist das humane Pin1 (**Protein interacting with NIMA**). Es erhielt seinen Namen, da es bei seiner Entdeckung als Interaktionspartner der *Aspergillus*-Kinase NIMA (*never in mitosis A*), welche für die Einleitung und Durchführung der Mitose notwendig ist (Osmani *et al.* 1988), beschrieben wurde (Ping Lu *et al.* 1996).



Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der humanen Parvuline

Pin1 besteht aus seiner typischen Parvulindomäne mit dem ausgeprägten S₁-H₁-loop (**PPIC**) und der N-terminalen WW-Domäne (**WW**). Par14 besitzt in seiner Parvulindomäne einen fünf Aminosäuren großen Einschub in den H₄-S₃-Loop und eine basische Domäne am N-Terminus (+). Par17 ist auf demselben Gen codiert wie Par14 und enthält auf Grund alternativer Translationsinitiation ein zusätzliches N-terminales Zielpeptid für die Mitochondrien (**MT**).

Die Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten, welchen ein Prolin folgt, ist ein molekularer Schalter, der regulativ auf zelluläre Schlüsselmechanismen wirkt (Yaffe *et al.* 1997) oder dessen Fehlfunktion für viele pathologische Bilder, wie Alterung, *Morbus Alzheimer* und Krebs (Lee *et al.* 2011) sorgt. Die Beobachtung, dass Pin1-*knockout*-Mäuse neben verringerter Körpermasse und degenerierter Hoden (Liou *et al.* 2002) auch einen beschleunigten Abbau der Telomere aufweisen (Lee *et al.* 2009), legt einen Zusammenhang zwischen Pin1 und den Prozessen der Alterung nahe. Experimente, die eine Bindung von Pin1 an die phosphorylierte Form des Transkriptionsfaktors FOXO4 aufzeigen (Brenkman *et al.* 2008), untermauern diese These, da FOXO4 zuständig für die Kontrolle von mitochondrialem und oxidativem Stress ist (Greer und Brunet 2008). Da *Morbus Alzheimer* eine typische altersabhängige neurodegenerative Krankheit ist, liegt es sehr nahe, dass der Zusammenhang zwischen diesem Krankheitsbild und der Pin1-Funktion ausgiebig untersucht wurde. Eines der Schlüsselproteine im Zusammenhang mit *Morbus Alzheimer* ist der Microtubuliregulator Tau (Buée *et al.* 2000). Dieser verlässt in seiner hyperphosphorylierten Form die Mikrotubuli und wird so zum Pathogen (Iqbal *et al.* 2009). Pin1 reguliert den Phosphorylierungsgrad von Tau und wirkt so der Ausbildung

von Alzheimer entgegen (Liou *et al.* 2003). Neben dieser Wirkung auf Tau hat Pin1 auch Einfluss auf die Prozessierung von APP (*amyloid precursor protein*) und damit auf die Produktion von Amyloid β , welches wiederum den Kern der krankheitsauslösenden Plaques bildet (Pastorino *et al.* 2006). Zuletzt lässt der Fakt, dass das Level funktionsfähiger Pin1-Moleküle durch Oxidation enorm reduziert wird, eine Rolle in altersabhängigen Krankheitsbildern fast zwingend erscheinen (Sultana *et al.* 2006). *Morbus* Alzheimer ist nicht die einzige neurodegenerative Erkrankung, welche mit Pin1 in Verbindung gebracht wird. Untersuchte Gehirnproben von *Morbus* Parkinson-Patienten wiesen *Lewy bodies*, die für die Krankheit typischen cytoplasmatischen Einschlüsse (Lotharius und Brundin 2002), auf, die zu 50 %-60 % mit Pin1 colokalisiert sind. Dieselbe Studie zeigte, dass Pin1 die α -Synuclein-Halbwertszeit signifikant erhöht (Ryo 2006). α -Synuclein ist einer der Hauptbestandteile der *Lewy bodies* (Spillantini *et al.* 1997). Mit zunehmendem Alter treten nicht nur vermehrt neurodegenerative Krankheiten auf, sondern auch die Wahrscheinlichkeit einer Krebserkrankung steigt. Pin1 ist auch in der Tumorentstehung ein wichtiger Baustein. Ein Beispiel ist die Bindung von Pin1 an die phosphorylierte Form von p53 (Wulf *et al.* 2002). Dieser Vermittler genomischer Stabilität, dessen Integrität in 50 % aller Krebsarten gestört ist (Lutzker und Levine 1996), wird durch diese Bindung stabilisiert. Des Weiteren ist Pin1 in viele onkogenetische Signalwege verwickelt, zum Beispiel in den Jun/Fos-Signalweg (Wulf *et al.* 2001), den β -Catenin-Signalweg (Ryo *et al.* 2001) und den $\text{nf-}\kappa\text{B}$ -Signalweg (Ryo *et al.* 2003). Zudem ist Pin1 in vielen Tumortypen, wie zum Beispiel Brustkrebs (Bao *et al.* 2004) und Prostatakrebs (Sasaki *et al.* 2006) vermehrt zu finden.

1997 wurde die Struktur von hPin1 mittels Röntgenkristallographie aufgeklärt (Ranganathan 1997). Das Protein wurde mit einem Ala-Pro-Dipeptid und PEG400 kokristallisiert; während das Dipeptid erwartungsgemäß im aktiven Zentrum der Parvulindomäne zu sehen ist, wirkt PEG400 als Bindeglied zwischen WW-Domäne und Parvulindomäne (Abbildung 1.4). Die Magnetresonanzspektroskopie (NMR)-Struktur von 2003 (Bayer *et al.* 2003) zeigte, dass die Substraterkennung in Pin1 keine starre Begebenheit ist, wie der Kristall zunächst suggerierte. In dieser NMR-Struktur ist die WW-Domäne durch einen flexiblen Linker von der PPIC-Domäne getrennt. Die NMR-Struktur zeigt auch den besonders ausgeprägten, für Pin1 typischen $\text{S}_1\text{-H}_1\text{-loop}$ als sehr flexibel an.

Anders als Pin1 ist die zweite Parvulinfamilie der Mehrzeller nicht abhängig von phosphorylierten Erkennungssequenzen (Fanghänel und Fischer 2004). Sie wurde 1999 in zwei Veröffentlichungen beschrieben, einmal unter dem Namen EHPV (*eucaryotic homologue of parvulins*) (Rulten *et al.* 1999) und zum zweiten unter dem Namen, der sich am Ende durchsetzen sollte, hPar14 (Uchida *et al.* 1999). Wie die beiden NMR-Strukturen zeigen, besitzt Par14 einen unstrukturierten positiv geladenen N-Terminus (Abbildung 1.4) (Sekerina *et al.* 2000; Terada *et al.* 2001).

Dieser N-Terminus ist notwendig für die DNA-Bindung (Surmacz *et al.* 2002) und Kernlokalisation (Reimer *et al.* 2003). Kompensationsexperimente zeigten, dass Par14 Pin1 teilweise (Uchida *et al.* 2003), aber nicht vollständig (Metzner *et al.* 2001) ersetzen kann. Typisch für die Proteine dieser Klasse ist ein fünf Aminosäuren großer Einschub in den H₄-S₃-loop. Funktionell ist Par14 wenig erschlossen. Es gibt Hinweise dafür, dass Par14 an präribosomale Ribonucleoprotein-Komplexe bindet (Fujiyama *et al.* 2002) und als rRNA prozessierender Faktor eine Rolle spielt (Fujiyama-Nakamura *et al.* 2009). 2006 beschrieben Mueller *et al.* ein durch alternative Translationsinitiation N-terminal verlängertes Par14, Par17 (Mueller *et al.* 2006). Dieses Protein, welches nur in Hominiden auftritt, trägt ein N-terminales α -helikales Mitochondrienlokalisations-Signal (Abbildung 1.4) und ist entsprechend dort lokalisiert (Kessler *et al.* 2007). Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie hält Par17 für einen Promotor der Microtubulibildung (Thiele *et al.* 2011).

Pin1 und Par14/Par17 sind die einzigen humanen Parvuline. Dies gilt jedoch nicht für alle Metazoen, wie die Entdeckung eines 45 kDa großen Parvulins in *Drosophila melanogaster* (Pemberton und Kay 2005) zeigt. Ein diesem Protein ähnliches Parvulin beherbergt auch der einzellige Parasit *Trypanosoma brucei* (Erben *et al.* 2010).

1.3.3 Parvuline in Pflanzen

Als erstes pflanzliches Parvulin wurde im Jahr 2000 das AtPin1 aus *Arabidopsis thaliana* beschrieben. Zum einen hat das Protein das vollständige Fehlen von N- und C-terminalen Domänen mit dem bakteriellen Par10 gemeinsam, zum anderen ist der S₁-H₁-loop noch ausgeprägter (Abbildung 1.5) als bei Pin1, ähnelt dem humanen Homologen jedoch merklich. Ebenso wie hPin1 ist die katalytische Aktivität abhängig von der Phosphorylierung der prolinvorgesetzten Aminosäure (Landrieu 2000).

Neben AtPin1 sind phosphorylierungsabhängige Parvuline aus vielen Organismen, wie zum Beispiel in *Malus domestica* (Yao *et al.* 2001) und *Digitalis lanata*, dessen Pin1 in der Lage ist sein Hefehomologes Ess1 zu substituieren (Metzner *et al.* 2001), isoliert und untersucht worden. Die erste Struktur eines pflanzlichen Parvulins wurde 2002 veröffentlicht (Landrieu *et al.* 2002). Neben dem zu erwartenden parvulintypischen β 3 α β 2 β -Faltungsmuster und einer negativ geladenen Interaktionsfläche, die mit der Kontaktfläche des humanen Pin1 mit seiner, in AtPin1 fehlenden, WW-Domäne korreliert, zeigt sich, dass die pflanzlichen Pin1-Proteine einen vier Aminosäuren großen Einschub in ihren S₁-H₁-loop tragen. He *et al.* zeigten 2004 auf, dass das Genom von *A. thaliana* noch die Information für zwei weitere Parvuline beinhaltet (He 2004). AtPin2 trägt eine einfache, Par10 ähnliche PPIC-Domäne, die von einer N-terminalen lysinreichen Domäne komplettiert wird. AtPin3 ist ein ungewöhnliches Parvulin. Es besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid, welches für die Chloroplastenlokalisation zuständig ist (CT in Abbildung 1.5), einer zentralen Parvulindomäne und einer C-terminalen Rhodanasedomäne (eine Sulfotransferase, CLEMEDSON *et al.* 1954). Homologe zu jeder der drei Parvuline aus *Arabidopsis*

thaliana wurden auch in *Lotus japonicus* gefunden (Kouri *et al.* 2009). Auch einzellige Algen wie *Chlamydomonas* exprimieren Parvuline. Im Fall von *C. reinhardtii* wurde neben dem Pin1 homologen CrPin3 auch CrPin4 beschrieben (Vallon 2005), welches eine für die DNA-Bindung zuständige FHA (*forkhead*)-Domäne am N-Terminus besitzt (Weigel und Jäckle 1990).



Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der pflanzlichen Parvuline

AtPin1, aus *Arabidopsis thaliana*, ist das homologe Protein zum humanen Pin1. Es besitzt einen um vier Aminosäuren längeren S₁-H₁-loop. AtPin2 besitzt diesen loop nicht, jedoch eine N-terminale lysinreiche Domäne (**K**). AtPin3 besitzt eine Chloroplastenerkennungssequenz am N-Terminus (**CT chloroplast targeting**), eine zentrale PPIase-Domäne und eine C-terminale Rhodanase-Domäne (**Rhod.**). CrPin4, aus *Chlamydomonas reinhardtii*, trägt eine N-terminale **FHA (forkhead)**-Domäne, was auf DNA-Bindung hinweist. Natürlich besitzen alle pflanzlichen Parvuline eine entsprechende Domäne (**PPIC**).

1.3.4 Parvuline in Pilzen

Das erste Parvulin, welches in einem eukaryotischen Organismus beschrieben wurde, war Ess1 (zu der Zeit noch Ptf1) aus *Saccharomyces cerevisiae*. Es wurde als essentiell für das Wachstum der Hefe beschrieben (Hani *et al.* 1995). Orthologische Untersuchungen von 16 Pilzorganismen aus vier Ordnungen ergaben, dass alle untersuchten Pilze ein Ess1-Homolog tragen. Diese Pin-Proteine sind zwischen 17,2 kDa und 24,4 kDa groß und bis auf das kleinste aus *Encephalitozoon cuniculi* beherbergen alle eine WW-Domäne am N-Terminus (Abbildung 1.6). Zusätzlich zu diesem Pin-Protein besitzen die echten Schlauchpilze, die *Pezizomycotina*, auch ein Parvulin, welches in Größe und Sequenz dem humanen Par14 ähnlich ist. Diese Proteine sind mit 13,7 kDa bis 14,3 kDa in ihrer Größe stark konserviert. Eines dieser Proteine, das von *Gibberella zeae*, trägt bereits eine erkennbare basische Domäne, wie sie auch in humanen Par14 zu finden ist. Den drei anderen untersuchten *Pezizomycotina*-Parvulinen fehlt diese positiv geladene N-terminale Region (Pemberton 2006). Auf Grund fehlender Daten bleibt zu den Par14-Homologen innerhalb der Pilze nur zu sagen, dass der Übergang von einzelligen (*Protozoa*) zu mehrzelligen (*Metazoa*) Pilzen mit der Entwicklung dieses Proteins zusammenfällt (Mueller und Bayer 2008).



Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Parvuline aus Pilzen

Die Pilze besitzen zwei Arten von PPIasen: Die Pin1-ähnlichen, wie Ess1 aus *Saccharomyces cerevisiae*, tragen neben der typischen Pin1-Parvulindomäne (**PPIC**) mit ihrem ausgeprägten S₁-H₁-loop, eine WW-Domäne (**WW**). In einigen Pilzhomologen von Ess1 ist die WW-Domäne nicht vollständig ausgeprägt, wie in *Encephalitozoon cuniculi*. Innerhalb der *Pezizomycotina* (echte Schlauchpilze) ist auch ein Homolog zum humanen Par14 zu finden. Auch hier ist die positiv geladene N-terminale Domäne (+) teils vorhanden, wie in *Gibberella zeae*, teils auch nicht, wie in *Aspergillus nidulans* (Pemberton 2006).

Untersuchungen an den Ess1-Homologen in verschiedenen Pilzen ergaben unterschiedliche Funktionen. Während Ess1 aus *S. cerevisiae* in die Transkriptionselongation involviert ist (Wu *et al.* 2000), indem es mit dem C-Terminus der RNA-Polymerase II interagiert (Wilcox *et al.* 2004), reguliert das Pin aus *Schizosaccharomyces pombe* Proteine des Zellzyklus (Huang *et al.* 2001). Die humanpathogene Hefe *Cryptococcus neoformans* wiederum benötigt ihr Ess1 als Virulenzfaktor, obwohl das Parvulin nicht essentiell für ihr Wachstum ist (Ren *et al.* 2005). Das neben dem Ess1 von *S. cerevisiae* bestuntersuchte Parvulin in Pilzen ist das Ess1 aus *Candida albicans*, welches in den morphogenetischen Wechsel zwischen hyphalen und pseudohyphalen Wachstum des Pilzes involviert ist (Devasahayam *et al.* 2002). Die Kristallstruktur von CaEss1 zeigt, worin die Unterschiede der Pin1-Homologen innerhalb der Pilze liegen. Anders als Pin1 besitzt dieses Ess1 einen α -helikalen *linker*, der die beiden Domänen des Proteins starr fixiert (Li *et al.* 2005). Die domänenverbindende Region des Ess1-Moleküls aus *Neurospora crassa* dagegen beinhaltet einen poly-Glutamin-Abschnitt, wie er in bisher keinem anderen Pin gefunden wurde. Dies lässt auf eine völlig andersartige Funktionalität schließen (Kops *et al.* 1998).

1.3.5 Molekularer Mechanismus der PPIase-Reaktion durch Parvuline

Der Mechanismus der Isomerisierung von X_{aa}-Pro-Bindungen durch die Parvuline schien mit der ersten Kristallstruktur von Pin1 im Jahre 1997 bereits gelöst (Ranganathan 1997). Der erste postulierte Mechanismus sah eine kovalente Bindung von C113 an das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Substrats vor, welche durch einen nucleophilen Angriff des Schwefelatoms zustande kommen sollte. Das dadurch

entstehende negativ geladene Zwischenprodukt sollte durch die Histidine H59 und H157 stabilisiert werden. Doch bereits im Jahr 2000, mit der Publikation der zweiten Struktur eines humanen Parvulins, Par14, zeigte sich, dass dieser Mechanismus zumindest nicht der einzige sein konnte, da hier das C113 durch einen Aspartatrest D74 ersetzt ist (Sekerina *et al.* 2000). Als in der 2002 veröffentlichten Struktur von AtPin1 C70, welches C113 von Pin1 gleichzusetzen ist, nicht ins aktive Zentrum sondern klar von diesem weg zeigte (Landrieu *et al.* 2002), wurde deutlich, dass man den Mechanismus der Isomerisierung durch Parvuline noch nicht vollständig verstanden hatte. Die Theorie des nucleophilen Angriffs fand ihr Ende, als sich eine C113D-Mutante (Behrsin *et al.* 2007) in Pin1 als katalytisch aktiv erwies (Lippens *et al.* 2007), eine Mutation, welche in vielen phosphorylierungsunabhängigen Parvulinen vorkommt (Mueller und Bayer 2008). Ein weiterer Streitpunkt in der Frage, wie es die Parvuline schaffen, Prolylbindungen zwischen cis und trans wechseln zu lassen sind die das katalytische Zentrum aller aktiven Parvulindomänen durchspannenden Histidine. Wie die Struktur des Parvulins aus PpiD, in welcher das zweite Histidin durch ein V263 ersetzt ist (Weininger *et al.* 2009), und die H59A-Mutante (Yaffe *et al.* 1997) von Pin1 andeuten, hängt die katalytische Funktion klar von der Anwesenheit beider Histidine ab, da beide Enzyme keine Isomerisierungsaktivität aufweisen. Allerdings bleibt zu erwähnen, dass eine H59L/H157L-Doppelmutante von Pin1 beträchtlich aktiv bleibt. Dieses, der ersten These widersprechende, Ergebnis wurde so gedeutet, dass H59 und H157 für die sterische Stabilität der Reaktionshöhle, nicht aber für die Katalyse als solches zuständig sind (Bailey *et al.* 2008).

Ein weiterer Rest, der in der Frage des Katalyse-Mechanismus eine tragende Rolle spielt, ist S154, das von Ranganathan noch als Protonen-Donor verstanden wurde (Ranganathan 1997). In vielen späteren Strukturen ist dieses Serin jedoch durch andere Reste ersetzt, welche nicht in der Lage sind ein Proton abzugeben, wie Valin oder Phenylalanin in der Struktur von PrsA aus *Staphylococcus aureus* (Heikkinen *et al.* 2009). Die Autoren der PrsA-Studie schlugen eine Elektronentransportkette über die beiden Histidine vor. Als Donor beziehungsweise Akzeptor, werden diese beiden Histidine je von einem Serin und einen Aspartatrest flankiert. Wie in Abbildung 1.7 zu erkennen, bietet eine extrem hochaufgelöste Kristallstruktur (0,8 Å) von hPar14 den bisher besten Nachweis einer potentiellen Elektronentransportkette (Mueller *et al.* 2011). Die Autoren sprechen hier von einem Wasserstoffbrücken-Netzwerk. Betrachtet man die Elektronendichten, so kann man eine, an Protonentransport gekoppelte, Elektronentransportkette vermuten. Neben D74 und den beiden Histidinen, welche schon seit längerem als katalytisch aktiv vermutet wurden, spielt hier auch T118 eine Rolle. Dieses T118 ist über alle Parvuline als Threonin oder Serin konserviert. Außerdem zeigten Mueller *et al.*, dass eine T118A-Mutante enorm an Aktivität einbüßt.

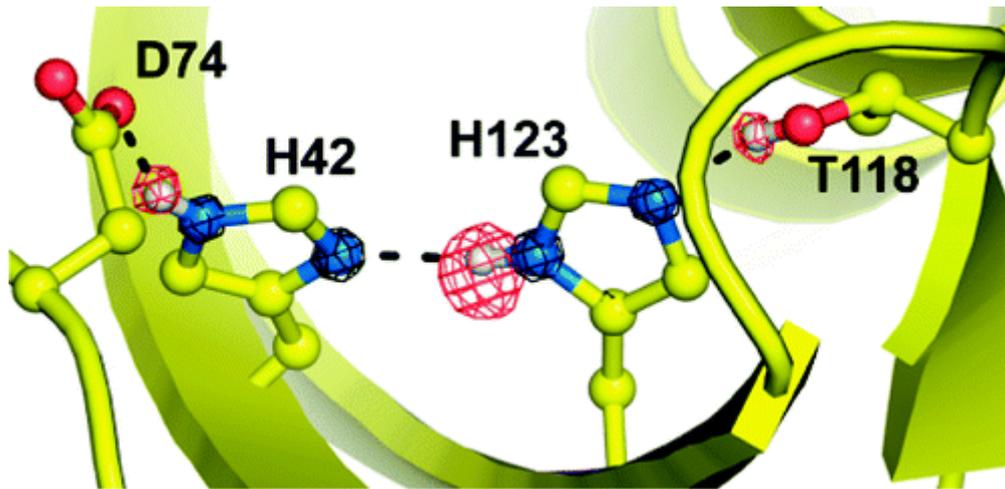


Abbildung 1.7: Wasserstoffbrücken-Netzwerk im hPar14-Kristall

Dargestellt ist ein Ausschnitt aus hPar14. Das Proteinrückgrat ist in *ribbon-style* zu sehen. Für die am Wasserstoffbrücken-Netzwerk beteiligten Reste wurde der *ball and stick*-Modus gewählt. Anhand der Elektronendichte die als rotes Gitternetz um die Protonen gelegt wurde, kann man den propagierten Weg der Elektronen (von D74 zu T118) gut nachvollziehen. (Mueller *et al.* 2011)

Trotz dieser neuen Erkenntnisse bleibt der vollständige molekulare Ablauf der Isomerisierung von X_{aa} -Pro-Bindungen durch die PPIC-typ-PPIasen ein zu lösendes Rätsel. Um dem Ziel der Entschlüsselung dieses Mechanismus näher zu kommen ist es sinnvoll sich der molekularen Evolution urtümlicher Parvuline zu widmen. Die Auflösung der Struktur des Parvulins, des bis dato einzigen kultivierbaren Archaeen (Könneke *et al.* 2005), welcher auch ein Parvulingen codiert (Walker *et al.* 2010), *Nitrosopumilus maritimus*, ist daher ein Hauptteil dieser Arbeit.

1.4 Archaeale Phylogenie

Lange ging man davon aus, alles Leben in zwei große Reiche gliedern zu können. Diese beiden Reiche waren die *Eukarya* und die *Prokarya*. Die *Prokarya* wurden unterteilt in die *Eubacteria* (die heutigen *Bacteria*) und die *Archaeobacteria*. Die Zusammenfassung der beiden prokaryotischen Reiche erfolgte auf Grund von vergleichenden Studien, welche die Struktur der Zellwand, die Organismenform oder den Stoffwechsel als Forschungsgrundlage hatten. Erst 1965 wurden Moleküle als Träger evolutiver Information vorgeschlagen, die Geburtsstunde der Phylogenie (Zuckerkanndl und Pauling 1965). Eines dieser Moleküle, die 16S-rRNA, oder genauer ssu (*small subunit*)-rRNA, verhalfen Woese & Fox 1977 zur Einsicht, dass nicht zwei sondern drei Reiche realistisch sind (Woese und Fox 1977). Diese Drei-Reiche-Theorie wurde 1990 neu benannt. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde der phylogenetische Begriff „Reich“ für die *Archaea*, *Bacteria* und *Eukarya* verwendet. Die Drei-Domänen-Theorie geht bis heute von eben diesen drei großen phylogenetischen Gruppen als „Domänen“ aus, welche wiederum in verschiedene Reiche unterteilt werden (Woese *et al.* 1990).

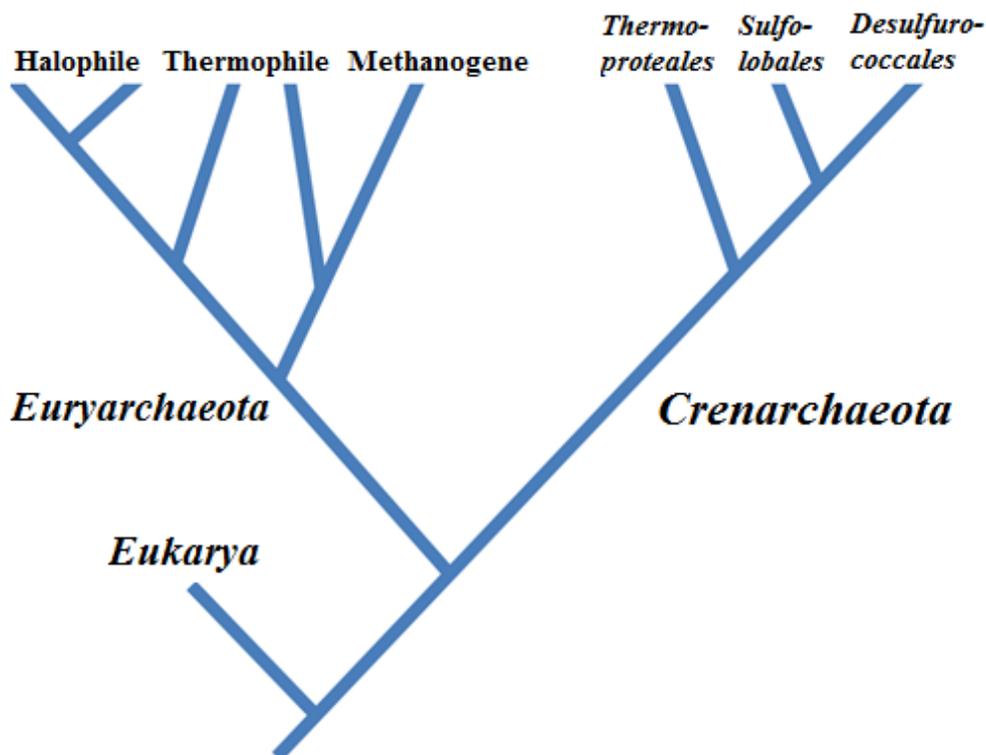


Abbildung 1.8: Schema der beiden dominierenden Archaeen-Reiche

Die *Euryarchaeota* kann man in drei Organismengruppen einteilen, welche aber nicht als phylogenetisch abgetrennt begriffen werden können, sondern ihre Einteilung ihrer Lebensweise verdanken. Die Halophilen sind sehr salztolerant. Die meisten euryarchaeotischen Thermophilen sind moderat thermophil, jedoch gibt es auch hyperthermophile Spezies. Die Methanogenen zeichnen sich durch ihren Stoffwechsel aus, der zur Methanfreisetzung führt. Die *Crenarchaeota* bestehen aus drei thermophilen Ordnungen, den *Thermoproteales*, den *Sulfolobales* und den *Desulfurococcales*.

Auch die innerarchaeale Phylogenie beschäftigte sich bis Mitte des letzten Jahrzehnts damit, alle neu entdeckten Organismen in eines der bis dato einzigen Reiche einzuordnen. Die *Euryarchaeota*, welche den *Eukarya* näher verwandt sind als dem zweiten großen Archaeen-Reich, den *Crenarchaeota* (Lake 1988), teilen sich demnach in drei polyphyletische Gruppen (Abbildung 1.8). Die Halophilen zeichnen sich durch eine sehr hohe Salztoleranz aus, welche sie in Gebieten wie Salzseen oder Salinen zu den wenigen lebensfähigen Organismen macht. Die Methanogenen haben einen methanproduzierenden Stoffwechsel gemeinsam, sind jedoch ansonsten sehr polyvalent. Thermophilie ist kein Alleinstellungsmerkmal der *Crenarchaeota*, wie die zahlreichen thermophilen *Euryarchaeota* beweisen. Die drei Hauptordnungen der thermophilen *Crenarchaeota* sind die *Desulfurococcales*, *Sulfolobales* und die *Thermoproteales*, welche alle als hyperthermophil bezeichnet werden können - im Gegensatz zu den meisten thermophilen *Euryarchaeota*, die als moderat thermophil anzusehen sind. Ein großes Problem für archaeale Phylogenie ist der Mechanismus des horizontalen Gentransfers, der 1951 das erste Mal beschrieben wurde (Freeman 1951). Bei diesem Vorgang wird genetisches Material entweder über Pili genannte Zellausstülpungen (Marklund *et al.* 1992), oder Transformation (Lorenz und Wackernagel 1994) zwischen zwei Organismen, die artverwandt sein können, aber nicht müssen, ausgetauscht. Wie in Abbildung 1.8 zu erkennen, ist zwischen den beiden großen Reichen der *Archaea* viel Platz für intermediäre Organismengruppen. In den letzten Jahren Jahre beschäftigte sich die archaeale Phylogenie vor allem damit, dieses Vakuum auszufüllen.

1.4.1 Zwischen *Eury-* und *Crenarchaeota*

Dass die Aufteilung aller Archaeen in die thermophilen *Crenarchaeota* und die mesophilen *Euryarchaeota* (Woese *et al.* 1990) nicht in dieser Grundsätzlichkeit aufrecht erhalten werden kann, zeigte sich schon Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts. Zuerst wurden nicht-thermophile marine *Crenarchaeota* entdeckt (Fuhrman *et al.* 1992). Da diese aber hauptsächlich in antarktischen Gefilden angetroffen wurden (DeLong *et al.* 1994), blieben die *Crenarchaeota* zumindest extremophil. 1995 wurden die ersten mesophilen *Crenarchaeota* gefunden; nicht etwa im Meer, sondern im Nährboden eines Sojafeldes (Ueda *et al.* 1995). Diese ersten Funde wurden in den nächsten zehn Jahren um viele weitere Beschreibungen erweitert, so dass die mesophilen und cryophilen *Crenarchaeota* fester Bestandteil archaealer Phylogenie wurden. Nicht nur die Funde mesophiler Archaeen stellten die Zwei-Phyla-Theorie in Frage; bereits 1993 isolierte Susan Barns erste ssu-rRNA-Fragmente aus einer heißen Quelle des *Yellowstone Nationalparks*, welche sich stark von den *crenarchaealen* ssu-rRNAs unterschieden (Barns *et al.* 1994). Sie nannte dieses neue Phylum, das in den Folgejahren immer wieder als Teil der *Crenarchaeota* oder als eigenständiges Reich bezeichnet wurde, *Korarchaeota* (Barns *et al.* 1996). Als diese *Korarchaeota* 1999 auch in hydrothermalen Quellen der Tiefsee nachgewiesen wurden, war klar, dass es sich nicht um ein lokales Phänomen handelt (Takai und

Horikoshi 1999). Bisher ist das Genom nur eines Korarchaeoten bekannt; *Candidatus Korarchaeum cryptophilum* wurde 2008 genetisch entschlüsselt (Elkins *et al.* 2008). Genau wie die *Korarchaeota* gaben auch die Nanoarchaeen, dessen einziger bekannter Vertreter *Nanoarchaeum equitans* im Jahr 2002 zuerst beschrieben wurde (Huber *et al.* 2002), den Phylogenetikern Rätsel auf. Das ein Jahr später bereits entschlüsselte Genom (Waters *et al.* 2003) zeigte die Besonderheit dieses einzig bekannten archaealen Parasiten, der ein sehr reduziertes Genom aufweist. Dies führte dazu, dass dieser winzige Organismus lange Zeit phylogenetisch nicht einzuordnen war. Wie sich *N. equitans* ein solch reduziertes Genom leisten kann, wurde klar, als 2008 die Erbinformation seines Wirtes *Ignicoccus hospitalis* (Paper *et al.* 2007) entschlüsselt wurde (Podar *et al.* 2008). Die beiden Organismen tauschten in ihrer langen gemeinsamen Evolutionen zahlreiche Gene aus, so dass das zunächst angenommene parasitäre Verhältnis heute auch als Symbiose gedeutet wird (Forterre *et al.* 2009). Neben den mesophilen Crenarchaeoten und den hyperthermophilen Kor- und Nanoarchaeoten wurden 2006, in der Drainage einer alten Eisenmine in *Richmond*/Kalifornien, mesophile, extrem kleine Archaeen gefunden (Baker *et al.* 2006), die zunächst den *Euryarchaeota* zugeordnet wurden (Dick *et al.* 2009). Da diese Organismen sowohl enorm niedrige pH-Werte tolerieren als auch, mit einer Größe von $0,009 \mu\text{m}^3 - 0,04 \mu\text{m}^3$, extrem klein sind, wurden sie ARMAN (**a**rchaeal **R**ichmond **M**ine **a**cidophilic **n**anoorganisms) genannt. Nachdem viele Studien versuchten, die oben aufgeführten Phyla in das bestehende Muster einzufügen, lösten Guy und Ettema dieses Problem mit einer Vereinigungstheorie (Guy und Ettema 2011). Sie gehen davon aus, dass die ARMAN und die *Nanoarchaeota* sich sehr früh von den übrigen Archaeen abspalteten und sich der Rest in zwei große Phyla teilt: die *Euryarchaeota* und das Superphylum TACK. Der Name setzt sich zusammen aus den Anfangsbuchstaben der eingegliederten Phyla: **K**orarchaeota, die thermophilen **C**renarchaeota, die **A**igarchaeota (*Caldiararchaeum subterraneum*) (Nunoura *et al.* 2011) und die mesophilen *Crenarchaeota*. Diese werden seit 2008 **T**haumarchaeota genannt (Brochier-Armanet *et al.* 2008) und beinhalten den einzigen kultivierbaren Archaeen, der ein Parvulingen trägt, *Nitrosopumilus maritimus*, welcher in dieser Arbeit als Ausgangsorganismus fungiert. (vgl. 1.3.5.).

1.5 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, durch die Auflösung der Struktur des thaumarchaealen Parvulins aus *Nitrosopumilus maritimus* einen Beitrag zur Auflösung des Isomerisierungsmechanismus der PPIC-Typ-Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen zu leisten. Zu diesem Zweck sollte zunächst die Frage beantwortet werden, ob die Gruppe der archaealen Parvuline eine evolutionär unabhängige Parvulinspezies darstellt, oder ob sich die archaealen Vertreter durch horizontalen Gentransfer aus den Par10-Typ PPIasen der Bakterien entwickelt haben. Nur wenn Ersteres der Fall ist kann von einer wirklich „urtümlichen“ Proteinspezies gesprochen werden. Um diese erste Frage zu beantworten, sollte zunächst ein genaues Bild der Parvulinverteilung innerhalb der Prokaryoten gezeichnet werden, um im Anschluss mittels phylogenetischer und bioinformatischer Methoden die Abgrenzbarkeit bakterieller und archaealer Parvuline zu untersuchen.

Um die Struktur des ausgewählten archaealen Parvulins zu lösen, sollte dessen Gen mittels PCR aus der genomischen DNA des Wirts isoliert, in einen Expressionsvektor subkloniert und schließlich mittels GST-Affinitätschromatographie und Gelfiltration aufgereinigt werden. Für die Aufnahme multidimensionaler NMR-Spektren sollte das Protein zudem mit stabilen Isotopen markiert werden. Im Zuge der NMR-spektroskopischen Untersuchungen sollten zudem die Methoden der dreidimensionalen Magnetresonanzspektroskopie (3D-NMR) und die Auswertung der erhaltenen Daten mittels aktueller Software (CCPN-*suite*, Cyana 3.0) in der Arbeitsgruppe etabliert, bzw. aktualisiert werden. Das resultierende Strukturmodell sollte mit anderen bereits gelösten Parvulinmodellen (zum Beispiel dem Parvulins aus *Cenarchaeum symbiosum*; Jaremko *et al.* 2011) verglichen werden, um so Hinweise für die Besonderheiten archaealer PPIC-Typ-PPIasen zu erhalten.

Nicht zuletzt sollten erste immunbiochemische Untersuchungen mit Lysaten des Wirtsorganismus *Nitrosopumilus maritimus* durchgeführt werden. Um endogenes Parvulin nachweisen zu können, sollte ein Antikörper gegen rekombinantes NmPin hergestellt und für Western Blot-Analysen verwendet werden, um eventuell erste Hinweise auf Lokalisation oder Bindungsverhalten des archaealen Parvulins zu erhalten.

2 Materialien und Methoden

2.1 Geräte

Tabelle 2.1: Liste verwendeter Geräte

Funktion	Name	Hersteller
kühlb. Tischzentrifuge (groß)	5820 R	Eppendorf, Hamburg
kühlb. Tischzentrifuge (klein)	5415 R	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	<i>minispin</i>	Eppendorf, Hamburg
Standzentrifuge	Avanti JE	Beckman, Palo Alto
Ultrazentrifuge	Optima LE-80K	Beckman, Palo Alto
<i>SpeedVac</i>	<i>Concentrator 5301</i>	Eppendorf, Hamburg
temp. Schüttelinkubator	HT Minitron	Infors, Bottmingen
temp. Schüttelinkubator	HT	Infors, Bottmingen
temp. Inkubator	BD53	Binder, USA
Heizblock mit Mixer	Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf, Hamburg
Heizblock	LS1	VLM, Bielefeld
Magnetrührer	MR 3000	Heidolph, Schwabach
Spannungsgeber	<i>PowerPac basic</i>	BioRad, Berkeley
Spannungsgeber	<i>Power Pack P25T</i>	Biometra, Göppingen
Grammwaaage	EG	Kern, Balingen-Frommern
Feinwaage	ABJ	Kern, Balingen-Frommern
Gelkammer (DNA)	<i>Mini Subcell GT</i>	BioRad, Berkeley
Gelkammer (SDS)	XCell Mini <i>Protean 3</i>	BioRad, Berkeley
<i>Semi-Dry</i> Tisch	<i>blotting table</i>	Biometra, Göppingen
Tischphotometer	Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg
UV-Lampentisch	N36M	Benda, Wiesloch
Agarosegel-Analyseapparat	<i>BioDoc Analyze</i>	Biometra, Göppingen
<i>NanoDrop</i>	ND 1000 <i>Spectrophotometer</i>	Peqlab, Erlangen
Wasseraufbereitung	Milli-Q Biocel	Millipore, Schwalbach
<i>PCR-Cycler I</i>	<i>Mastercycler epigradient</i>	Eppendorf, Hamburg
<i>PCR-Cycler II</i>	T 3000 <i>Thermocycler</i>	Biometra, Göppingen
Elektroporator	<i>MicroPulser</i>	BioRad, Berkeley
Sonifikator	SONOPULS	Bandelin, Hamburg
<i>Mikrofluidizer</i>	M-110L	Microfluidics, Newton
Druckkammer (<i>Mikrofluidizer</i>)	H10L-Druckkammer	Microfluidics, Newton
Blotentwickler	Cawomat 2000 IR	Cawo, Schrobenhausen
Vakuumpumpe	KNF-LAB	KNF, Trenton
Rollenschüttler	<i>roller mixer SRT6</i>	Stuart, Staffordshire
Gefriertrockner	ALPHA 2-4 LDplus	Christ, Osterode
NMR-Spektrometer	<i>Ultrashield 700-NMR</i>	Bruker BioSpin, Fällanden
Cryoprobenkopf	Tripleresonanz Cryoprobenkopf	Bruker BioSpin, Fällanden
Kontrolleinheit (NMR)	BVT 3000-Kontrolleinheit	Bruker BioSpin, Fällanden
FPLC (Pumpe)	<i>DuoFlow</i>	BioRad, Berkeley
FPLC (Lampe)	QuadTec UV-Vis <i>detector</i>	BioRad, Berkeley
FPLC (Fraktionssammler)	BioFrac <i>fraction collector</i>	BioRad, Berkeley
FPLC (Pumpe)	P-920	GE Healthcare, Solingen
FPLC (Lampe)	UPC-900	GE Healthcare, Solingen
FPLC (Fraktionssammler)	Frac-920	GE Healthcare, Solingen
Einspritz- <i>Valve</i>	WV-907	GE Healthcare, Solingen

2.2 Kits

Tabelle 2.2: Verwendete Kits

Funktion	Name	Hersteller
Vektorpräparation (Mini)	Nucleo Spin® Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
Vektorpräparation (Mini)	E.Z.N.A.™ Plasmid <i>Mini Prep Kit</i>	Omega, Norcross
Vektorpräparation (Mini)	<i>Mini Prep Kit</i>	Peqlab, Erlangen
Vektorpräparation (Midi)	Nucleo Bond® <i>Xtra Midi</i>	Macherey-Nagel, Düren
Vektorpräparation (Midi)	Qiagen® Plasmid <i>MidiKit</i> (100)	Qiagen, Hilden
DNA-Reinigung	Nucleo Spin® Extract II	Macherey-Nagel, Düren
DNA-Reinigung	peqGold Gel <i>Extraction Kit</i>	Peqlab, Erlangen
DNA-Reinigung	MicroElute™ DNA <i>Clean-Up Kit</i>	Omega, Norcross
DNA-Reinigung	E.Z.N.A.™ <i>gel extraction kit</i>	Omega, Norcross
ECL-Kit	Pierce® ECLplus	Thermo Scientific, Waltham

2.3 Chemikalien

Tabelle 2.3: Verwendete Chemikalien

Name	Hersteller
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V, fettsäurefrei (BSA)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl), 99 % ¹⁵ N	CIL, Cambridge
Ammoniumperoxodisulfat (APS) 98 %	Roth, Karlsruhe
Ampicilin Natriumsalz 99 %	Roth, Karlsruhe
Ampicilin Natriumsalz 99 %	Gerbu, Wieblingen
L-Arginin	Roth, Karlsruhe
Adenosintriphosphat (ATP) 98 %	Fluka, Seelze
Borsäure (H ₃ Bo ₃) 99,8 %	Roth, Karlsruhe
Borsäure (H ₃ Bo ₃) 99,8 %	Fluka, Seelze
Bromphenolblau Indikator pH 3,0-4,6	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid (CaCl ₂) ≥94 %, entwässert	Roth, Karlsruhe
Coomassie <i>brilliant blue</i> G-250	Roth, Karlsruhe
Deuteriumoxid (D ₂ O) 99 % <i>atom D</i>	Sigma, Seelze
Deuteriumoxid (D ₂ O) 100 % <i>atom D</i>	Sigma, Seelze
di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄), wasserfrei	Roth, Karlsruhe
di-Natiumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄), wasserfrei ≥99 %	Roth, Karlsruhe
2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure (DSS)	Sigma, Seelze
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat ≥99 %	Roth, Karlsruhe
Eisencitrat	Sigma, Seelze
Eisessig	Thermo Scientific, Waltham
Ethanol (technisch & absolut)	Chemikalienlager
Ethidiumbromid	Sigma, Seelze
D(+)-Glukose wasserfrei	Roth, Karlsruhe
>98 % ¹³ C <i>atom</i> ¹³ C ₆ -D-Glukose	CIL, Cambridge
L-Glutamat	Roth, Karlsruhe
L-Glutathion reduziert ≥98 %	Roth, Karlsruhe
Glycerin ROTIPURAN® 86 %	Roth, Karlsruhe
Glycerol 87 % BioChemica	AppliChem, Darmstadt
L-Glycin ≥99 %	Roth, Karlsruhe
Guanidin-Hydrochlorid ≥98 %	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
L-Histidin	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Chemikalienlager
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) 99 %	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl) 99,5 %	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) ≥99 %	Roth, Karlsruhe

Name	Hersteller
Kanamycinsulfat	Roth, Karlsruhe
Cobaltchlorid (CoCl ₂) Hexahydrat	Fluka, Seelze
Kupferchlorid (CuCl ₂) Dihydrat	Fluka, Seelze
L-Lysin	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂) Hexahydrat ≥99 %	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (MgSO ₄) Hydrat	Fluka, Seelze
Manganchlorid (MnCl ₂) Tetrahydrat	Fluka, Seelze
<i>Meat Extract</i>	Fluka, Seelze
2-Mercaptoethanol (β-Mercaptoethanol) 99 %	Roth, Karlsruhe
Methanol ROTIPURAN® 99,5 %	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Dr. Oetker, Bielefeld
Natriumazid (NaN ₃)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl) ≥99,8 %	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH) ≥99 %	Roth, Karlsruhe
Natriummolybdat (Na ₂ MoO ₄)	Fluka, Seelze
Natriumselenit (Na ₂ SeO ₃)	Fluka, Seelze
Nickelchlorid (NiCl ₂) Hexahydrat	Fluka, Seelze
Orange G (C.I. 16230)	Roth, Karlsruhe
Pepton aus Fleisch	Fluka, Seelze
O-Phosphorsäure (H ₃ PO ₄) 85 %	Roth, Karlsruhe
ROTIPHORESE® Gel30 (30% AA/Bis)	Roth, Karlsruhe
D(+)-Saccharose 99,5 %	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl) min. 25 %	Riedel – de Haën, Seelze
SDS <i>ultra pure</i> 99%	Roth, Karlsruhe
L-Serin	Roth, Karlsruhe
TEMED®	Roth, Karlsruhe
Thiamin Hydrochlorid (Vitamin B ₁)	Sigma, Seelze
Thiamin Hydrochlorid (Vitamin B ₁)	Merck, Darmstadt
L-Threonin	Roth, Karlsruhe
Tricin	Roth, Karlsruhe
Tris <i>ultra pure</i>	AppliChem, Darmstadt
Trypton BioChemica	AppliChem, Darmstadt
Tween® 20	Roth, Karlsruhe
L-Valin	Roth, Karlsruhe
Zinksulfat (ZnSO ₄) Heptahydrat	Fluka, Seelze

2.4 Medien und Lösungen

Tabelle 2.4: Verwendete Lösungen, Puffer und Medien

Name	Rezept
10 % APS	10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS) 98 %, ddH ₂ O
Ampicilin-Lsg.	10 % (w/v) Ampicilin Natriumsalz 99 %, ddH ₂ O
ATP-Lsg.	0,1 M Adenosintriphosphat (ATP) 98 %, ddH ₂ O
Bradford-Reagenz	5 % (v/v) 95 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) 85 % (w/v) H ₃ PO ₄ , 0,01 % (w/v) Coomassie brilliant blue G 250, ddH ₂ O
BSA-Lsg.	1 M Albumin Fraktion V, fettsäurefrei (BSA), ddH ₂ O
0,05 M (1 M) CaCl ₂ -Lsg.	0,05 M (1 M) Calciumchlorid (CaCl ₂) ≥94 %, entwässert, ddH ₂ O
10 mM Eisencitrat-Lsg.	10 mM Eisencitrat, ddH ₂ O
Gelfiltrationspuffer pH 6,5	2 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT), 150 mM Kaliumchlorid (KCl) 99,5 %, 17,125 % (v/v) 0,2 M KH ₂ PO ₄ , 7,875 % (v/v) K ₂ HPO ₄ , ddH ₂ O
10 % Glycerol-Lsg.	11,5 % (v/v) Glycerol 87 %, ddH ₂ O
GST-Reinigung (Elution)	1x PBS pH 8,0, 0,6 % (w/v) L-Glutathion reduziert ≥98 %
GST-Reinigung (Hochsalz)	1x PBS pH 8,0, 2 % (w/v) Natriumchlorid (NaCl) ≥99,8 %
GST-Reinigung (Waschen)	1x PBS pH 8,0
6 M Guanidin-Hydrochlorid	6 M Guanidin-Hydrochlorid ≥98 %, ddH ₂ O
1 M IPTG-Lsg.	1 M Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) 99 %, ddH ₂ O
Kanamycin-Lsg.	3% (w/v) Kanamycinsulfat, ddH ₂ O
0,2 M K ₂ HPO ₄	0,2 M di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄), wasserfrei, ddH ₂ O
0,2 M KH ₂ PO ₄	0,2 M Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) ≥99 %, ddH ₂ O
KP _i -Puffer pH 6,5 (NMR)	17,125 % (v/v) 0,2 M KH ₂ PO ₄ , 7,875 % (v/v) K ₂ HPO ₄ , ddH ₂ O

Name	Rezept
2x Laemmli-Probenpuffer	125 mM Tris/HCl pH 6,8, 50 % (w/v) Glycerin, 10 % (w/v) SDS, 10 mM β -Mercaptoethanol, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, ddH ₂ O
Laemmli-Laufpuffer	0,1 % (w/v) SDS, 0,303 % (w/v) Tris, 1,441 % (w/v) Glycin, ddH ₂ O
4x Laemmli-Sammelgelp.	500 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,4 % (w/v) SDS, ddH ₂ O
4x Laemmli-Trenngelpuffer	3 M Tris/HCl pH 8,8, 0,4 % (w/v) SDS, ddH ₂ O
Laemmli-Sammelgel (12,5 %)	50 % (v/v) 30 % AA/Bis, 26 % (v/v) ddH ₂ O, 22 % (v/v) Trenngelpuffer, 1 % (v/v) 10 % SDS, 1 % (v/v) 10 % APS, 0,033 % (v/v) TEMED
Laemmli-Trenngel (12,5 %)	17 % (v/v) 30 % AA/Bis, 70 % (v/v) ddH ₂ O, 10 % (v/v) Sammelgelp., 1 % (v/v) 10 % SDS, 1 % (v/v) 10 % APS, 0,1 % (v/v) TEMED
LB-Medium	1 % (w/v) Typton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,17 M NaCl, pH 7,0, ddH ₂ O
LB-Medium (für Platten)	1,5 % (w/v) Agar-Agar, LB-Medium
M9-Medium	0,68 % (w/v) Na ₂ HPO ₄ , 0,3 % (w/v) KH ₂ PO ₄ , 0,05 % (w/v) NaCl, 0,1 % (w/v) NH ₄ Cl, 0,2 % (v/v) 1 M MgSO ₄ , 0,2 % (v/v) 50x TS2, 0,1 % (v/v) 10 mM Eisencitrat, 0,4 % (w/v) Glukose, 0,01 % (v/v) CaCl ₂ , 0,01 % (v/v) 0,5 % Vitamin B ₁ , 0,1 % (v/v) Antibiotika-Lsg., ddH ₂ O
1 M MgSO ₄ -Lsg.	1 M Magnesiumsulfat (MgSO ₄) Hydrat, ddH ₂ O
Na ₂ EDTA-Lsg.	0,5 M EDTA Dinatriumsalz Dihydrat \geq 99 %, pH 8,0, ddH ₂ O
Nutrient Medium	0,5 % (w/v) Pepton, 0,3 % (w/v) Fleischextrakt, ddH ₂ O
6x Orange G	40 % (w/v) Saccharose, 0,5 % (w/v) Orange G, ddH ₂ O
1x PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , ddH ₂ O
4x Schägger-Jagow (SJ)-Probenpuffer	40 % (v/v) 0,5 M Tris/HCl pH 6,8, 48 % (v/v) Glycerin (86 %), 16 % (w/v) SDS, 0,04 % (w/v) Coomassie brilliant blue G-250, 0,05 M DTT, ddH ₂ O
SJ-Gelpuffer	3 M Tris/HCl pH 8,45, 0,3 % (w/v) SDS, ddH ₂ O
SJ-Anodenpuffer	0,2 M Tris/HCl pH 8,9, ddH ₂ O
SJ-Kathodenpuffer	0,1 M Tris, 0,1 M Tricin, 0,1 % (w/v) SDS, ddH ₂ O
SJ-Sammelgel (6 %)	20 % (v/v) 30 % AA/Bis, 25 % (v/v) SJ-Gelpuffer, 54,4 % (v/v) ddH ₂ O, 0,5 % (v/v) 10 % APS, 0,2 % (v/v) TEMED
SJ-spacer gel (10 %)	33,3 % (v/v) 30% AA/Bis, 35 % (v/v) SJ-Gelpuffer, 31,2 % (v/v) ddH ₂ O, 0,5 % (v/v) 10 % APS, 0,2 % (v/v) TEMED
SJ-Trenngel (12,5 %)	42 % (v/v) 30 % AA/Bis, 35 % (v/v) SJ-Gelpuffer, 5,8 % (v/v) ddH ₂ O, 16,6% (v/v) Glycerin (86 %), 0,5 % (v/v) 10 % APS, 0,1 % (v/v) TEMED
SOC-Medium	0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose, ddH ₂ O
TAE-Puffer	40 mM Tris, 1mM Na ₂ EDTA, 0,1142 % (v/v) Eisessig, ddH ₂ O
TBE-Puffer	940 mM Tris, 2mM Na ₂ EDTA, 85 mM Borsäure, ddH ₂ O
TBST 150	3 % (w/v) BSA, 50 mM Tris, 0,1 % (v/v) Tween® 20, 150 mM NaCl, pH 7,5 (HCl), ddH ₂ O
TBST 500	3 % (w/v) BSA, 50 mM Tris, 0,1 % (v/v) Tween® 20, 500 mM NaCl, pH 7,5 (HCl), ddH ₂ O
50x TS2	2,4 mM ZnSO ₄ , 0,15 mM MnCl ₂ , 4,9 mM H ₃ BO ₃ , 0,84 mM CoCl ₂ , 0,84 mM NiCl ₂ , 58 μ M CuCl ₂ , 4,3 mM Na ₂ MoO ₄ , 0,12 mM Na ₂ SeO ₄ , ddH ₂ O
Vitamin B ₁ -Lsg.	0,5 % (w/v) Thiamin Hydrochlorid (Vitamin B ₁), ddH ₂ O
Western Blot-Transferpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, ddH ₂ O

2.5 Verbrauchsmaterial

DNA-Marker:

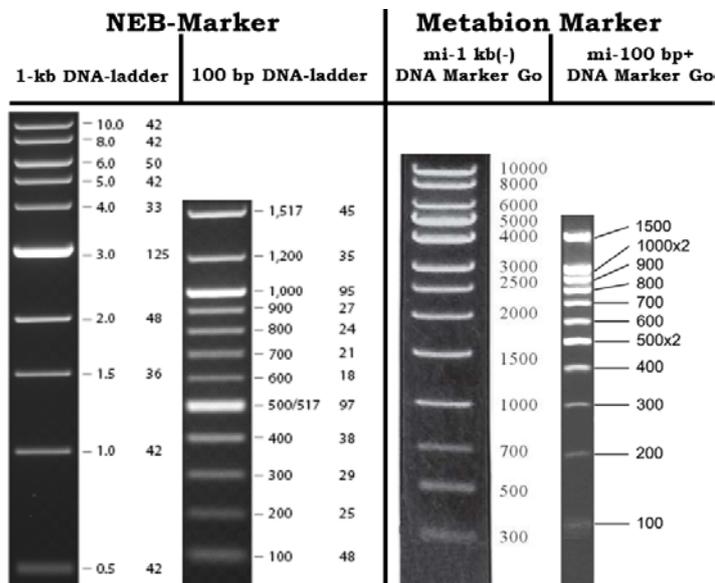


Abbildung 2.1: DNA-Marker

Auf der linken Seite befinden sich die 1 kb- und 100 bp-DNA-Marker der Firma NEB, Frankfurt am Main. Rechts: Marker derselben Größen der Firma Metabion, Martinsried.

Protein-Marker:

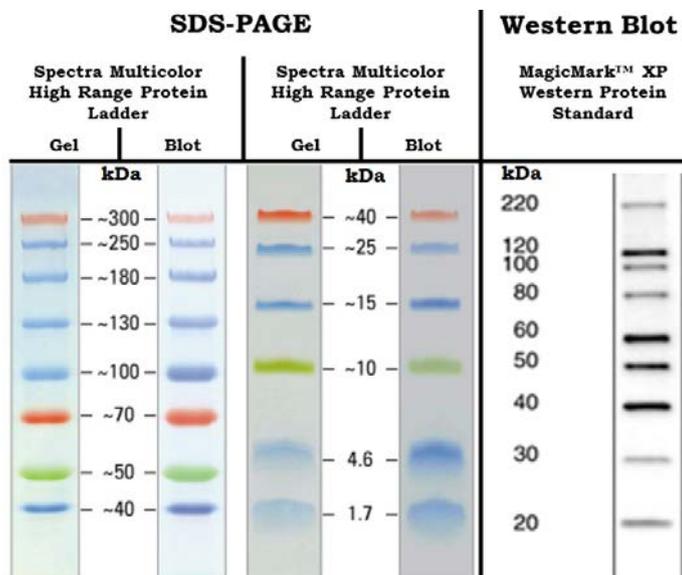


Abbildung 2.2: Protein-Marker

Als Größenmarker für SDS-Gele wurden Produkte der Spectra™ Multicolor-Reihe der Firma Thermo Scientific, Waltham verwendet; diese hinterlassen ihr Muster auch auf der Blotmembran. Für Western Blots wurde auch der MagicMark™ XP der Firma Invitrogen, Carlsbad, der durch ECL detektiert werden kann und somit auch auf entwickelten Filmen erkennbar ist, verwendet.

Tabelle 2.5: Prokaryotenstämme

Stamm / Verwendung	Herkunft	Interne Resistenzen	Beschreibung / Genotyp
XL 10 Gold Speicherzellen	MPI Dortmund	Tetracyclin, Chlor- amphenicol, Nalidixin- säure	XL10-Gold ultrakompetente Zellen beinhalten den Hte Phänotyp, welcher die Transformationseffizienz für große, ligierte DNA-Fragmente erhöht. Der Stamm ist endonukleasefrei (endA), wodurch die Effizienz von Vektorpräparationen deutlich verbessert wird. Tetr (mcrA)183, (mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F ⁺ proAB lacIqZ M15 Tn10 (Tetr) Amy Camr].
NEB 5 alpha Speicherzellen	NEB, Frankfurt a. M.	-	DH5α™ Derivat, NEB 5-alpha elektrokompetente <i>E. coli</i> wurden für die Elektroporation optimiert. Sie sind, aufgrund ihrer Endonukleasefreiheit ideal für alle Klonierungsanwendungen. Transformationseff.: 1-3 x 10 ¹⁰ cfu/μg pUC-DNA fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17
Shox cells Speicherzellen	Bioline, Lucken- walde	-	<i>ElectroSHOX Competent Cells</i> wurden für die Elektroporation optimiert. Sie sind, aufgrund ihrer Endonukleasefreiheit ideal für alle Klonierungsanwendungen. F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 ara Δ139 Δ(ara, leu)7697 galU galK rpsL(StrR) nupG λ-
BL21 (DE 3) T1r Expressionsstamm	Sigma, Seelze	-	BL21(DE3)-T1R kompetente <i>E. coli</i> wurden entwickelt, um hoch effizient Proteine durch T7-Promotoren zu exprimieren. Durch die Abwesenheit der lon-Protease und ompT wird die Degradation exprimierten Proteins vermindert. Der tonA Genotyp vermittelt zudem eine Resistenz gegen T1- und T5-Bakteriophagen. F- ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm λ(DE3) tonA
Candidatus Nitrosopumilus maritimus SCM1	Dr. Könnecke, Oldenburg	-	<i>N.maritimus</i> ist einer der wenigen kultivierbaren Archaeen. Ein etwa 100 μl großes Zentrifugat dieser Zellen wurde uns von Dr. Könnecke aus Oldenburg zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2.6: Weitere Verbrauchsartikel

Typ	Name	Hersteller
Gelkassetten	NC2010 Cassettes 1,0 mm	Invitrogen, Carlsbad
GSH-Säule (1 ml)	GSTrap HP (1 ml)	GE Healthcare, Solingen
GSH-Säule (20 ml)	GSTPrep FF 16/10 (20 ml)	GE Healthcare, Solingen
Gelfiltrationssäulen (nach Proteinmenge und -größe sortiert)	HiLoad™ Superdex 75 16/60, HiLoad™ Superdex 75 26/60, HiLoad™ Superdex 200 16/60, HiLoad™ Superdex 200 26/60	GE Healthcare, Solingen
NAP-Säulchen	Illustra NAP10 columns	Thermo Scientific, Waltham
NMR-Röhrchen	NMR sample tubes AP5-Reihe	AMPOL, Warschau
Western Blot Filme	CL-XPosure™ Film 5x 7 inches	Thermo Scientific, Waltham
Western Blot Membran	Protran® Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman, Dassel
Centrikons (verschiedene Ausschlussgrößen)	Amicon® Ultra (3 kDa, 10 kDa, 30 kDa)	Millipore, Schwalbach

2.6 Enzyme und Antikörper

Tabelle 2.7: Verwendete Enzyme

Typ	Hersteller
ApaI (Restriktionsendonuklease)	Fermentas, Waltham
ApaI (Restriktionsendonuklease)	NEB, Ipswich
BamHI (Restriktionsendonuklease)	Fermentas, Waltham
BamHI (Restriktionsendonuklease)	NEB, Ipswich
Lysozym aus Hühnereiweiß	Fluka, Seelze
(Cloned) Pfu Polymerase AD	Stratagene, Santa Clara
PreScission™-Protease, lehrstuhlintern gereinigt mit pGex-Vektor (BC 530)	GE Healthcare, Solingen
Ribonuclease H (RNase H)	Gibco, Carlsbad
Ribonuclease H (RNase H)	NEB, Ipswich
T4-Ligase	Fermentas, Waltham
Taq DNA Polymerase (mit Standard Taq Puffer)	NEB, Ipswich

Antikörper:

Für die Immunoblot-Experimente wurde ein polyklonales Serum bei der Firma Eurogentec, Seraing in Auftrag gegeben. Als Antigen wurde ein KLH (*keyhole limpet hemocyanin*)-gekoppeltes, rekombinant aus *E. coli* gereinigtes NmPin verwendet. Es wurden zwei Kaninchen (SA6940 und SA6941) immunisiert. Deren *final bleed* wurde nach allen Immunisierungsschritten vermischt (je 10 ml) und gegen rekombinantes NmPin affinitätsgereinigt.

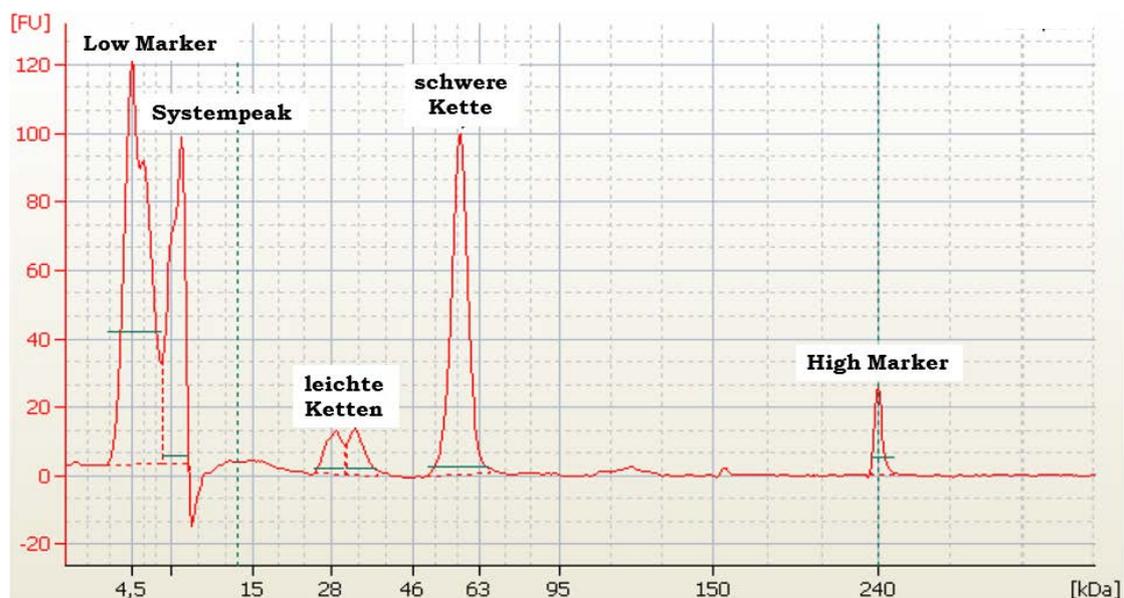


Abbildung 2.3: SDS-PAGE-Analyse der Affinitätsreinigung des Antikörperserums:

Wie in der Analyse der Firma Eurogentec zu erkennen, ist das Serum nach der Affinitätsreinigung frei von Verunreinigungen. Die Reinigung und die Analyse wurden seitens des Herstellers vorgenommen.

Abbildung 2.3 zeigt die Analyse eines SDS-Gels, welches mittels eines *SDS-PAGE Analyzers* (Bioanalyzer, Agilent) in einen Graphen übertragen worden ist. Mit

Ausnahme der typischen Marker- und Systempeaks sind keine weiteren Verunreinigungen zu sehen. Als Sekundärantikörper wurde der *anti rabbit* HRP der Firma Amersham, London verwendet. Dieser ist gekoppelt mit HRP (*Horseradish peroxidase*) und kann daher zusammen mit ECL-Kits verwendet werden.

2.7 Oligonukleotide und Vektoren

Tabelle 2.8: Verwendete Oligo- und Polynukleotide

Name	Sequenz	Herkunft
Forward primer für die PCR auf genomische DNA aus <i>Nitrosopumilus maritimus</i> . ApaI-Schnittstelle im Überhang für die anschließende Klonierung in pET41presc. (FW632)	cat tc GGGCCC tca aac aaa atc aaa tgt tca cac	synthetisiert von Metabion, Martinsried
Reverse primer für die PCR auf genomische DNA aus <i>Nitrosopumilus maritimus</i> . BamHI-Schnittstelle im Überhang für die anschließende Klonierung in pET41presc. (RV633)	tgc ag GGA TCC tta tcc gaa tct ctt gat aat atg	synthetisiert von Metabion, Martinsried
Genomische DNA von <i>Nitrosopumilus maritimus</i>	-	erhalten von Dr. Könnecke, Oldenburg

pET41presc.:

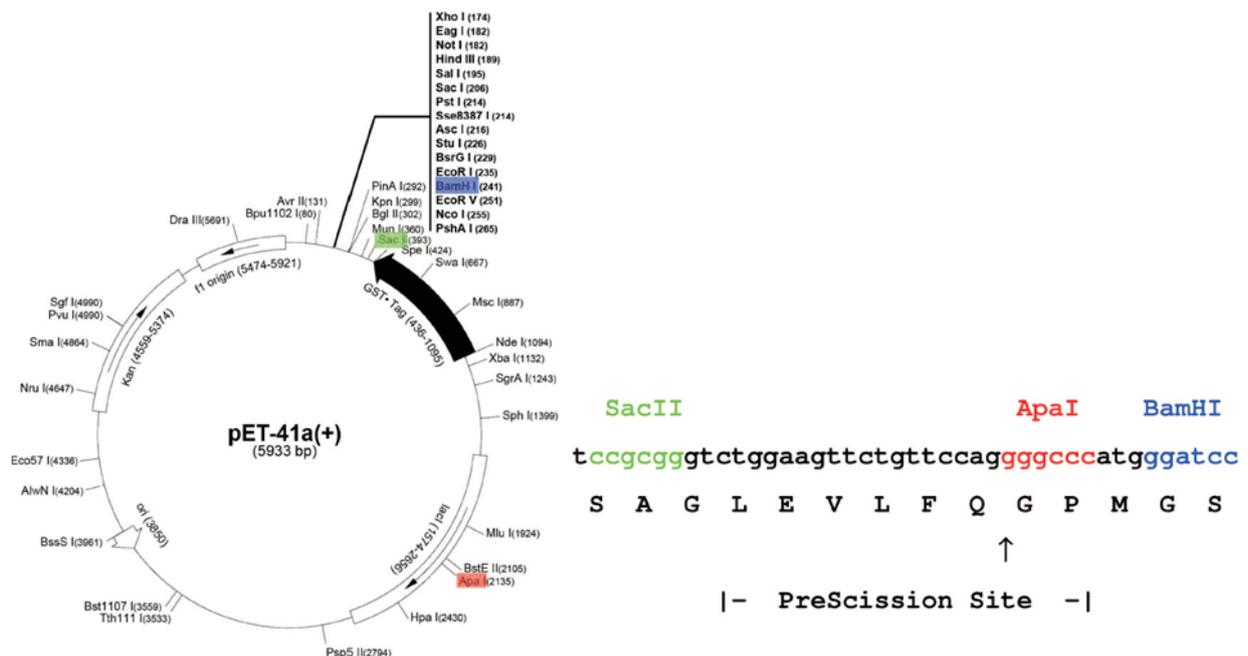


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung von pET41presc.

Dieses Schema zeigt die Klonierung der *PreScission*TM-Schnittstelle über die Restriktionsenzyme SacII (grün) und BamHI (blau). Hierbei wurde eine ApaI-Schnittstelle eingebracht, über welche zukünftige Klonierungen geschaltet werden sollten. Die eigentliche ApaI-Schnittstelle wurde deletiert (rot hinterlegt). Diese Arbeiten wurden lehrstuhlintern von Daniel Neumann während seiner Diplomarbeit durchgeführt (Neumann 2006).

Für alle Proteinpräparationen dieser Arbeit wurde das GST-Konstrukt BC 730 verwendet. Dieses Konstrukt besteht aus dem Standard-GST-Vektor dieser

Arbeitsgruppe pET41presc. (Abbildung 2.4), in welchen über ApaI und BamHI die Sequenz für das Zielprotein NmPin einkloniert wurde. Der Vektor besteht aus der Basis des Addgene-Vektors pET-41b (+). Diesem Vektor wurde in der Diplomarbeit von Daniel Neumann eine interne ApaI-Schnittstelle entfernt, so dass nur noch die einklonierte ApaI-Schnittstelle vorhanden war. Des Weiteren wurde eine *PreScission*-Schnittstelle so eingebracht, dass der N-terminale *GST-tag* nach der Affinitätsreinigung mittels *PreScission*TM-Protease entfernt werden konnte.

2.8 Software

Tabelle 2.9: Software

Name	Verwendung	Referenz
BLASTp	Suche nach PPIase-Repertoire in verschiedenen Genomen	(Johnson <i>et al.</i> 2008)
bio3d	Berechnung der Shannon Entropie	(Grant <i>et al.</i> 2006)
CCPNsuite 2.1	Bearbeitung und Auswertung von NMR-Spektren, Konvertieren verschiedener Dateiformate	(Vranken <i>et al.</i> 2005)
CDD 3.0	Suche nach konservierten Proteindomänen	(Marchler-Bauer <i>et al.</i> 2011)
ClustalW2	Sequenzalignment; Berechnung der Konserviertheit benachbarter Proteine	(Thompson <i>et al.</i> 1994)
CSS-Palm 3.0	Suche nach Palmitoylierungssequenzen	(Ren <i>et al.</i> 2008)
Cyana 3.0	Berechnung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins anhand NMR-Ergebnissen	(López-Méndez und Güntert 2006)
DualFlow TM	Systemsoftware für BioRad FPLC	BioRad, Hercules
FigTree 1.3.1	Darstellung phylogenetischer Bäume	(Rambaut 2009)
Jalview	Online-tool zur Darstellung und Bearbeitung von multiplen Sequenzalignments	www.ebi.ac.uk
kernlab & randomForest	Software für Experimente maschinellen Lernens	(Breiman 2001)
MUSCLE align	Online-tool für multiple Sequenzalignments	www.ebi.ac.uk
OligoCalc	Berechnung verschiedener Parameter bei der Erstellung von Primern	(Kibbe 2007b)
ORFFinder	Durchsuchen von DNA-Sequenzen nach offenen Leserastern	Tatusov & Tatusov, 2009
PHYLPsuite 3.6	phylogenetische Studien	Felsenstein, 2005
PhyML 3.0	phylogenetische Berechnungen nach der <i>Maximum Likelihood</i> Methode	(Guindon <i>et al.</i> 2005)
T-coffee	Sequenzalignment	(Notredame <i>et al.</i> 2000)
tBLASTn	Suche nach PPIasen in Metagenomen	(Johnson <i>et al.</i> 2008)
Theseus 1.2.1	Überlagerung von Struktur-Ensembles an ihren Sekundärstrukturelementen (<i>Yasara-suite</i>)	Theobald & Wuttke, 2006
Topspin 2.1/3.0	Prozessierung von NMR-Spektren, Systemsoftware NMR-Spektrometer	Bruker, Fällanden
Unicorn 5.1	Systemsoftware für Äcta ^{FPLC}	GE Healthcare, Solingen
Yasara Twinset	Erstellen von homologiebasierten Strukturmodellen, <i>water refinement</i> gerechneter Strukturen, Darstellung und visuelle Bearbeitung von Proteinstrukturen	(Krieger <i>et al.</i> 2002)

2.9 DNA-basierte Methoden

2.9.1 Anzucht genetisch veränderter *E.coli*

In dieser Arbeit wurde als Anzuchtmedium für Isotopenmarkierungsexperimente und als Wachstumsmedium für Plasmidvektorpräparationen einfaches LB-Medium (Tabelle 2.4) verwendet. In der Regel wurden die Kulturen als Übernacht-Kulturen gehandhabt. Für das Animpfen des Nährmediums wurden entweder Gefrierkulturen, welche bei -70 °C (0) aufbewahrt wurden, oder bereits vorselektierte Bakterienkulturen von LB-Platten (Tabelle 2.4) verwendet. Die Medien wurden je nach Verwendungszweck in verschiedenen Mengen (5 ml–1 l) vorgelegt, beimpft und anschließend bei 37 °C im Schüttler (Tabelle 2.1) bei 180 rpm (*rounds per minute*) bis zur gewünschten Zelldichte inkubiert.

2.9.2 Bestimmung der Zelldichte durch Photometrie

Zur Bestimmung der Zelldichte wurde ein Tischphotometer von Eppendorf verwendet (Tabelle 2.1). Es wurde eine 1 ml-Probe der Bakteriensuspension gegen eine 1 ml-Probe des verwendeten Nährmediums gemessen (*blank*). Gemessen wurde die optische Dichte bei 600 nm (OD600).

2.9.3 Plasmidvektorpräparation

Je nach benötigter Menge an Vektor-DNA wurden zwei verschiedene Präparationsgrößen angewandt (5 ml oder 100 ml). Als Ausgangsmaterial dienten den Zielvektor enthaltende *E. coli*, welche je nach Maßstab der Präparation (*Mini* oder *Midì*) über Nacht angezogen und am nächsten Morgen mit Hilfe der Tischzentrifuge (Tabelle 2.1) (20 min; 4000 x g) pelletiert wurden. Die Präparation wurde gemäß dem Handbuch des verwendeten Präparations-Kits durchgeführt (Tabelle 2.2). Die Konzentration der DNA wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie (Tabelle 2.1) ermittelt. Zum einen wurde hierfür das Tischphotometer mit entsprechenden UV-Küvetten, zum anderen das genauere *NanoDrop* verwendet. Die gewonnene DNA kann dann beliebig lange in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -20 °C aufbewahrt werden.

2.9.4 DNA-Restriktion mittels Restriktionsenzymen

Zu Beginn dieser Arbeit wurden vor allem Enzyme der Firma NEB (Tabelle 2.7) verwendet. Diese wurden im Laufe der Arbeit durch die *FastDigest*-Linie von Fermentas ersetzt. Wie der Name schon sagt, liegt der Unterschied vor allem in der Reaktionsgeschwindigkeit. Während ein Verdau mit NEB-Enzymen in der Regel zwei Stunden Inkubationszeit bei 37 °C im Heizblock (Tabelle 2.1) benötigt, reduziert sich diese Zeit mit den *FastDigest*-Restriktionsendonukleasen auf bis zu fünf Minuten. Zudem arbeiten alle *FastDigest*-Enzyme im selben Reaktionspuffer, was sequentielle Verdauexperimente unnötig macht. Jedes Enzym wird mit einem 10-fach Reaktionspuffer geliefert, zudem wird die Ziel-DNA (etwa $2\text{ }\mu\text{g}/20\text{ }\mu\text{l}$ -Ansatz), die verwendeten Enzyme ($1\text{ }\mu\text{l}/20\text{ }\mu\text{l}$ -Ansatz) und je nach Enzym BSA (Tabelle 2.3) als

Reaktionsstabilisator (0,5 µl/20 µl-Ansatz) benötigt. Der Ansatz wird mit ddH₂O aufgefüllt. Die Größe des Ansatzes hängt von der benötigten DNA-Menge ab (20 µl-100 µl).

2.9.5 Fragmentlängenanalyse mittels Agarose-Gel

Je nach zu erwartender Fragmentlänge verwendet man Agarosegele verschiedener Konzentration (Tabelle 2.10). Die Agarose wird in TAE- bzw. TBE-Puffer (Tabelle 2.4) gelöst, anschließend in der Mikrowelle erhitzt bis keine Schlieren mehr zu sehen sind und schließlich in die Form gegossen. Kurz vor dem Gießen wird ein DNA-färbendes Reagenz (z. B.: Ethidiumbromid; Tabelle 2.3) zugegeben.

Tabelle 2.10: Fragmentlänge und Agarosekonzentration

Fragmentlänge	5 kB– 60 kB	1 kB– 20 kB	0,8 kB– 10 kB	0,5 kB– 7 kB	0,4 kB– 6 kB	0,2 kB– 3 kb	0,1 kB– 2 kB
Agarose- konzentration	0,3 %	0,6 %	0,7 %	0,9 %	1,2 %	1,5 %	2,0 %

Das ausgekühlte Gel wird in die, mit dem entsprechenden Puffer gefüllte, Gelkammer (Tabelle 2.1) gesetzt und die Taschen mit DNA-Proben und Markerlösungen befüllt. Die Proben wurden vorher mit Laufpuffer (z. B.: 6x *Orange G*) (Tabelle 2.3) versetzt. Die Gelkammer wird an einen Spannungsgenerator (Tabelle 2.1) angeschlossen. Eine konstante Stromstärke von 90 mA sorgt für die Auftrennung der Fragmente. Nach dem Lauf kann das Gel mittels UV-Licht analysiert und auf einer Photobank (Tabelle 2.1) dokumentiert werden.

2.9.6 Gelextraktion

Um durch ein Gel aufgetrennte DNA-Fragmente weiterzuverwenden, muss man diese aus der Gelmatrix aufreinigen. Zu diesem Zweck schneidet man die entsprechenden Banden mit einem Skalpell aus, wiegt das Gelstück und extrahiert die darin enthaltene DNA gemäß dem Handbuch des verwendeten Kits (Tabelle 2.2). Mit Hilfe desselben Kits kann man auch DNA-Lösungen von störenden Zusätzen befreien.

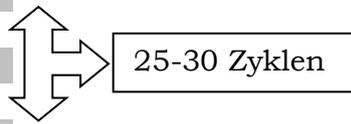
2.9.7 Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels PCR

In allen PCR-Applikationen ist es notwendig, das verwendete Primerpaar bezüglich Schmelztemperatur und etwaiger Sekundärstrukturbildungsmöglichkeiten aufeinander abzustimmen. Hierfür hat sich die online verfügbare Software *OligoCalc* (Kibbe 2007a) als hilfreich erwiesen. Auch die Wahl der DNA-Polymerase (Tabelle 2.7) ist entscheidend. Die am häufigsten verwendeten Enzyme sind Taq (aus *Thermus aquaticus*) und Pfu (aus *Pyrococcus furiosus*). Die beiden unterscheiden sich vor allem in Tempo und Fehlerhäufigkeit. Taq ist hierbei schneller und ungenauer, Pfu langsamer, aber genauer. Für die Durchführung derartiger Versuche wurden sogenannte PCR-Cycler (Tabelle 2.1) und besonders dünnwandige Reaktionsgefäße

verwendet. PCR-Produkte konnten direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert werden.

Tabelle 2.11: Verwendetes PCR-Programm

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
Deckeltemperatur	95°C	
Initiale Denaturierung	95°C	5 Minuten
Aufschmelzen	95°C	30 Sekunden
Paarung (<i>annealing</i>)	65°C	45 Sekunden
Elongation	72°C	1 Minute
Finale Elongation	72°C	10 Minuten



2.9.8 Ligation

Hierfür wurde T4-Ligase (Tabelle 2.7) verwendet. Die geschnittenen DNA-Fragmente wurden vor der Ligasereaktion im Rotationskonzentrator (*SpeedVac*) (Tabelle 2.1) eingedampft und anschließend in ddH₂O resuspendiert. Ligationen wurden in 20 µl-Ansätzen durchgeführt. Das Vektor/Fragment-Verhältnis betrug 1:3. Neben 10-fach-Ligasepuffer und 1 µl/20 µl Enzym wurde dem Ansatz noch das von der Ligase benötigte ATP (Adenosintriphosphat) zugegeben (0,025 M). Der Ansatz wurde über Nacht bei 16 °C im Heizblock (Tabelle 2.1) inkubiert. Es ist möglich die Inkubationszeit durch Erhöhung der Temperatur zu verkürzen. Die ligierten DNA-Fragmente konnten direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert werden.

2.9.9 Herstellung kompetenter Zellen

Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Arten kompetenter *E. coli*: chemisch kompetente und elektrokompente (Tabelle 2.5).

Chemische Kompetenz:

Der Expressionsstamm BL21(DE3)-T1^R (Tabelle 2.5) erlangt nur sehr schwer Elektrokompentenz, daher wurde er in dieser Arbeit ausschließlich chemisch transformiert. Zunächst wurde eine 10 ml-Übernachtskultur angesetzt und mit dieser am Folgetag 200 ml LB-Medium (Tabelle 2.4) einprozentig angeimpft. Nachdem diese Kultur bis zu einem OD₆₀₀ von 0,6 angezogen worden war, wurde sie in vier 50 ml-Falcons überführt und in der Tischzentrifuge (Tabelle 2.1) (4 °C; 5 min; 3000 rpm) pelletiert. Nachdem der Überstand verworfen war, wurde das Pellet jedes Falcons in 45 ml eiskalter 0,5 M CaCl₂-Lösung (Tabelle 2.4) resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nachdem die Lösung erneut, wie oben beschrieben, pelletiert und das Pellet in 2 ml 0,5 M CaCl₂-Lösung resuspendiert worden war, wurde die Bakteriensuspension in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße zu 50 µl aliquotiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert (Tabelle 2.1).

Elektrokompetenz:

Für die Herstellung elektrokompetenter Zellen werden 500 ml *Nutrient*-Medium (Tabelle 2.4) einprozentig mit der entsprechenden Übernachtskultur angeimpft und im Schüttelinkubator (Tabelle 2.1) bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 kultiviert. Nach einer 15-30 minütigen Inkubation auf Eis, wird die Suspension vorsichtig pelletiert. Das Zellpellet wird in 500 ml kaltem ddH₂O resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 250 ml kaltem ddH₂O aufgenommen und wieder zentrifugiert. Anschließend wird der *E. coli*-Niederschlag in 20 ml 10 % Glycerol resuspendiert, zentrifugiert und schließlich in 0,5 ml 10 % Glycerol aufgenommen. Zuletzt wird die Bakteriensuspension in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße zu 50 µl aliquotiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -70 °C (Tabelle 2.1) gelagert.

2.9.10 Transformation

Unter Transformation versteht man die Aufnahme freier DNA durch kompetente Bakterien. Man unterscheidet chemische Transformation und Elektroporation.

Chemische Transformation:

Ein 50 µl-Aliquot chemisch kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der DNA (meist 5 µl bzw. 15 µl Ligationsansatz) wurde die Bakteriensuspension für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch für 45 Sekunden auf 42 °C erhitzt, kurz im Eisbad abgekühlt und mit 250 µl LB-Medium (Tabelle 2.4) versetzt. Der Ansatz wurde dann im Heizschüttler (Tabelle 2.1) eine Stunde bei 37 °C und 300 rpm kultiviert. Die angereicherte Bakteriensuspension wurde schließlich auf LB-Platten (Tabelle 2.4) mit dem entsprechenden Selektionsmarker (Tabelle 2.3) ausplattiert.

Elektroporation:

Die Elektroporationsküvetten wurden vor jeder Transformation vorgekühlt und erst dann ein 50 µl-Aliquot elektrokompetenter Zellen (Tabelle 2.5) auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe der DNA (20 pg) wurde der Ansatz sanft gemischt und für eine Minute auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde dann in die vorgekühlten Küvetten gefüllt und mit dem Programm EC2 elektroporiert. Direkt im Anschluss wurden 300 µl vorgewärmtes SOC-Medium (Tabelle 2.4) zugegeben und alles zusammen im Heizschüttler (Tabelle 2.1) für eine Stunde bei 37 °C und 300 rpm kultiviert. Die angereicherte Bakteriensuspension wurde schließlich auf LB-Platten (Tabelle 2.4) mit dem entsprechenden Selektionsmarker ausplattiert. Sequenzierung

Alle Sequenzierungen während dieser Arbeit wurden von der Firma GATC in Regensburg, nach der Methodik von Sanger (Sanger *et al.* 1973) durchgeführt.

2.10 Proteinbiochemische Methoden

2.10.1 Expressionstest

Nachdem das Vektorkonstrukt erstellt und in den entsprechenden Bakterienstamm transformiert (2.9.10) wurde, muss ein Expressions- und Löslichkeitstest durchgeführt werden, um die Bedingungen zu ermitteln, bei welchen die Zielproteinausbeute maximal ist. Zu diesem Zweck wurde der transformierte Stamm über Nacht angezogen. Mit der daraus resultierenden Kultur wurden 100 ml LB-Medium beimpft und bis zu einem OD₆₀₀ von 0,8 kultiviert. Nach der Induktion mit 1 mM-3 mM IPTG wurde das Medium aufgeteilt und in Bezug auf Temperatur und Dauer der Expression unterschiedlich behandelt. Es wurden Proben vor der Induktion und von jeder Inkubationsbedingung genommen und durch Sonifikation (Tabelle 2.1) aufgeschlossen. Danach wurden lösliche Bestandteile von den unlöslichen durch Zentrifugation (14000 rpm; 4 °C; 60 min) getrennt. 20 µl Überstand wurde mit derselben Menge SDS-Probenpuffer (Tabelle 2.4) vermischt und aufgeköcht (95 °C; 5 min). Die Pellets wurden in 0,5 ml 1 x PBS resuspendiert, danach wurden 20 µl dieser Lösung mit derselben Menge SDS-Probenpuffer vermischt und aufgeköcht (95 °C; 5 min). Von allen Proben wurden 10 µl auf ein SDS-Gel (Tabelle 2.4) aufgetragen und verglichen.

25 °C	25 °C	25 °C
3 Stunden	5 Stunden	über Nacht
30 °C	30 °C	30 °C
3 Stunden	5 Stunden	über Nacht
37 °C	37 °C	37 °C
3 Stunden	5 Stunden	über Nacht

Tabelle 2.12 beschreibt ein Beispiel für verschiedene Expressionsbedingungen. Die Bedingungen mit der besten Ausbeute an löslichem Protein wurden für Reinigungen im größeren Maßstab gewählt. Für das Protein NmPin waren dies 5 Stunden über Nacht.

2.10.2 Expression von unmarkiertem Protein

Um unmarkiertes Protein zu erhalten, wurde eine 50 ml-Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstamms in LB-Medium (2.9.1) angezogen. Mit dieser Kultur wurde am Folgetag 1 liter LB-Medium (Tabelle 2.4) zweiprozentig angeimpft und bis zur OD₆₀₀ von 0,8 bei 37 °C inkubiert. Danach wurde 1 mM-3mM IPTG (Tabelle 2.3) zugegeben um die Expression zu starten. Die Expression erfolgte mit den in einem Expressionstest (2.10.2) ermittelten Bedingungen. Nach der Expression wurde die Kultur in großen Zentrifugationsbechern für 20 Minuten (5500 x g; 4 °C) in der Standzentrifuge (Tabelle 2.1) pelletiert, das Pellet in 1 x PBS resuspendiert und

schließlich in 50 ml-Falcons überführt. Das Pellet konnte direkt aufgeschlossen oder bei -20 °C für mehrere Monate gelagert werden.

2.10.3 Expression von markiertem Protein mittels Spar-Präp

In dieser Arbeit wurden Proteine mit ¹³C und ¹⁵N markiert. Zu diesem Zweck wurden die Bakterien in Minimalmedium (M9-Medium) (Tabelle 2.4) kultiviert. Als einzige Stickstoffquelle wurde markiertes Ammoniumchlorid (¹⁵NH₄Cl), als einzige Kohlenstoffquelle markierte Glucose (¹³C₆H₁₂O₆) verwendet (Tabelle 2.3). Um den Bakterien das Wachstum zu erleichtern, wurde die sogenannte Spar-Präparation angewendet. Hierfür wird eine 20 ml-Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstamms in LB-Medium (Tabelle 2.4) angezogen. Mit dieser Kultur wurden am Folgetag 0,3 Liter LB-Medium zweiprozentig angeimpft und bis zur OD₆₀₀ von 0,6 bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension in Zentrifugenbecher überführt und in der Tischzentrifuge (4 °C; 5 min; 3000 rpm) vorsichtig pelletiert. Das Pellet wurde in Minimalmedium resuspendiert und mit der erhaltenen Suspension 1 Liter M9-Medium (Tabelle 2.4) auf eine OD₆₀₀ von 0,15 inokuliert. Dieses Medium wurde wie in 2.10.2 beschrieben behandelt.

2.10.4 Zellaufschluss

Der erste Schritt der Proteinaufreinigung ist der Aufschluss des in 2.10.2 oder 2.10.3 erhaltenen Bakterienpellets. Das Pellet wurde auf Eis aufgetaut, mit einer Spatelspitze Lysozym (Tabelle 2.7) und 1 µl RNase H versetzt und für zwei Stunden bei 4 °C inkubiert. Dadurch wurden die Zellwände der Bakterien geschwächt. Für den Aufschluss wurde eine von zwei unterschiedlichen Methoden verwendet:

Sonifikation:

Für den Aufschluss durch Ultraschall wurde der Bandelin Sonoplus HD2200 (Tabelle 2.1) verwendet. Die mit Lysozym behandelte Bakteriensuspension wurde mit zehn einsekündigen Intervallen sonifiziert (60 % Leistung). Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Zwischen den Durchgängen wurde die Lösung auf Eis gekühlt und mit eisgekühltem 1 x PBS (Tabelle 2.4) verdünnt (Endvolumen: 120 ml-130 ml). Der Aufschluss wurde bis zur Weiterverarbeitung auf Eis aufbewahrt.

Druckaufschluss:

Um Zellen durch Überdruck aufzuschließen, wurde der Microfluidics *Mikrofluidizer* M-110L (Tabelle 2.1) zusammen mit der H10Z-Druckkammer verwendet. Die Anlage befand sich zwischen den Anwendungen in Isopropanol. Nachdem dieser mit reichlich Wasser entfernt wurde, wurde das Gerät mit 1 x PBS (Tabelle 2.4) gefüllt. Mittels eines speziellen Einfülltrichters wurde die mit Lysozym behandelte Bakteriensuspension in das Gerät gegeben, in der Druckkammer mit etwa 700 bar Druck behandelt und schließlich in einem Becherglas wieder gesammelt. Diese Prozedur wurde mehrfach wiederholt. Zuletzt wurde die Anlage mit 1 x PBS gespült um auch Reste des

Aufschlusses nicht zu verlieren (Endvolumen: 120 ml-130 ml). Der gewonnene Aufschluss wurde in zwei 70 ml Ultrazentrifugenröhrchen gegeben und mit Hilfe einer Waage (Tabelle 2.1) auf das hundertstel Gramm genau tariert. Anschließend erfolgte eine 90 minütige (30000 x g; 4 °C) Pelletierung in der Ultrazentrifuge (Tabelle 2.1). Der Überstand wurde mit einer Glaspipette vorsichtig abgenommen, durch Filtration von etwaigen Schwebstoffen befreit und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis aufbewahrt.

2.10.5 Affinitätschromatographie mittels GST-tag

Alle Affinitätschromatographien dieser Arbeit wurden an zwei FPLC-Anlagen durchgeführt, die BioRad *DuoFlow* und die Äkta_{FPLC} (Tabelle 2.1). Für die GST-Reinigung wurden je nach Menge des zu reinigenden Proteins Säulen der Firma GE Healthcare in verschiedenen Größen verwendet.

Tabelle 2.13: Verwendetes GST-Reinigungsprotokoll (20 ml Säule)

Schritt (Startvolumen)	Puffer	Volumen	Geschwindigkeit
1 (0 ml)	Waschpuffer	100 ml	3 ml/min
2 (100 ml)	QuadTec Zero Baseline (Nulllinie der Detektionslampe)		
3 (100 ml)	Auftrag (Probe)	120 ml	1 ml/min
4 (220 ml)	Waschpuffer	100 ml	2 ml/min
5 (320 ml)	Hochsalzpuffer	100 ml	2 ml/min
6 (420 ml)	Waschpuffer	100 ml	2 ml/min
7 (520 ml)	Elutionspuffer	100 ml	2 ml/min
Sammelfenster: 520 ml–620 ml (Elution); Fraktionsgröße 2 ml			

Wie in Tabelle 2.13 zu sehen, wurde zu Beginn der Reinigung die Säule mit etwa fünf Säulenvolumen Waschpuffer (1 x PBS; pH 8,0) gespült und äquilibriert. Danach wurden alle von der Detektionslampe (Tabelle 2.1) (UV/Vis) erfassten Spektrallinien auf null gesetzt. Dem Beladen der Säule folgten mehrere Waschschriffe, die alle dazu dienten, unspezifisch gebundene Proteine von der Säulenmatrix zu waschen. Zum Schluss wurde das rekombinante GST-Protein mittels Glutathionüberschuss (Elutionspuffer mit 6 mg/ml Glutathion, Tabelle 2.4) von der Säule gelöst und durch einen Fraktionator in 2 ml-Aliquots gesammelt. Mit Hilfe der Absorptionsspektren, die während der Reinigung permanent aufgenommen wurden, konnte man nun erkennen, in welchen Glasröhrchen sich das gereinigte Protein befand. Dieses wurde gesammelt und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis aufbewahrt. Die benutzten Säulen wurden mit 6 M Guanidinium-Hydrochlorid (Tabelle 2.4) regeneriert.

2.10.6 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration des in 2.10.5 gesammelten Proteins wurde mittels Bradford bestimmt. Hierfür wurde 1 µl der Proteinlösung mit 999 µl Bradfordreagenz (Tabelle 2.4) gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde dieses Gemisch in eine Einmal-Küvette gegeben und in einem geeichten und mit Bradfordreagenz genullten Tischphotometer gemessen. Bei Proben, deren Proteinkonzentration sehr genau bestimmt werden musste, wurde das *NanoDrop* (Tabelle 2.1) verwendet.

2.10.7 PreScission-Verdau

Pro 6 mg GST-Zielprotein wurde der Lösung 1 µl *PreScissionTM*-Lösung (16 mg/ml) zugegeben. Die *PreScissionTM* Protease ist ein künstlicher Hybrid der Protease des Rhinovirus 3C und GST (Walker *et al.* 1994), der die Erkennungssequenz LEVLFQ/GP schneidet (Cordingley *et al.* 1990). Das Gemisch wurde mit Hilfe von Zentrifugons (Tabelle 2.5) (10 kDa Ausschluss) in der Tischzentrifuge (Tabelle 2.1) (4 °C; 3000 x g) bis auf 2 ml einkonzentriert. Der Verdau wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert.

2.10.8 Gelfiltration

Alle Gelfiltrationen dieser Arbeit wurden an zwei FPLC-Anlagen durchgeführt, die BioRad DuoFlow und der Äkta_{FPLC} (Tabelle 2.1). Es wurden verschiedene Säulenmodelle der HiLoadTM Superdex-Reihe von GE Healthcare (Tabelle 2.5) verwendet. Die Matrix dieser Säulen besteht aus einer Mischung aus hochvernetzter Agarose und Dextran. Der Dextrangehalt bestimmt die Maschenweite.

Tabelle 2.14: Gelfiltrationsprotokoll (Superdex 75 26/60)

Schritt (Startvolumen)	Puffer	Volumen	Geschwindigkeit
1 (0 ml)	entgastes Wasser	340 ml	1 ml/min
2 (340 ml)	Gelfiltrationspuffer	340 ml	2,2 ml/min
3 (680 ml)	Zero Baseline (Nulllinie der Detektionslampe)		
4 (680 ml)	Umschalten der Flussrichtung von Spülen zu Injektion (Spülen des Injektion-loop; Auftrag der Probe auf die Säule)		
5 (680 ml)	Gelfiltrationspuffer	20 ml	2,2 ml/min
6 (700 ml)	Umschalten der Flussrichtung von Injektion zu Spülen		
7 (700 ml)	Gelfiltrationspuffer	350 ml	2,2 ml/min
8 (1050 ml)	entgastes Wasser	340 ml	2,2 ml/min
9 (1390 ml)	20 % Ethanol	340 ml	1 ml/min
Sammelfenster: 780 ml – 1020 ml (Schritt 7); Fraktionsgröße 3 ml			

Bei allen Schritten der Gelfiltration wurde darauf geachtet, dass die Säulen keine Luft einschließen, daher war es nötig, alle Puffer und Lösungen mit einer Vakuumpumpe zu entgasen. Die Probe wurde vor Start des Programms mittels einer Spritze in einen passenden Injektions-loop gegeben.

Wie in Tabelle 2.14 abgebildet, begann jeder Lauf damit, das 20 prozentige Ethanol (Tabelle 2.4), in dem die Säulen gelagert werden, von der Säule zu waschen. Nach der anschließenden Äquilibration mit Gelfiltrationspuffer (Tabelle 2.4) wurden die Absorptionsspektren auf null gesetzt. Die Probe wurde mit Gelfiltrationspuffer vom Injektions-*loop* auf die Säule aufgetragen und dann, ebenfalls mit Gelfiltrationspuffer, auf der Säule aufgetrennt. Der Durchfluss wurde während der Auftrennung in Glasröhrchen gesammelt, die Säule anschließend gewaschen und zur Lagerung in 20 prozentiges Ethanol gesetzt. Das erhaltene reine Zielprotein wurde mit Hilfe von Zentrifugations (Tabelle 2.5) (3 kDa Ausschluss) in der Tischzentrifuge (4 °C; 3000 x g) bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml einkonzentriert. Das Protein wurde bei 4 °C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt oder direkt für die NMR-Spektroskopie vorbereitet (2.12.1).

2.10.9 Gelfiltration mit vorgeschalteter GSH-Säule

Da die Ausbeuten an GST-Zielprotein pro Liter Bakterienkultur mehrere hundert Milligramm betragen und die größte vorhandene Gelfiltrationssäule, die HiLoad™ Superdex 75 26/60, nur etwa 100 mg Protein fassen kann, wurde nach dem *PreScission™*-Verdau (2.10.7) eine abgewandelte Form der Gelfiltration angewandt. Hierbei wurde direkt vor die Gelfiltrationssäule eine 200 mg GST-Protein fassende Säule (Tabelle 2.5) (GSTPrep FF 16/60; GE Healthcare) geschaltet. Damit wurde das abgeschnittene GST abgefangen und es gelangte beinahe ausschließlich Zielprotein auf die Gelfiltrationssäule (Tabelle 2.6). Die praktische Durchführung war wie in 2.10.8 beschrieben. Dies führte zu Ausbeuten von bis zu 120 mg Zielprotein pro Liter Bakterienkultur.

2.10.10 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Während dieser Arbeit wurden für Standardproben das System nach Laemmli (Laemmli 1970), für Proben, bei welchen Proteine mit kleinen Massen (5-20 kDa) von Interesse waren, das System nach Schagger & Jagow (Schagger und von Jagow 1987) verwendet. Die Proteine wurden nach der Auftrennung durch das Zusammenspiel von Coomassie- und Entfärberlösung (Tabelle 2.4) sichtbar gemacht. Die Banden der untersuchten Proteinproben konnten mit speziellen Markern (2.5) verglichen werden. Das Färben fand entweder direkt nach der Auftrennung oder nach der Übertragung eines Teils der Proteine auf eine Trägermembran (Tabelle 2.6) statt.

2.10.11 Semi-Dry Western-Blot

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Nitrozellulosemembranen (Tabelle 2.6) und die *Semi-Dry* Methodik verwendet. Der Aufbau erfolgte wie in Abbildung 2.5 zu sehen. Alle Elemente wurden vor dem Aufbau in Transferpuffer (Tabelle 2.4) eingeweicht. Um Luftblasen zu vermeiden, wurde das System nach Aufbringen jeder Lage mit einem 15 ml Plastikfalcon kompaktiert. Der Transfer fand bei konstant 3,5 mA/cm² Gel statt und dauerte eine Stunde.

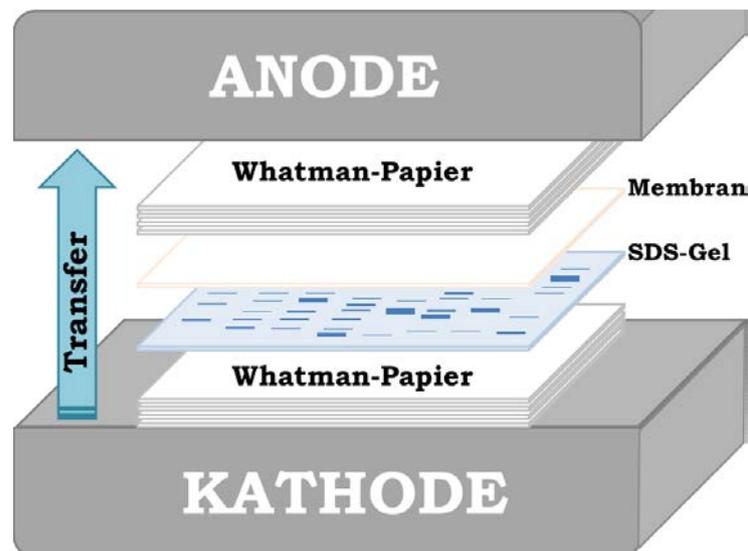


Abbildung 2.5: Schematischer Aufbau eines *Semi-Dry*-Blots

Der Transfer erfolgt von Kathode zu Anode. Das Gel-Membran-System ist eingebettet in mit Transferpuffer getränkte Whatman-Papiere.

Nach dem Blotten wurden die Membran in 10 % Milchpulver/TBST 150 (Tabelle 2.4) für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C geblockt. Das Gel wurde mit Coomassie (Tabelle 2.4) gefärbt und dokumentiert. Zur Erkennung des Zielproteins wurde ein polyklonaler Antikörper (2.6) verwendet, dessen ideale Gebrauchskonzentration mittels *Dot-Blot* (2.10.12) ermittelt wurde. Die Gebrauchsverdünnung des Erstantikörpers betrug 1:1000, die des Zweitantikörpers 1:2000. Die Antikörper wurden beide in 3 % Milchpulver/TBST 150 (Tabelle 2.4) gelöst. Zwischen den verschiedenen Schritten wurde der Blot je dreimal gewaschen, zunächst mit TBST 500 (Tabelle 2.4), danach zweimal mit TBST 150 (Tabelle 2.4). Der Zweitantikörper war an HRP (2.6) gekoppelt, so dass zur Entwicklung ein ECL-Kit (Tabelle 2.2) gemäß den Vorgaben verwendet wurde. Der belichtete Film wurde in einem Entwickler finalisiert. Für einige Western Blots wurden Marker (2.5) verwendet, welche durch Sekundärantikörper detektiert werden können und so auch auf dem Film sichtbar waren.

2.10.12 Dot-Blot

Um die Sensitivität des polyklonalen Antikörpers (2.6) gegen das Zielprotein und somit die idealen Gebrauchsbedingungen für den Western Blot herauszufinden, wurde der Antikörper mittels *Dot-Blot* getestet. Dabei wurden je 2 μl verschiedener Konzentrationen rekombinanten Zielproteins auf eine Nitrozellulosemembran (Tabelle 2.6) aufgebracht. Die Proben wurden so angeordnet, dass die Membran anschließend so in Streifen geschnitten werden konnte, dass jeder Streifen alle Konzentrationen an Protein in absteigender Form enthielt (Abbildung 2.6).

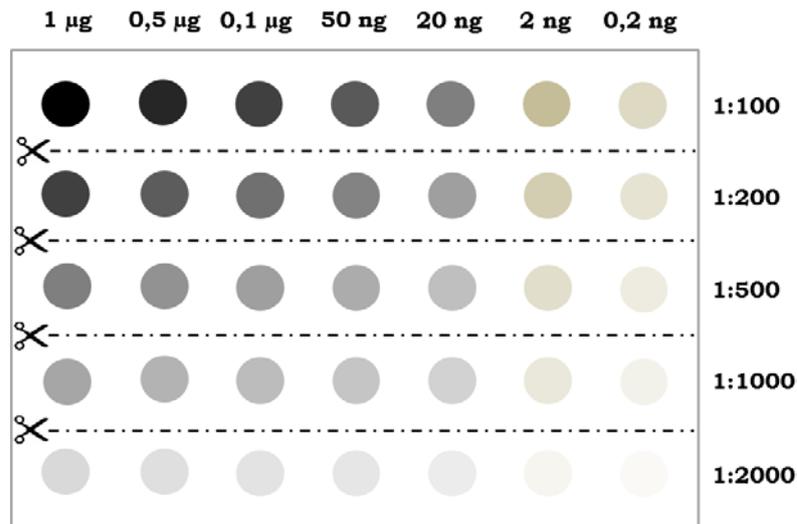


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung eines *Dot Blots*

Auf die Membran wurden (streifenweise) verschiedene Mengen Protein aufgebracht. Diese Membran wurde in fünf Streifen geschnitten. Jeder Streifen wurde mit einer anderen Konzentration Erstantikörper behandelt. Diese Prozedur wurde wiederholt und so auch die Zweitantikörperkonzentration variiert (1:2000 und 1:5000).

Es wurden die Bedingungen gewählt, welche die höchste Sensitivität bei möglichst minimalem Hintergrund aufwiesen.

2.11 Phylogenie

2.11.1 Übersicht über das PPIase-Repertoire der Prokaryoten

Zunächst wurde eine Liste aller vollständigen und fast vollständigen Genome der Domäne Archaea erstellt. Fast vollständige Genome sind zum Beispiel große, mehrere Kilobasen lange *contigs* (*contiguous sequence*, engl: zusammenhängende Sequenz) die aus sogenannten *shotgun sequencing* (Schrotschusssequenzierung)-Ansätzen stammen. Beim *whole genome shotgun sequencing* wird DNA durch Scherung zerteilt, die Bruchstücke anschließend sequenziert und mit bioinformatischen Mitteln überlappende Enden gesucht. Informationen über Genome wurden der NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)-Genomdatenbank entnommen (Sayers *et al.* 2012). Um die Genome nach verschiedenen PPIase-Typen zu untersuchen, mussten Proteine als Suchanfrage (*query*) definiert werden. Für alle in *E. coli* vorkommenden PPIasen wurde das *E. coli*-Homolog (1.2.1) gewählt: SlyD-typ-FKBP (GeneID: 947859), FkpA-typ-FKBP [GeneID: 947870], Trigger-Faktor [GeneID: 945081], Cyclophilin [GeneID: 949038], SurA [GeneID: 94481], Par10 [GeneID: 948285]. Als PrsA-*query* wurde der Vertreter aus *Staphylococcus aureus* [GeneID: 5560626], als NifM-*query* der Vertreter aus *Azotobacter vinelandii* [GeneID: 7759132] (1.2.1) gewählt. Die Suche erfolgte zum einen durch das Durchforsten der annotierten Proteine, zum anderen durch Verwendung von BLASTp (Tabelle 2.8). Positive Treffer, welche in den NCBI-Datenbanken bisher nicht annotiert wurden, wurden durch Vergleich mit der CD (*Conserved Domain*)-Datenbank bestätigt (Tabelle 2.8).

2.11.2 Suche nach archaealen Parvulinen des Par10-Typs

Diese Arbeit handelt in erster Linie von den archaealen Parvulinen. Alle diese PPIasen können dem Par10-Typ (1.2.1) zugeordnet werden, das bedeutet, sie besitzen keine N- oder C-terminalen Verlängerungen und bestehen aus einer einzelnen PPIC-Typ PPIase. Diese Art Parvulin wird im folgendem *sdPar* (*single domain Parvulin*) genannt. Neben den 106 bekannten Genomen der Archaea wurden auch genomische Bruchstücke vergangener Arbeiten, welche in den NCBI-Datenbanken *whole genome shotgun* (wgs) und *environmental samples* (env) abgelegt wurden, untersucht. Hierfür wurde tBLASTn (Tabelle 2.9) verwendet. Die Länge der gefundenen offenen Leseraster (*open reading frame*; ORF), wurde mit dem Programm *ORF Finder* (Tabelle 2.9) bestimmt. Zusätzlich wurde auch der genomische Kontext der Parvulin-Leseraster mit denselben Werkzeugen untersucht.

2.11.3 Vergleich der Konserviertheit benachbarter Genprodukte

Eine hohe evolutorionäre Konserviertheit ist Grundvoraussetzung, um ein Molekül als phylogenetischen Marker in Betracht zu ziehen. Eine Möglichkeit diese Konserviertheit zu testen, ist die, das zu überprüfende Gen mit seinen genetischen Nachbarn zu

vergleichen. Zu diesem Zweck wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Methoden angewendet:

ClustalW2-score:

Erstellt man ein Sequenzalignment zweier Proteinsequenzen mit ClustalW2 (Tabelle 2.9), so erhält dieses Pärchen einen sequenzlängenunabhängigen ClustalW2-score. Betrachtet man nun *contigs*, welche sowohl das Zielprotein als auch Homologe benachbarter Proteine codieren, so kann man Durchschnittswerte für den ClustalW2-score, den die homologen Proteine der untersuchten *contigs* untereinander aufweisen, ermitteln und vergleichen. Als Ausgangs-*contig* wurde das Genom von *Nitrosopumilus maritimus* hergenommen. In diesem Genom befinden sich in direkter Nachbarschaft zum, für diese Studie relevanten, Parvulingen, einige Gene, welche sich auch in mehreren Parvulingen-enthaltenden *contigs* wiederfinden: UbiA Prenyltransferase (UbiA); hypothetisches Protein mit unbekannter Funktion DUF2203 (DUF), hypothetisches Protein nmar_0940 (hyp), Pyridoxamin-5'-Phosphat-Oxidase-verwandtes Protein (PPOX) und DEAD/DEAH-box-enthaltendes Protein (DHCP). Alle diese Proteine waren auf mindestens fünf unterschiedlichen *contigs* kodiert.

Shannon Entropie:

Für die Berechnung der Shannon-Entropie wurden dieselben Sequenzen verwendet wie für die Ermittlung des ClustalW2-scores (siehe oben). Für das Alignment wurde allerdings *T-coffee* (Tabelle 2.9) verwendet. Die Shannon-Entropie für jedes multiple Sequenzalignment wurde mittels bio3d-Software (Tabelle 2.9) ermittelt und über alle Positionen gemittelt.

2.11.4 Phylogenie prokaryotischer sdPars

Die Suche nach archaealen und bakteriellen PPIC-Typ PPIasen ergab einen ersten Datensatz von 326 Proteinsequenzen. 16 Sequenzen enthielten N-terminale Verlängerungen, die, genau wie die eine C-terminale Erweiterung, aus der Berechnung genommen wurden. Das FKBP SlyD aus *Escherichia coli* wurde, aufgrund seiner abweichenden Primärsequenz bei struktureller Ähnlichkeit zu den Parvulinen, als sogenannte *outgroup* verwendet. Als *outgroup* bezeichnet man eine Sequenz, von der man erwartet, dass sie, aufgrund ihrer Primärsequenzunähnlichkeit, dem phylogenetischen Baum eine Basis gibt. Für das Sequenzalignment wurde *T-coffee* (Tabelle 2.9) verwendet. Die evolutionären Verhältnisse wurden nach dem *Maximum Likelihood*-Prinzip, unter Verwendung von PhyML 3.0 (Tabelle 2.9), mit 1000 *bootstraps* abgeschätzt. Als *bootstrap* bezeichnet man eine Neuberechnung der Baumtopologie nach, ersetzen zufälliger Stellen der Sequenzen. Je seltener sich eine Verzweigung des berechneten Baumes durch derartige Neuberechnungen verändert, desto größer ist seine Aussagekraft. Ein Übereinstimmungsbaum wurde mittels des Programms *consense* aus der PHYLIPsuite (Tabelle 2.9) erstellt und mit dem Programm

FigTree 1.3.1 (Tabelle 2.9) dargestellt. Nach der ersten Berechnung wurden Paraloge aus dem Datensatz entfernt. Ebenfalls wurden Parvuline aus Organismengruppen entfernt, in welchen diese Enzyme unterrepräsentiert erschienen, da dies auf Ereignisse horizontalen Gentransfers hindeuten könnte. Mit dem resultierenden Datensatz aus 241 Proteinsequenzen wurde die Rechnung und Darstellung des phylogenetischen Baums wiederholt.

2.11.5 Maschinelles Lernen

Zu Beginn der Experimente maschinellen Lernens wurden die Parvuline im Hinblick auf ihre proteinbasierten Parameter (Gasteiger *et al.* 2003) und ihre Oberflächenbeschaffenheit (Kabsch und Sander 1983) verglichen. Der in 2.11.4 erhaltene Datensatz von 241 Proteinsequenzen wurde verwendet, um eine lineare *Support Vector Machine* und einen *Random Forest* zu trainieren. Neben den N- und C-terminalen Verlängerungen wurde zusätzlich eine 15 Aminosäuren lange *loop*-Region aus den Sequenzen der Spezies *Photobacterium* entfernt, welche nur diese enthalten. Die verbleibenden Sequenzen wurden auf 92 Aminosäuren projiziert. Die Sequenzen wurden gemäß ihres Deskriptors, entweder Nettoladung oder Hydrophobizität, kodiert (Kawashima *et al.* 2008). Die kodierten Sequenzen wurden als *Input* für die Programme *kernlab* und *randomForest* (Tabelle 2.9) verwendet. Mit Hilfe von *Random Forests* kann man die Wichtigkeit einer Sequenzposition für den Klassifikationsprozess abschätzen, indem man Berechnungen erstellt bei welchen immer eine Sequenz nicht berücksichtigt wird. Je höher der Verlust an Klassifikationseffizienz durch einen fehlenden Rest ist, desto wichtiger ist er (*leave one out* Verfahren). Die Werte des *Random Forests*, betreffend Nettoladung und Hydrophobizität, wurden gemittelt und in drei Kategorien eingeteilt: hoch (> 2 %), mittel (1 %-2 %), schwach (0,6 %-1 %). Diese Kategorien wurden auf die Struktur des Parvulins aus *Cenarchaeum symbiosum* übertragen.

2.12 NMR-Spektroskopie

2.12.1 Probenvorbereitung

Alle Proben wurden mittels NAP-Säulchen (nach Anleitung) oder Zentrikons (Tabelle 2.6) in 50 mM Kaliumphosphat (pH 6,5) (Tabelle 2.4) umgepuffert. Die Proben wurden so angesetzt, dass ein Endvolumen von 0,6 ml erreicht wurde. Darin befanden sich 1 mM Protein (unmarkiert, ^{15}N -markiert oder ^{13}C - ^{15}N -markiert), 10 % (v/v) D_2O , 0,02 % (w/v) NaN_3 und 50 μM DSS (2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat). Zur Aufbewahrung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$, wurden die Proben in einer Christ-Lyophylle (2.1) gefriergetrocknet. Vor der Benutzung wurden die Proben entweder in einem 90 % H_2O /10 % (99,9 %) D_2O -Gemisch oder in 100 % D_2O gelöst. Die Proben wurden in 5 mm-*thinwall*-Probenröhrchen gegeben und sofort gemessen.

2.12.2 Messbedingungen

Alle NMR-spektroskopischen Messungen wurden an einem Bruker Ultrashield 700-NMR (2.1) bei konstanten Transmitterfrequenzen (^1H : 700,22 MHz; ^{15}N : 70.952676 MHz; ^{13}C : 176,070459 MHz) durchgeführt. Als Probenkopf fand ein inverser Tripleresonanz-Cryoprobekopf (700 MHz) Verwendung, dessen Gradientenspulen in allen drei Raumrichtungen aktiv abgeschirmt sind. Die konstante Messtemperatur von 300 K wurde bei allen Messungen über eine BVT3000-Kontrolleinheit (2.1) gesteuert. Die Wasserunterdrückung erfolgte bis auf wenige Ausnahmen durch die 3-9-19-WATERGATE-Pulsfolge (Piotto *et al.* 1992). Es wurden, bis auf eine Ausnahme (^{15}N -HSQC-NOESY, Pulsprogramm siehe Anhang), nur Pulsprogramme der Bruker Standardbibliothek verwendet. Als Feldfrequenz-Lock diente das der Probe zugesetzte D_2O , als externer Standard das DSS (2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat). Bis auf wenige Ausnahmen wurden alle Spektren im phasensensitiven Modus mit Quadraturdetektion in beiden Zeitdimensionen aufgenommen. Alle Spektren wurden traditionell mittels Flächen dargestellt (FnTYPE: *traditional [planes]*).

Tabelle 2.15 stellt eine Auflistung der meistverwendeten Pulse dar. Gezeigt werden die Observations- beziehungsweise Entkopplungspulse der drei verwendeten Kerne sowie die für die ^{13}C -Spektren verwendeten *shaped* Pulse. Tabelle 2.16 zeigt alle für die Strukturauflösung verwendeten Spektren und deren Standard-Aufnahmeparameter. Für alle Spektren, außer dem ^{15}N -HSQC-NOESY, wurden Pulsprogramme der Bruker Standard-Bibliothek verwendet. Das Pulsprogramm für das ^{15}N -HSQC-NOESY wurde lehrstuhlintern von Ana Messias geschrieben und befindet sich im Anhang (Tabelle 6.3). Da die Etablierung der 3D-NMR-Methodik ein Teil der Aufgabenstellung dieser Arbeit darstellt, wird auf spezielle, für einzelne Spektren entscheidende Aufnahmeparameter im Ergebnisteil gesondert eingegangen.

Tabelle 2.15: Auflistung der wichtigsten Pulse

Puls	Leistung (W)	Dauer (μ s)	Beschreibung	Spektren
p1	7,8239	13	^1H 90 °-Hochleistungspuls	alle
p21	89,492	35,5	^{15}N 90 °-Hochleistungspuls	^{15}N -Spektren
p3	40,617	13,5	^{13}C 90 °-Hochleistungspuls	^{13}C -Spektren
pcpd1	0,17596	60	^1H Entkopplungspuls über cpdprg1 (immer dipsi2)	HNCO; HNCACB
pcpd2	3,6535	100	^{13}C Entkopplungspuls über cpdprg2 (mlevsp180;garp)	^{13}C -HSQC; HCCH-Spektren
pcpd3	4,352	180	^{15}N Entkopplungspuls über cpdprg3 (immer garp)	alle HSQCs außer ^{13}C -HSQC
sp1	0,0039212	-	^1H 90 ° <i>shaped pulse</i> (H_2O on resonance)	HNCO; HNCACB
sp2	53,544	-	^{13}C 90 ° <i>shaped pulse</i> (C_{ali} on resonance)	HNCO; HNCACB
sp3	47,381	-	^{13}C 180 ° <i>shaped pulse</i> (C_{ali} on resonance)	HNCO; HNCACB; ^{13}C -HSQC-NOESY
sp5	47,381	-	^{13}C 180 ° <i>shaped pulse</i> ($\text{C}=\text{O}$ off resonance)	HNCO; HNCACB; HCCH-Spektren
sp8	53,544	-	^1H 90 ° <i>shaped pulse for time reversed pulse</i> (H_2O on resonance)	HNCO; HNCACB
sp23	0,022051	-	^1H 120 ° <i>shaped pulse</i>	sofast-HMQC
sp24	0,14237	-	^1H 180 ° <i>shaped pulse</i>	sofast-HMQC

Tabelle 2.16: Aufnahmeparameter NMR

SWH: spektrale Breite in Hz; O1, O2, O3: Transmitterfrequenz-Abstand der jeweiligen Dimension; TD: Zahl der realen Punkte in der jeweiligen Dimension; AQ-mod: Aufnahmemodus in der jeweiligen Dimension; NS: Anzahl der Experimentwiederholungen

Spektrum (Pulsprogramm)	F1					F2					F3					NS	Referenz
	Kern	SWH (Hz)	O1 (Hz)	TD	AQ-mod	Kern	SW (Hz)	O2 (Hz)	TD	AQ-mod	Kern	SW (Hz)	O3 (Hz)	TD	AQ-mod		
¹H-1D (zgpr)	¹ H	8417,51	3286,83	16834	DQD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-
2D-NOESY (noesygp19)	¹ H	10504,20	3291,23	512	States-TPPI	¹ H	10504,20	3291,23	2048	DQD	-	-	-	-	-	64	(Piotto <i>et al.</i> 1992)
2D-TOCSY (dipsi2phr)	¹ H	11203,60	3291,03	512	States-TPPI	¹ H	11160,71	3291,03	2048	DQD	-	-	-	-	-	64	(Cavanagh und Rance 1990)
2D-COSY (cosygp19)	¹ H	10504,20	3280,53	512	QF	¹ H	10504,20	3280,53	2048	DQD	-	-	-	-	-	48	(Derome und Williamson 1990)
¹⁵N-HSQC (hsqctf3gpsi2)	¹⁵ N	2838,43	8159,96	256	echo-anti-echo	¹ H	11261,26	3287,53	2048	DQD	-	-	-	-	-	64	(Palmer III <i>et al.</i> 1991)
sofast-HMQC (sfhmqc3gpph)	¹⁵ N	2696,51	8159,96	512	States-TPPI	¹ H	10504,20	3287,53	2048	DQD	-	-	-	-	-	4	(Schanda und Brutscher 2005)
¹³C-HSQC (hsqctgpsi)	¹³ C	27116,18	8627,45	512	echo-anti-echo	¹ H	11261,26	3287,53	2048	DQD	-	-	-	-	-	64	(Palmer III <i>et al.</i> 1991)
¹⁵N-HSQC-TOCSY (dipsihsqc3gpsi3d)	¹ H	11203,57	3288,23	128	States-TPPI	¹⁵ N	2767,48	8443,37	48	echo-anti-echo	¹ H	11160,71	3288,23	2048	DQD	8	(Schleucher <i>et al.</i> 1994)
¹⁵N-HSQC-NOESY (Ehnhsqcnoe)	¹⁵ N	2483,55	8372,42	140	nicht gesetzt	¹ H	10504,20	3287,90	300	nicht gesetzt	¹ H	10504,20	3287,90	1024	qsim	4	Ana Messias
HNCO (hncogpwg3d)	¹³ C	3889,18	30988,48	128	States-TPPI	¹⁵ N	2554,60	8479,25	40	States-TPPI	¹ H	9803,92	3328,15	2048	DQD	32	(Muhandiram und Kay 1994)
HNCACB (hncacbgpwg3d)	¹³ C	14086,19	6866,75	128	States-TPPI	¹⁵ N	2412,68	8443,37	40	States-TPPI	¹ H	10504,20	3277,03	2048	DQD	24	(Grzesiek und Bax 1992)
HCCH-TOCSY (hcchdigp3d)	¹ H	5601,79	3328,26	128	States-TPPI	¹³ C	13205,80	6866,79	64	States-TPPI	¹ H	11160,71	3328,26	2048	DQD	16	(Ikura <i>et al.</i> 1991)
HCCH-COSY (hcchcogp3d)	¹ H	5601,79	3329,45	128	States-TPPI	¹³ C	13205,80	6866,83	64	States-TPPI	¹ H	11160,71	3329,45	2048	DQD	32	(Ikura <i>et al.</i> 1991)
¹³C-HSQC-TOCSY (Aliphaten) (noesyhsqc3gpsi3d)	¹ H	9803,92	3333,00	160	States-TPPI	¹³ C	13381,86	6866,75	80	echo-anti-echo	¹ H	9803,92	3333,00	2048	DQD	16	(Marion <i>et al.</i> 1989)
¹³C-HSQC-TOCSY (Aromaten) (noesyhsqc3gpsi3d)	¹ H	9803,92	3333,00	128	States-TPPI	¹³ C	6690,94	23065,23	64	echo-anti-echo	¹ H	9803,92	3333,00	2048	DQD	16	(Marion <i>et al.</i> 1989)

2.12.3 Prozessierung

Das Programm Topspin 2.1/Topspin 3.0 (Tabelle 2.9) wurde nicht nur als Systemsoftware zur Aufnahme der Spektren, sondern auch zur Prozessierung verwendet. Die FIDs (*free induction decays*) wurden in jeder Dimension einer Fourier-Transformation (xfb: 2D; tf3, tf2, tf1: 3D) unterzogen. Als Filterfunktionen wurden $\pi/4$ - oder $\pi/2$ -verschobene Sinus- oder Sinusquadratfunktionen verwendet. Die Basislinienkorrektur erfolgte standardmäßig durch Subtraktion einer Polynomfunktion fünften Grades in jeder Dimension (abs: 2D; tabs3, tabs2, tabs1: 3D). Um Projektionen eines dreidimensionalen Spektrums prozessieren zu können, mussten dem Datensatz imaginäre Anteile zugefügt werden. Hierfür wurde die Hilbert-Transformation genutzt (xht2, xht1: 2D-*plane*). Die Spektren wurden geeicht und phasenkorrigiert. Da die Etablierung der 3D-NMR-Methodik ein Teil der Aufgabenstellung dieser Arbeit darstellt, wird auf spezielle für einzelne Spektren entscheidende Prozessierungsparameter im Ergebnisteil gesondert eingegangen. Auch auf die Auswertung der Spektren mit Hilfe der CCPN-*suite* 2.1 (Tabelle 2.9) wird im Ergebnisteil eingegangen.

2.12.4 Strukturrechnung

Nachdem das Rückgrat und die Seitenketten des Proteins, dessen Struktur ermittelt werden sollte, zugeordnet waren, wurde eine *shift list* erstellt. Diese und die Listen der Peaks (*peak lists*) aller NOE-Signale-enthaltenden Spektren wurden als Input für das Strukturrechnungsprogramm Cyana 3.0 (Tabelle 2.9) verwendet. Cyana ist wie in Abbildung 2.7 zu erkennen, ein Programm, welches Strukturrechnung und automatisiertes NOE-Assignment kombiniert. Im Gegensatz zu kartesischen Strukturrechnungsprogrammen wie CNS stellt Cyana das Protein als eine Reihe von Festkörpern dar, die über drehbare Verbindungen verknüpft sind. Hierbei werden nicht Koordinaten festgehalten, sondern Winkelspannweiten eben dieser drehbaren Verknüpfungen, diese nennt man Torsionswinkel (Abbildung 2.7C). Weitere Eingangsdaten für die Strukturrechnung entstammten einem Homologie-Modell (*homology model*) von NmPin, welches mit YASARA erstellt wurde und für das die Struktur von CsPin (1.2.5) als Blaupause diente, sowie eine Informationen über mögliche Wasserstoffbrücken. Das aus dieser Berechnung resultierende Ensemble von 20 Strukturen wurde mit dem Programm YASARA (Tabelle 2.9) einem *water refinement* (Schärfung der Struktur in einer simulierten wässrigen Umgebung) unterzogen. Sowohl für das Homologiemodell, als auch für das *water refinement* wurde in YASARA das YASARA-NOVA-Kraftfeld verwendet. Da die Etablierung aktueller Strukturrechnungsmethodiken und die Nutzung aktueller Programme ein Teil der Aufgabenstellung dieser Arbeit darstellt, wird auf die Details der Strukturrechnung im Ergebnisteil eingegangen.

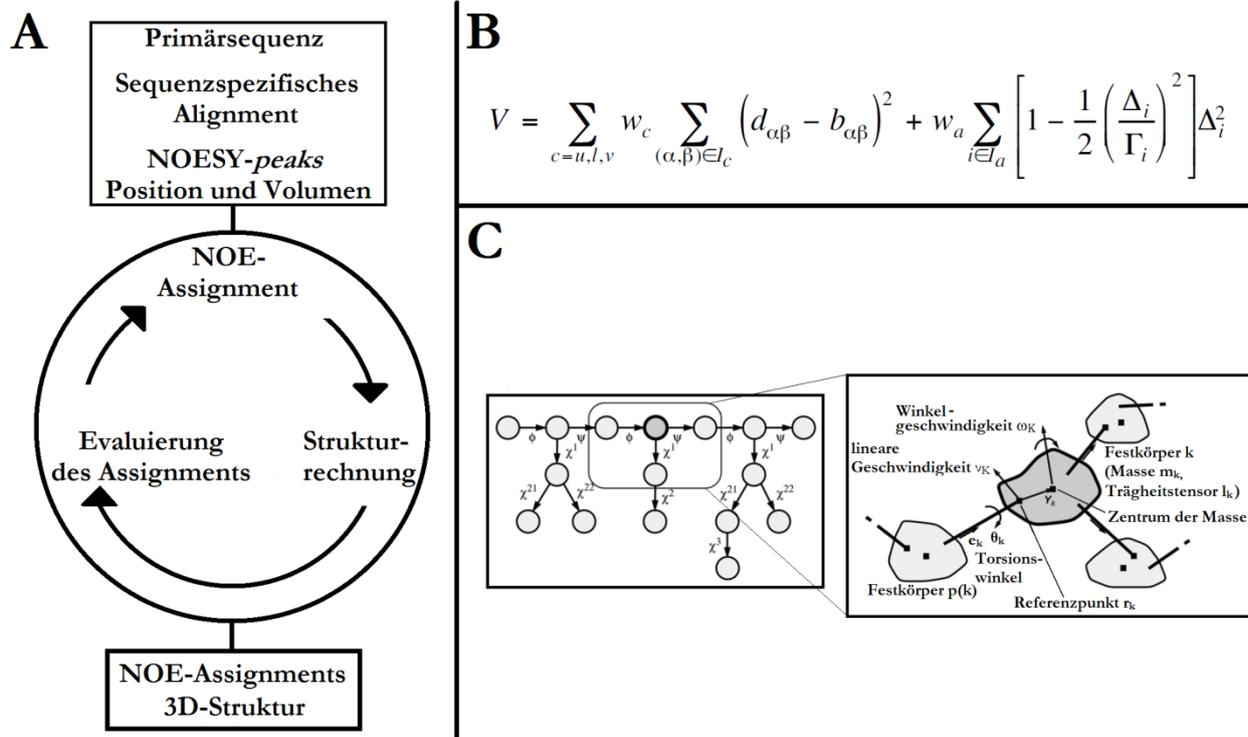


Abbildung 2.7: Cyana 3.0

A: Schema der Funktionsweise von Cyana 3.0. Das NOE-Assignment ist an die Strukturrechnung gekoppelt und durchläuft mehrere (meist 7) Zyklen. **B:** Cyana-Zielfunktion. Es wurden obere und untere Grenzen, $b_{\alpha\beta}$, für die Distanzen $d_{\alpha\beta}$ zwischen zwei Atomen α und β und *constraints* θ_i in Form erlaubter Intervalle $[\theta_i^{\min}, \theta_i^{\max}]$ angenommen. I_u, I_l und I_v stellen eine Reihe von Atompaaren (α, β) mit oberen, unteren oder von der Waals-Distanzbegrenzungen dar. I_a ist eine Reihe von Torsionswinkel-*restraints*. w_u, w_l, w_v , und w_a sind die Wichtungsfaktoren für die verschiedenen *constraints*. $\Gamma_i = \pi - (\theta_i^{\max} - \theta_i^{\min})/2$ benennt die halbe verbotene Spannweite der Torsionswinkel-*restraints* und Δ_i ist die Größe der Torsionswinkel-*constraint*-Verletzung. **C:** Schematische Darstellung der verschiedenen Teilnehmer in Strukturberechnungen mittels Torsionwinkel. Abbildung nach (Güntert 2004)

Ergebnisse

3 Ergebnisse

Ungeachtet der zahlreichen sowohl funktionellen als auch strukturellen Untersuchungen und der Bedeutung vor allem der humanen PPIC-Typ PPIasen (1.2.2) für Krankheiten wie *Morbus Alzheimer*, *Morbus Parkinson* oder auch Krebs, war der molekulare Mechanismus der Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerisierung durch diese Proteinfamilie zu Beginn dieser Arbeit ein herausforderndes Rätsel, zu dessen Lösung ein Teil beigetragen werden sollte. Die verschiedenen Theorien, betreffend der Bedeutung der das katalytische Zentrum durchspannenden und umgebenden reaktiven Reste, wurden in 1.2.5 ausführlich erläutert. Ob die beiden Histidine im Zentrum nun strukturgebend (Bailey *et al.* 2008) oder katalytisch aktiv (Weininger *et al.* 2009) sind, war und ist bis heute strittig. Aktuell gibt es starke Hinweise, die auf die Existenz einer, an Protonentransport gekoppelten, Elektronentransportkette ausgehend von sauren Aminosäurenresten über die beiden Histidine hin zu alkoholischen (Mueller *et al.* 2011) oder weiteren sauren Resten (Heikkinen *et al.* 2009) hinweisen. Der Mechanismus der Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerisierung durch PPIC-Typ-PPIasen ist selbst mit diesen neuen Erkenntnissen weit davon entfernt entschlüsselt zu sein. Daher und aufgrund der Tatsache, dass Mitte des letzten Jahrzehnts die Entschlüsselung archaealer Genome immer schneller fortschritt, lag es nahe sich mit dem Ursprung der Proteinfamilie zu beschäftigen, um dadurch möglicherweise neue Argumente für die Diskussion um den Wirkmechanismus gewinnen zu können.

Die erste Frage, die gestellt wurde, war, ob es überhaupt Parvuline in archaealen Genomen gibt. Diese Frage war bereits durch die Existenz dieser Proteinfamilie innerhalb zweier Thaumarchaeoten (*C. symbiosum* Hallam *et al.* 2006 und *N. maritimus* Schouten *et al.* 2008) mit Ja beantwortet worden. Die nächste und ebenso entscheidende Frage lautete: Sind die archaealen Parvuline tatsächlich archaeal? Da nur sehr wenige der neu sequenzierten Genome PPIC-Typ-PPIasen enthielten, musste zunächst gezeigt werden, dass diese kleine Proteingruppe wirklich urtümlich und nicht ein durch horizontalen Gentransfer entstandener genetischer Abkömmling bakterieller oder eukaryotischer Proteine ist. Horizontaler (oder auch lateraler) Gentransfer zwischen prokaryotischen Organismen ist weit verbreitet und führt beispielsweise zu ausgeprägten Antibiotikaresistenzen innerhalb pathogener Krankenhauskeime (Barlow 2009).

Um horizontalen Gentransfer als Ursache für die Existenz archaealer Parvuline auszuschließen, bestand der erste Teil dieser Arbeit darin, die verschiedenen archaealen Genome nach Parvulinen zu durchsuchen und zu ergründen inwieweit die archaealen von den bakteriellen bzw. eukaryotischen Vertretern dieser Proteinspezies durch phylogenetische und bioinformatische Ansätze unterschieden werden können.

3.1 Phylogenetische Untersuchungen

3.1.1 PPIase-Repertoire der Archaea

Zunächst wurden alle, zum Zeitpunkt der Analyse, 106 kompletten und beinahe kompletten archaealen Genome unter der Verwendung von BLASTp und ORF-finder (Tabelle 2.9), wie in 2.11.2 beschrieben, nach Parvulinen durchsucht. Die beinahe kompletten Genome stammen aus sogenannten *whole genome shotgun* Sequenzierungsansätzen. Hierbei wird DNA aus Umweltproben extrahiert, geschert und, mit Hilfe verschiedener Primer, Stücke davon sequenziert. Die überlappenden Regionen dieser Stücke werden dann so angeordnet, dass große Teile eines Genoms wie ein Puzzle zusammengesetzt werden können, daher der Begriff beinahe komplett.

Tabelle 3.1: Archaeale Parvuline

Reich	Spezies	Sequenz des sdPars
bereits in der Studie (Lederer et al. 2011) enthaltene Sequenzen (Februar 2011)		
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanosaeta concilii</i>	MTKEVHAAHILCKTEKKALEVKELLASGQESFAQMARKYSQCPSPGKSGGD LGWFGKGRMVPEFEKAAFEGEKGIIGPVKSQFGYHLIRVLDKK
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanoregula boonei</i>	MTTQVRASHILVTSEDDANKILKRIKDGEDFAAVAKRFSSCPSKKSGGDL GWFGKNQMVPEFEAAAFADQGTVVGPVKSQFGYHVIVKTGKK
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanocorpusculum labreanum</i> Z	MVRVKASHILVKTEAQAKEIMQKISAGDDFAKLAKMYSQCPSGNAGGDLG YFGKGQMVKPFEDACFKAKAGDVVGPVKTQFGWHIIKVTDIKN
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanoplanus petrolearius</i>	MAKKVRASHILVNSEKEAKDILAKLNSGENFEELAKKYSTCPSGRKGDDL GWFGKGMVKEFEDASFSAKDGDVTPVKTQFGYHIKIKITGNK
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanosphaerula palustris</i>	MVKQVSAAHILVKTQEDLKKQISAGGNFELAKKYSECPSPGKKGDEL GWFGKGMVPEFEKVAFEKQEGDVVGPVKTQFGFHLIKILGQK
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Micrarchaeum acidiphilum</i>	MAGKIRCAHILVEKFSTAQEVLDKLAKESEFAKLAEEFYSIDGSRKRGGDL GFFGKGMVREFEDAAFKLEKQTSQIVKTQFGYHIKIRLE
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Parvarchaeum acidiphilum</i>	MVDKIRCAHILVKKQSLAYSILERINKGESFSKLAEEFYSIDSSRRGGEL GYFGRGIMVKEFEKAAFLNKGQISQPIKTQFGYHIKIRLD
<i>Thaumarchaeota</i>	<i>Nitrosopumilus maritimus</i>	MSNKIKCSHILVSKQSEALAIMKELKSGEKFGKLAKELSIDSGSAKKNGN LGYFTKGMVVKPFEDAAFKLQVGEVSEPIKSEFGYHIKIRFG
<i>Thaumarchaeota</i>	<i>Cenarchaeum symbiosum</i>	MADKIKCSHILVKKQGEALAVQERLQKAGEKFGKLAKELSIDGSAKRDGS LGYFGRGKMKPFEDAAFKLQVGEVSEPVKSEFGYHVIKRLG
<i>Thaumarchaeota</i>	<i>Nitrosoarchaeum limnia</i>	MSNKIKCSHILVSKQSEALAIMKELKSGEKFGKLAKELSIDGSAKKNGN LGYFTKGMVVKPFEDAAFKLQVGEVSEPIKSEFGYHIKIRFG
kürzlich gefundene archaeale Parvuline		
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Nanosalinarum</i> sp. J07AB56	MTEVHAKHILVEHEEHATQLKRLKLEKDEGEFEELAREHSDGSPGKGGDL GWFGKGMVVKPFERTAFELSDGEVSEPVETQFGWHLIKKEGER
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Nanosalina</i> sp. J07AB43	MGDEIRASHILVDNEEHANQIKLDDLDRDTKDFQAQLAEEKSEGSPGDNGGD LGFFGRGKMKVPEFEVAFDLVGEVSDPVETQFGWHIIKKTDEK
<i>Thaumarchaeota</i>	<i>Nitrosoarchaeum koreensis</i>	MSNKIKCSHILVTKQSEALAIMKELKSGEKFGKLAKELSIDGSAKRDGN LGYFTKGMVVKPFEDAAFKLQVGEVSEPIKSEFGYHIKIRFG

Wie in Tabelle 3.1 zu sehen, können zwei entscheidende Tatsachen festgehalten werden. Zunächst enthalten nur 5 der 18 Archaea-Gruppen Parvuline. Zu diesen 18 Gruppen zählen 13 gut etablierte Ordnungen innerhalb der *Crenarchaeota* und *Euryarchaeota*. Dazu kommen die erst in den letzten Jahren benannten Phyla *Thaumarchaeota*, *Nanoarchaeota*, *Korarchaeota*, *Aigarchaeota*, sowie die **archaeal Richmond Mine acidophilic nanoorganisms** (ARMAN). Neben den *Thaumarchaeota*, unter denen alle bisher vollständig aufgelösten Genome ein Parvulin enthalten, beinhalten noch einige Vertreter der *Euryarchaeota* ein solches. Die Resultate der Suche im Zuge dieser Arbeit ließen vermuten, dass unter den *Euryarchaeota* nur

einige methanproduzierende Organismen der Ordnungen *Methanomicrobiales* und *Methanosarcinales* und die aus einer Eisenminendrainage stammenden, ultrakleinen Archaeen des ARMAN-Typs (1.4.1) eine PPIase kodieren. Jedoch besitzen zwei vor wenigen Monaten (nach Beendigung der phylogenetischen Analysen dieser Arbeit) gelöste Genome halophiler Archaeen der Ordnung *Halobacteriales* (Narasingarao *et al.* 2011) ebenfalls ein Parvulingen. Des Weiteren ist in Archaeen ausschließlich der Par10-Typ (ab jetzt nur *sdPar* genannt; *single domain* Parvulin) zu finden. Ebenfalls gibt es in keinem bisher bekannten archaealen Genom mehr als eine Kopie des *sdPar*-Gens. Diese Tatsache führt dazu, dass jede neuentdeckte archaeale *sdPar*-Sequenz, zum Beispiel aus metagenomischen Daten, einem virtuellen Organismus zugewiesen werden kann.

Der nächste Schritt bestand darin, dieselben archaealen Genome, wie in 2.11.1 beschrieben, auf ihr gesamtes PPIase-Repertoire zu überprüfen. Die letzte Veröffentlichung zu diesem Thema stammt aus dem Jahr 2000 (Maruyama und Furutani 2000) und war, obwohl sie 2004 (Maruyama *et al.* 2004) aktualisiert wurde, entsprechend veraltet. Die vollständige Auflistung aller bekannten archaealen PPIasen (Zeitpunkt: Februar 2011) kann in Tabelle 6.1 (Anhang) eingesehen werden. Tabelle 3.2 zeigt eine Zusammenfassung der oben erwähnten Daten. Betrachtet man das PPIase-Repertoire nur anhand in den Genomen vorhandener offener Leseraster, welche PPIasen kodieren, so lassen sich einige allgemeine Tendenzen herausstellen. Die erste und einfachste ist, dass alle Archaeen zumindest eine PPIase besitzen und dass alle drei PPIasen-Familien zu finden sind. Die einzige Ausnahme stellt *Nanoarchaeum equitans*, der bislang einzigen Vertreter der *Nanoarchaeota*, dar, dem aber auf Grund seiner symbiotischen Lebensweise mit *Ignicoccus*-Spezies eine genetische Sonderstellung zugewiesen werden muss (1.3.1). Einige hyperthermophile Spezies besitzen nur ein FKBP des *E. coli*-SlyD-Typs, welches als einzige PPIase ubiquitär unter den Archaeen vertreten ist.

Zusätzlich kann man Zusammenhänge zwischen Art und Anzahl an PPIasen und dem bevorzugten Lebensraumtemperaturen erkennen. Bis auf den Aigarchaeoten *Caldiarchaeum subterraneum*, welcher zwei FKBP besitzt, beinhalten alle Genome hyperthermophiler Organismen ausschließlich ein FKBP als einzige PPIase. Keine hyperthermophile Spezies kodiert ein Cyclophilin oder Parvulin. Parvuline findet man ohne Ausnahme nur in mesophilen und psychrophilen Archaeen, während Cyclophiline auch in thermophilen Arten vorkommen. Auch innerhalb einzelner Ordnungen kann man eine Verbindung zwischen Temperaturoptimum und PPIase-Repertoire herstellen. So trägt innerhalb der Ordnung *Thermococcales* die thermophile Spezies *Thermococcus* zwei FKBP, die hyperthermophile Spezies *Pyrococcus*, wie bereits erwähnt, nur eines. Ähnlich verhält es sich innerhalb der Ordnung *Methanococcales*, in welcher die thermophile Spezies *Methanocaldococcus* ein deutlich kleineres PPIase-Repertoire aufweist (zwei FKBP; keine Cyclophiline), als die mesophile Spezies *Methanococcus* (2-3 FKBP; 0-2 Cyclophiline).

Tabelle 3.2: PPIase-Repertoire Archaea

#: Anzahl der entschlüsselten Genome (Februar 2011); Gruppe: Phyla mit der Endung „-ales“ sind gut etablierte Ordnungen, ARMAN steht für **archaeal Richmond Mine acidophilic nanoorganisms**, diese Organismen stammen aus einer Eisenminendrainage in *Richmond*, Kalifornien; psychrophil: -15 °C-15 °C; mesophil: 15 °C-35 °C; moderat thermophil: 35 °C-50 °C; thermophil: 50 °C-80 °C; hyperthermophil: 80 °C-122 °C

Reich	Gruppe	#	FKBPs /Genom	Cyclophiline /Genom	Parvuline /Genom	Temperatur-optimum
Eury-archaeota	Archaeoglobales	3	1	-	-	hyperthermophil
Eury-archaeota	Thermoplasmatales	4	1	1 (<i>Ferroplasma Picrophilus</i>); 0 (<i>Thermoplasma</i>)	-	thermophil
Eury-archaeota	Thermococcales	9	1 (<i>Pyrococcus</i>); 2 (<i>Thermococcus</i>)	-	-	<i>Pyrococcus</i> : hyperthermophil; <i>Thermococcus</i> : thermophil
Eury-archaeota	Halobacteriales	13	1-3	1	-	mesophil / moderat thermophil
Eury-archaeota	Methanococcales	12	2 (<i>Methanocaldococcus</i>); 2-3 (<i>Methanococcus</i>)	0 (<i>Methanocaldococcus</i>); 0-2 (<i>Methanococcus</i>)	-	<i>Methanocaldococcus</i> : thermophil; <i>Methanococcus</i> : mesophil
Eury-archaeota	Methanocellales	1	4	1	-	mesophil
Eury-archaeota	Methanopyrales	1	1	-	-	thermophil
Eury-archaeota	Methanosarcinales	7	1-4	1-2	1 (<i>M. conciliū</i>); 0 (Rest)	mesophil
Eury-archaeota	Methanobacteriales	8	1	1	-	mesophil
Eury-archaeota	Methanomicrobiales	6	1-4	1-2	1 (4 Genome); 0 (Rest)	mesophil
Eury-archaeota	ARMAN	3	2-3	-	1 (2 Genome); 0 (1 Genom)	mesophil
Nano-archaeota	-	1	-	-	-	hyperthermophil
Thaum-archaeota	-	3	1	1-2	1	mesophil / psychrophil
Aig-archaeota	-	1	2	-	-	hyperthermophil
Cren-archaeota	Desulfurococcales	8	1	-	-	hyperthermophil
Cren-archaeota	Thermoproteales	8	1	-	-	hyperthermophil
Cren-archaeota	Sulfolobales	12	1	-	-	hyperthermophil
Kor-archaeota	-	1	1	-	-	hyperthermophil

Das gehäufte Vorkommen von Parvulingenen innerhalb Ordnungen mesophiler Organismen, oder vielmehr die Abwesenheit selbiger innerhalb hitzeliebender Spezies, lässt darauf schließen, dass die archaealen Parvuline nicht wahllos durch eine Reihe von horizontalen Gentransfers entstanden sind, sondern dass evolutionäre Einflüsse durch selektiven Druck eine große Rolle gespielt haben. Um dies zu untermauern, wurde im nächsten Schritt versucht anhand einer phylogenetischen Untersuchung die Abstammungsverhältnisse innerhalb der *sdPar* aufzuklären. Dazu wurden in einem ersten Schritt auch die *Eukarya* und *Bacteria* nach Parvulinen ohne N- oder C-terminalen Verlängerungen durchsucht, da dies die einzige Parvulinart ist, welche innerhalb der *Archaea* anzutreffen ist.

3.1.2 Single domain Parvuline (sdPar)

Betrachtet man die Eukaryoten, so findet man bis auf AtPin1 (1.2.3) keine Parvulinproteine ohne terminale Domänen. Selbst AtPin1 besitzt einen sehr ausgeprägten *loop*, der dafür sorgt, dass es mit 119 Aminosäuren etwa ein Fünftel größer ist als die bereits annotierten archaealen Parvuline, welche zwischen 92 und 94 Aminosäuren messen. Dies und die Tatsache, dass der auszuschließende horizontale Gentransfer zwischen *Bacteria* und *Archaea* weit wahrscheinlicher auftritt als ein horizontaler Gentransfer zwischen *Archaea* und *Eukarya*, gaben Anlass, das Hauptaugenmerk auf die Unterscheidung der archaealen von den bakteriellen sdPar zu legen. Zu diesem Zweck wurden nun auch, wie in 2.11.1 beschrieben, alle bakteriellen Genome auf Besitz eines sdPar überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass bis auf *Lentisphaera araneosa* und zwei Vertretern der *Planctomycetes*, alle, sdPar kodierenden Bakterien zu der Gruppe der *Proteobacteria* zu zählen sind. Die meisten Spezies kodieren wie die *Archaea* ein sdPar, einige zwei und nur der extrem psychrophile Organismus *Colwellia psychrerythraea* besitzt drei Kopien des sdPar, was erneut auf einen Zusammenhang zwischen Temperatur und Parvulin-Repertoire schließen lässt.

Den resultierenden 303 Sequenzen aus den *Bacteria* standen zum Zeitpunkt der Experimente nur acht archaeale Sequenzen gegenüber (die Sequenzen von *N. limnia* und *M. concilii* waren noch nicht verfügbar).

Tabelle 3.3: sdPar-Sequenzen aus Metagenomen

Bezeichnung	Sequenz
AACY023772022	MSNKIKCSHILVKKQSEALDILNKIKTGEKFGKLAKELSIDSGSAKRDRGSLGY FGRGMMVKPFEEAAFKLQIGEVSEPIKSEFGYHI IKRLG
AACY020521263	MSNKIKCSHILVKKQSESLAILDRIKKGEKFGKLAKELSIDSGSAKRDRGSLGY FGRGMMVKPFEEAAFKLQIGEI SEPIKSEFGYHLIKRLG
AACY023721900	MANKIKCSHILVEKQSHALQLLERIKNGEKFGKLAKENSTDSGSAKRDRGSLGY FSKGMVMKPFEEVAFKLEIGQVSEPVKTQFGYHI IKRFS
AACY020179599	MADKIKCSHILVEKQSQALAVLDRLLKGEKFDLAKELSLDTGCGKRGGDLGY FGRGRVKPFETAFAFALSVGQISEPVKTEFGYHVIKRNA
AACY020172942	MVDKIKCSHILVEKQSQALAILERLRKGEKFDIAKELSLDTGCGKRGGDLGY FGRGMMVKPFESAFAFALSIGQISEPVKTEFGYHI IKRLLPKNMHQDQ
AACY020565072	MAQKIKCSHILVEKQSQALQILEEIKNGKKFGAAAKEISSCPSSKKEGDLGYF TKGMMVKEFEDVAFNLEIGEVSAPVKTQFGYHI IKRLG
AACY022114635	MSNKIKCSHILVDKQSEAMKLYEEIKSGKKFGSVARDISKCPGSKKDGDLGYF TKGMMVKEFEDVAFNLEVEGEMSPPVKTQFGYHLIKRLA
AACY020912937	MSNKIKCSHILVEKQSEAMKLYDEIKSGKKFGSVARDISKCPGSKKDGDLGYF TKGMMVKEFEDVAFNLEVEGEMSPPVKTQFGYHLIKRLA
AACY023104196	MSNKIKCSHILVDKQSEAMKLYEEIKSGKKFGAIARDISKCPGSKKDGDLGYF TKGMMVKEFEDVAFNLEIGEMSPPVKTQFGYHLIKRLA
AACY021994642	MAQKIKCSHILVEKQSQALQILDEIKNGKKFGAAAKEISSCPSAKKEGDLGFF TKGMMVKEFEDVAFNLDIGEVSAPVKTQFGYHI IKRLA
AACY023450473	MANKIKASHILVEKHNQALEVIQMLKSGEDFANLAQKFSIGPSAKRGGNLGEF GRGQMVKPFESAFAFLNKGEYTTLEPVKTQFGYHVIKRTG
AACY023784421	MAEVKASHILVGSKELADEIKAKIDAGSDFGTMAQEYKCPSSKKGDLGWFK RGMMVREFENAAAFKMEGEVSEPVKTQFGWHI IKLTGKKK
ABEF01053500	MANKIKCSHILVQKQSEAMPILDKIRQGEKFGKLARELSIDSGSAKRDRGNLGY FGRGMMVKEFETAFAFNLEVGKISEPVKTQYGYHI IKRLS
ACXJ01008586	MAEKIRCSHILVEKLSQAQQAMELLKKGESFESLAQKYSIDSSRKRGGDLGYF GHGVMVKEFEKAAFSLKQVSEIVKTQFGYHI IKRTA
umc AD1000-56-E4	MTNKIKCSHILVEKQSQALQLLEEIKKGGKFGAVAREVSTCPSSKKGDLGYF TKGMMVKEFDEVAFAFKLQIGEVSEPVKTQFGYHLIKRIS

Um die Stichprobe der archaealen Sequenzen zu vergrößern, wurden, wie in 2.11.2 beschrieben, mittels tBLASTn, ORFFinder und der CD-Datenbank (Tabelle 2.9), Datenbanken durchsucht, welche genomische Bruchstücke (contigs: *contiguous sequences*) vergangener Analysen beinhalten (NCBI-Datenbanken: *whole genome shotgun reads* und *environmental samples*).

Das Ergebnis dieser Suche zeigt Tabelle 3.3. Zwölf Parvulingene (ACY...) stammen von der Reise der *Sorcerer II* (Yooseph *et al.* 2007), ABEF01053500 wurde aus einem Biofilm der *Richmond Mine* in Kalifornien isoliert (Dick *et al.* 2009), ACXJ01008586 stammt von einem subtropischen Tiefseeschlot vor Hawaii in 4000 Metern Tiefe. Die letzte Sequenz der Tabelle stammt aus einem Fosmid (großer, zusammenhängender *contig* von mehreren Kilobasen Länge) das aus einer Planktonsammlung der Adria in 1000 Metern Tiefe isoliert wurde (Martin-Cuadrado *et al.* 2008). Zusammen mit den acht Sequenzen annotierter Genome wurden 23 archaeale Parvulingene in den Datensatz aufgenommen.

Um phylogenetische Analysen durchführen zu können, muss das Molekül, welches die Basis der Berechnungen liefert, evolutionär stark konserviert sein, um überhaupt genug Information für eine sinnvolle Berechnung liefern zu können. Um diese Konserviertheit zu überprüfen, wurde im nächsten Schritt der genetische Hintergrund der *sdPar*-Gene untersucht.

3.1.3 Genomischer Kontext der archaealen Parvulingene

Bei der Überprüfung des genetischen Kontexts der in den (Meta)-Genomen enthaltenen Parvulinloci wurde klar, dass bereits ohne phylogenetische Rechnungen eine gewisse Gruppierung möglich ist. Zunächst konnte man feststellen, dass sich die metagenomischen Sequenzen darin unterscheiden, ob sie sich wiederholende Gene in Nähe des Parvulingens besitzen oder nicht. Wie in Abbildung 3.1 zu erkennen enthält die Sequenz ACY023784421 keine solchen Gene und wurde daher auf Grund ihrer Parvulinprimärsequenz der sehr diversen Gruppe der euryarchaealen Sequenzen zugeordnet. Entsprechendes gilt für die Sequenzen ACY021994642 (*Thaumarchaeota* II), und ACXJ01008586 (ARMAN), wobei bei letzterer noch der Ort der Isolation als Hinweis hinzukommt, das Metagenom stammt aus einem Biofilm der bereits erwähnten *Richmond Mine* in Kalifornien. Die Unterscheidung der beiden thaumarchaealen Gruppen basierte auf der Betrachtung des dem Parvulingen vorstehenden Gens. Während in *Thaumarchaeota* I entweder ein Pyridoxamin-5'-Phosphat-Oxidase-verwandtes Protein (grün), oder ein hypothetisches Protein mit der konservierten Domäne DUF2203 (beige) dem Parvulin vorangeht, fehlen diese beiden Proteine in *Thaumarchaeota* II völlig. In dieser Gruppe liegt vor dem Parvulinlocus entweder ein hypothetisches Protein nmar_0940 (grau), oder es befindet sich eine größere Intronregion an besagter Stelle.

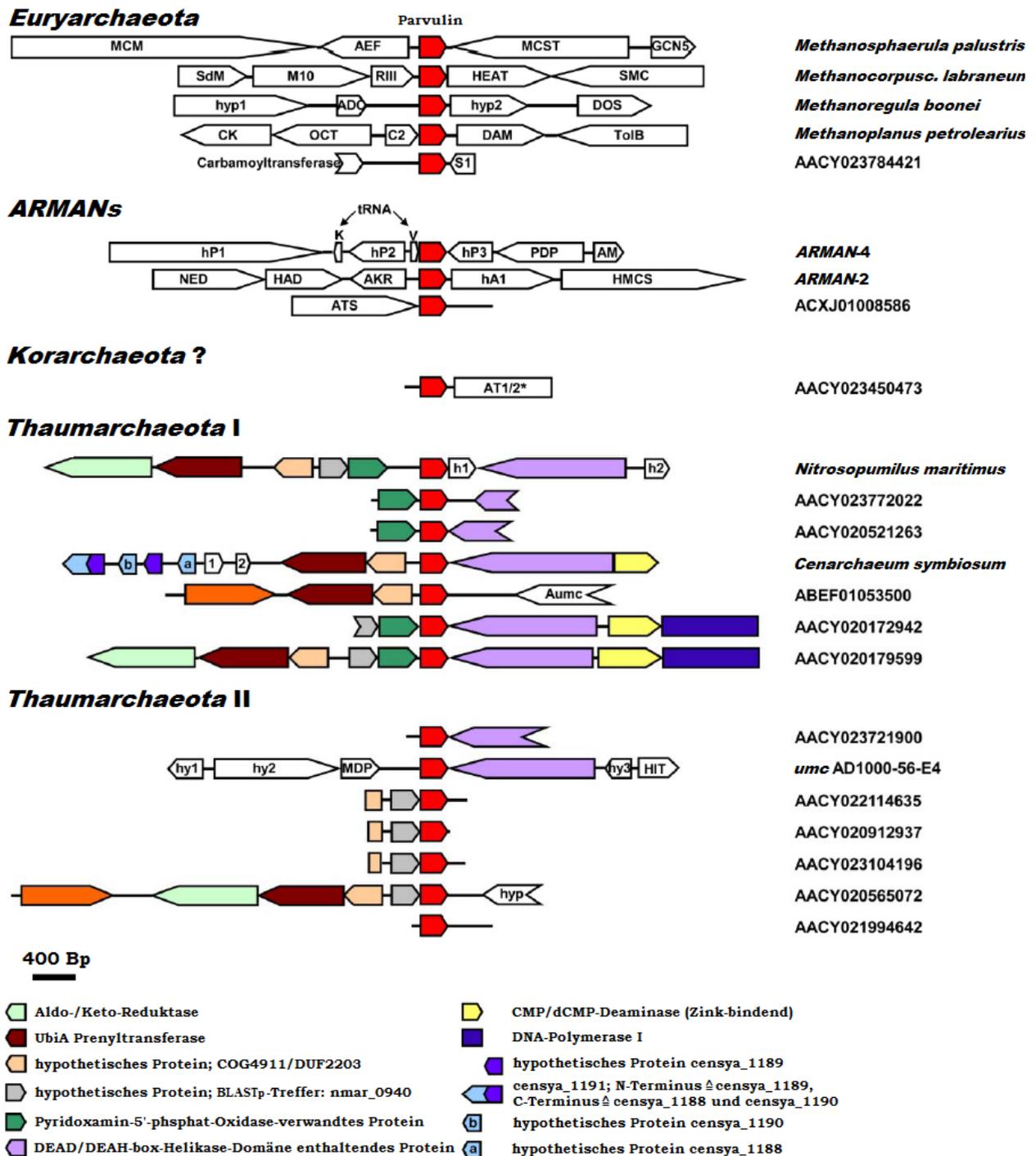


Abbildung 3.1: Genomischer Kontext der archaealen Parvuline

Die Abbildung wurde nach dem Parvulinlocus (rot) ausgerichtet. Gene die sich in der Abbildung nicht wiederholen, sind weiß hinterlegt. Die metagenomischen Sequenzen der Gruppen *Thaumarchaeota* I und *Thaumarchaeota* II wurden anhand ihres genomischen Umfelds geordnet. Die übrigen Metagenome wurden gruppiert nach der Primärsequenz des in ihnen enthaltenen Parvulins. Im Falle von ACXJ010008586 passt darüber hinaus die Einordnung noch mit dem Ort der Isolierung der genetischen Information zusammen. Der *contig* AACY023450473 enthält 341 Aminosäuren des N-Terminus einer Klasse I/II Aminotransferase, deren nächster Verwandter das entsprechende Protein aus *Korarchaeum cryptofilum* ist. Daher wurde es als putativ korarchaeal eingeordnet. Die vollständige Abkürzungsliste findet sich im Anhang. Die Abbildung stammt aus (Lederer *et al.* 2011).

Eine Sonderstellung nimmt die Sequenz AACY023450473 ein: Dieser sehr kurze *contig* enthält nach dem Parvulinlocus die ersten 341 Aminosäuren des N-Terminus einer Klasse I/II Aminotransferase, deren nächster Verwandter laut BLASTp (Tabelle 2.9) das entsprechende Protein aus *Korarchaeum cryptofilum* ist. Daher wurde es in Abbildung 3.1 als putativ korarchaeal gekennzeichnet.

3.1.4 Konserviertheit des Parvulingens

Um den Grad der Konservierung des Parvulingenprodukts zu ermitteln, wurden die das Parvulingen umgebenden Loci als Vergleich hergenommen, die in mindestens fünf weiteren (Meta-)Genomen vorhanden waren.

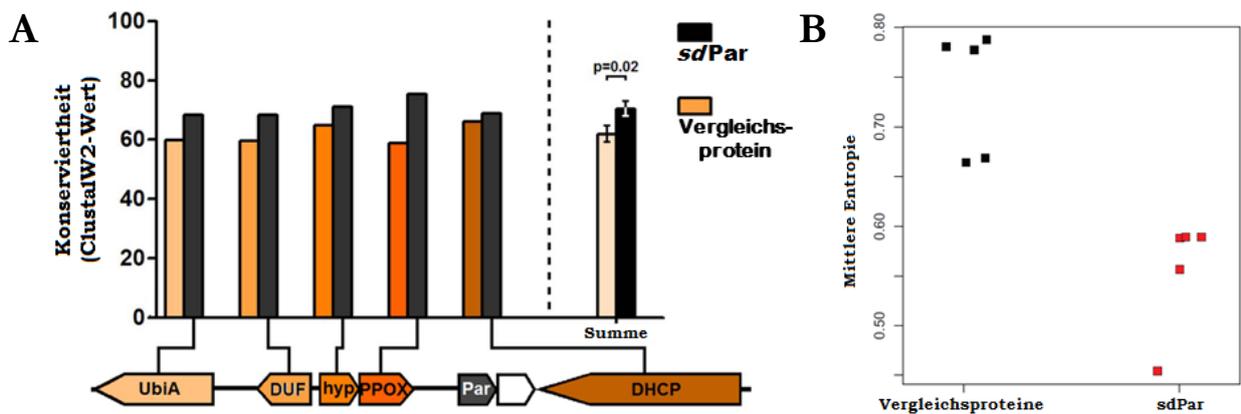


Abbildung 3.2: Konserviertheit des archaealen Parvulinlocus

A: Zu sehen ist der Parvulinlocus mit den ORFs für die Vergleichsproteine UbiA Prenyltransferase (**UbiA**), hypothetisches Protein mit der konservierten Domäne DUF2203 (**DUF**), hypothetische Protein nmar_0940 (**hyp**), Pyridoxamin-5'-Phosphat-Oxidase-verwandtes Protein (**PPOX**) und DEA/DEAD-box-Helikase-enthaltendes Protein (**DHCP**). Jedes der Vergleichsproteine ist weniger konserviert als das *sdPar*. Maß: ClustalW2-score **B:** Dieselben Vergleichsproteine (blau) jeweils verglichen mit *sdPar* (rot). In jedem Vergleichspaar ist die Konservierung des *sdPar*s stärker. Maß: Mean Shannon Entropy.

Für die Ermittlung des ClustalW2-scores wurden diese Vergleichsproteine sowie die auf den entsprechenden *contigs* liegenden Parvuline mit ClustalW2 (Tabelle 2.9) *aligned* und der Durchschnitt der paarweise ermittelten ClustalW2-scores berechnet. Für die Ermittlung der Shannon Entropie wurden die Sequenzen mit T-coffee (Tabelle 2.9) *aligned* (alle verwendeten *alignments* sind auf der beigelegten CD einzusehen) und die Entropie mittels bio3D-Software (Tabelle 2.9) ermittelt 2.11.3. Bei beiden Bestimmungsmethoden zeigte sich das Genprodukt des Parvulinlocus als weit stärker konserviert als seine direkten genetischen Nachbarn.

3.1.5 Phylogenetische Berechnungen

Nachdem gezeigt wurde, dass es sich bei den *sdPar* um evolutiv stark konservierte Proteine handelt, konnte der erste Datensatz von insgesamt 326 prokaryotischen Parvulinsequenzen, 303 aus bakteriellen Genomen, 8 aus archaealen Genomen und 15 aus den Metagenomen einer phylogenetischen Berechnung zugeführt werden. Diese wurde, wie in 2.11.4 beschrieben, mittels *Maximum Likelihood*-Methodik durchgeführt. Diese erste Rechnung zeigte bereits eine Aufspaltung der bakteriellen

und archaealen Parvulinsequenzen an der Basis des ermittelten Baumes, jedoch war der Datensatz noch mit einigen bakteriellen Paralogen und Parvulinsequenzen, die sehr wahrscheinlich aus Ereignissen horizontalen Gentransfers resultieren, durchsetzt. Diese wurden, wie in Abbildung 6.1 (Anhang) am Beispiel der *Enterobacteriales* zu sehen ist, aussortiert. Um die Paralogen zu ermitteln wurden die erhaltenen Zweige mit entsprechenden Bäumen ausgehend von *ssu-rRNA* (*small subunit ribosomal RNA*) verglichen. Um den Einfluss horizontalen Gentransfers zu minimieren, wurden die Parvulinsequenzen solcher Organismengruppen aus dem Datensatz entfernt, in denen weniger als 50 % der bekannten Genome ein Parvulingen enthielten, hierzu gehörten die *Proteobacteria*-Ordnungen *Chromatiales*, *Oceanospirillales*, *Myxococcales*, *Desulfobacterales*, *Campylobacterales*, *Burkholderiales*, *Nitrosomonadales* und *Rhodospirillales*, sowie die Planctomyceten (Abbildung 3.3).

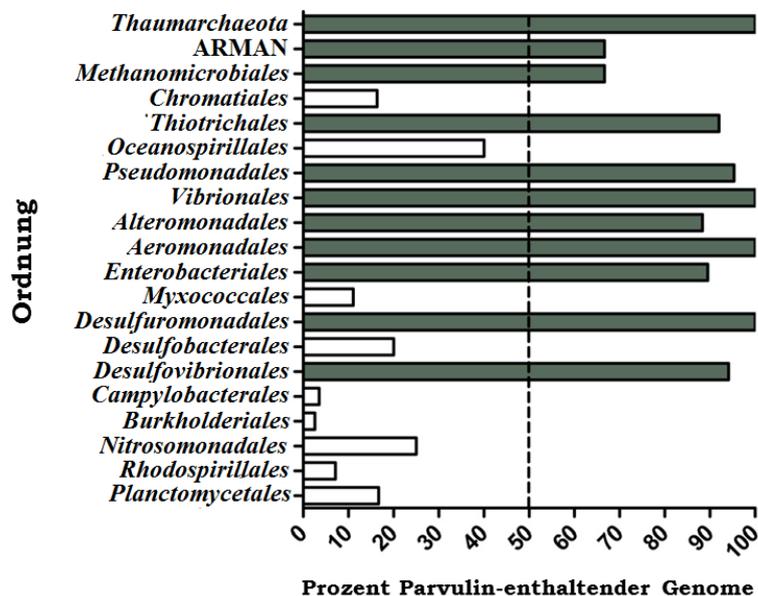


Abbildung 3.3: Cut Off-Datensatz Phylogenie

Organismengruppen, in welchen weniger als 50 % (gestrichelte Linie) der vorhandenen Genome einen Parvulinlocus enthalten (weiß hinterlegte Balken), wurden aus dem Datensatz für die weiteren phylogenetischen Berechnungen entfernt, um die Verunreinigung der phylogenetischen Berechnung durch Ereignisse horizontalen Gentransfers zu vermeiden.

Auf diese Weise wurden insgesamt 85 bakterielle Parvulinsequenzen (59 Paraloge; 26 potentielle HGT-Ereignisse) aussortiert. Dieses Filtern ausschließlich bakterieller Sequenzen war für die weiteren Berechnungen problemlos, da das Ziel selbiger nicht war, einen einwandfreien Abriss über die archaeale und bakterielle Phylogenie zu liefern, dafür sind Moleküle wie *ssu-rRNA* weit besser geeignet. Das Ziel lag vielmehr darin, zu zeigen, dass sich bakterielle und archaeale Parvuline so weit voneinander unterscheiden, dass die strukturelle Analyse eines Vertreters der archaealen Parvuline neue Erkenntnisse versprechen könnte.

Der gefilterte Datensatz von 241 Proteinsequenzen, basierend auf 218 bakteriellen Genomen, 8 archaealen Genomen und 15 metagenomischen Sequenzen, wurde, wie in

2.11.4 beschrieben, einer weiteren phylogenetischen Berechnung zugeführt. Abbildung 3.4 zeigt einen kondensierten Überblick über den gesamten Baum. Bis auf einige Ausnahmen (*Shewanella*; *Thiotrichales*) ist die Topologie, auch der bakteriellen Ordnungen, durchaus zufriedenstellend, vor allem eingedenk der Tatsache, dass nur etwa 100 Stellen maßgebend für die Berechnung waren. Die wichtigste Aussage für die weitere Arbeit stellte zu diesem Zeitpunkt der basale *bootstrap* für die Trennung archaealer und bakterieller *sdPar* dar. Dieser liegt mit 874/1000 in einem Bereich, der als signifikant angesehen werden kann.

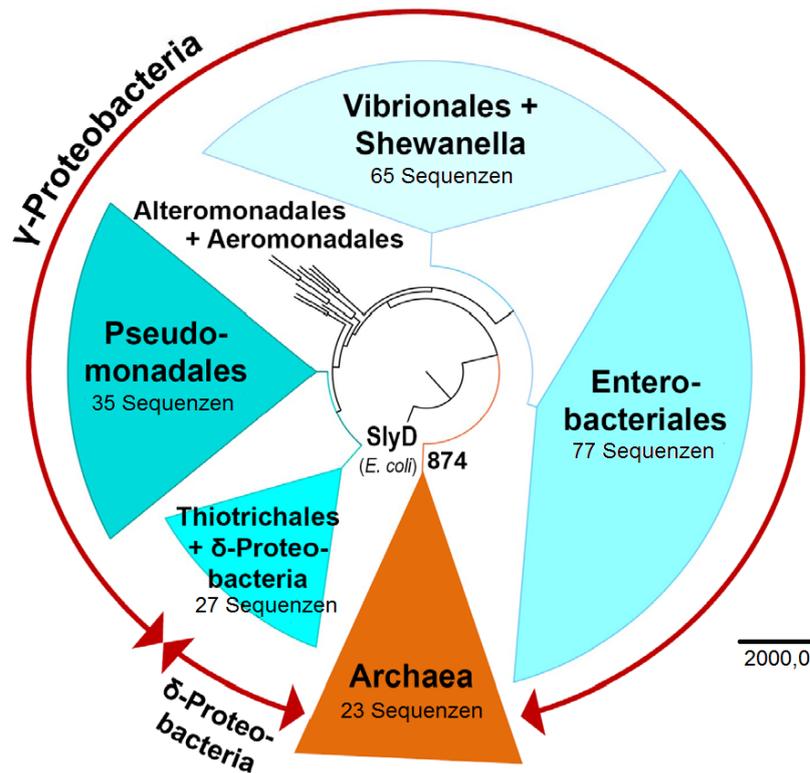


Abbildung 3.4: Kondensierter Blick auf den phylogenetischen Baum

MLP-Baum mit 1000 *bootstraps* und SlyD aus *E. coli* als *outgroup*, auf Grund der strukturellen Analogien bei fehlenden Sequenzähnlichkeiten. Die bakteriellen Zweige ähneln jenen aus Berechnungen basierend auf *ssu-rRNA*. Einzig die *Altero-* und *Aeromonadales* formen keine autonomen Äste. Die Spezies *Shewanella* findet sich fälschlicherweise innerhalb der Ordnung *Vibrionales* wieder und die *Thiotrichales* gruppieren sich mit den *delta-Proteobacteria*. Dennoch ist der Baum überraschend nah an dem zu erwartenden Ergebnis. Der entscheidende *bootstrap* für diese Arbeit, an der Basis des archaealen Zweigs kann mit 874/1000 als signifikant angenommen werden. Abbildung aus (Lederer *et al.* 2011).

Neben der Tatsache, dass es eine signifikante phylogenetische Trennung der bakteriellen und archaealen *sdPar*-Spezies gibt, können mit Hilfe des erhaltenen Baums einige Hinweise für die archaeale Phylogenie und auch spezielle evolutionäre Ereignisse innerhalb der *Thaumarchaeota* benannt werden. Abbildung 3.5 zeigt den aufgeklappten archaealen Zweig des *Maximum-Likelihood*-Phylogenie-Baums. Die verschiedenen archaealen Phyla bilden auch in diesen Baum Gruppierungen. Die *Euryarchaeota* stellen, vergleichbar zum Stand der Forschung, die den Bakterien am nächsten verwandte Gruppe dar. Anders als bisher angenommen ähneln die ARMAN-Organismen mehr den *Thaumarchaeota* als den *Euryarchaeota*. Das durch seine

Ergebnisse

Phylogenetische Untersuchungen

Korarchaeota-ähnliche Aminotransferase außergewöhnliche Metagenom AACY023450473 stellt auch in der Berechnung einen eigenen Zweig dar. Innerhalb der gut aufgelösten *Thaumarchaeota*-Verzweigung können mehrere evolutionäre Ereignisse, höchstwahrscheinlich Deletionen, eingezeichnet werden.

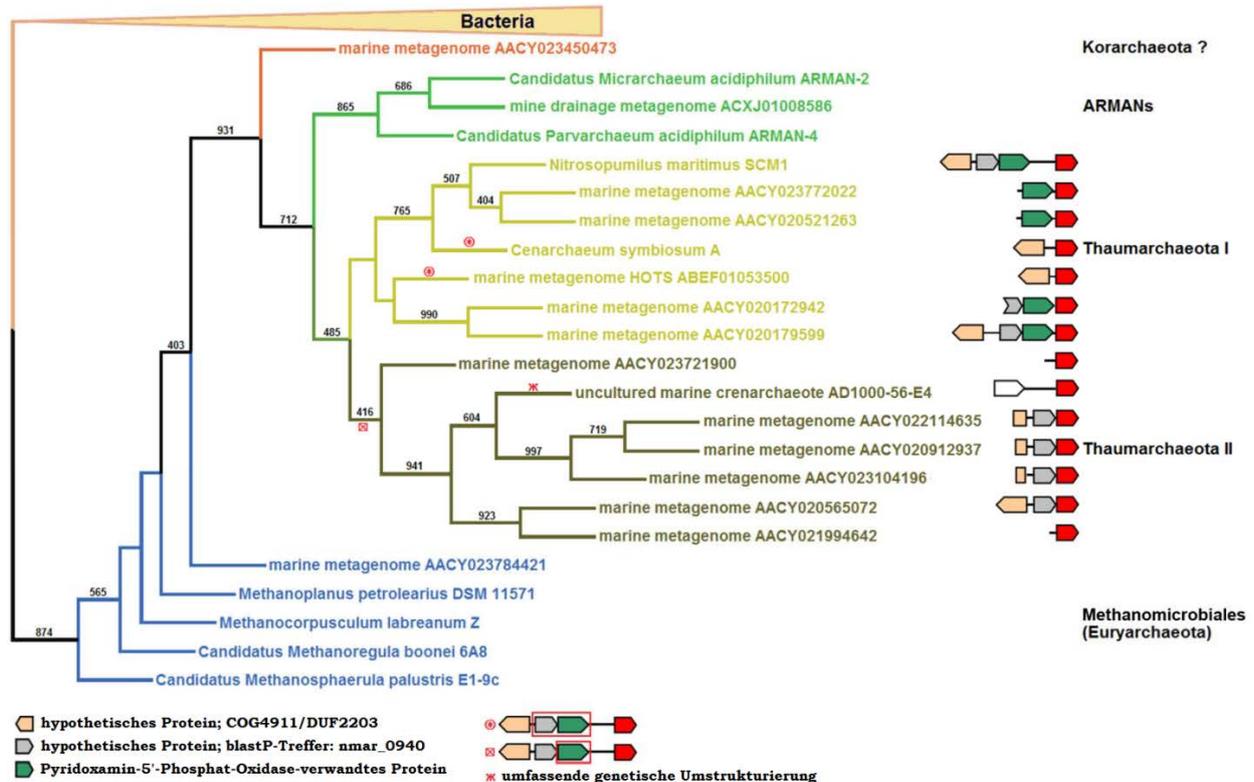


Abbildung 3.5: Archaealer Zweig kombiniert mit genetischem Umfeld

Zu sehen ist der aufgeklappte archaeale Zweig des MLP-Baums aus Abbildung 3.4. Die *outgroup* wurde zu Gunsten der Übersichtlichkeit weggelassen und der bakterielle Ast kondensiert. Die Deletion des PPOX-Gens scheint ein basales Ereignis in der Evolution der *Thaumarchaeota* II darzustellen. Die Deletion der beiden stromabwärts des *sdPar*-Gens gelegenen ORFs innerhalb der *Thaumarchaeota* I fand laut dieser Berechnung zweimal statt. Dies erscheint allerdings eher unwahrscheinlich, so dass diese Beobachtung die Verzweigung an dieser Stelle in Frage stellt. Die beschriebene große genetische Umstrukturierung, welche innerhalb des Fosmids AD1000-56-E4 stattgefunden hat, macht diese Sequenz einzigartig innerhalb der *Thaumarchaeota*.

Zusammenfassend kann erwähnt werden, dass alle Bereiche des Baums gut aufgelöst sind, obwohl nur unter 100 Stellen zur Berechnung verfügbar waren. Neben den phylogenetischen Beobachtungen bleibt die stärkste Aussage die klare Unterscheidbarkeit archaealer und bakterieller *sdPar*.

3.1.6 Bioinformatische Ansätze

Die phylogenetischen Berechnungen lieferten bereits einen starken Hinweis für die klare Unterscheidbarkeit archaealer und bakterieller *sd*Par. Mit Hilfe von bioinformatischen Methodiken, die zusammen mit Dr. Dominik Heider aus dem von Prof. Hoffmann geleiteten Lehrstuhl durchgeführt wurden, sollten diese Hinweise untermauert und die Art der Unterschiede benannt werden. Hierfür wurden, wie in 2.11.5 beschrieben, je ein *Random Forest* (RF) und eine *Support Vector Machine* (SVM) trainiert.

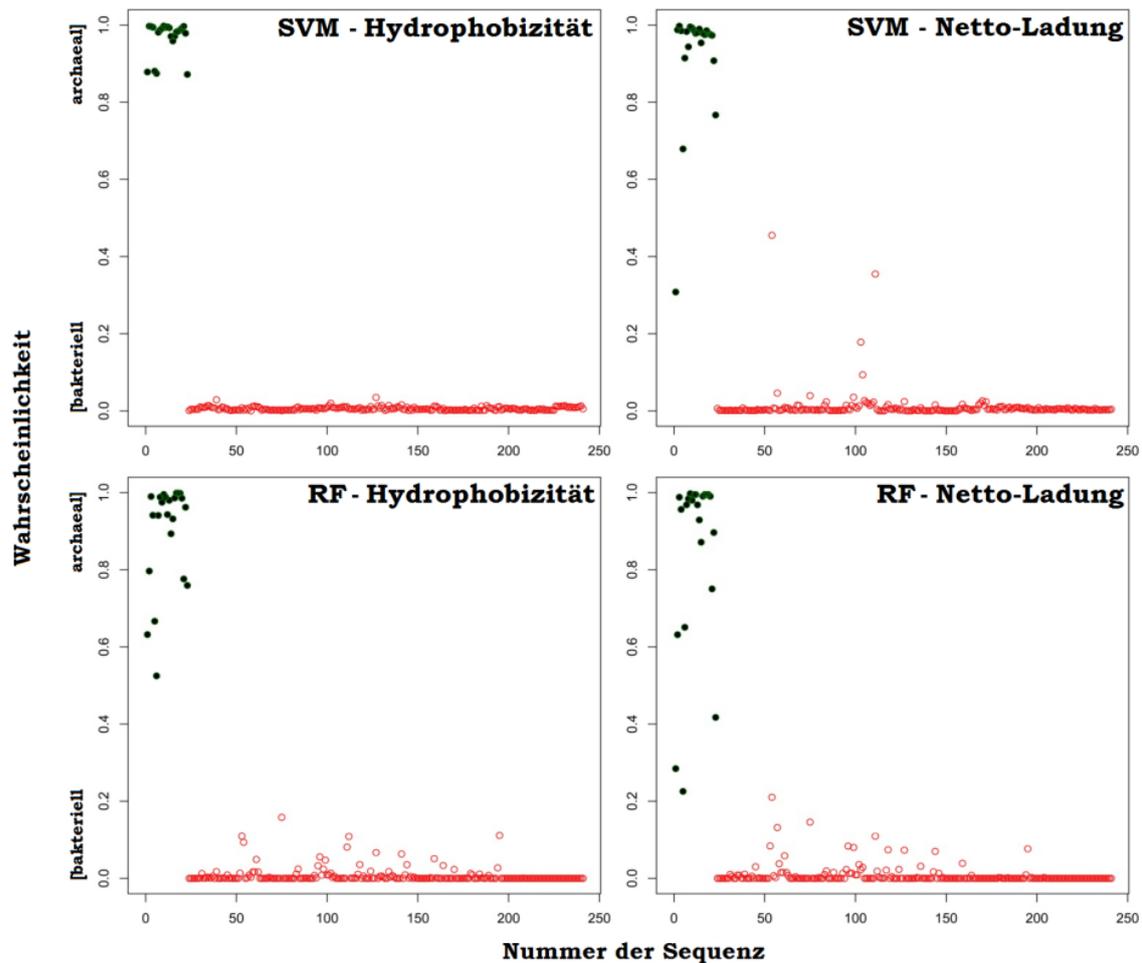


Abbildung 3.6: Support Vector Machine (SVM) und Random Forest (RF)

Sowohl eine trainierte SVM als auch der RF waren in der Lage anhand der beiden Deskriptoren Hydrophobizität und Nettoladung zwischen archaealem und bakteriellen *sd*Par zu unterscheiden. Es wurde derselbe Datensatz verwendet, der auch Grundlage der phylogenetischen Analysen war. Die Vorhersagegröße wurde für die bakteriellen Proteine mit 0,0, für die archaealen Proteine mit 1,0 festgesetzt. Alle Proteinsequenzen, die im MLP-Baum als archaeal bezeichnet werden konnten, wurden in grün, alle bakteriellen in rot dargestellt.

Wie in Abbildung 3.6 zu sehen, wurden für den Deskriptor Hydrophobizität beide Proteinspezies perfekt getrennt (F_1 -score = 1,00). Im Fall des Nettolandungs-Deskriptors war der F_1 -score für beide Berechnungen 0,98, bei unterschiedlichen *Cut-Off*-Werten (RF = 0,20; SVM = 0,33), was immer noch nahe 100 % Trennung liegt.

Es ist also möglich sowohl mit phylogenetischen Methoden als auch mit Methoden maschinellen Lernens klar zwischen *sdPar* aus *Archaea* und *sdPars* aus *Bacteria* zu unterscheiden. Die Bioinformatik liefert zudem die Möglichkeit für jede Aminosäure einen Wert anzugeben, welcher die Wichtigkeit dieses Restes für die Unterscheidung der beiden Proteinklassen angibt (*importance value*, Abbildung 3.7).

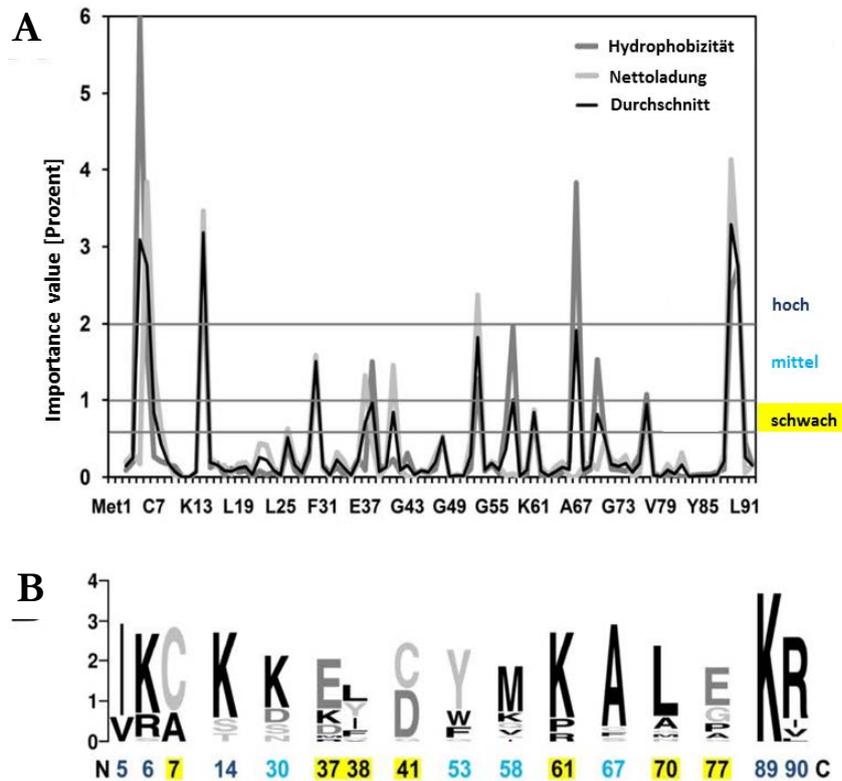


Abbildung 3.7: Wichtigkeitsverteilung und Proteinlogo

A: Die Verteilung der Wichtigkeit wurde aus dem *Random Forest* gewonnen und auf die Sequenz des Parvulins aus *Cenarchaeum symbiosum* übertragen. Dieses Modell wurde durch ein zehnfach wiederholtes *leave-one-out* (lass einen weg)-Validierungsverfahren ermittelt. **B:** Alle Positionen mit einem *importance value* > 0,6 wurden herangezogen um ein Proteinlogo über die verwendeten 23 archaealen Parvuline zu erstellen.

Die Wichtigkeit wurde je nach *importance value* in unwichtig, schwach (0,6-1 %), mittel (1-2 %) und hoch (über 2 %) eingeteilt und farblich unterschieden. Das erstellte Logo (Abbildung 3.7 B) zeigt, dass vor allem die Reste direkt am Amino- sowie am Carboxyende maßgeblich für die Unterscheidbarkeit bakterieller und archaealer Parvuline sind.

3.2 Klonierung und Reinigung von NmPin

Nachdem die archaealen Parvuline als bisher strukturell unbeschriebene Proteingruppe identifiziert waren, wurde das Parvulin aus *Nitrosopumilus maritimus* als Ziel der folgenden strukturellen Untersuchungen ausgewählt. Den Ausschlag für diese Wahl gab die Tatsache, dass *N. maritimus* das einzige kultivierbare Mitglied parvulintragender *Archaea* war und ist. Die Erbinformation von *N. maritimus* bekam unsere Gruppe von Dr. Könnecke aus Oldenburg in Form genomischer DNA. Wie in 2.9 beschrieben wurde das Parvulin in den Vektor pET41presc. (Tabelle 2.7), welcher einen GST-Reinigungstag enthält, kloniert. Die Klonierung wurde lehrstuhlintern von Ricarda Maltaner abgeschlossen.

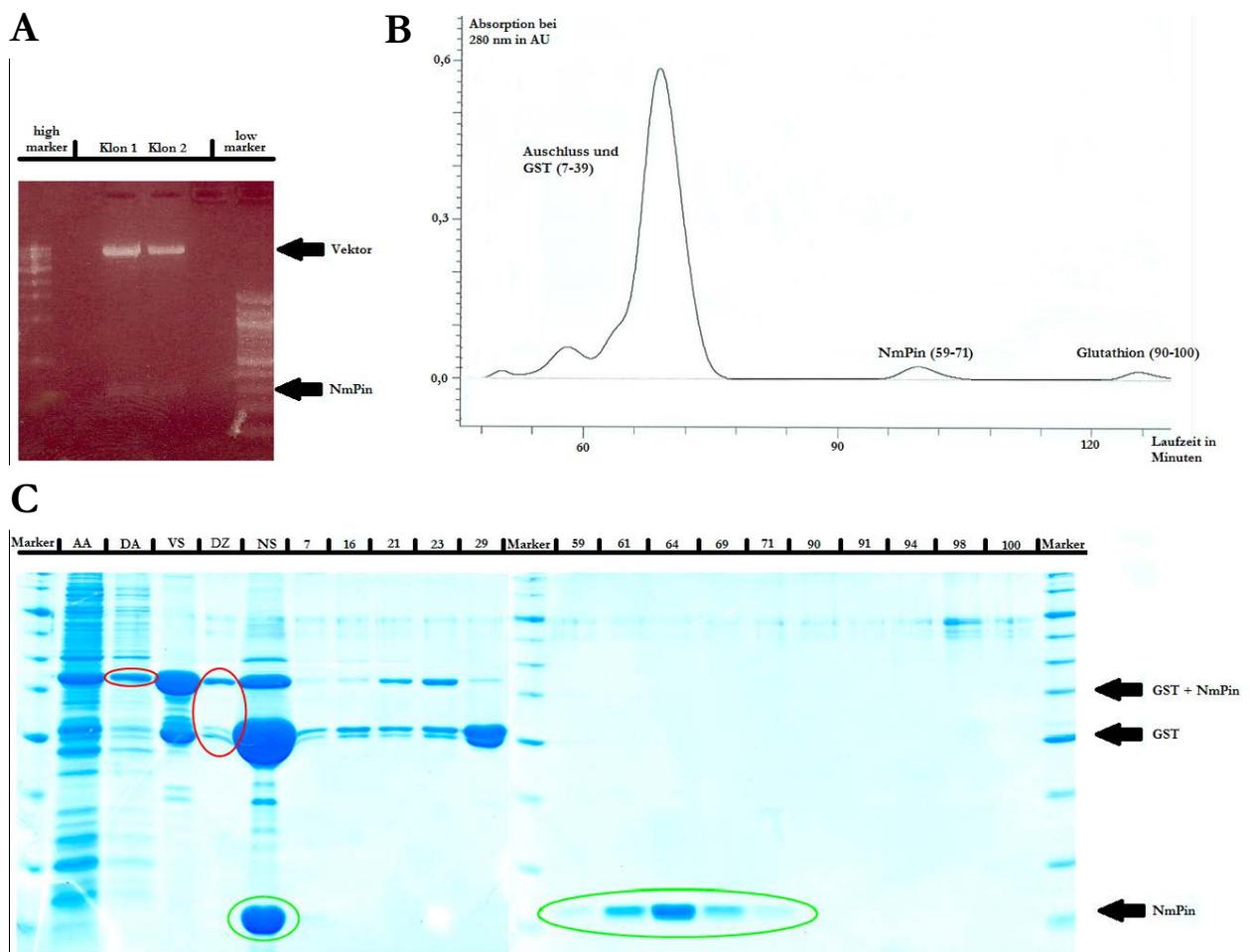


Abbildung 3.8: Klonierung und Reinigung von NmPin

A: Letzter Schritt der Klonierung. Kontrollverdau der beiden positiven Klone mit Apal/BamHI. Aus beiden pET41presc.-Konstrukten konnte das gewünschte Fragment ausgeschnitten werden, somit waren beide Klone positiv. **B:** Gelfiltration des geschnittenen Expressionsprodukt GST-NmPin. In den Fraktionen 59-71 ist das gewünschte reine NmPin-Proteinprodukt zu finden. **C:** AA: Auftrag Affinitätsreinigung; DA: Durchfluss Affinitätsreinigung; VS: Ergebnis der Affinitätsreinigung vor dem Schneiden; DZ: Durchfluss durch das Zentrikon (Tabelle 2.6); NS: Ergebnis der Affinitätsreinigung nach dem Schneiden. Anhand der roten Einkreisung kann man erkennen, dass sowohl während der Affinitätsreinigung als auch beim Einkonzentrieren mittels Zentrikon ein Teil an rekombinantem Protein verloren ging. Die grünen Markierungen zeigen das Zielprotein an.

Abbildung 3.8 A zeigt das Ergebnis des letzten Schritts dieser Klonierung. Der erstellte Vektor wurde mit den für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzymen ApaI/BamHI geschnitten und dieser Verdau mittels 1 %igem Agarosegel aufgetrennt (Kontrollverdau). Die beiden positiven Klone zeigten neben der Vektorbande auch noch die für NmPin zu erwartende Bande bei etwa 300 Basen. Wie in Abbildung 3.8 B+C zu erkennen, verlief die Reinigung sehr sauber und mit bis zu 120 mg Zielprotein pro Liter Medium auch mit hoher Effizienz. Abbildung 3.8 B zeigt den die Reinigung abschließenden Gelfiltrationslauf. Neben dem Ausschluss-Signal, das mit dem GST-Signal zusammenfällt, sind nur noch zwei weitere Buckel zu erkennen. Diese wurden mit einem SDS-Gel (Abbildung 3.8 C) als reines NmPin- bzw. Glutathion-Signal identifiziert. Insgesamt wurden im Laufe dieser Arbeit 42 solcher Reinigungen durchgeführt, die sich, je nach Verwendung des Zielproteins, nur durch das verwendete Medium unterscheiden. Mit dem erhaltenen Protein wurden wie in 2.12.1 beschrieben, NMR-Proben erstellt, die dann, wie in 2.12.2 und 2.12.3 erwähnt, zur Aufnahme von NMR-Spektren herangezogen wurden. Diese Spektren sind die Grundlage für die Aufklärung der Struktur des Zielproteins NmPin in Lösung.

3.3 NMR-Spektroskopie

3.3.1 Selektive Demarkierung einzelner Aminosäuren

Nachdem NmPin exprimiert und gereinigt worden war, wurden die ersten NMR-Spektren aufgenommen, welche zur Zuordnung des Proteinrückgrats dienen sollten. Eines der zentralen Spektren dieses Schritts ist das ^{15}N -HSQC (*hetero single quantum coherence*; Tabelle 2.16), in dem die Kopplungen zwischen einem ^{15}N -Atom und dem daran gebundenen Wasserstoffatom sichtbar gemacht werden. In der sogenannten *Fingerprint-Region* (H: zwischen 6 ppm und 11 ppm, N: Zwischen 100 ppm und 140 ppm) ist in diesem Spektrum für jede Aminosäure (außer Prolin, welches keine NH-Gruppe besitzt) ein Signal zu erkennen, nämlich das der Kopplung des *backbone*-Ns mit dem daran gebundenen HN. Zusätzlich kann man die NH_2 -Seitenketten von Asparagin und Glutamin erkennen. Diese kann man auf Grund ihres paarweisen Auftretens und ihrer spezifischen N-Frequenz (zwischen 110 ppm und 115 ppm) leicht von den übrigen Signalen unterscheiden.

Lysin-Demarkierung:

A

GPSN**KIK**CSH ILV**S**KQSEAL AIME**K**L**K**SGE **K**FG**K**L**A**K**E**L**S** IDSG**S**A**K**K**N**G
 NLGYFT**K**GMM **V**K**P**FEDAA**F**K LQVGEV**S**E**P**I **K**SEFGY**H**I**I**K RFG

B

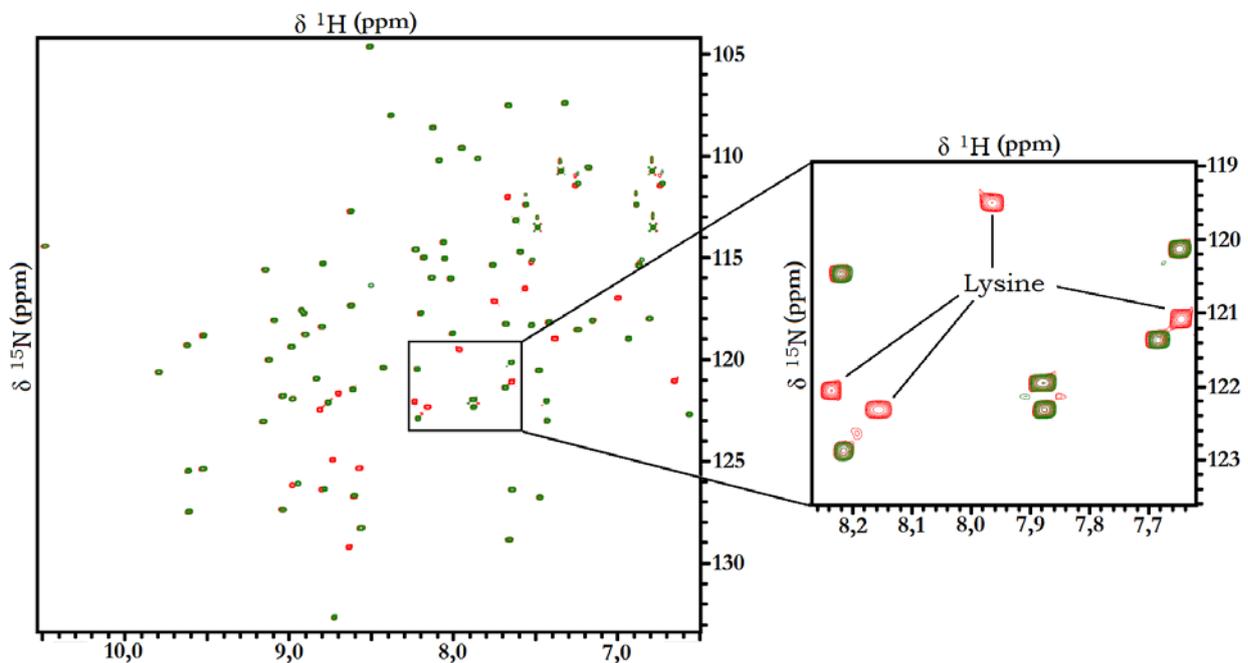


Abbildung 3.9: Primärsequenz und demarkiertes Lysin (^{15}N -HSQC-overlay)

A: Primärsequenz des für die Strukturaufklärung verwendeten NmPin-Konstrukts. In grau ist der N-Terminus zu erkennen, in grün die in NH-Spektren unsichtbaren Proline. Die Lysine sind in rot dargestellt. **B:** In rot ist das ^{15}N -HSQC zu sehen, wie es sich mit uniform ^{15}N -markiertem Stickstoff darstellt. In grün das ^{15}N -HSQC einer Probe, bei der durch Zugabe von unmarkiertem L-Lysin alle Lysin-N-H-Kopplungen verschwinden.

Das Ziel des *backbone assignments* ist es, jedem Signal in diesem Spektrum eine Aminosäure in der Primärsequenz zuzuordnen. Hierfür werden Spektren verwendet, die es erlauben, verschiedene Spinsysteme miteinander zu verbinden (hier das HNCACB). Je mehr Startinformation vorhanden ist, desto einfacher ist es, diese Zuordnung zu vervollständigen.

In Abbildung 3.9 A ist die Primärsequenz abgebildet. Neben dem N-terminalen GP (grau) und den Prolinen (grün), die in NH-Spektren nicht sichtbar sind, sind die Lysine hervorgehoben. Es fällt sehr schnell auf, dass die rotmarkierten Lysine einen Großteil der zuzuordnenden Signale des Proteins ausmachen, daher war es von großem Vorteil bereits vor Beginn der Zuordnung die Lysinsignale, mittels selektiver Demarkierung, im ^{15}N -HSQC identifizieren zu können. Abbildung 3.9 B zeigt das Ergebnis dieses Versuches, mit dem alle 15 Lysine im ^{15}N -HSQC identifiziert werden konnten. Das Verschwinden der Lysinsignale wurde während der Expression durch Zugabe von 1 g/l unmarkiertem Lysin nach der Induktion bewirkt.

Demarkierung weiterer Aminosäuren:

Das oben beschriebene, sehr einfache und kostengünstige Verfahren funktioniert nur mit Lysin in dieser Absolutheit, da Lysin eine Sackgasse des *E. coli*-Stoffwechsels darstellt. Das heißt, zugegebenes Lysin wird nicht zur Energieerzeugung genutzt, sondern nur in Proteine eingebaut. Abbildung 3.10 zeigt das typische Bild für Aminosäuren, die teilweise verstoffwechselt, aber zum größten Teil in Proteine eingebaut werden. Zu den derartigen in dieser Arbeit verwendeten Aminosäuren gehörten neben dem abgebildeten Histidin auch Leucin, Isoleucin, Arginin und Valin. Anders als zum Beispiel Glycin, Serin, Glutamat oder Aspartat, welche auch getestet wurden und zum größten Teil in den Energiestoffwechsel eingingen und so nur für eine globale Senkung der Signalstärke in ^{15}N -HSQCs führten, konnte man bei diesen Aminosäuren Folgendes feststellen: Es verschwanden neben den jeweiligen Aminosäuren-Signalen (in Abbildung 3.10 Histidin) immer dieselben 4 N-H-Signale, die, wie sich nach der Zuordnung herausstellte, zu den Aminosäuren Phenylalanin 32, Glutamin 16, Serin 43 und Serin 17 gehören. Zusätzlich verschwanden die Signale der Amid-Seitenkette der Aminosäure Asparagin 51, sowie das Hd2b von Asparagin 4. Für die Zuordnung des Proteinrückgrats, wurde daher nur die Zusatzinformation aus den Demarkierungsversuchen mit Lysin verwendet, da man die Demarkierungsversuche mit anderen Aminosäuren zwar im Nachhinein bewerten, die verschwindenden Signale aber vor der Zuordnung nicht eindeutig identifizieren konnte.

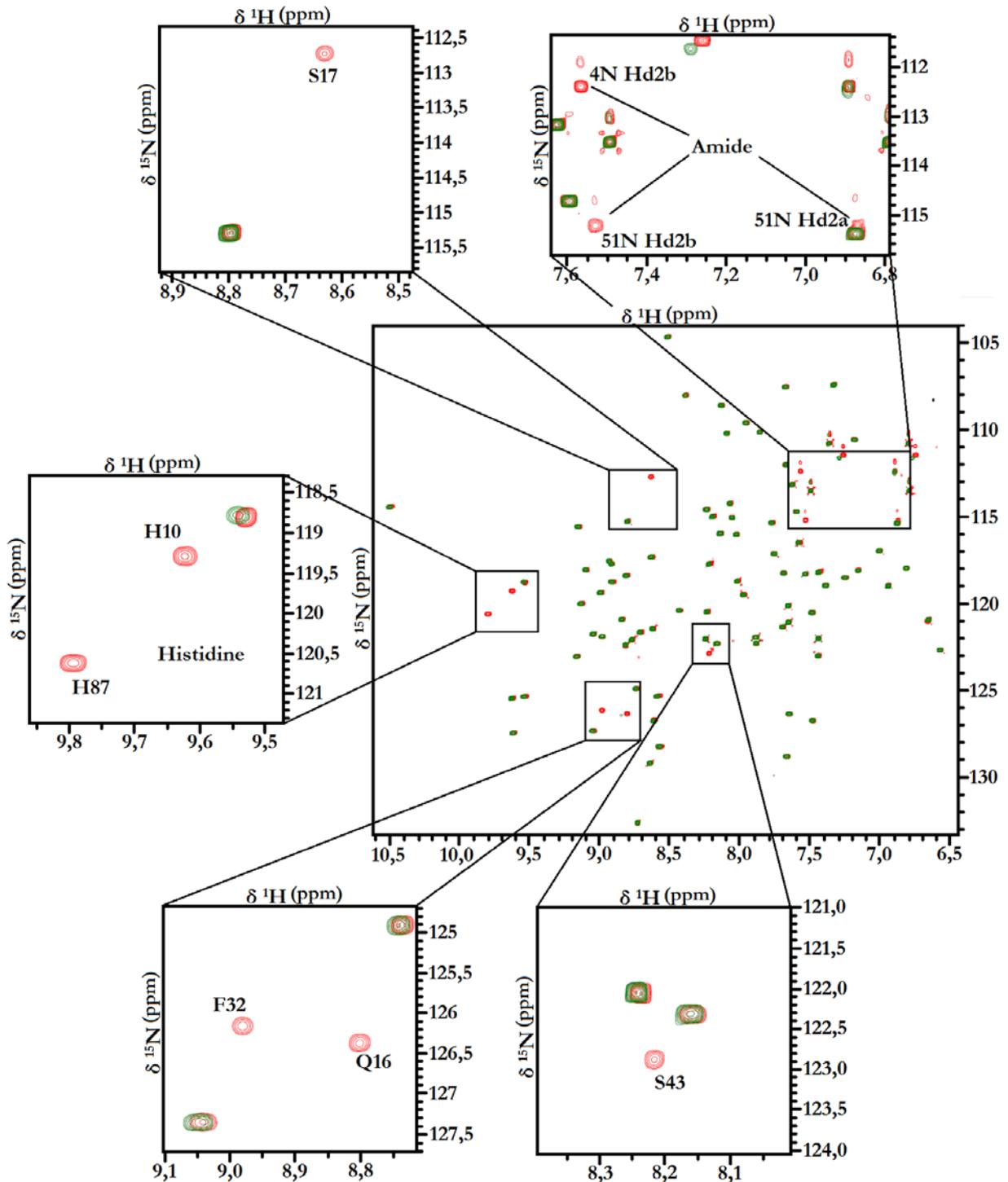


Abbildung 3.10: Grenzen der Demarkierungsexperimente (Histidin-Experimente)

Zu sehen ist eine Überlagerung der ^{15}N -HSQCs einer uniform ^{15}N -markierten Probe (rot) und einer Probe mit demarkiertem Histidin (grün). Anders als in Abbildung 3.9, wo ausschließlich die Lysine verschwinden, sind auch Signale nicht zu sehen, die nicht zu Histidin gehören. Die Signale für F32, Q16, S43 und S17, sowie für drei Amidseitenketten verschwinden in einigen derartigen Spektren (z. B.: Histidin, Isoleucin, Leucin, Valin). In solchen Spektren kann vor Beginn einer Zuordnung keine eindeutige Aussage über die Identität der verschwindenden Signale getroffen werden.

3.3.2 Zuordnung des Proteinerückgrats (*backbone assignment*)

Um die dreidimensionale Struktur eines Proteins mit Hilfe der NMR-Spektroskopie zu ermitteln, muss man zunächst jedem Wasserstoffatom (besser: so vielen wie möglich) eine Frequenz (bzw. chemische Verschiebung) zuordnen. Die Frequenzen der schweren Atome wie Stickstoff (N) und Kohlenstoff (C) sind für die Strukturrechnung von untergeordneter Bedeutung und dienen während des Zuordnungsprozesses als Mittel zum Zweck um alle Wasserstoffatome eindeutig benennen zu können. Für die Zuordnung des Rückgrats, das heißt der Atome NH, HN, CA und HA, wurden in dieser Arbeit neben dem ^{15}N -HSQC noch die 3D-Spektren ^{15}N -HSQC-NOESY, ^{15}N -HSQC-TOCSY und HNCACB verwendet. Allen diesen Spektren liegt ein ^{15}N -HSQC zu Grunde. Die dritte Dimension bilden Signalsäulen auf den HSQC-Signalen, welche sich je nach Spektren-Typ unterscheiden.

Das ^{15}N -HSQC-NOESY zeigt in der Frequenz des Atoms NH_i alle Kopplungen des Atoms HN_i mit Protonen der Aminosäure i , welche eine räumliche Entfernung von $< 4 \text{ \AA}$ (Angström) aufweisen (NOE: *nuclear Overhauser effect*). Die Atome einer Aminosäure bezeichnet man auch als Spinsystem. Das ^{15}N -HSQC-TOCSY unterscheidet sich vom ^{15}N -HSQC-NOESY nur in der Art der abgebildeten Kopplungen. Hier werden nicht Kopplungen über den Raum, sondern Kopplungen über die Bindungen innerhalb eines Spinsystems dargestellt, sogenannte *j-couplings*. Das HNCACB ist das Spektrum, welches für die Konnektivität sorgt. In diesem Spektrum sind in der Frequenz des Atoms NH_i die Kopplungen des Atoms HN_i mit den Atomen CA_i , CB_i , sowie CA_{i-1} und CB_{i-1} zu erkennen. Die Kopplungen zwischen HN_i mit CA_i und CA_{i-1} sind in positiver, die mit CB_i und CB_{i-1} in negativer Phase abgebildet. Des Weiteren sind die Signale der Atome CA_i und CB_i deutlich stärker als die der Atome CA_{i-1} und CB_{i-1} , so dass man sich durch die Aminosäurekette von stark zu schwach in Richtung C-Terminus hangeln kann.

Abbildung 3.11 A zeigt die typischen chemischen Verschiebungen für alle relevanten Atome der Aminosäure Asparagin, welche willkürlich zur Veranschaulichung ausgewählt wurde. Diese Referenzgraphen, welche im verwendeten Programm CCPN Analysis (Tabelle 2.9) enthalten sind und über die chemischen Verschiebungen der entsprechenden Atome in bereits gelösten Molekülen ermittelt werden, bilden einen ersten Informationsspeicher zu Beginn einer Zuordnung. So kann man zum Beispiel Alanin, Serin, Threonin oder auch Phenylalanin und Glycin anhand ihrer typischen chemischen Verschiebungen der CA- und CB-Atome im HNCACB erkennen (Abbildung 3.11B+C). Auch das ^{15}N -HSQC-NOESY und das ^{15}N -HSQC-TOCSY enthalten Informationen über den Typ der abgebildeten Aminosäure (Abbildung 3.11 B). Legt man diese beiden Spektren übereinander, ergeben sich auch hier Muster, welche typisch für bestimmte Aminosäuren sind. Alle diese Beobachtungen stellen jedoch nur Visualisierungen der in Abbildung 3.11 A gezeigten Referenzgraphen dar.

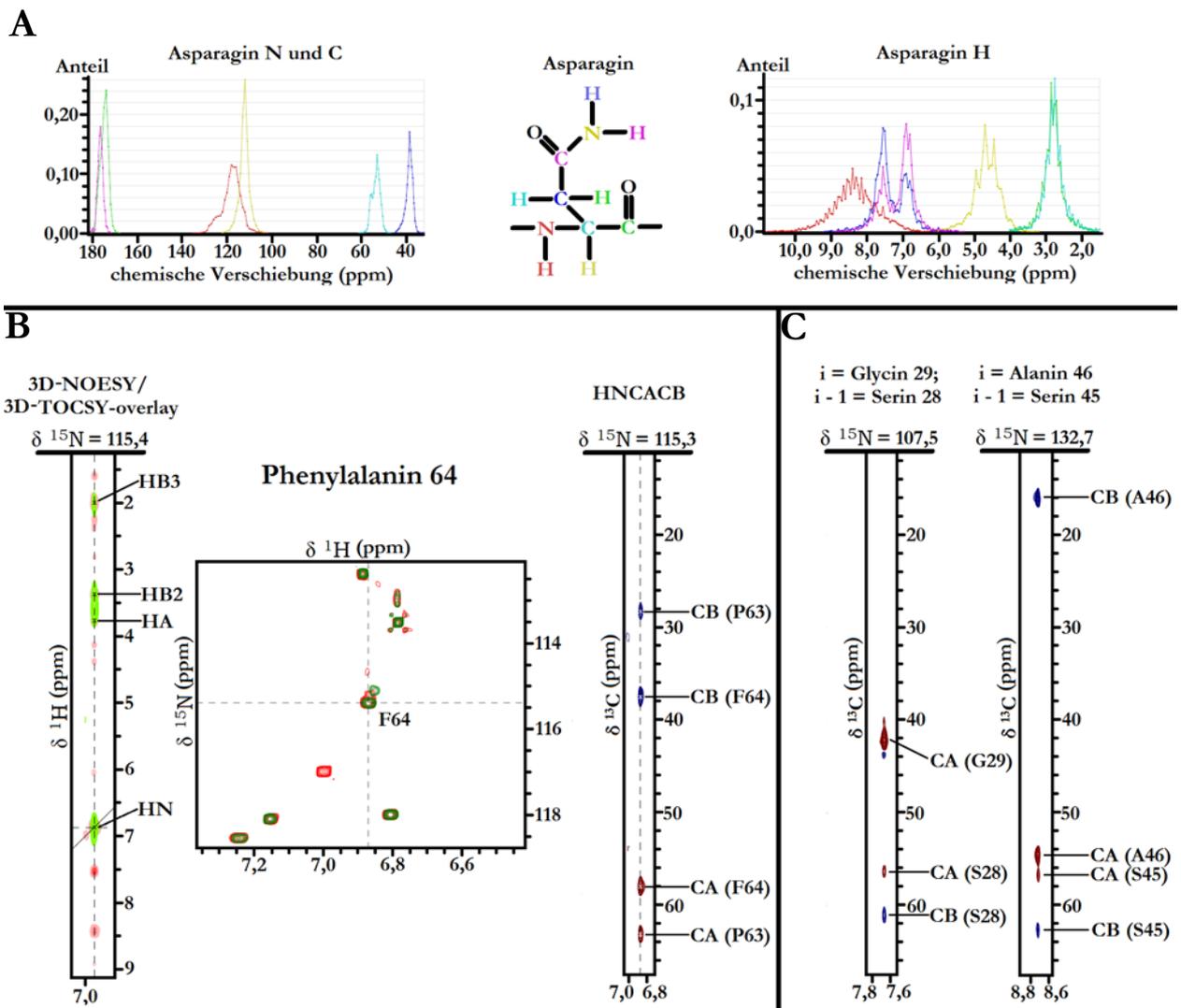


Abbildung 3.11: Backbone Assignment

A: Referenzgraphen für die typischen chemischen Verschiebungen aller relevanten Atome der Aminosäure Asparagin. Links sind die Werte für die schweren Atome N und C zu sehen, rechts die Werte für die Wasserstoffatome. Die Farben der Atome im Modell entsprechen der Farbe des entsprechenden Graphen.

B: Die drei für das *backbone assignment* verwendeten Spektren werden beispielhaft für die Aminosäure F64 dargestellt. Im **HNCACB** sind die positiven Signale in **dunkelrot**, die negativen in **blau** dargestellt. Im ^{15}N -HSQC-Ausschnitt ist das Lysinspektrum (vgl. 3.3.1) in **grün**, das reguläre Spektrum in **rot** dargestellt. Im **3D-HSQC-overlay** ist das NOESY-Spektrum **hellrot**, das TOCSY-Spektrum **hellgrün** dargestellt.

C: Zwei Streifen (*strips*) aus dem **HNCACB** sind dargestellt, um die Besonderheiten der Signalmuster der Aminosäuren Glycin, Serin und Alanin darzustellen. Auch die Tatsache, dass die Signale für die Aminosäure i eines *strips* deutlich stärker sind als jene der Aminosäure $i-1$ wird in beiden *strips* erkennbar.

Die HN-NH-Kopplungen (genauer die chemischen Verschiebungen von HN und NH) sind der Ausgangspunkt für das *backbone assignment*. Die Koordinaten dieses Pärchens können für jedes Signal in die Maske des verwendeten Zuordnungsprogramms CCPN Analysis (Tabelle 2.9) eingegeben werden um zu den entsprechenden Signalen der weiteren relevanten Spektren zu navigieren (Abbildung 3.11 B). Das ^{15}N -HSQC-NOESY und das ^{15}N -HSQC-TOCSY werden hierbei vor allem zur Identifizierung des Aminosäuretyps verwendet. Das HNCACB sorgt derweil für die sequentielle Konnektivität. Für jedes HSQC-Koordinatenpaar erhält man einen

Streifen (engl.: *strip*) mit 4 Signalen (3 Signale für einen Glycin-enthaltenden *strip*, da ein CB-Atom fehlt). Die positiven Signale stehen hierbei für die chemischen Verschiebungen von CA-Atomen, die negativen für die von CB-Atomen. Die stärkeren Signale stehen für die Signale der Aminosäure *i*, sprich für die dessen N-H-Kopplung den angezeigten *strip* benennt, die schwächeren Signale stehen für die Signale der Aminosäure *i-1*, sprich der N-terminal gelegenen Aminosäure der Aminosäure *i*.

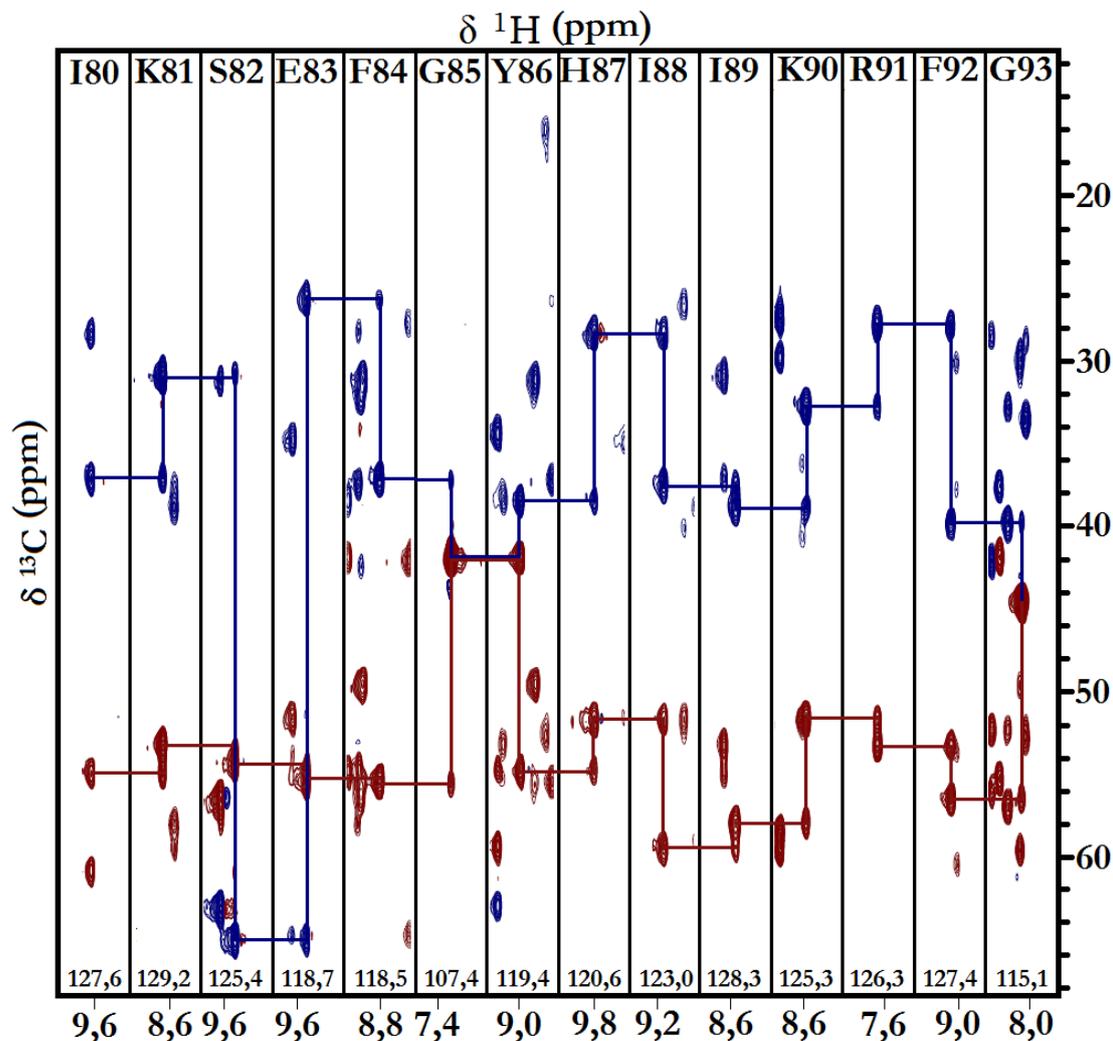


Abbildung 3.12: N-Terminus von NmPin im HNCACB

An Stelle 79 der NmPin-Sequenz befindet sich ein Prolin. An diesen Stellen brechen die Zuordnungsketten ab, da die Aminosäure Prolin keine N-H-Gruppe besitzt. Gezeigt sind alle 14 *strips* des C-Terminus. Die CA- und CB-Signale wurden verbunden, um den Weg der Zuordnung zu dokumentieren. Die Werte am unteren Ende der *strips* stehen für die chemische Verschiebung des Atoms NH, auf welchen das Spinsystem *i* fußt.

Abbildung 3.12 zeigt beispielhaft die 14 *strips* des C-Terminus ab dem letzten von 3 Prolinen, P79. Prolin ist in keinem der HN-basierten Spektren zu sehen, da es auf Grund seines zyklischen Charakters keine H-N-Gruppe besitzt. Die CA- bzw. die CB-Signale der Aminosäuren I80 bis G93 sind verbunden. Man erkennt die Leserichtung, welche ein schwaches Signal auf ein starkes Signal folgen lässt, wenn man sich in Richtung C-Terminus bewegt und *vice versa*.

Ein weiteres Resultat der Zuordnung mittels HNCACB sind die chemischen Verschiebungen der Atome CA und CB, die sich für die Aminosäuren 2-93 automatisch durch die Verbindung der einzelnen Aminosäuren ergeben. Zusätzlich konnten mit Hilfe des ^{15}N -HSQC-*overlays* alle HA-Atome zugeordnet werden, da der NOE zwischen HN_i und HA_{i-1} im Spinsystem i sehr stark abgebildet wird und so identifiziert werden kann. Diese Daten sind vor allem für den nächsten Schritt, die Zuordnung der Seitenketten, wichtig.

3.3.3 Zuordnung der Seitenketten

Ähnlich der Zuordnung des Rückgrats (1.3.2), ist das Ausgangsspektrum der Seitenkettenuordnung (*side chain assignment*) ebenfalls ein 2D-HSQC. Da aber die meisten H-Atome der Seitenketten mit C-Atomen verknüpft sind, handelt es sich nicht um ein ^{15}N -, sondern um ein ^{13}C -HSQC. Das ^{13}C -HSQC kann in mehrere Abschnitte unterteilt werden. Zum einen kann man durch Einstellen der Aufnahmeregion zwischen aliphatischer (0 ppm-80 ppm) und aromatischer Region (120 ppm-180 ppm) unterscheiden. Zum anderen besteht auch das Spektrum über den Aliphaten aus zwei Teilen (Abbildung 3.14). In der unteren Hälfte des Spektrums, zwischen 40 ppm und 80 ppm, befinden sich die Signale der Kopplungen zwischen HA und CA des Rückgrats sowie die HB-CB-Kopplungen von Serinen und Threoninen. Diese Region kann mit den Daten des *backbone assignments* vor Beginn des *side chain assignments* vollständig zugeordnet werden. Neben dem ^{13}C -HSQC wird für diesen Schritt eine Überlagerung (*overlay*) der Spektren HCCH-COSY und HCCH-TOCSY verwendet.

Bei der Aufnahme der HCCH-Spektren ist zu beachten, dass in F1 die Aufnahmereichweite (*spectral width*) nach der Formel $\text{SW}(\text{F1}) = \frac{1}{2} \text{SW}(\text{F3})$ einzustellen ist, um eine gute Auflösung zu erhalten, diese Änderungen müssen vor Beginn der Aufnahme in der Maske *acquisition parameters* des Programms Topspin 3.0 (Tabelle 2.9) eingegeben werden. Um dies wieder auszugleichen, muss bei der anschließenden Prozessierung eine Spektrums-Referenzfrequenz (*spectrum reference frequency*) nach der Formel $\text{SR}(\text{Hz}) = \frac{1}{4} \text{SW}(\text{F1})(\text{Hz})$ berücksichtigt werden, diese Änderungen müssen nach der Aufnahme in der Maske *processing parameters* des Programms Topspin 3.0 (Tabelle 2.9) eingegeben werden. Der Unterschied zwischen dem TOCSY- und dem COSY-Spektrum liegt darin, dass im TOCSY-Spektrum theoretisch immer das ganze Spinsystem zu sehen ist, während im COSY-Spektrum nur Kopplungen zwischen Atomen, welche nicht mehr als drei Bindungen auseinander liegen, ein Signal ergeben. In Abbildung 3.14 kann man erkennen, dass in der HH-Projektion mit der Frequenz des CA-Atoms von I22 (62,26 ppm) nicht nur das Signal für die HA-HA-Kopplung (Diagonale), bei 3,41 ppm, im COSY-Spektrum zu sehen ist, sondern auch das Signal für die HA-HB-Kopplung, bei 1,93 ppm. Die Kopplungen HA-HG12 (1,74 ppm), HA-HG13 (0,86 ppm), HA-HG2* (0,67 ppm) und HA-HD* (0,61 ppm) sind nur im TOCSY-Spektrum zu sehen, da hier mehr als drei Bindungen zwischen den Wasserstoffatomen liegen.

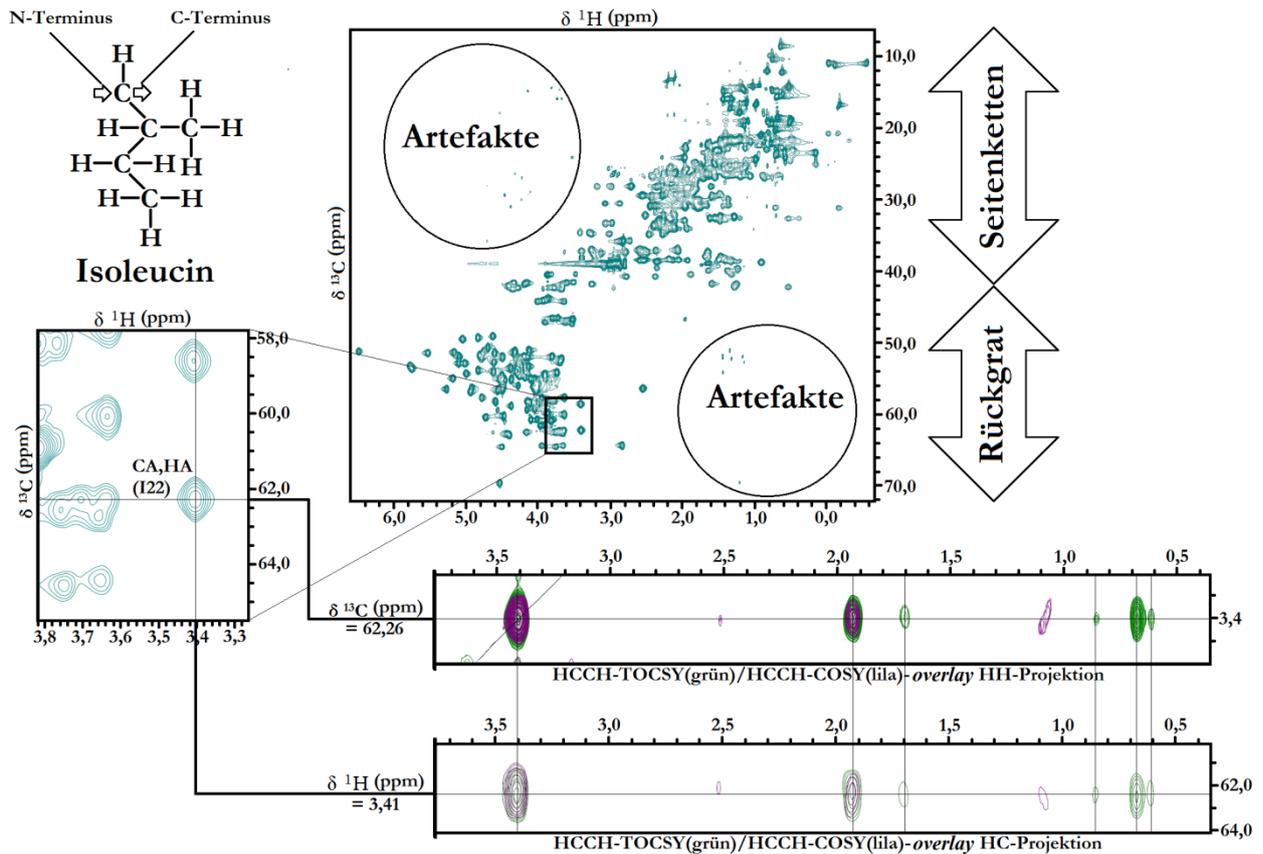


Abbildung 3.14: Prinzip der Seitenkettenuordnung (side chain assignment)

Prinzip der Seitenkettenuordnung am Beispiel der Aminosäure Isoleucin. Die Signale des zentralen ^{13}C -HSQCs sind in blau dargestellt. In den HH- bzw. HC-Projektionen des HCCH-Overlays sind die Signale des TOCSY-Spektrums in grün, die des COSY-Spektrums in violett dargestellt. Für jedes Signal im ^{13}C -HSQC kann man im HCCH-Overlay über beide Koordinaten zu einer entsprechenden strip-Projektion navigieren. Theoretisch sind die Signalmuster in beiden Projektionen identisch, für die Aminosäure I22 ist dies auch der Fall, in vielen anderen Fällen sind die Signale der HC-Projektion kaum oder gar nicht zu erkennen.

Durch die Kombination aller resultierenden strips (Abbildung 3.15) konnten 88 der 92 aliphatischen Seitenketten-Wasserstoffatome zugeordnet werden. Probleme gab es nur bei 4 der 15 Lysine (K25, K27, K34 und K37), da diese selbst durch 3D-Spektren nicht eindeutig benannt werden konnten. Für diese Lysine bricht die Zuordnung beim HA ab, da bereits die HB- und HG-Atome nicht mehr separiert werden können. Der Hauptteil der Zuordnung war damit abgeschlossen. Für die Zuordnung der fehlenden aromatischen und amidischen Seitenketten mussten andere Methoden und Spektren verwendet werden.

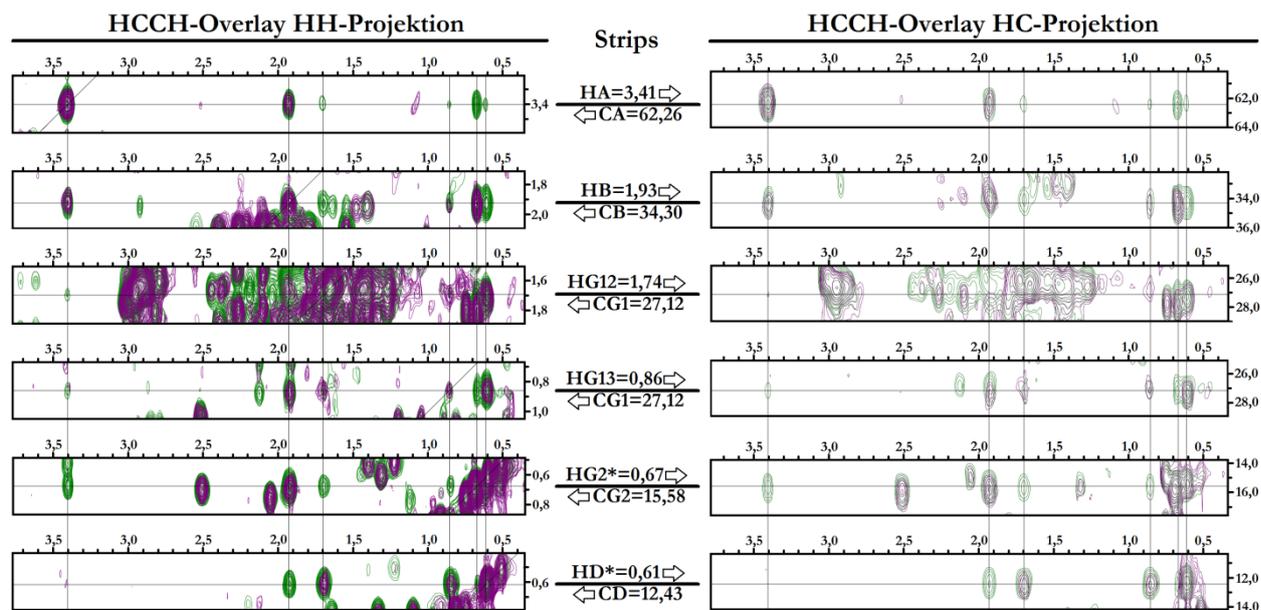


Abbildung 3.15: Beispielzuordnung der Seitenketten von I22

Vollständige Zuordnung der Seitenketten-Wasserstoffatome der Aminosäure Isoleucin 22. Durch die Kombination der verschiedenen *strips* im Hinblick auf TOCSY- und COSY-Signale können alle Wasserstoffatome eindeutig zugeordnet werden.

3.3.4 Aromaten, Amide, Cystein-HG

Für die Zuordnung der aromatischen Seitenketten wurden zwei Arten von Spektren verwendet. Zum einen, wie bereits in 3.3.2, eine Überlagerung aus ^{15}N -HSQC-TOCSY bzw. -NOESY, zum anderen homonukleare 2D-Spektren (NOESY, TOCSY, COSY). Die Besonderheit der 2D-Spektren war, dass sie in D_2O aufgenommen wurden und somit alle ^1HN -Atome durch ^2H (Deuterium) ersetzt waren. Dieser Austausch findet nur bei ^1HN -Atomen, nicht aber bei ^1HC -Atomen statt. Da Deuterium kein halb-integrierter Kern ($\text{Anzahl}_{\text{Neutronen}} + \text{Anzahl}_{\text{Protonen}} = \text{ungerade}$) und diese Eigenschaft für die Detektion in NMR-Spektren unabdingbar ist, sind nur noch Signale der Kopplungen mit HC-Atomen, nicht aber mit HN-Atomen in den Spektren sichtbar. Dies sorgt in der *Fingerprint* (engl.: Fingerabdruck)-Region der 2D-Spektren dafür, dass diese ansonsten mit Signalen überfüllte Region nun eindeutig auswertbar ist. Um Proben in D_2O zu messen, wurde das Protein nach der Reinigung lyophilisiert (Tabelle 2.1) und danach in 100 % D_2O (Tabelle 2.3) resuspendiert.

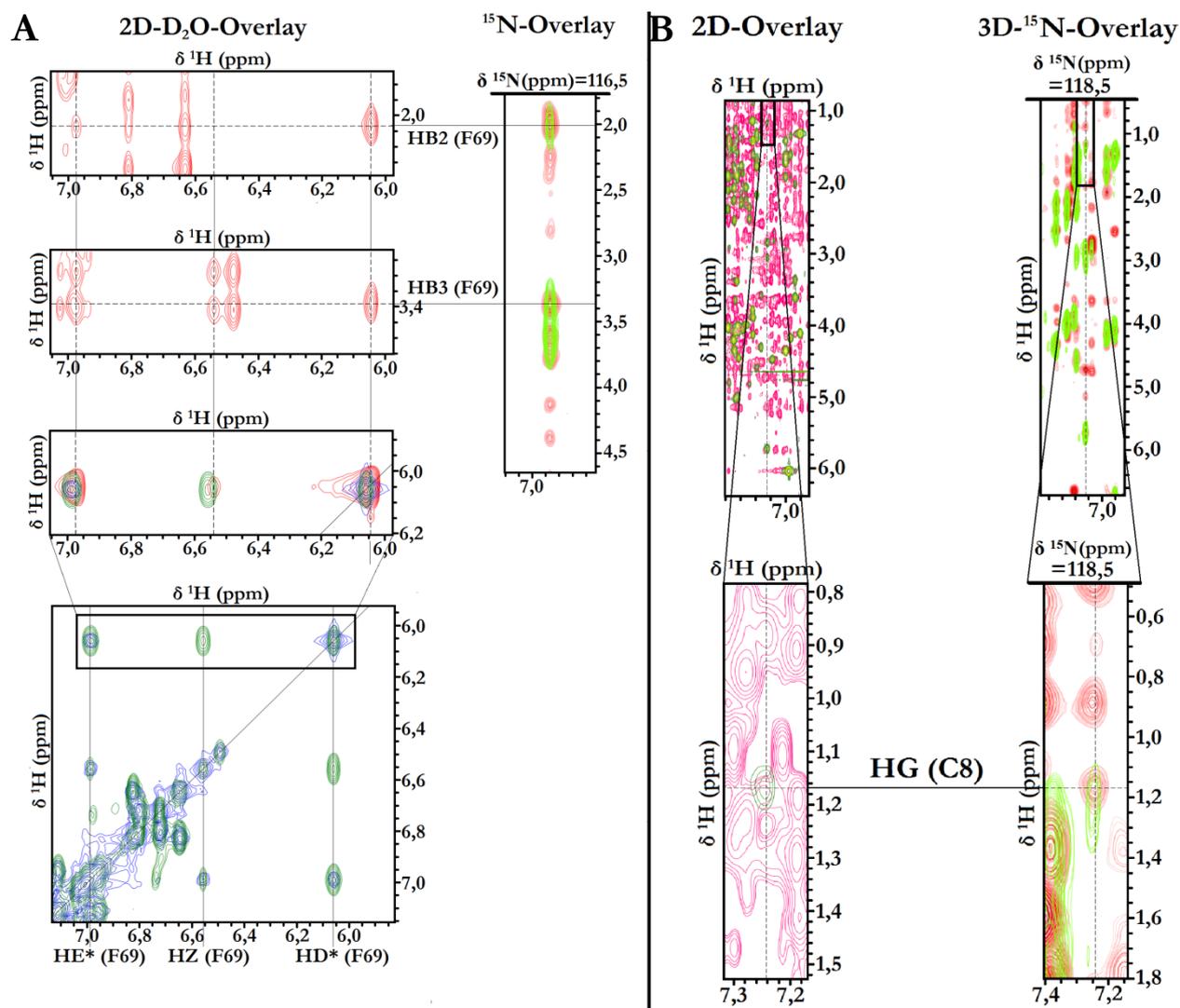


Abbildung 3.16: Zuordnung: Aromaten am Beispiel F69, Amide und Cystein HG

A: Die aromatischen Seitenketten wurden mit Hilfe der Überlagerungen von in D₂O aufgenommenen, homonuklearen 2D-Spektren (COSY, TOCSY, NOESY) und der der beiden 3D-¹⁵N-HSQC-Spektren (TOCSY, NOESY) zugeordnet. **B:** Das Signal für die HN-HG-Kopplung des Cystein 8 ist sowohl im 2D- als auch im 3D-TOCSY-Spektrum (beide grün) klar zu erkennen. Im 2D-NOESY (rot) kann dieses Signal auf Grund der Tatsache, dass die spezifische Region sehr überfüllt ist nicht, mit Bestimmtheit zuordnen. Im 3D-NOESY (rot, rechts) ist das Signal für diese Kopplung klar zu erkennen. **C:** Die amidischen Seitenketten wurden mit Hilfe des ¹⁵N-HSQC's (rot) und des HNCACB's (positive Signale, negative Signale) zugeordnet.

In Abbildung 3.16 A ist die Zuordnung des aromatischen Rings der Aminosäure F69 zu sehen. Der Ring enthält fünf Wasserstoffatome, wobei nur drei unterschieden werden können, da die Atome HD2 und HD3 sowie die Atome HE2 und HE3 jeweils chemisch identisch sind und somit unter HD* und HE* zusammengefasst werden. Aromatische Spinsysteme erscheinen als eine in Rechtecken angeordnete Kombination von COSY- und TOCSY-Signalen in der Nähe der Diagonalen. Anhand der Stärke der NOE-Signale der Kopplungen der aromatischen Wasserstoffatome mit den dem Ring nächsten aliphatischen Wasserstoffatomen (in Phenylalanin HB2, bei 1,96 ppm, und HB3, bei 3,41 ppm), kann man die Wasserstoffatome des Rings benennen. Die Signale für die Kopplungen zwischen den HB-Atomen sind in Phenylalanin 69 mit HD* am stärksten, mit HE* bereits schwächer und mit HZ nicht mehr zu erkennen (Abbildung 3.16 A). Mit dieser Methode konnten alle aromatischen Wasserstoffatome zugeordnet werden.

Abbildung 3.16 B zeigt die HN-HG-Kopplung der Aminosäure Cystein 8 bei 1,16 ppm, sowohl im 2D- als auch im 3D-TOCSY-Spektrum. Das C8 liegt daher in reduzierter Form vor.

Abbildung 3.16 C ist ein Beispiel für je eine Zuordnung des Seitengruppenamids von Asparagin und Glutamin (N4 bzw. Q16) mit Hilfe der Signale des HNCACBs und des ¹⁵N-HSQC zu sehen. Die Seitenkettenamid-Stickstoffatome tragen anders als die *backbone*-Stickstoffatome zwei und nicht nur ein Wasserstoffatom. Daher sind sie als Doppelspinsysteme im HNCACB zu erkennen. Ihre Signalintensität ist weit schwächer als die der Signale, welche auf Rückgrat-HN-Atomen basieren, jedoch konnten alle fünf Seitenkettenamide mit dieser Methode zugeordnet werden. Asparagin und Glutamin unterscheiden sich in der Anzahl der aliphatischen CH₂-Gruppen; während Asparagin nur eine solche Gruppe trägt, besitzt Glutamin zwei. Dies führt dazu, dass das Doppelspinsystem der Asparaginseitenkette dasselbe Muster aufweist, wie das Spinsystem, welches auf dem Rückgrat-HN der Aminosäure basiert. Der einzige Unterschied liegt in der Phase der Signale. Während in *backbone*-Spinsystemen des HNCACBs CA-Atome immer positive und CB-Atome immer negative Signale zeigen, ist dies für das Amiddoppelspinsystem genau andersherum. Für Glutamin, das neben CA und CB auch ein CG besitzt, gilt, dass im Doppelspinsystem CB als negatives Signal erhalten bleibt, CA nicht mehr zu sehen ist, dafür aber CG als positives Signal dargestellt wird. Daher konnte mit diesem Verfahren auch die chemische Verschiebung der Glutamin-CG-Atome ermittelt werden.

3.3.5 Wasserstoffbrücken-Donoren

Wie bereits in 1.3.4 beschrieben, tauschen N-H-Gruppen ihr H-Atom schnell mit dem Lösungsmittel aus. Protein, welches in H₂O extrahiert und gereinigt wurde, besitzt daher ¹H-Atome an allen Positionen. Lyophilisiert man nun diese Probe und entzieht ihr damit alles Wasser (H₂O), so kann man die Probe anschließend in D₂O resuspendieren. Die ¹H-Atome in N-H-Gruppen werden nun innerhalb weniger

Sekunden durch ^2H -Atome ersetzt. Der Prozess des Austausches ist allerdings stark verlangsamt, falls das ^1H -Atom in eine Wasserstoffbrückenbindung eingeflochten ist.

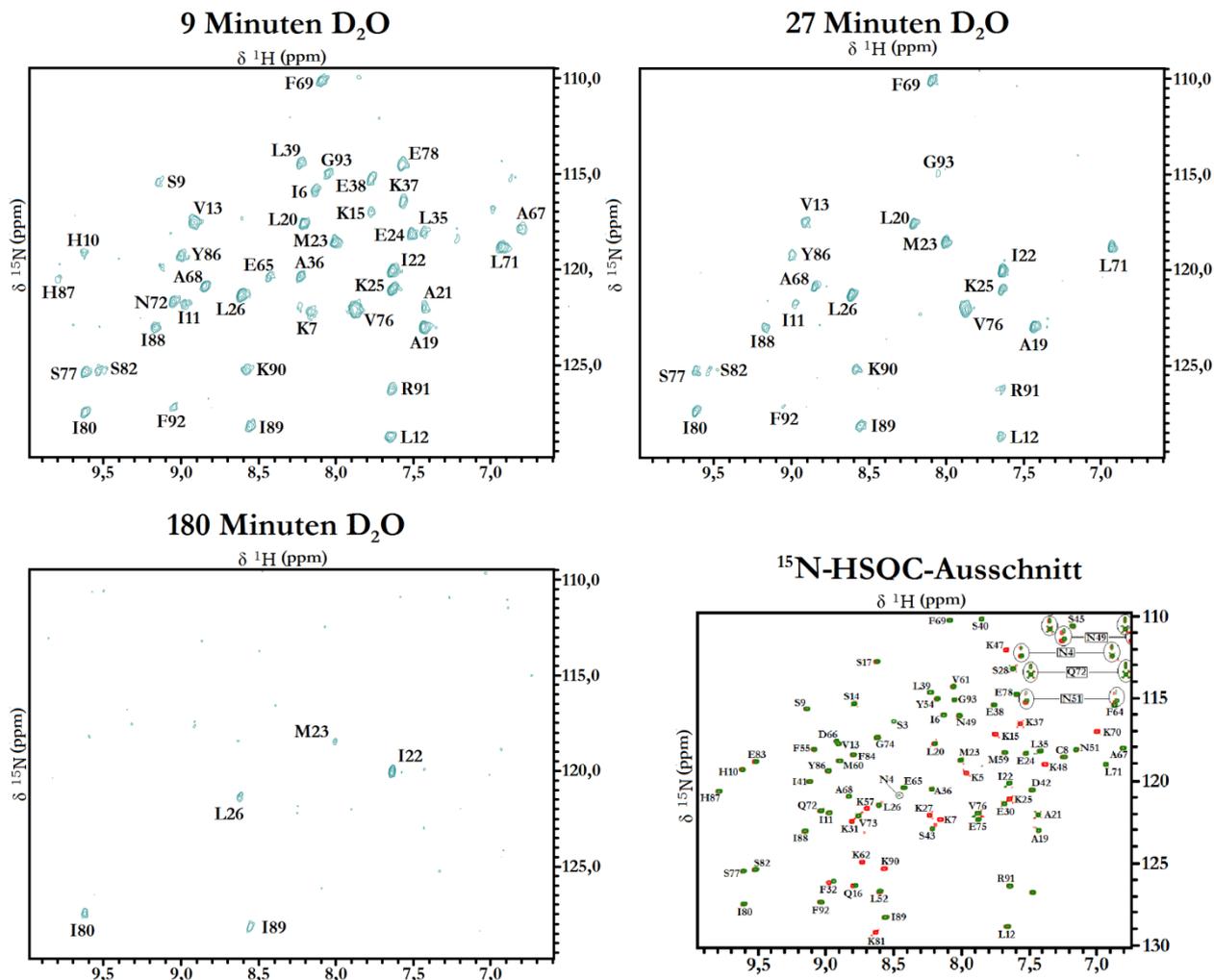


Abbildung 3.17: Wasserstoffbrücken-Donoren

Rechts unten ist der Referenzausschnitt aus dem regulären ^{15}N -HSQC zu sehen. Derselbe Ausschnitt ist für drei Zeitpunkte des Wasserstoffbrückenexperiments dargestellt. Nach 9 Minuten war die erste Messung beendet; 40 der 78 NH-Signale sind nach dieser Zeitspanne noch zu sehen. Alle diese Signale sind Teil einer Wasserstoffbrücke. Nach 27 Minuten sind noch 23 der 78 NH-Signale zu erkennen. Diese N-H-Gruppen sind in starke Wasserstoffbrücken involviert und wurden daher auch in die Strukturrechnung mit einbezogen. Nach 180 Minuten endete das Experiment. Die N-H-Gruppen der Aminosäuren I22, M23, L26, I80 und I89 sind noch immer zu erkennen; dies sind die Donoren der stärksten Wasserstoffbrücken.

Diesen Sachverhalt macht man sich bei einem Experiment zunutze, bei dem man eine H_2O -Probe in 100 % D_2O resuspendiert und ab dem Zeitpunkt der Resuspension kurze ^{15}N -HSQCs (*number of scans: ns = 2*) aufnimmt. Eine solche Messung dauert 9 Minuten. Dies bedeutet, dass eine Messung über die ersten 9 Minuten eine Mittelung der Signalintensität über die Zeitspanne 0 min-9 min darstellt, dies entspricht dem Wert der Intensität bei 4,5 Minuten. Abbildung 3.17 zeigt immer die Endpunkte der Messung.

Nach 9 Minuten sind noch 40/78 der Signale des gewählten Ausschnitts zu sehen. Der Ausschnitt wurde so gewählt, da die Signale außerhalb bereits nach der ersten Messung verschwanden. Alle diese 40 Signale gehören zu Aminosäuren deren HN-Atom Teil einer Wasserstoffbrücke ist. Wäre dem nicht so, wären sie bereits nach der ersten Messung verschwunden. Der Zeitpunkt 27 Minuten ist abgebildet, da diese 23 Donoren in die erste Strukturberechnung mit einbezogen wurden. Der Endpunkt der Messung war nach 180 Minuten erreicht. Nach dieser Zeitspanne waren nur noch die Signale für die N-H-Kopplung der Aminosäuren I22, M23, L26, I80 und I89 zu erkennen. Diese Reste sind in die stärksten Wasserstoffbrücken des Proteins NmPin eingebaut.

3.4 Strukturrechnung

3.4.1 Cyana 3.0

Nach der Zuordnung der Signale (3.3) folgte die initiale Strukturrechnung mit Hilfe des Programms Cyana 3.0 (2.12.4). Es handelt sich hierbei um ein Skript-basiertes Programm, welches automatisches NOE-assignment mit mehreren Strukturrechnungszyklen vereint. Abbildung 3.18 zeigt das verwendete *script*.

```

peaks      := 15N_Peaks,aro_2d_d2o,aro_2d_h2o_hn,13C-ali,d20-ali    # NOESY peak lists in XEASY format
prot       := ShiftList1                                          # names of chemical shift lists
restraints := hbonds.lol                                          # additional (non-NOE) constraints
tolerance  := 0.040,0.030,0.45                                    # chemical shift tolerances
#calibration := |                                                # NOE calibration parameters
info       := full
structures := 100,20                                             # number of initial, final structures
steps      := 10000                                             # number of torsion angle dynamics steps
rmsdrange  := 1..93                                             # residue range for RMSD calculation
randomseed := 434726                                           # random number generator seed

noeassign peaks=$peaks prot=$prot autoaco

```

Abbildung 3.18: Verwendetes Skript für Cyana 3.0

Das Hauptskript der Strukturrechnung mit gekoppelter NOE-Zuordnung enthielt die verwendeten *peak*-Listen, die *shift*-Liste, eine Wasserstoffbrücken-*restraint*-Datei und die Standard-Toleranzlevel. Es wurden 100 Strukturen im letzten Durchlauf errechnet und die 20 Strukturen mit der niedrigsten RMSD (*root mean square deviation*) wurden ausgegeben. Für jeden Rechenschritt wurden 10000 Schritte der Drehungswinkel-Dynamiken berechnet, nach jedem Zyklus wurde eine *simulated annealing*-Runde durchlaufen.

Die vorgegebenen Peak-Listen wurden mit Hilfe von CCPN Anaylsis aus folgenden Spektren erstellt: ¹⁵N-HSQC-NOESY, ¹³C-HSQC-NOESY, 2D-H₂O-NOESY und 2D-D₂O-NOESY. Alle diese Listen wurden im XEASY-Format gespeichert und bekamen die Endung .peaks. Die *shift*-Liste wurde mit demselben Programm erstellt und im selben Format gespeichert und erhielt die Endung .prot. Die *shift*-Liste war zu 96,7 % vollständig, es fehlten lediglich die chemischen Verschiebungen für das N-terminale H-Atom der Aminosäure G1, sowie die Seitenketten der bereits erwähnten Lysine 25, 27, 34 und 37. Die *restraints*-Datei für die gesetzten Wasserstoffbrücken wurde mit der Endung .lol versehen. Eine gesetzte Wasserstoffbrücke führte zu zwei Distanz-*restraints*, einem oberen und einem unteren Limit. Da diese Wasserstoffbrücken nicht direkt gemessen, sondern nur die Donoren gemessen, die Akzeptoren jedoch durch Vergleich mit der *guide*-Struktur ermittelt wurden, wurde dem Programm erlaubt gesetzte Wasserstoffbrücken wieder aufzubrechen. Es wurden im letzten Strukturrechnungsschritt 100 Strukturen berechnet und die 20 mit der niedrigsten Abweichung vom Durchschnitt (RMSD: *root mean square deviation*) in eine .pdb-Datei geschrieben. Alle verwendeten *input*- und *output*-Dateien der Strukturrechnung können auf der der Arbeit beigefügten CD eingesehen werden.

Zusätzlich zu den oben erwähnten Dateien wurde ein Homologie-Modell als so genannte *guide*-Struktur für die Berechnung verwendet. Das Homologie-Modell wurde mit Hilfe von Yasara (Tabelle 2.9), unter Verwendung des Yasara Nova Kraftfelds,

erstellt. Als Blaupause diente das NMR-Ensemble von CsPin (pdb-ID: 2rqs). CsPin ist ein dem NmPin sehr nah verwandtes Protein (Proteinidentität: 80,7 %; Proteinähnlichkeit 92 %) aus dem nächsten Verwandten von *N. maritimus*, dem Schwammsymbionten *Cenarchaeum symbiosum* (1.4.1).

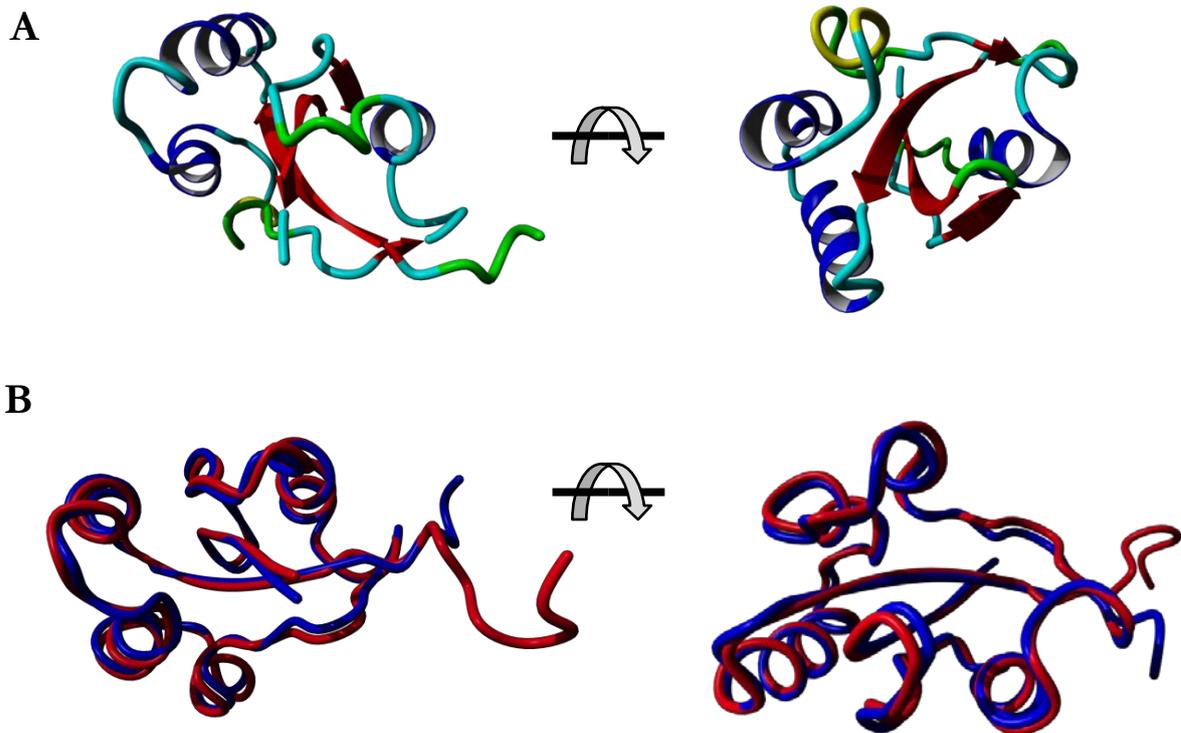


Abbildung 3.19 Homologie-Modell NmPin

A: Das obere Bilderpaar zeigt das Ergebnis des *homology model* in *ribbon*-Darstellung erstellt mit YASARA. **B:** Das untere zeigt eine Überlagerung (erstellt mit dem Programm MUSTANG aus dem YASARASuite) des NmPin-Homologiemodell (blau) mit der Durchschnitts (engl.: *average*)-Struktur von 2rqs (CsPin Strukturensamble; rot). Die Ansicht kippt jeweils um 180° über die *x*-Achse.

Abbildung 3.19 A zeigt das fertige Homologiemodell in *ribbon*-Darstellung. Die Überlagerung mit der *average*-Struktur (Abbildung 3.19 B) des CsPin-Ensembles 2rqs zeigt, dass die Übereinstimmungen über das *backbone* sehr groß sind. Die RMSD zwischen diesen beiden Strukturen liegt mit 11.0265 Å dennoch sehr hoch, da die Seitenketten sehr stark divergieren. Die *average*-Struktur für das CsPin-Ensemble wurde (wie alle folgenden *average*-Strukturen auch) mit YASARA erstellt. Die 20 Strukturen wurden hierbei zunächst mit Theseus 1.2.1 aus dem YASARA-suite überlagert, danach die jeweiligen Atompositionen addiert und auf die erste der 20 Strukturen projiziert. Diese *average*-Struktur ist jedoch geometrisch ungenau, so dass eine anschließende Energieminimierung mit dem YASARA NOVA-Kraftfeld nötig war. Die RMSD zwischen der mathematischen *average*-Struktur und der Struktur nach der Energieminimierung lag für das CsPin-Ensemble bei 1,43 Å.

Für die finale Strukturrechnung mit Cyana 3.0 wurde wie folgt vorgegangen: Zunächst wurde eine Rechnung ohne *guide*-Struktur durchgeführt. Das Programm durchläuft

nun 7 Zyklen von Zuordnung und Rechnung. Nach jedem Zyklus erstellt das Programm ein Ensemble von 20 Strukturen und benennt dieses mit cycleX.pdb (X ist Nummer des Zyklus). Um nun die *guide*-Struktur einzufügen, wurden alle Daten nach dem ersten Zyklus gelöscht, die Datei cycle1.pdb durch das Homologie-Modell ersetzt und die Rechnung fortgeführt.

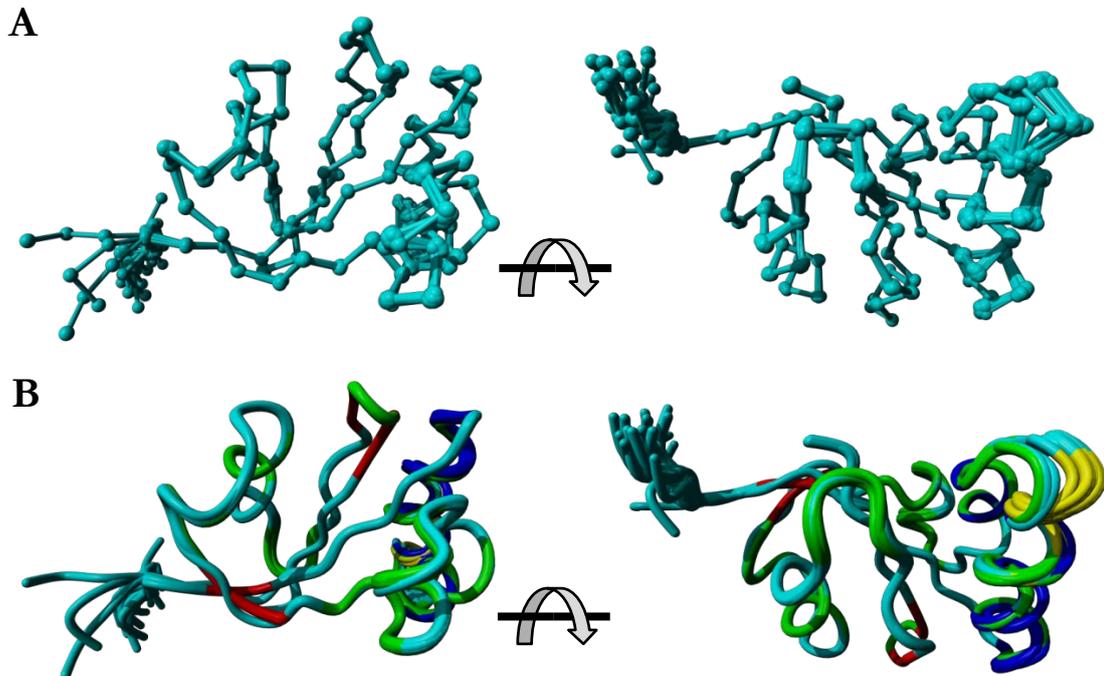


Abbildung 3.20: NmPin-Ensemble nach Rechnung mit Cyana 3.0

A: NmPin-Ensemble (20 Strukturen) nach Rechnung mit Cyana 3.0 in der Skelett-Darstellung. **B:** *backbone*-Darstellung des NmPin-Ensembles (20 Strukturen). In **rot** sind β -Faltblatt-, in **blau** α -helikale Strukturen erkennbar. In **grün** bzw. **gelb** sind *turn* und *coil* Strukturen zu erkennen. Das Ensemble wurde mit Theseus 1.2.1 des YASARA-*suite* überlagert. Die RMSD über alle Atome liegt bei 1,08 Å (backbone: 0,70 Å).

Das Ergebnis dieser Rechnung ist in Abbildung 3.20 zu erkennen. 3.20 A zeigt das gut aufgelöste Rückgrat (RMSD: 0,70 Å). 3.20 B lässt vor allem rechts unten erkennen, dass einige Sekundärstrukturen noch nicht einwandfrei aufgelöst werden konnten. Die roten (β -Faltblatt) und blauen (α -Helix) Bereiche sind nicht überall ausreichend ausgebildet. In beiden Darstellungen ist klar der sehr flexible N-Terminus zu erkennen, der auch starken Einfluss auf die RMSD-Werte hat. Ohne diesen liegen die Werte bei 0,91 Å, für alle Atome, sowie 0,33 Å für das *backbone*. Alle RMSD-Werte wurden mit YASARA berechnet, die vollständige EXCEL-Datei befindet sich ebenfalls auf der beigelegten CD.

Das automatische NOE-*assignment* ergab, wie in Tabelle 3.4 zu sehen, insgesamt 1846 verwendete NOE-*restraints*. Davon sind nur 42,7 % intraresidual oder sequentiell. Der Anteil an *restraints*, deren teilnehmende Aminosäuren in der Primärsequenz mehr als 5 Reste auseinander liegen (*long range NOEs*), ist mit 40,1 % sehr hoch. Es wurden keine *restraints* erstellt, deren teilnehmende Protonen einen

größeren Abstand als 6,00 Å aufweisen, da Cyana 3.0 derartige *restraints* für die Rechnung nicht verwendet.

Tabelle 3.4: NOE-*restraints*

Die komplette Liste erstellter NOE-*restraints* kann der beigelegten CD entnommen werden

Art	Anzahl	Anteil
Gesamt	1846	100 %
Intraresiduell, $ i-j =0$	352	19,1 %
Sequentiell, $ i-j =1$	436	23,6 %
kurze Entfernung, $ i-j \leq 1$	788	42,7 %
mittlere Entfernung, $1 < i-j < 5$	318	17,2 %
weite Entfernung, $ i-j \geq 5$	740	40,1 %
Grenzen: ... - 2,99 Å	147	8,0 %
Grenzen: 3,00 Å - 3,99 Å	617	33,4 %
Grenzen: 4,00 Å - 4,99 Å	711	28,5 %
Grenzen: 5,00 Å - 5,99 Å	371	20,1 %
Grenzen: 6,00 Å - ...	0	0 %

Die Verteilung der Ψ - bzw. Φ -Winkel des Proteinerückgrats kann im in Abbildung 3.21 gezeigten Ramachandran-Plot abgelesen werden. Zusätzlich kann die aus der Rechnung resultierende Winkel-Datei (final.aco) auf der beigelegten CD eingesehen werden. Wie in der Abbildung zu erkennen, finden sich keine Winkel im unerlaubten Bereich. Der Anteil der Winkel, die sich in der bevorzugten Region befinden ist mit 72,9 % ebenso zufriedenstellend wie die nur 1,1 %, die sich in der großzügig erlaubten Region befinden.

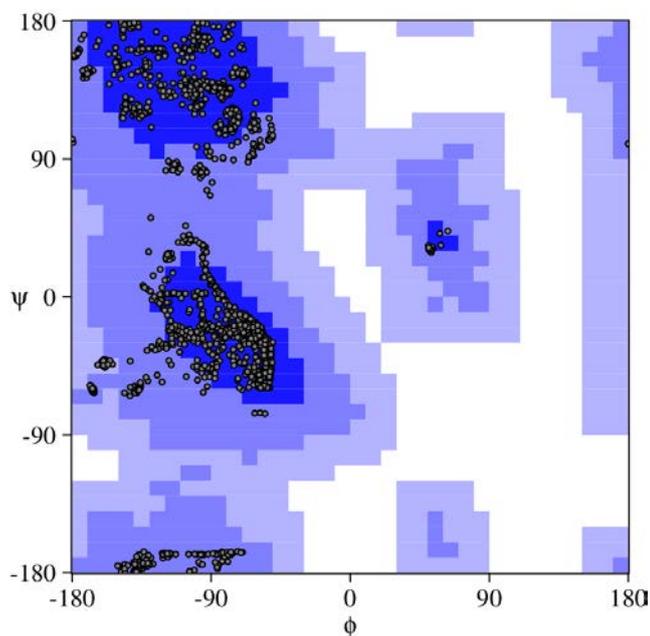


Abbildung 3.21: Ramachandran Plot des NmPin-Ensembles

72,9 % aller Ψ - bzw. Φ -Winkel befinden sich in der meist bevorzugten Region (dunkelblau), 26,0 % befinden sich in der zusätzlich erlaubten Region (mittelblau), 1,1 % befinden sich in der mit Großzügigkeit erlaubten Region (hellblau). In der weißen, unerlaubten Region befinden sich keine der Winkel.

3.4.2 Water refinement

Wie in Abbildung 3.20 zu sehen, sind einige Sekundärstrukturelemente nach der Rechnung noch nicht ausreichend definiert. Um dies zu verbessern, wurden die 20 Strukturen des Ensembles nach der Rechnung mit Cyana 3.0 Lösungsmittelverfeinert. Da das Protein in wässriger Lösung aufgenommen wurde, ist das Lösungsmittel Wasser, daher auch der Name *water refinement*.

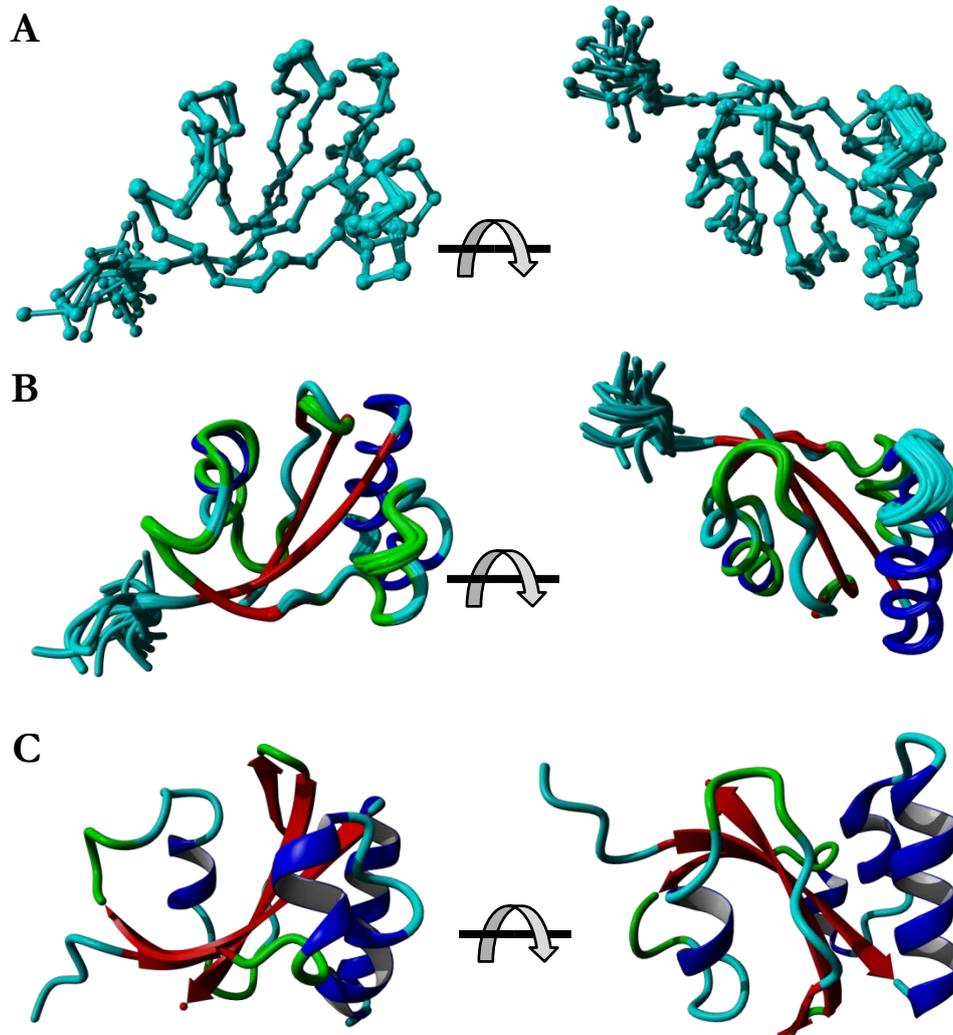


Abbildung 3.22: Ensemble und Durchschnittsstruktur nach *water refinement*

A: NmPin-Ensemble (20 Strukturen) nach dem *water refinement* in der Skelett-Darstellung. **B:** *backbone*-Darstellung des NmPin-Ensembles (20 Strukturen) nach dem *water refinement*. In rot sind β -Faltblatt-, in blau α -helikale Strukturen erkennbar. In grün sind *turn*-Strukturen zu erkennen. Das Ensemble wurde mit Theseus 1.2.1 des YASARA-suite überlagert. Die RMSD über alle Atome liegt bei 1,07 Å (*backbone*: 0,89 Å). **C:** Durchschnittsstruktur (*average*-Struktur) des verfeinerten Ensembles in *ribbon*-Darstellung. Die RMSD zwischen der mathematischen *average*-Struktur und der Struktur nach der Energieminimierung lag für das NmPin-Ensemble nach dem *water refinement* bei 1,01 Å.

Als *input* für das *water refinement* wurde das Ensemble aus der Rechnung mit Cyana 3.0 verwendet, zusätzlich wurden alle Distanz-*restraints* in Form einer .tbl-Datei vorgegeben. Das *water refinement* wurde mit YASARA Structure und dem Kraftfeld YASARA NOVA durchgeführt. Pro Struktur wurden vier Energieminimierungsdurchläufe angesetzt und jeweils die Struktur mit der geringsten *violation energy* (die

wenigsten *restraints* sind verletzt) in das neue Ensemble aufgenommen. Alle *input*- und *output*-Dateien können auf der der Arbeit beigelegten CD eingesehen werden. Abbildung 3.22 A+B zeigen das resultierende Ensemble. Die Sekundärstrukturelemente sind nun besser aufgelöst und auch die Seitenketten-RMSD über das ganze Molekül hat sich von 1,24 Å auf 1,16 Å verbessert.

Tabelle 3.5: RMSD-Werte (in Angström Å)

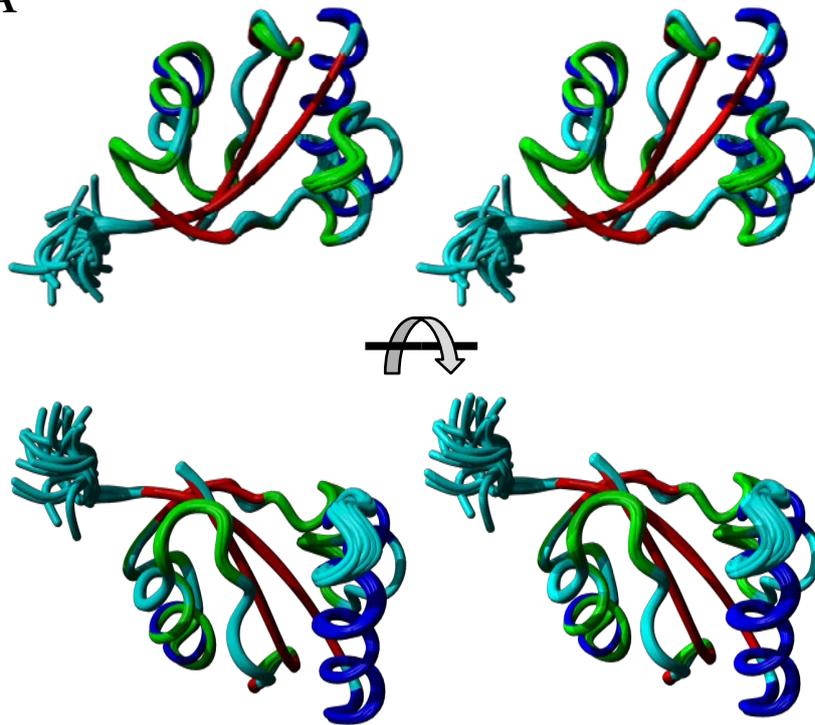
Aufgelistet wurden die Durchschnitts-RMSD der 20 besten Strukturen vor und nach dem *water refinement*. In Klammern angegeben ist die Spanne an RMSD-Werten innerhalb der 20 besten Strukturen.

	vor dem <i>water refinement</i>			nach dem <i>water refinement</i>		
	alle Atome	<i>backbone</i>	<i>side chains</i>	alle Atome	<i>backbone</i>	<i>side chains</i>
alle Atome	1,079 (0,827-1,720)	0,704 (0,370-1,767)	1,243 (1,010-1,690)	1,069 (0,863-1,600)	0,885 (0,492-1,769)	1,157 (1,008-1,547)
AS 4-93	0,914 (0,784-1,125)	0,325 (0,207-0,597)	1,133 (0,977-1,354)	0,802 (0,737-0,856)	0,296 (0,230-0,423)	0,992 (0,911-1,063)
Helices	1,136 (0,912-1,738)	0,276 (0,173-0,430)	1,425 (1,144-2,187)	1,031 (0,861-1,183)	0,228 (0,140-0,334)	1,285 (1,074-1,479)
Faltblätter	0,549 (0,475-0,771)	0,087 (0,059-0,154)	0,686 (0,594-0,965)	0,555 (0,451-0,730)	0,146 (0,103-0,216)	0,680 (0,552-0,893)
<i>turn</i> - Elemente	0,932 (0,774-1,167)	0,229 (0,126-0,434)	1,202 (0,999-1,501)	0,690 (0,598-0,836)	0,279 (0,188-0,450)	0,879 (0,736-1,057)
<i>coil</i> - Elemente	1,186 (0,810-2,212)	0,982 (0,514-2,560)	1,276 (0,944-1,960)	1,533 (1,053-2,692)	1,567 (0,858-3,195)	1,501 (1,158-2,441)

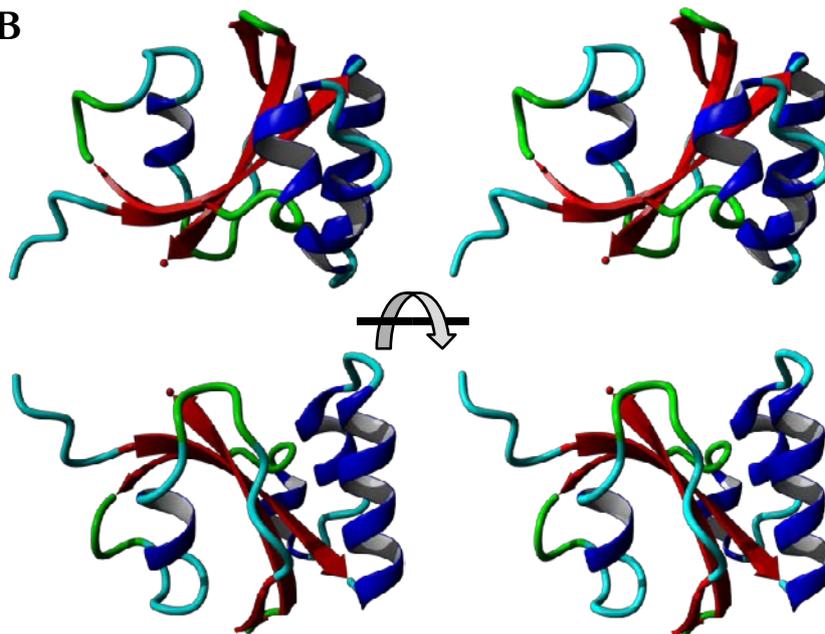
Da der N-Terminus nicht strukturiert ist, sind die entscheidenden RMSD-Werte des finalen NmPin-Ensembles die in Tabelle 3.5 unterstrichene Werte für die Reste 4-93 nach dem *water refinement*. Über alle Atome liegen diese Werte bei 0,80 Å (*backbone*: 0,30 Å). Die RMSD-Werte für Helices und *turn*-Elemente haben sich durch das *water refinement* stark verbessert. Nicht so stark verbessert haben sich die Werte für Faltblatt-Strukturen. Dies liegt daran, dass diese Strukturelemente bereits nach der Rechnung mit Cyana 3.0 sehr gut definiert waren.

3.4.3 Stereobilder

A



B

**Abbildung 3.23: Stereobilder der finalen NmPin-Struktur**

A: Verfeinertes Ensemble **B:** *Average*-Struktur. Um den 3D-Effekt zu erhalten, teilen Sie bitte Ihr Gesichtsfeld mit Hilfe der flachen Hand, so dass die beiden Teilbilder verschwimmen.

3.4.4 Oberflächen und elektrostatisches Potential

Die verschiedenen Oberflächenprojektionen (Abbildung 3.24) wurden auf der Durchschnittsstruktur (*average*-Struktur) des verfeinerten Ensembles in Skelett-Darstellung visualisiert. Die RMSD zwischen der mathematischen *average*-Struktur und der Struktur nach der Energieminimierung lag für das NmPin-Ensemble nach dem *water refinement* bei 1,01 Å, über alle Atome. Das Bild wurde jeweils um 180° entlang der Horizontalen gekippt.

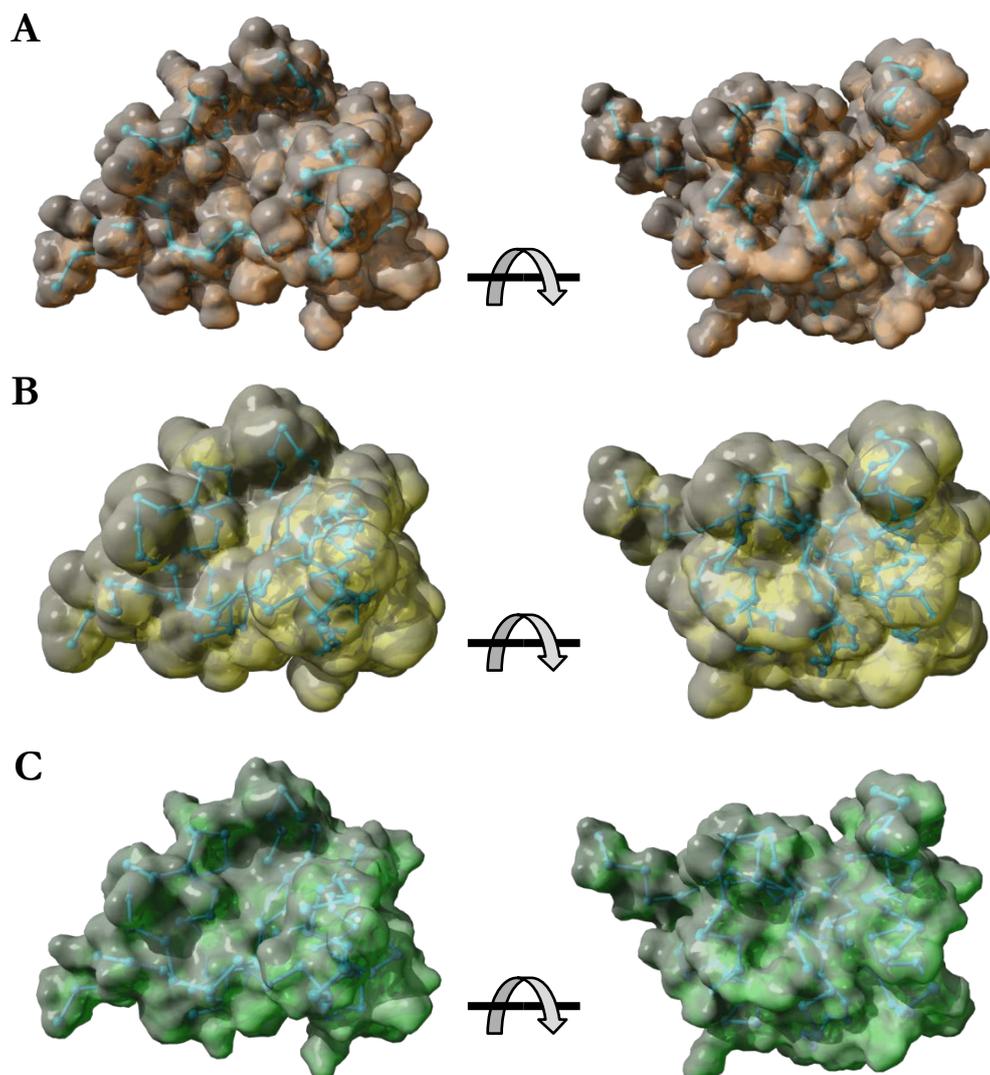


Abbildung 3.24: Oberflächen NmPin

A: van der Waals-Oberfläche **B:** Oberfläche der Lösungsmittelzugängigkeit **C:** Molekulare Oberfläche; dargestellt ist jeweils die mit YASARA angezeigte Oberfläche und das Rückgrat in Skelett-Darstellung (blau).

Aussagekräftiger als die reinen Oberflächen sind auf die Oberflächen projizierte elektrostatische Potentiale. Die Potentiale wurden in dieser Arbeit mit Hilfe von YASARA über zwei unterschiedlich schnelle und genaue Wege ermittelt. ESPPME (*electrostatic potential by Particle-Mesh Ewald*) unterscheidet sich von ESPPB (*electrostatic potential by Poisson-Boltzmann*) dadurch, dass die Wechselwirkungen

des elektrostatischen Potentials über längere Distanzen über eine Fourier-Transformation vereinfacht werden und somit schneller berechnet und dargestellt werden können.

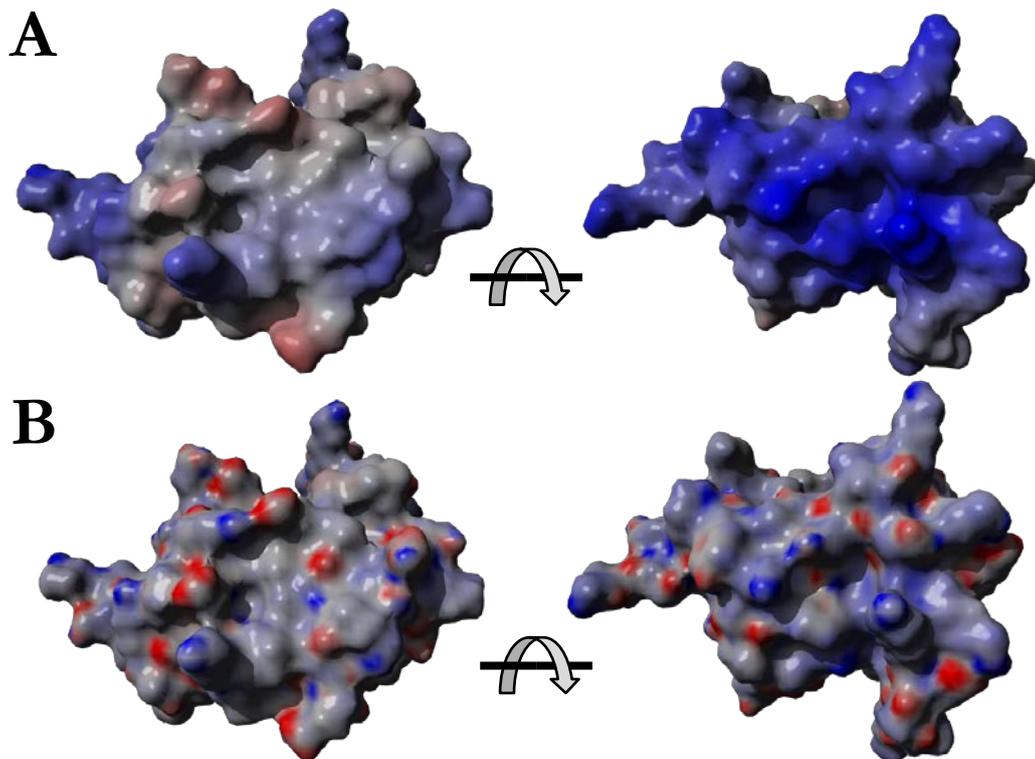


Abbildung 3.25: Elektrostatisches Potential

Positiv geladene Bereiche sind in blau dargestellt, negativ geladene Bereiche in rot. Das elektrostatische Potential wurde mit Hilfe von YASARA ermittelt und auf die molekulare Oberfläche der *average*-Struktur des Wasser-verfeinerten Ensembles projiziert. **A (ESPPME)**: Auf der rechten Seite ist eine weitläufige Region positiver Ladungen zu erkennen. Diese Region stellt ein Bindungs-*interface* für negativ geladene Moleküle wie negativ geladene Proteine oder Membranen dar. **B (ESPPB)**: Auch hier ist rechts dasselbe Interface zu erkennen; zwar gibt es in der besser aufgelösten ESPPB-Darstellung auch negativ geladene Zonen in diesem Bereich, jedoch überwiegen die positiv geladenen Zonen auch hier deutlich.

Abbildung 3.25 zeigt die beiden verschieden ermittelten elektrostatischen Potentiale projiziert auf die *average*-Struktur des Ensembles nach dem *water refinement*. Zu beachten ist, dass die beiden Potentiale mit unterschiedlicher Punktdichte ermittelt wurden. Für das in 3.25 A zu erkennende ESPPME wurde die Punktdichte (ESPmax) auf 150 kcal/mol, für das in 3.25 B abgebildete ESPPB auf nur 30 kcal/mol festgelegt. Hier gilt je höher die Zahl, desto schwächer sind die Signale. Um den Bereich der positiven Ladungen, der für die ESPPME-Projektion sehr stark ausgebildet ist (3.25 A rechts), besser aufzulösen wurde hier die Punktdichte stark verringert, um Abstufungen innerhalb dieses Bereiches sichtbar machen zu können. Jedoch ist diese Region derart stark positiv geladen, dass diese Abstufungen erst in der genaueren ESPPB-Projektion zu erkennen sind (3.25 B rechts). Das positiv geladene *interface* ist in beiden Darstellungen sehr stark ausgeprägt und bildet eine mögliche Bindungsoberfläche zu negativ geladenen Proteinen oder auch Membranen.

3.4.5 Protonentransport-gekoppelte Elektronentransportkette

Wie in 1.3.5 bereits erwähnt, wurde in einem Kristall des humanen Par14 ein das katalytische Zentrum durchspannendes Wasserstoffbrückennetzwerk nachgewiesen. Da der molekulare Mechanismus der Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerisierung noch nicht vollständig verstanden ist, war ein Ziel dieser Arbeit, etwaige Analogien zwischen den archaealen (urtümlichen) Parvulinen und den humanen zu erkennen. Auch wenn die NMR-Struktur, auf Grund der Tatsache, dass hier keine starren Gebilde sondern „fließende“ Moleküle in Mittelung aufgenommen und berechnet werden, Wasserstoffbrückennetze oder Transportketten nicht so genau auflösen kann, wie das die Kristallographie vermag, die mit Elektronendichten statt Protonenabständen arbeitet, kann die Lage und Ausrichtung spezifischer Reste und Gruppen einen Hinweis dafür liefern, ob die Ausbildung einer solchen Kette überhaupt wahrscheinlich ist.

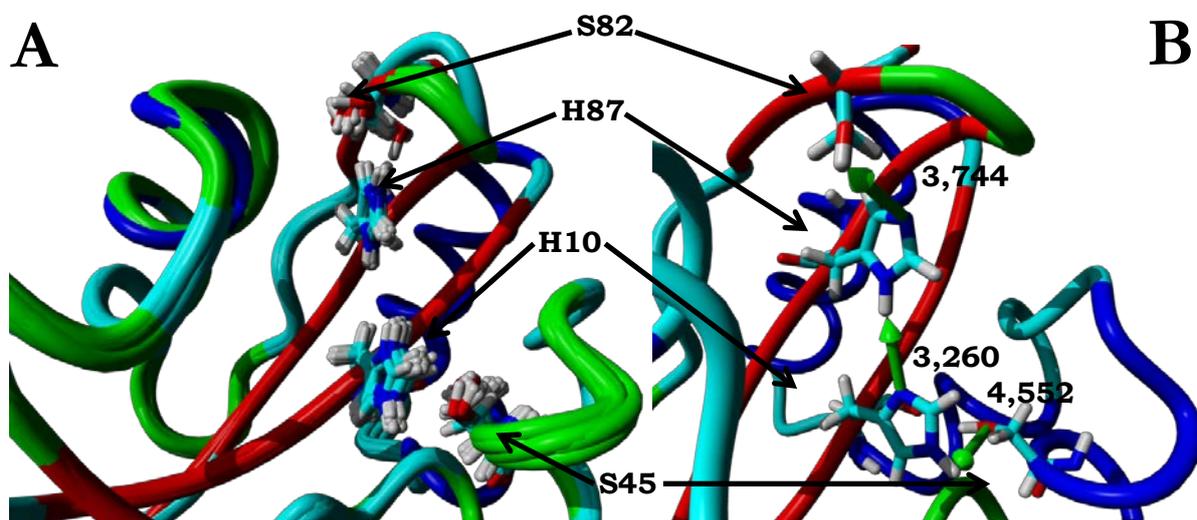


Abbildung 3.26: Potentielle Elektronentransportkette

A: Das Ensemble der besten 20 Strukturen zeigt die an der potentiellen Elektronentransportkette beteiligten Reste S45, H10, H87 und S82. Die beiden Histidine sind in allen 20 Strukturen parallel ausgerichtet und werden von den beiden Serinen flankiert. **B:** Die grünen Kegelpfeile zeigen den potentiellen Weg der Elektronen über OG(S45, HE2(H10)), ND1(H10), HD1(H87), NE2(H87) und HG(S82). Die Abstände sind in Å angegeben.

Wie in Abbildung 3.26 A zu sehen, sind die zentralen Histidine (vgl. 1.3.5) in allen 20 Strukturen des Ensembles parallel angeordnet, so dass hier eine Übergabe von Elektronen (Protonen) möglich erscheint. Das Histidin H10 liegt sehr nah dem Serin S45, das ebenfalls in alle 20 Strukturen in Richtung des Histidins weist. Auf der gegenüberliegenden Seite der potentiellen Elektronentransportkette liegt das Serin S82 in allen 20 Strukturen in Richtung H87 gerichtet. Die Protonierung der Imidazol-Stickstoffe der beiden Histidine ist in den 20 besten Strukturen des Ensembles unregelmäßig. Berechnet man jedoch die Durchschnittsstruktur, so ergibt sich für H10 ein protoniertes NE2 und ein deprotoniertes ND1. Für H87 verhält sich die

Protonierung exakt entgegengesetzt, so dass (Abbildung 3.26 B) einem deprotonierten ND1(H10) ein protoniertes NE2(H87) gegenübersteht.

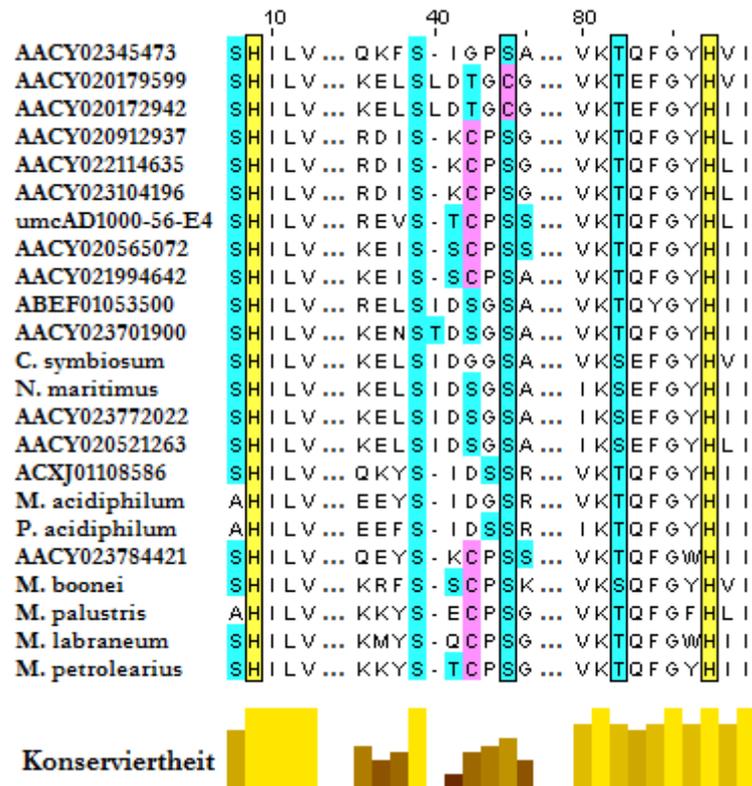


Abbildung 3.27: Konserviertheit der potentiellen Elektronentransportkette

Die Teilnehmer der potentiellen Elektronentransportkette H10, S45, S82 und H87 sind über alle zum Zeitpunkt dieser Arbeit bekannten archaealen Parvuline konserviert. Während die Histidine in allen Organismen gleich bleiben, alterniert S82 zwischen Serin und Threonin. S45 ist bis auf zwei Organismen immer ein Serin, in diesen ist es durch ein Cystein ersetzt. Abbildung mit JalView erstellt.

Die Teilnehmer der potentiellen Elektronentransportkette sind innerhalb der archaealen Parvuline stark konserviert. Die Histidine sind universell vertreten. S45 wird nur in zwei Organismen durch ein Cystein ersetzt, was einem Elektronentransport genauso wenig widerspricht wie die Tatsache, dass S82 innerhalb der *Archaea* zwischen Serin und Threonin alterniert.

Die Abstände, die in Abbildung 3.26 B eingezeichnet sind, erscheinen gerade zwischen den Atomen HG(S82) und NE2(H87) mit 3,74 Å und den Atomen HE2(H10) und OG(S45) mit 4,55 Å als zu groß, um eine Wasserstoffbrücke und damit einen potentiellen Elektronentransport anzunehmen

Tabelle 3.6: Abstände innerhalb der potentiellen Elektronentransportkette

OG(S45)—HE2(H10)		NE2(H87)—HG(S82)	
Struktur	Abstand (Å)	Struktur	Abstand (Å)
1	2,710	3	2,812
11	2,520	9	2,645
16	2,920	10	1,855
20	2,540	17	2,937
		18	2,786
		19	2,828

Daher wurden diese beiden Abstände in allen 20 Strukturen des Ensembles genauer untersucht.

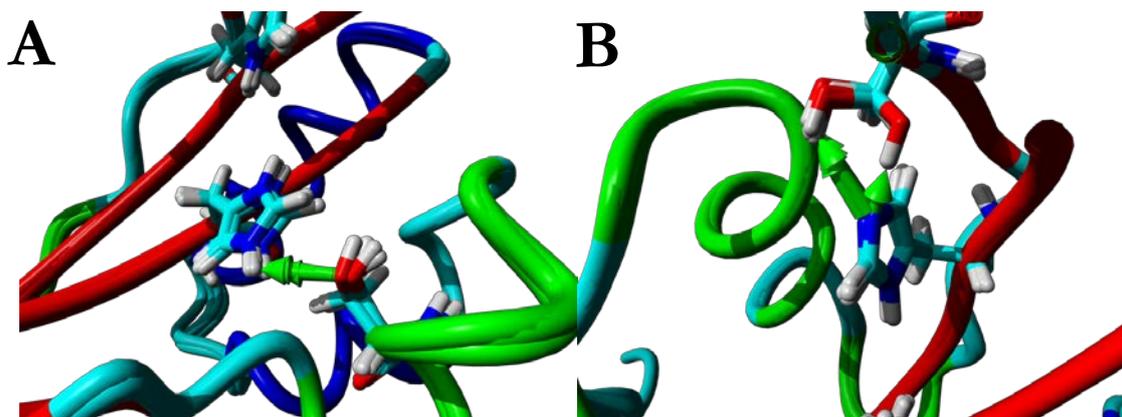


Abbildung 3.28: Geringste Abstände in der potentiellen Elektronentransportkette

A: Abgebildet sind die vier niedrigsten Abstände zwischen OG(S45) und HE2(H10) in Form grüner Kegelpfeile. **B:** Abgebildet sind die sechs niedrigsten Abstände zwischen NE2(H87) und HG(S82) in Form grüner Kegelpfeile. Die genauen Werte sind Tabelle 3.6 zu entnehmen.

Tabelle 3.6 bzw. Abbildung 3.28 zeigen alle Abstände, die weniger als 3,00 Å betragen. Es gibt daher spezifische Ausrichtungen der OH-Gruppen der beteiligten Serine, die einen Elektronentransport aufgrund kurzer Wege bevorzugen, die aber nicht in allen 20 Strukturen vorhanden sind.

3.5 Proteinbiochemie

Nitrosopumilus maritimus ist der einzig kultivierbare archaeale Organismus, welcher ein Parvulin trägt. Daher war es möglich, NmPin-Lysat in allerdings sehr geringen Mengen (50 µl lockeres Zellpellet von Dr. Martin Könneke) zu erhalten. Dieses Pellet wurde mittels Sonifikation aufgeschlossen und durch Zentrifugation wurden die löslichen Bestandteile (Überstand) von den unlöslichen (Pellet) getrennt. Anschließend wurden die Proben auf einem Schägger-Jagow-Gel aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Der Antikörper wurde von der Firma EuroGentec in Brüssel hergestellt; hierfür wurden zwei Kaninchen mit rekombinantem NmPin immunisiert

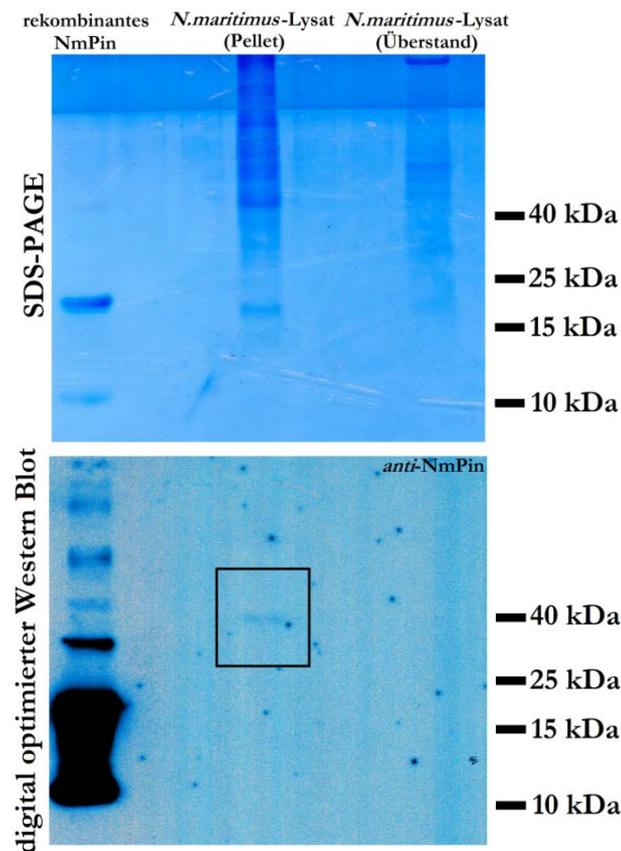


Abbildung 3.29: Western Blot-Analyse von NmPin-Lysat

Von oben nach unten ist das Coomassie-gefärbte Schägger-Jagow-Gel und danach der Western Blot mit dem Antikörper *anti-NmPin* zu sehen. Es wurden drei Spuren beladen: Links wurde rekombinantes NmPin aufgetragen mit Banden bei 10 kDa (Monomer) und 20 kDa (Dimer). Aufgrund leichter Verunreinigungen sind viele weitere, schwächere Banden zu sehen. In der Mitte wurde Lysat-Pellet aufgetragen, das mit 6 M GuCl aufbereitet worden war. Rechts befindet sich das lösliche Protein des Lysats. Der Film wurde eine Stunde lang belichtet.

Die Western Blot-Analyse ergab, dass kein lösliches NmPin im Überstand vom verwendeten Antikörper erkannt wurde (Abbildung 3.29, rechte Spur). Auch in der Pelletfraktion zeigt sich auf der erwarteten Höhe von 10 kDa kein Signal. Allerdings ist ein sehr schwaches Signal auf Höhe von etwa 40 kDa in dieser Fraktion erkennbar (Abbildung 3.29, mittlere Spur).

4 Diskussion

4.1 Bioinformatische Analysen

4.1.1 Archaeale Phylogenie

Wie in Abschnitt 3.1 bereits erläutert, war das Ziel der phylogenetischen Untersuchungen nicht, neue Erkenntnisse für die Aufklärung evolutionärer Ereignisse innerhalb der *Archaea* zu liefern, sondern einen Hinweis dafür zu geben, ob die archaealen und bakteriellen Parvuline unterscheidbare Proteinfamilien darstellen. Nichts desto trotz zeigt Abbildung 4.1, dass, ungeachtet der Berechnung der ML-Phylogenie (Abschnitt 1.1.5) mit nicht mehr als 100 Stellen, der resultierende Baum durchaus als sehr gut strukturiert angesehen werden kann.

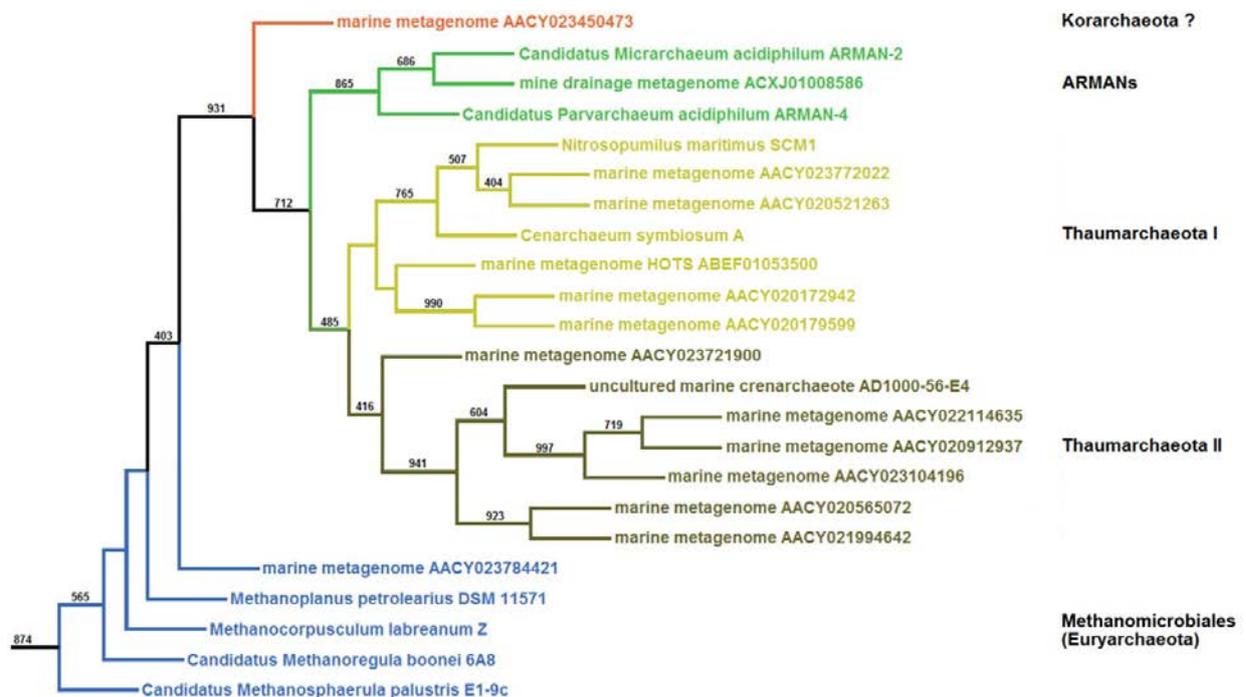


Abbildung 4.1: Archaealer Zweig des MLP-Baums

Abgebildet ist eine auf die phylogenetische Verzweigung der *Archaea* reduzierte Form der Abbildung 3.5. Auffallend ist der sehr starke *bootstrap* von 931/1000, welcher die *Euryarchaeota* von den übrigen *Archaea* abtrennt. Innerhalb dieses Zweiges befinden sich die *Thaumarchaeota*, ARMAN sowie das potentiell korarchaeale Metagenom AACY021450473 (Lederer *et al.* 2011).

Neben der diversen Gruppe der *Methanomicrobiales*, welche sich mit einem signifikanten *bootstrap* von 931/1000 gegenüber den restlichen *Archaea* abgrenzt, sind die *Thaumarchaeota* und die ARMAN zusammen mit dem potentiell korarchaealen Metagenom AACY021450473 gruppiert (Abbildung 4.1). Diese Verzweigung ähnelt sehr derjenigen, die Guy *et al.* im Jahre 2011 beschrieben, als sie das (bereits in Abschnitt 1.4.1 erwähnte) TACK-Superphylum postulierten, aus dem

sich, nach der Ansicht der Autoren, auch die Eukaryoten entwickelt haben könnten (Guy und Ettema 2011).

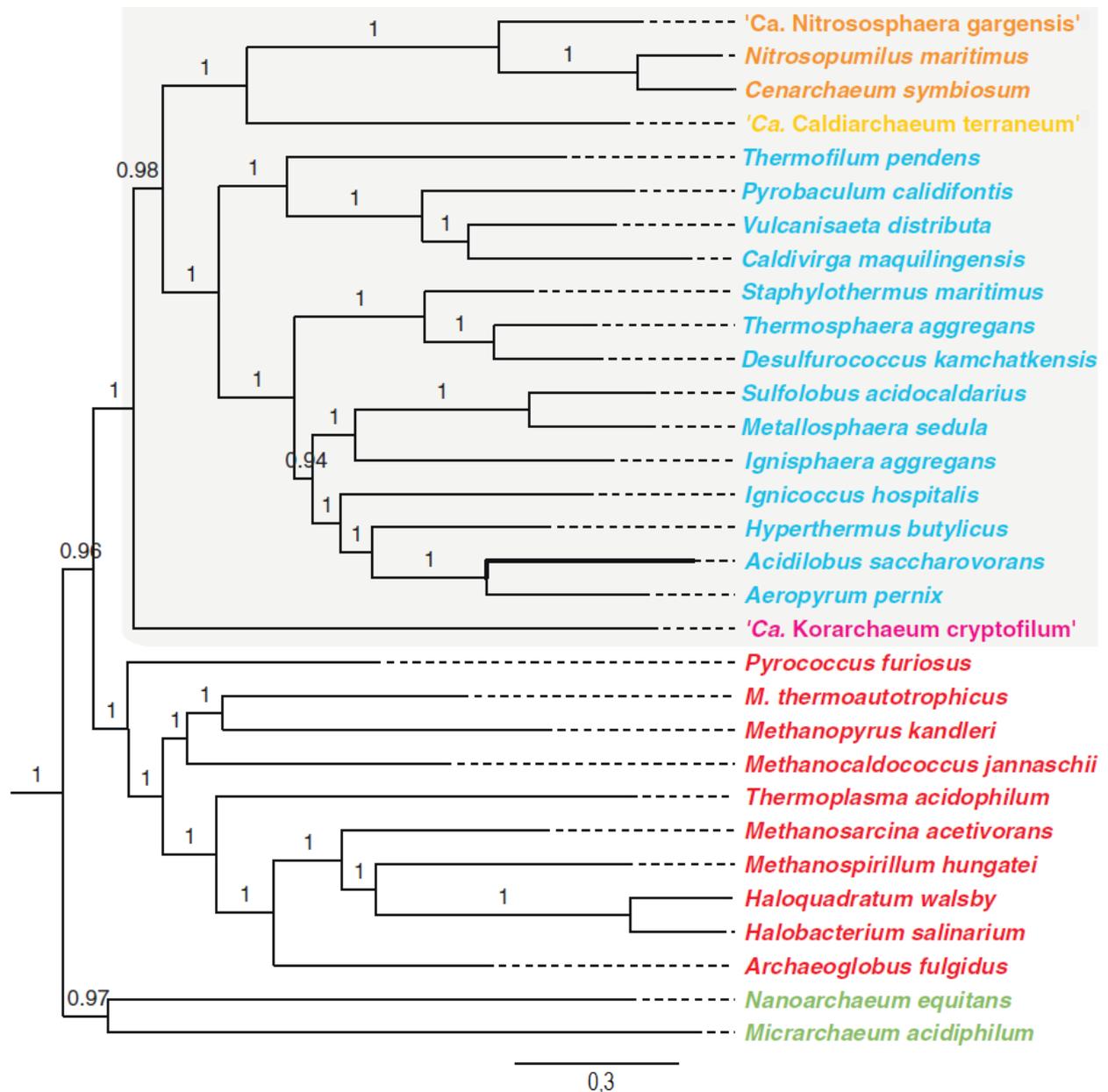


Abbildung 4.2: MLP-Baum aus Guy *et al.* 2011

Der Baum basiert auf 26 ubiquitären Proteinsequenzen, die für die Rechnung konkateniert (aneinandergereiht) wurden. Diese Vorgehensweise stellt eine Verknüpfung der Arbeiten von Cox *et al.* (Cox *et al.* 2008) und Ciccarelli *et al.* (Ciccarelli *et al.* 2006) dar. Das erwähnte TACK-Superphylum ist grau hinterlegt. Von oben nach unten sind farblich abgehoben die *Thaumarchaeota*, *Aigarchaeota*, *Crenarchaeota*, *Korarchaeota*, *Euryarchaeota* und *Nanoarchaeota* (mit ARMAN) abgebildet.

Der in Abbildung 4.2 dargestellte Baum ist auf Grund der vielen tausend Aminosäuren, welche zur Berechnung herangezogen wurden, phylogenetisch belastbarer als der Baum dieser Arbeit. Dies zeigen vor allem die eingezeichneten *bootstraps*, welche nur selten von 100 % abweichen. Betrachtet man jedoch nur die Verzweigungen, so sind diese in beiden Bäumen, bis auf eine Ausnahme, identisch. Die ARMAN, welche in Abbildung 4.1 als Schwesterphylum zu den *Thaumarchaeota*

auftreten, werden in Abbildung 4.2 den *Nanoarchaeota* zugeordnet, dem in diesem Baum dritten großen Phylum neben TACK und *Euryarchaeota*.

Abbildung 4.1 zeigt auch, dass durch phylogenetische Analysen mit dem archaealen Parvulin vor allem das Phylum der *Thaumarchaeota* stark erweitert werden kann. Hierfür sorgt zum einen das große Ausmaß an metagenomischen Fragmenten aus Probenahmen aquatischer Lebensräume. Zum anderen ist die Tatsache entscheidend, dass bis heute kein thaumarchaeales Genom entschlüsselt wurde, welches kein Parvulin enthält, wie auch das dritte, vor wenigen Monaten gelöste, thaumarchaeale Genom von *Nitrosarchaeum limnia* (Blainey *et al.* 2011) zeigt. Es bleibt an dieser Stelle zu erwähnen, dass neue phylogenetische Untersuchungen davon ausgehen, dass das Phylum der *Thaumarchaeota* auch andere Lebensräume besiedelt als moderat temperierte Ozeane (Pester *et al.* 2011). Diese Arbeiten sprechen von den aquatischen *Thaumarchaeota*, zu denen alle Sequenzen dieser Arbeit um die entschlüsselten Organismen *N. maritimus* und *C. symbiosum* gehören, als Subphylum *Thaumarchaeota* 1.a.

4.1.2 Erweiterungsmöglichkeiten für *Thaumarchaeota* 1.a

Wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, sind phylogenetische Berechnungen, welche auf der Sequenz des archaealen Parvulins basieren durchaus aussagekräftig. Dazu kommt die Tatsache, dass, wie in Abbildung 3.5 gezeigt, der *upstream*-Bereich des thaumarchaealen Parvulingens Informationen über konservierte Deletionsereignisse beherbergt, auf Grund deren Vorkommen man zwischen zwei Gruppen von marinen *Thaumarchaeota* unterscheiden kann (*Thaumarchaeota* I + II), die zudem noch durch die Verzweigung des MLP-Baums gestärkt werden. Zusätzlich konnte während dieser Arbeit das Metagenom AACY021994642 mit nur 804 Basen Länge, was etwas mehr als der Hälfte der Länge der ssu-rRNA (1409 Basen) von *N. maritimus* entspricht, allein durch die Primärsequenz des enthaltenen Parvulins einer der beiden Gruppen zugeordnet werden.

Diese Zuordnung von metagenomischen Bruchstücken, die weit kleiner sind als die standardmäßig verwendeten phylogenetischen Marker, anhand des Parvulingens und seines genomischen Kontexts, kann eine Hilfe darstellen, dem bis heute sehr kleinen Phylum der *Thaumarchaeota* neue Mitglieder hinzuzufügen. Hierbei kann bei Sequenzlängen unter 1000 Basen nicht nur eine einzelne Proteinsequenz als phylogenetischer Informationsträger genutzt werden, sondern der thaumarchaeale Parvulinlocus bietet zudem die Möglichkeit, den ganzen Genlocus mit wechselnden Genkombinationen zu betrachten.

Auf Grund dieser Beobachtungen wurden während dieser Arbeit Primer konzipiert, die für weitere metagenomische Studien oder die Untersuchung bereits vorhandener Umweltproben herangezogen werden können. Alle diese in Abbildung 4.3 dargestellten Primer befinden sich innerhalb 3 kB Entfernung zum entsprechenden Parvulingen.

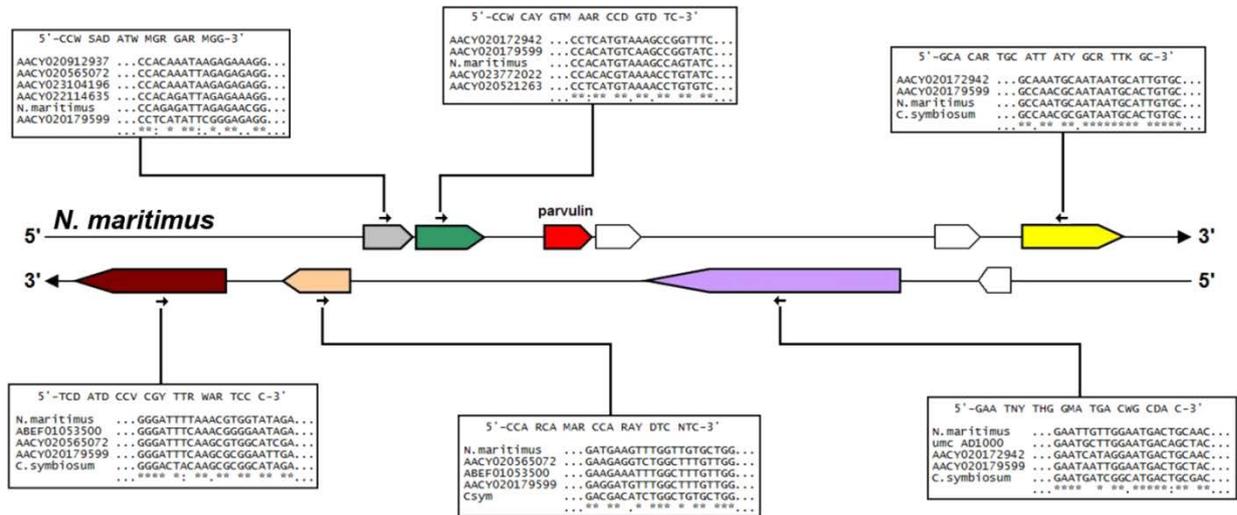


Abbildung 4.3: Mögliche Primer für weitere Analysen

Um diese Primer vorschlagen zu können, wurden die Gene um das Parvulingen von *N. maritimus* mittels ClustalW2 (Tabelle 2.9) *aligned*. Die Primer mussten verschiedenen Ansprüchen genügen: Sie mussten eine Länge zwischen 18 und 24 Basen aufweisen, einen GC-Gehalt über 40 % erreichen und eine Schmelztemperatur zwischen 50 °C und 65 °C besitzen. Für sogenannte *wobble*-Positionen wurde die entsprechende IUPAC Bezeichnung gewählt: A oder C: M / A oder G: R / A oder T: W / G oder C: S / C oder T: Y / G oder T: K / A, G oder C: V / A, C oder T: H / A, G oder T: D / G, C oder T: B / A, G, C oder T: N.

4.1.3 PPIase-Repertoire der Archaea

Wie bereits in Abschnitt 3.1.1 erwähnt, wurden insgesamt 106 archaeale Genome aus 18 verschiedenen Organismengruppen im Zuge dieser Arbeit untersucht; das ermittelte Repertoire an PPIasen kann in den Tabellen 3.1.2 und 6.1 (Anhang) eingesehen werden.

Diese Untersuchungen zeigten auf, dass es einige PPIase-Arten innerhalb der Archaea nicht, oder zumindest nicht in den bisher gelösten Genomen, gibt. Anders als bei den *Eukarya* oder den *Bacteria* gibt es fast keine großen multidomänen FKBP, Cyclophiline oder Parvuline. Einzig die beiden *Thaumarchaeota* *N. maritimus* und *C. symbiosum* besitzen ein Cyclophilin, welches knapp über 500 Aminosäuren lang ist und eine zentral gelegene Domäne besitzt, die Zink-abhängigen Proteasen ähnelt.

Die einzige PPIase-Familie, welche quasi ubiquitär in allen Archaea anzutreffen ist - nimmt man *N. equitans* auf Grund seiner durch die symbiontische Lebensweise erworbenen genetischen Besonderheit aus - ist die Familie der FKBP. Das in allen *Archaea* anzutreffende FKBP besteht aus einer einzelnen Domäne ohne C- oder N-terminale Verlängerungen. Thermophile und hyperthermophile Organismen weisen ein sehr reduziertes PPIase-Repertoire auf, was nicht verwunderlich ist, da die Isomerisierung der X_{aa}-Pro-Bindung bei derartig hohen Lebensraumtemperaturen spontan abläuft (Maruyama *et al.* 2004). Dennoch besitzen selbst alle hyperthermophilen Organismen dieses eine FKBP, was den Verdacht nahe legt, dass dieses Protein nicht als Isomerase dient, sondern eine physiologisch völlig andere Aufgabe innerhalb der hitzliebenden *Archaea* einnimmt.

Die Reduktion des PPIase-Repertoires bei steigenden Lebensraumtemperaturen ist eine Tendenz die über alle Ebenen der archaealen Systematik zu beobachten ist. Beinahe alle hyperthermophilen Organismen, seien es *Crenarchaeota*, *Korarchaeota* oder auch die hyperthermophilen Ordnungen der *Euryarchaeota* (*Archaeoglobales* und *Methanopyrales*), besitzen ausschließlich das eine bereits erwähnte FKBP. Die erste Ausnahme dieser Regel bilden die ebenfalls hyperthermophilen *Aigarchaeota*, die zwei Kopien dieses FKBP besitzen. Auch innerhalb einzelner Ordnungen lässt sich diese Tendenz verfolgen: So besitzt innerhalb der Ordnung *Methanococcales*, die thermophile Spezies *Methanocaldococcus* zwei FKBP, während die mesophile Spezies *Methanococcus* die genetische Information für deren drei, oder aber für zusätzliche Cyclophiline trägt. Die meisten offenen Leseraster, die PPIasen kodieren, besitzen die mesophilen, methanogenen Archaeen. Diese besitzen mit bis zu sieben PPIasen sogar deutlich mehr als das kälteadaptierte Archaeon *C. symbiosum*, welches 4 PPIase-Gene enthält. Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass PPIase-Aktivität und methanogene Lebensweise in einer noch nicht definierten Art und Weise zusammenhängen könnten.

4.1.4 Bioinformatische Trennung archaealer und bakterieller Parvuline

In Abschnitt 3.1.6 wurde bereits erläutert, dass die archaealen und bakteriellen Parvuline zu nahezu 100 % durch bioinformatische Methoden, genauer durch maschinelles Lernen mittels *standard vector machine* (SVM) und *random forest* (RF), voneinander getrennt und damit auch voneinander unterschieden werden können (vgl. Abbildungen 3.6 und 3.7). Des Weiteren konnten die Reste ermittelt werden, welche für diese Unterscheidung besonders wichtig sind, man spricht hierbei vom Wichtigkeits-Faktor (*importance factor*). Die Wichtigkeit wurde je nach *importance value* in unwichtig, schwach (0,6 % - 1 %), mittel (1 % - 2 %) und hoch (über 2 %) eingeteilt und farblich auf ein Proteinlogo übertragen, welches andeutete, dass vor allem die Reste direkt am Amino- sowie am Carboxyende maßgeblich für die Unterscheidbarkeit bakterieller und archaealer Parvuline sind.

Überträgt man nun die wichtigsten Reste auf die *average*-Strukturen der Ensembles der beiden strukturell aufgelösten archaealen Parvuline CsPin (aus *C. symbiosum*, pdb-ID: 2rqs) und NmPin (aus dieser Arbeit), ergibt sich das in Abbildung 4.4 zu erkennende Bild. Sowohl für CsPin als auch für das in dieser Arbeit aufgeklärte NmPin zeigt sich eine Ansammlung der wichtigsten Reste auf einer Seite der drei Faltblätter. Die jeweilige Struktur kippt von rechts nach links um 180 ° über die Horizontale. Vergleicht man beide Seiten so kann man erkennen (blauer Pfeil), dass die Anhäufung der Seitenketten der wichtigsten Reste in beiden Strukturen eine positiv geladene Interaktionsfläche bildet (vgl. dazu auch Abbildung 4.10).

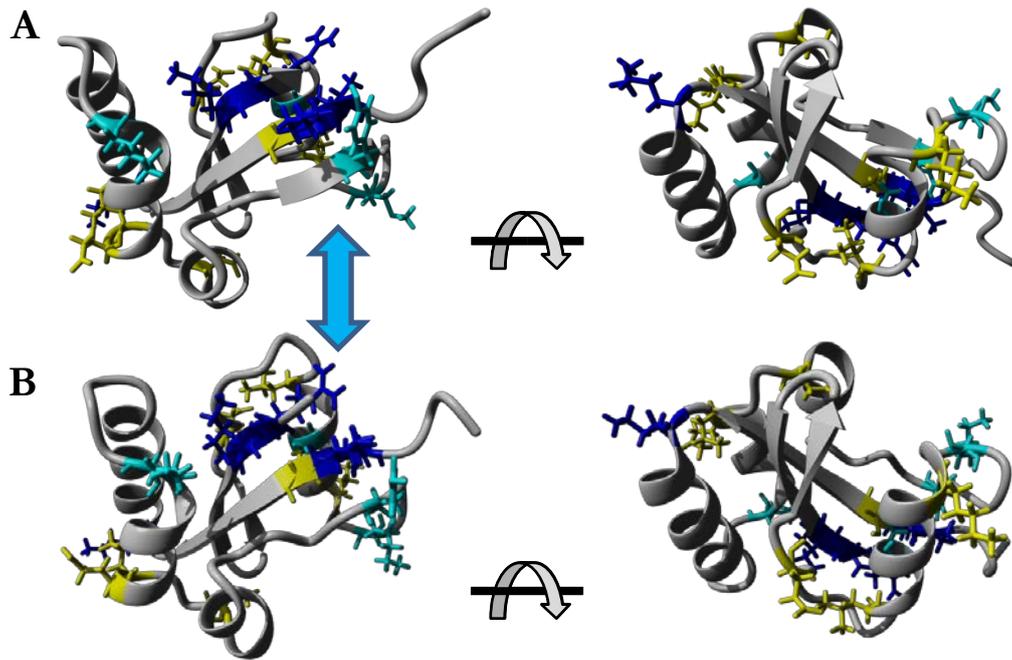


Abbildung 4.4: Molekulare Ansicht der für die Trennung wichtigsten Reste

A+B: Ribbon-Darstellung der NmPin- (**A**) bzw. CsPin- (**B**) *average*-Struktur. Farblich markiert und in atomarer Auflösung gezeigt sind die für die Unterscheidung archaer und bakterieller Parvuline wichtigsten Reste; **schwach**, **mittel**, **hoch**. Der blaue Pfeil zeigt das gehäufte Auftreten der farblich markierten und damit wichtigen Reste innerhalb der drei Faltblätter beider Strukturen. Hier bildet sich eine Interaktionsfläche aus.

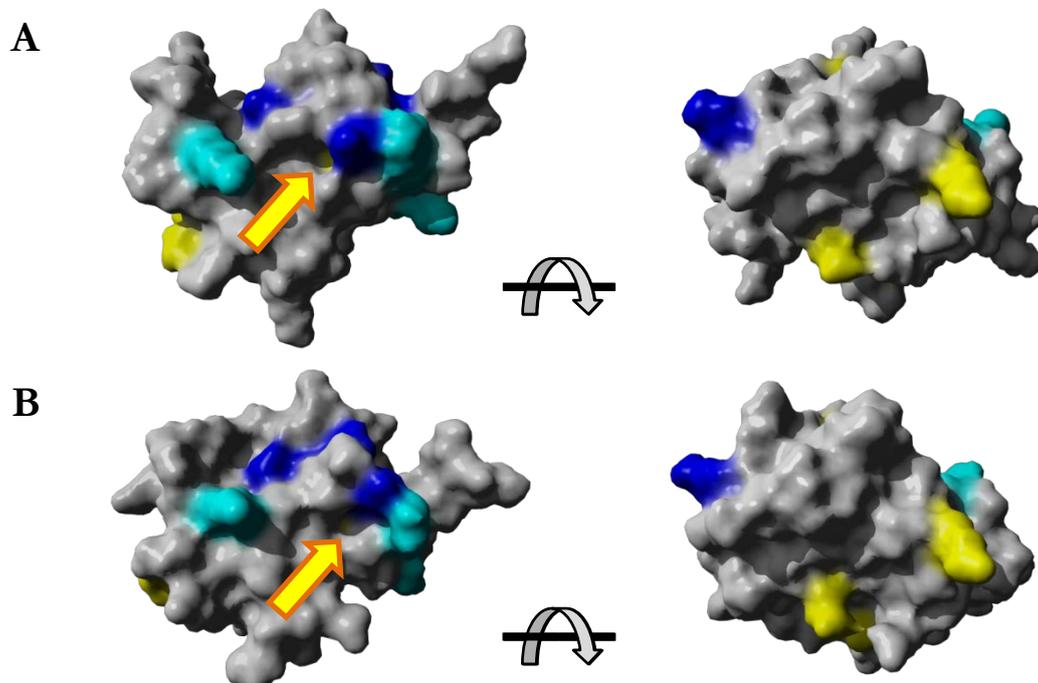


Abbildung 4.5: Projektion der wichtigsten Reste auf die molekulare Oberfläche

A+B: Molekulare Oberfläche der NmPin (**A**) bzw. CsPin (**B**) *average*-Struktur. Farblich sind die für die Unterscheidung archaer und bakterieller Parvuline wichtigsten Reste; **schwach**, **mittel**, **hoch**. Es zeigt sich, dass die wichtigsten Reste in beiden Strukturen ein N-terminales Cystein (gelber Pfeil) umgeben.

Um diese Interaktionsfläche zu zeigen, wurden die entsprechenden Reste im selben Farbschema auf die molekulare Oberfläche der beiden Strukturen projiziert (Abbildung 4.5). Die entstandene Interaktionsfläche ist auch in dieser Abbildung sehr gut zu erkennen. Die gelben Pfeile markieren das N-terminal gelegene Cystein, welches für die Trennung der beiden Parvulinspezies als schwach wichtig gilt und dementsprechend gelb eingezeichnet wurde. Es zeigt sich, dass dieses Cystein tief im Protein gelegen ist, aber seine Oberfläche, durch eine Einbuchtung mit dem Lösungsmittel in Kontakt treten kann. Da Cysteine auf Grund ihrer sehr reaktiven Sulfuryl-Gruppe in vielen Organismen modifiziert werden und in beiden bisher gelösten Strukturen eine für NMR-Strukturen ungewöhnliche Ausbuchtung, an genau der Stelle, an der das Cystein mit dem Lösungsmittel in Kontakt treten kann, zu finden ist, lässt sich eine Cysteinmodifikation an dieser Stelle vermuten. Da gerade um diese Ausbuchtung herum die Reste sind, die für die Unterscheidung zwischen archaealen und bakteriellen Parvulinen am wichtigsten scheinen, lässt sich eine Modifikation vermuten, die dem archaealen Parvulin eine Interaktion mit Molekülen eröffnet, mit welchen das bakterielle *sdPar* nicht interagiert.

4.2 Strukturvergleiche

4.2.1 NmPin verglichen mit CsPin

Das Genom des Schwammsymbionten *Cenarchaeum symbiosum*, welcher hauptsächlich in den kalten antarktischen Meeren anzutreffen ist (Hallam *et al.* 2006), wurde 2006 gelöst, doch bereits acht Jahre vorher war das Parvulingen dieses Organismus im Zuge einer metagenomischen Studie entdeckt worden (Schleper *et al.* 1998). Das Genom von *Nitrosopumilus maritimus* wurde 2010 gelöst (Walker *et al.* 2010), die genomische DNA des Organismus lag unserer Arbeitsgruppe seit 2008 vor. Die Struktur des ersten archaealen Parvulins, das von *C. symbiosum*, wurde 2011 veröffentlicht (pdb-ID: 2rqs) (Jaremko *et al.* 2011).

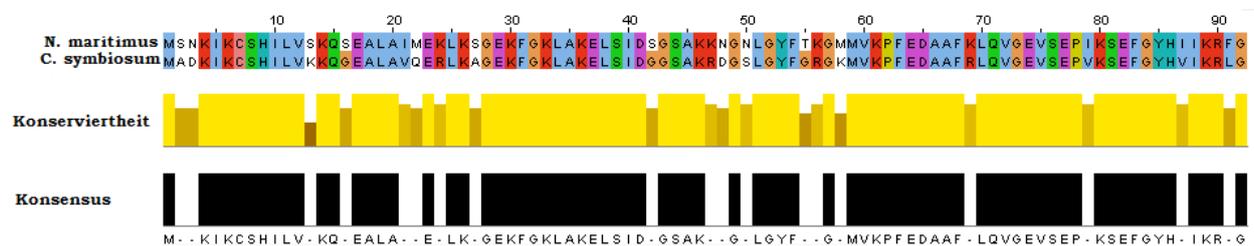


Abbildung 4.6: Alignment von CsPin und NmPin

Die Abbildung zeigt ein mit dem *online-tool* MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) angefertigtes Sequenzalignment von CsPin und NmPin. Das Konsensus-Diagramm zeigt an, dass nur 19 der 92 Reste ausgetauscht wurden. Das Konserviertheits-Diagramm zeigt, dass die stärkste Abweichung zweier Reste der Austausch des S15 in *N. maritimus* gegen ein K15 in *C. symbiosum* darstellt. Abbildung wurde angefertigt mit JalView (Tabelle 2.9).

Abbildung 4.6 zeigt die große Ähnlichkeit der Primärsequenzen dieser beiden Proteine (Identität: 79,34 %, Ähnlichkeit: 91,30 %). Auf Grund dieser Ähnlichkeit wurde das als *guide*-Struktur für die Rechnung verwendete Homologie-Modell, mit Hilfe des CsPin-Ensembles 2rqs berechnet (Abschnitt 3.4.1).

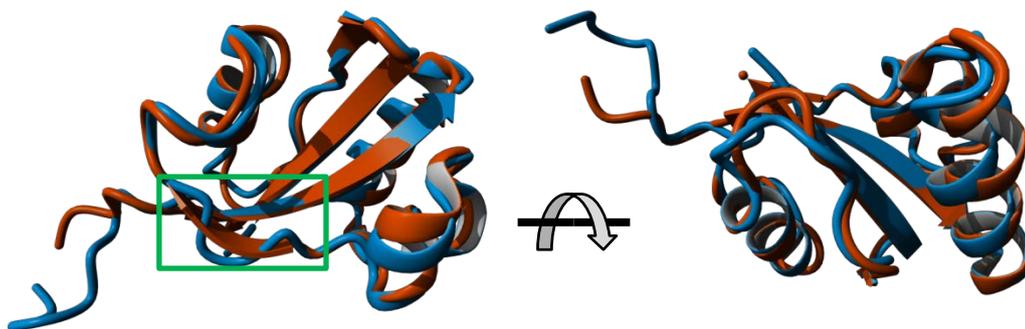


Abbildung 4.7: Überlagerung der NmPin- und CsPin-average-Strukturen

Dargestellt ist eine, mit dem Programm MUSTANG aus dem YASARA-*suite* (Tabelle 2.9) angefertigte, Überlagerung der *average*-Strukturen, des aus dieser Arbeit stammenden, NmPin-Ensembles (orange), sowie des NMR-Ensembles 2rqs (CsPin, blau). Die Strukturen sind in *ribbon*-Darstellung zu sehen. Der grüne Kasten zeigt den größten Unterschied zwischen den beiden Strukturen. Das Blatt S₂ ist in der NmPin-Struktur besser aufgelöst als dies in der CsPin-Struktur der Fall ist.

Wie auf Grund der hohen Sequenzhomologie zu erwarten, zeigt Abbildung 4.7 keine großen Unterschiede zwischen den beiden Strukturen. Der größte, im Bild durch einen grünen Kasten angedeutete, Unterschied besteht darin, dass das Faltblatt S_2 in der NmPin-Struktur deutlich als solches zu erkennen ist, während in der CsPin-Struktur der Faltblattcharakter von der Software nicht erkannt und somit in der verwendeten *ribbon*-Darstellung auch nicht als solches angezeigt wird.

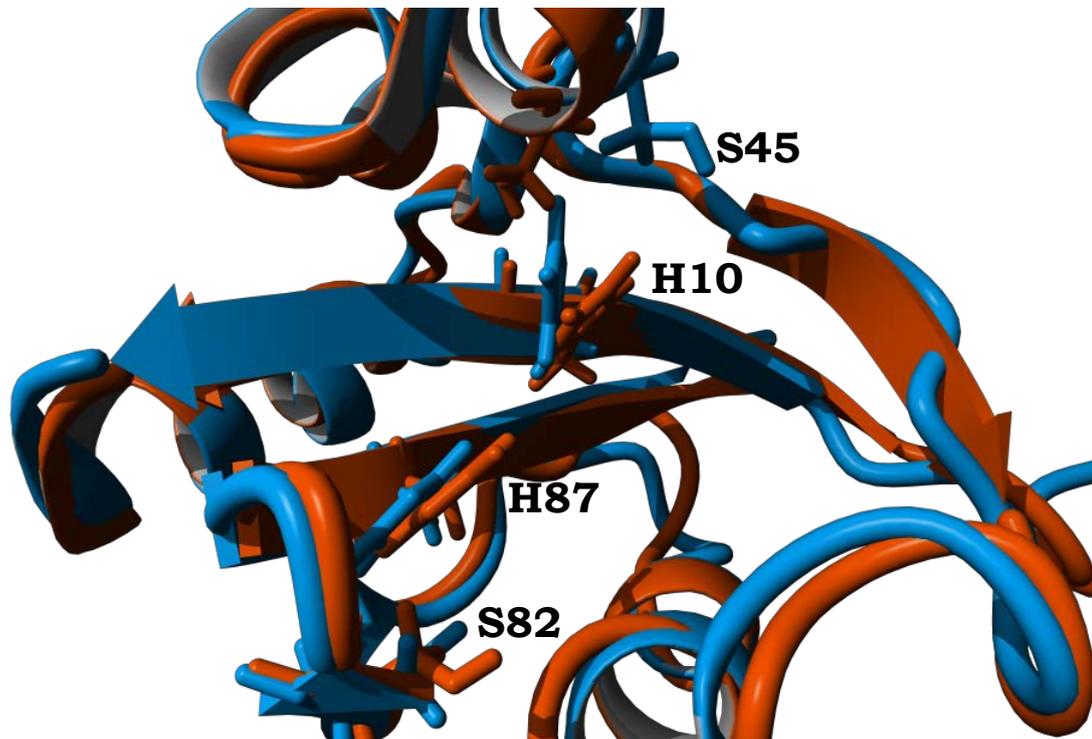


Abbildung 4.8: Vergleich Ladungsnetzwerk (NmPin vs. CsPin)

Dargestellt ist eine, mit dem Programm MUSTANG aus dem YASARA-*suite* (Tabelle 2.9) angefertigte, Überlagerung der *average*-Strukturen des aus dieser Arbeit stammenden NmPin-Ensembles (orange) sowie des NMR-Ensembles 2rqs (CsPin, blau). Die Strukturen sind in *ribbon*-Darstellung, die Reste der potentiellen Protonentransportkette in atomarer Darstellung zu sehen. Die Reste S82 und H87 sind in beiden Strukturen nahezu identisch ausgerichtet. H10 und S45 sind in einer Art und Weise verdreht, dass die Ausrichtung des S45 von NmPin besser zu H10 von CsPin passt und *vice versa*.

Betrachtet man die in Abschnitt 3.4.5 besprochene, potentielle Protonentransportgekoppelte Elektronentransportkette, so zeigt sich zunächst, dass alle Reste dieses Systems in beiden Proteinen konserviert sind. Abbildung 4.8 zeigt zudem, dass S82 und H87 in beiden *average*-Strukturen nahezu identisch ausgerichtet sind, während H10 und S45 etwas gegeneinander verdreht sind. Dies führt dazu, dass der Eindruck entsteht, die Ausrichtung des S45 von CsPin würde einer Wasserstoffbrückenausbildung zu H10 von NmPin eher entsprechen, als zu seinem eigenen H10 und *vice versa*. Es muss bei der Betrachtung derartiger Bilder immer in Betracht gezogen werden, dass es sich hierbei um Durchschnittsstrukturen der besten 20 Strukturen einer NMR-Strukturrechnung handelt und nicht um die starre Evidenz eines Kristalls.

4.2.2 NmPin verglichen mit PrsA und Par10 (bakterielle Parvuline)

Der Vergleich von NmPin mit den bakteriellen Parvulinen wird anhand der strukturell aufgelösten Parvulin-Domänen aus den *Bacteria* mit nachgewiesener Isomeraseaktivität gezogen. Wie in Abschnitt 1.3.1 besprochen, gehören zu den bakteriellen Parvulinen neben dem *sdPar* Par10 die multidomänen Parvuline NifM, PrsA, SurA und PPID.

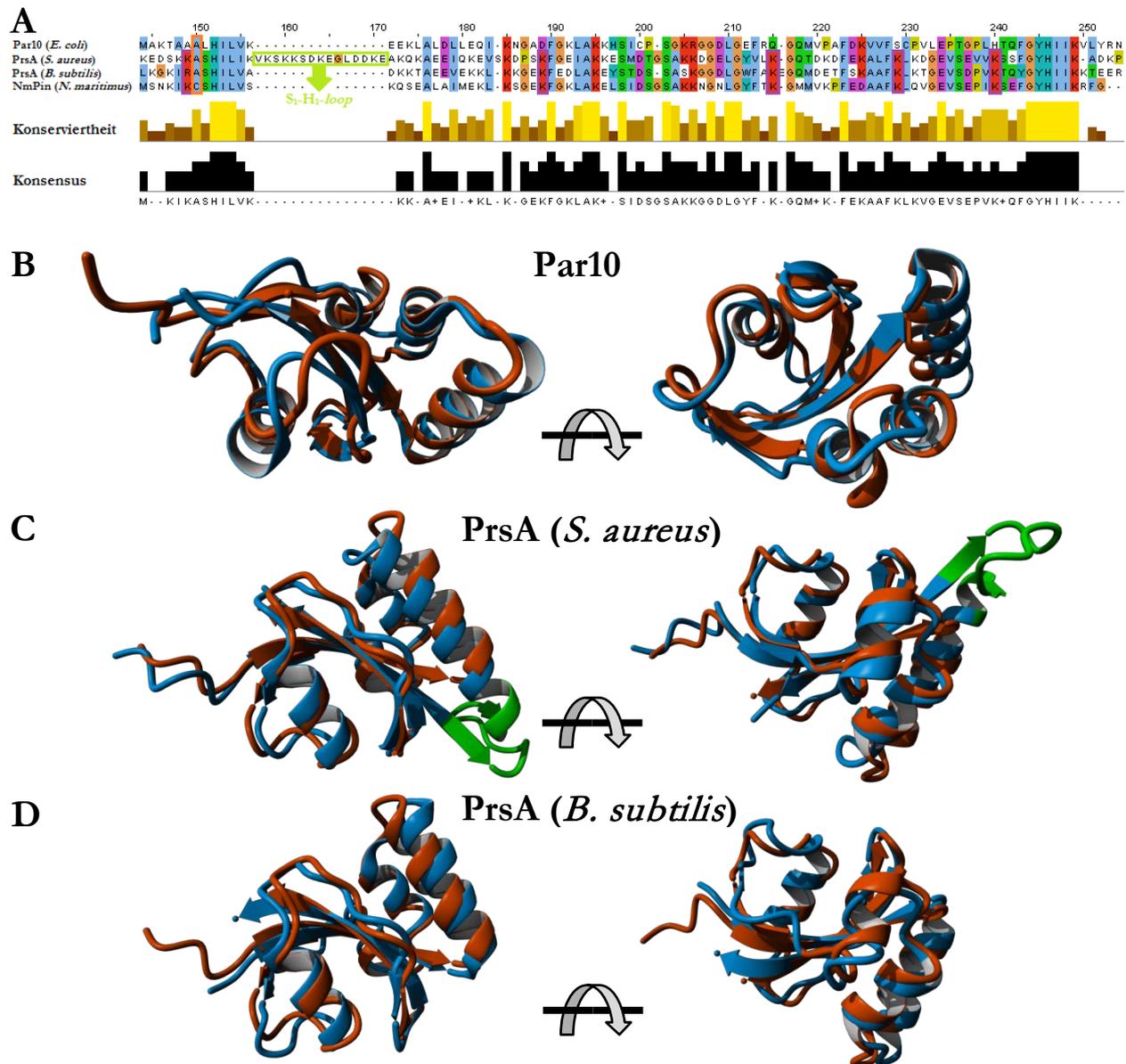


Abbildung 4.9: Vergleich: NmPin mit aktiven, bakteriellen Parvulin-Domänen

A: Mit MUSCLE angefertigtes multiples Sequenzalignment der aktiven, bakteriellen Parvulin-Domänen und NmPin. Die Abbildung wurde angefertigt mit JalView (Tabelle 2.9). Die orangefarbene Umrandung zeigt die Position des Cysteins 8 in NmPin, welches in den bakteriellen Sequenzen durch ein Alanin ersetzt ist. Die violetten Umrandungen zeigen Positionen, in denen die PrsA-Proteine und NmPin positive Ladungen tragen und sich so von Par10 unterscheiden. **B-D:** Dargestellt sind, mit dem Programm MUSTANG aus dem YASARA-suite (Tabelle 2.9) angefertigte, Überlagerungen der average-Strukturen, des aus dieser Arbeit stammenden NmPin-Ensembles (orange), sowie der NMR-Ensembles 1jns (Par10, blau, **B**), 2jzu (PrsA aus *S. aureus*, blau, **C**) und 1zk6 (PrsA aus *B. subtilis*, blau, **D**). **A+C:** In grün eingefärbt ist der für das PrsA aus *Staphylococcus aureus* typische verlängerte S₁-H₁-loop, welcher bereits im verlängerten Faltblatt beginnt und auch den Beginn der darauf folgenden Helix einschließt.

Die katalytisch inaktiven Parvulin-Domänen aus PPID (Weininger *et al.* 2009) und SurA (Behrens *et al.* 2001) wurden ebenso wenig zum Vergleich herangezogen, wie das strukturell unbeschriebene NifM. Abbildung 4.9 A zeigt das multiple Sequenzalignment der aktiven, strukturell beschriebenen, bakteriellen Parvulin-Domänen und NmPin. Betrachtet man dieses *alignment*, sind vor allem die konservierten Sequenzen um die katalytisch wichtigen Histidine auffällig. Des Weiteren ist zu erkennen, dass der ausgeprägte S₁-H₁-loop des PrsA aus *S. aureus* sowohl im *alignment* als auch in der Überlagerung mit NmPin (Abbildung 4.9 C) klar hervorsticht. Das Cystein 8 in NmPin ist in allen bakteriellen Parvulinen durch ein Alanin ersetzt (orangefarbene Umrandung). Die PrsA-Proteine und NmPin besitzen an insgesamt fünf Positionen (violette Umrandungen) positive Ladungen (Arginin oder Lysin), an welchen Par10 keine solche Ladung trägt. Dies deutet darauf hin, dass das elektrostatische Potential der PrsA-Protein und NmPin ähnlich verteilt sein könnte.

Die in Abbildung 4.9 B-C dargestellten Überlagerungen der einzelnen bakteriellen Parvuline mit NmPin wurden mit Hilfe der *average*-Strukturen der entsprechenden NMR-Ensembles angefertigt. Für das PrsA aus *S. aureus* wurde das Ensemble 1jzu (Heikkinen *et al.* 2009), für das PrsA aus *B. subtilis* das Ensemble 1zk6 (Tossavainen *et al.* 2006) und für Par10 das Ensemble 1jns (Kühlewein *et al.* 2004) verwendet. Die Abweichung der mathematischen *average*-Struktur durch Atomposition-Mittelung, von der endgültigen, energieminierten (YASARA NOVA bzw. AMBER96) *average*-Struktur betrug für PrsA (*S. aureus*) 1,07 Å, für PrsA (*B. subtilis*) 0,86 Å und für Par10 1,13 Å. Die Überlagerungen ergaben erwartungsgemäß sehr hohe Übereinstimmungen der Sekundärstrukturelemente, da die typische Parvulinfaltung sehr hoch konserviert ist.

Bereits bei Betrachtung des *alignments* konnte festgestellt werden, dass die PrsA-Parvulin-Domänen eine ähnliche Verteilung positiver Ladungen besitzen wie die thaumarchaealen Parvuline. Abbildung 4.10 zeigt sehr deutlich, dass die positiv geladene Interaktionsfläche, welche bereits in Abbildung 3.25 für NmPin zu erkennen ist, auch für die beiden PrsA-Parvulin-Domänen, welche bis dato strukturell untersucht wurden, zu erkennen ist. Zusätzlich zu dieser positiv geladenen Region haben die in der Abbildung gezeigten Proteine auch eine negativ geladene Bindungsfalte gemein, die in NmPin nur schwach, in PrsA aus *S. aureus* stärker und in PrsA aus *B. subtilis* sehr stark negativ geladen ist. Man erkennt auch den ausgeprägten S₁-H₁-loop des PrsA aus *S. aureus*, welcher ebenfalls leicht positiv geladen ist und in der Verlängerung der Bindungsfalte liegt. Die der Bindungsfalte und dem positiv geladenen *patch* gegenüberliegende Seite ist bei jedem der drei Proteine weit weniger geladen (PrsA; *B. subtilis*) bis kaum geladen (NmPin). Für die Anfertigung der Abbildung 4.10 wurden zunächst die drei Parvulin-Domänen mittels MUSTANG aus dem YASARA-*suite* (Tabelle 2.9) überlagert. Im Folgenden wurde für jedes Molekül das elektrostatische Potential mittels Particle-Mesh Ewald Methodik (ESPPME), mit einer ESP_{max} in Höhe von 150 kcal/mol berechnet.

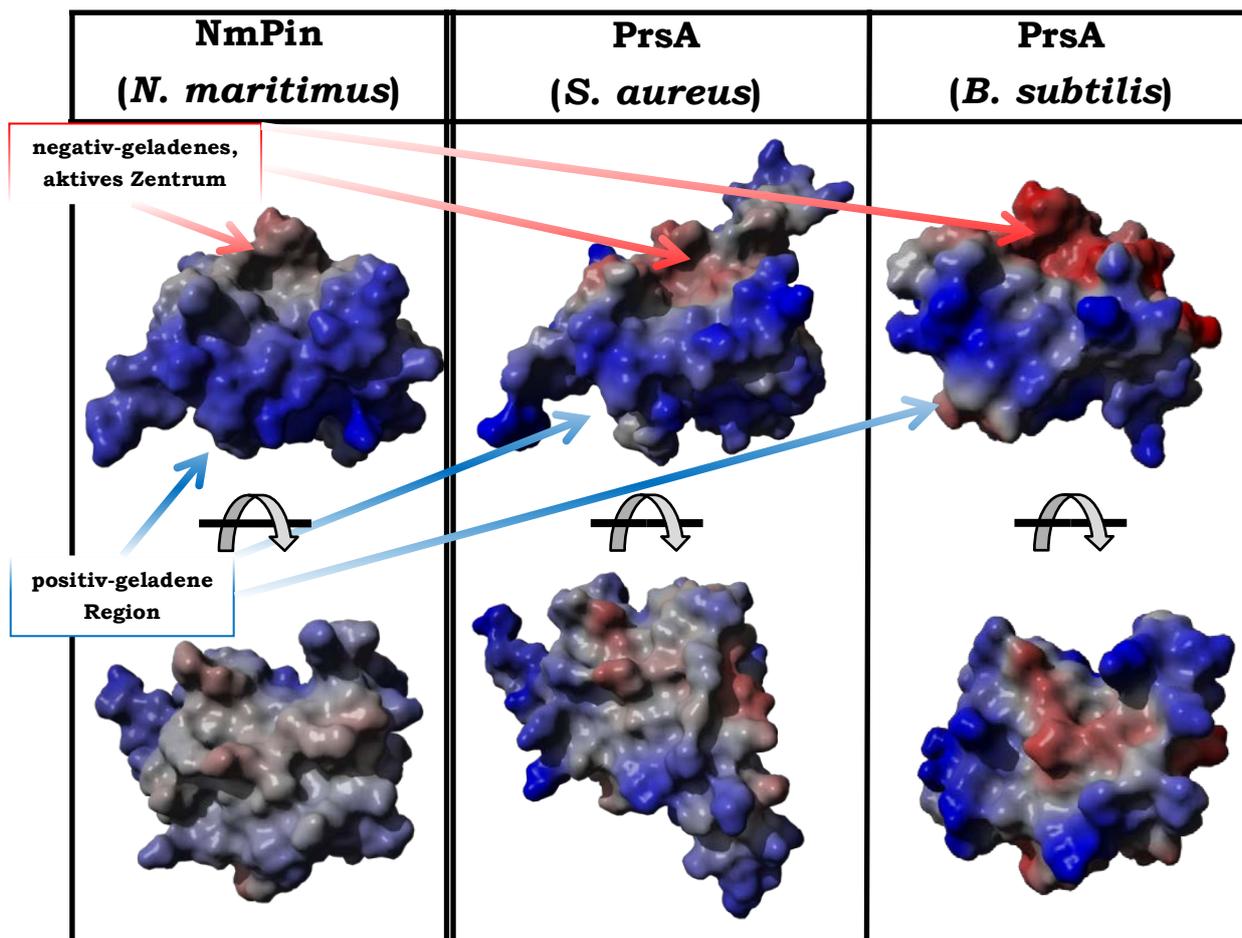


Abbildung 4.10: ESPPME-Vergleich zwischen PrsA und NmPin

Um diese Reihe von Abbildungen zu erstellen, wurden die *average*-Strukturen des Ensembles aus dieser Arbeit, des Ensembles 2jzu (PrsA aus *S. aureus*) und des Ensembles 1zk6 (PrsA aus *B. subtilis*) mit Hilfe des Programms MUSTANG aus dem YASARA-suite überlagert, so dass die Ausrichtung aller Domänen identisch war. Im Folgenden wurde für jedes Molekül das elektrostatische Potential mittels Particle-Mesh Ewald-Methodik (ESPPME) mit einer ESPmax in Höhe von 150 kcal/mol berechnet. Je intensiver die Farbgebung in diesen Abbildungen ist, desto stärker geladen ist die entsprechende Region. Rot steht hierbei für negative Ladungen, blau für positive Ladungen. Die Pfeile zeigen zum einen den positiv geladenen *patch*, den die drei Domänen genauso gemeinsam haben wie die, ebenfalls durch Pfeile angedeutete, negative Bindungsfalte des katalytischen Zentrums.

Bereits mit der Lösung der NMR-Struktur von PrsA aus *S. aureus* wurde eine Protonentransportkette vorgeschlagen (Heikkinen *et al.* 2009). Da, wie in Abschnitt 3.4.5 erläutert, eine solche Kette auch für NmPin in Frage kommen könnte, lag es nahe sich die an dieser Transportkette beteiligten Aminosäuren einmal genauer anzusehen und die Entfernungen der jeweiligen Atome zu untersuchen.

Tabelle 4.1: Abstände innerhalb der Elektronentransportkette (PrsA)

PrsA aus <i>S. aureus</i>		PrsA aus <i>B. subtilis</i>	
beteiligte Atome	Abstand in Å	beteiligte Atome	Abstand in Å
OG (S197) – HE2 (H146)	1,93	OG (S156) – HE2 (H122)	2,50
HD1 (H146) – ND1 (H239)	3,13	HD1 (H122) – ND1 (H199)	2,31
NE2 (H239) – HG (S234)	4,91	NE2 (H199) – HG1 (T194)	2,03

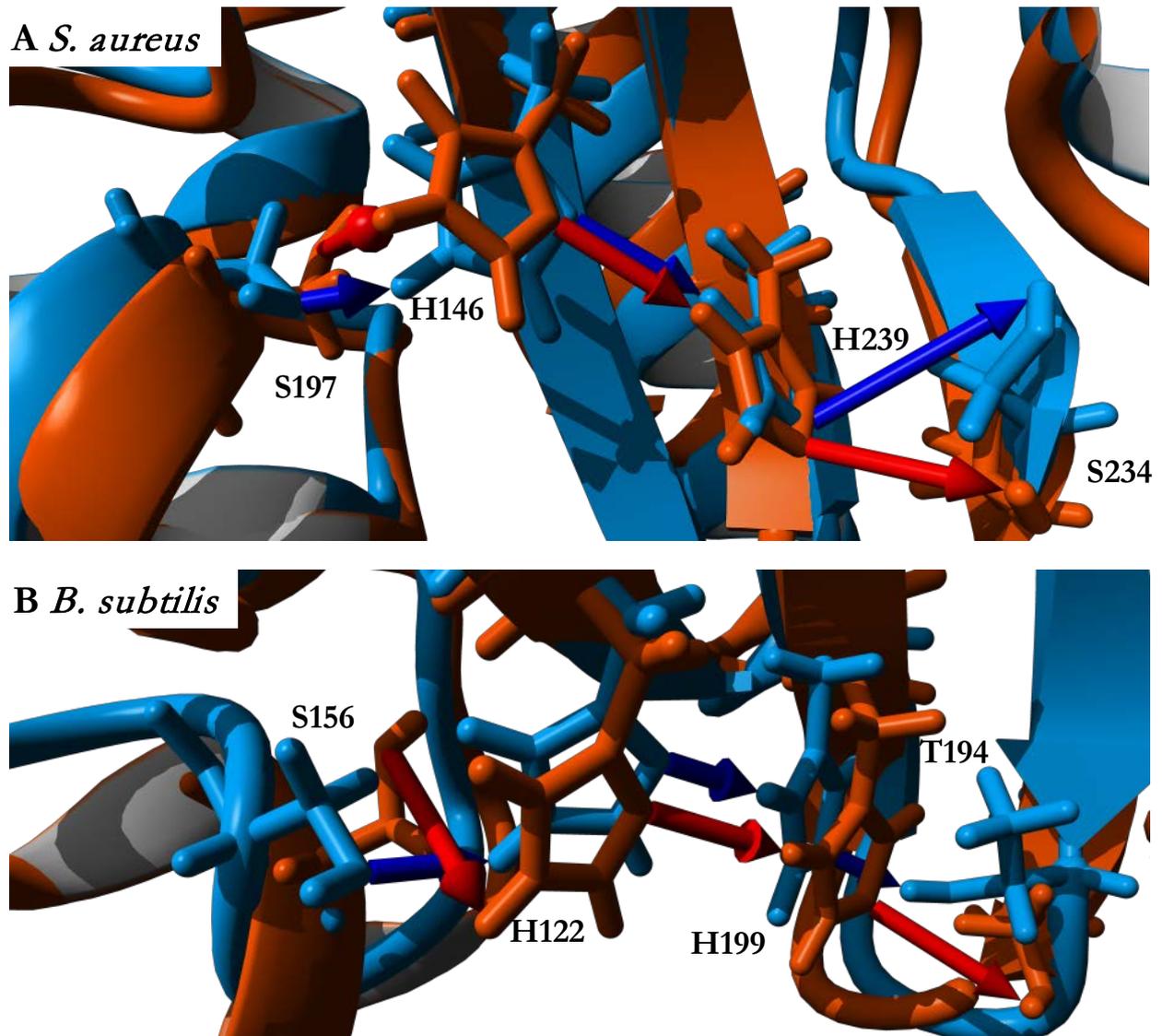


Abbildung 4.11: Potentielle Elektronentransportketten in PrsA

Dargestellt ist eine, mit dem Programm MUSTANG aus dem YASARA-suite (Tabelle 2.9) angefertigte, Überlagerung der *average*-Strukturen, des, aus dieser Arbeit stammenden NmPin-Ensembles (orange), sowie der NMR-Ensembles 2jzu (PrsA aus *S. aureus*, blau, **A**) und 1zk6 (PrsA aus *B. subtilis*, blau, **B**). Die Strukturen sind in *ribbon*-Darstellung, die Reste der potentiellen Protonentransportkette in atomarer Darstellung zu sehen. Die roten Kegelpfeile zeigen den potentiellen Weg der Elektronen für NmPin an. Die blauen Kegelpfeile zeigen den potentiellen Weg der Elektronen für das PrsA aus *S. aureus* (**A**), oder für das PrsA aus *B. subtilis* (**B**) an.

Abbildung 4.11 B zeigt, dass nicht nur das PrsA aus *S. aureus* über eine solche Elektronentransportkette verfügt (Abbildung 4.11 A), sondern auch das PrsA aus *B. subtilis*. Betrachtet man die Abstände aus Tabelle 4.1, welche in der Abbildung durch blaue Kegelpfeile visualisiert wurden, so zeigt sich, dass diese für *B. subtilis* sehr gering sind. Keine dieser Abstände liegt über 2,5 Å, bei Abständen bis 3,4 Å ist eine Wasserstoffbrücke wahrscheinlich. Gut zu erkennen ist auch, dass alle vier an der Kette beteiligten Reste in jedem der drei Proteine nahezu identisch ausgerichtet sind. In *B. subtilis* ist das C-terminale Serin durch ein Threonin ersetzt, was aber für die Ausbildung eines Wasserstoffbrückennetzwerkes chemisch kaum einen Unterschied macht.

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass sowohl das elektrostatische Potential als auch die potentielle Elektronentransportkette zwischen den thaumarchaealen Parvulinen und der Parvulin-Domäne der PrsA-Proteine konserviert scheinen. Es erscheint unwahrscheinlich, dass zwei so unterschiedliche Proteine diese Ähnlichkeiten auf Grund naher evolutionärer Verwandtschaft besitzen. Daher ist anzunehmen, dass die strukturellen Übereinstimmungen auf Grund ähnlicher Lokalisation, Aufgaben oder Interaktionspartner analog entstanden sind.

4.2.3 Potentielles Ladungsnetzwerk des katalytischen Zentrums

Abbildung 3.26 zeigte, dass in der katalytischen Bindungsfalte des im Zentrum dieser Arbeit stehenden Proteins NmPin, die Reste S45 und S82 die beiden bereits in Abschnitt 1.3.5 erwähnten Histidine so einrahmen, dass ein Netzwerk dieser vier Reste angenommen werden kann. Abbildung 3.27 zeigte die Tatsache, dass diese vier Reste über alle bis dato bekannten archaealen Parvuline konserviert sind allein S82 ist in einigen Organismen gegen ein chemisch nahezu identisches Threonin ausgetauscht. Abbildung 4.8 zeigt, dass die Ausrichtung der vier entscheidenden Reste innerhalb des nächstverwandten NmPin-Homolog CsPin nahezu identisch ist.

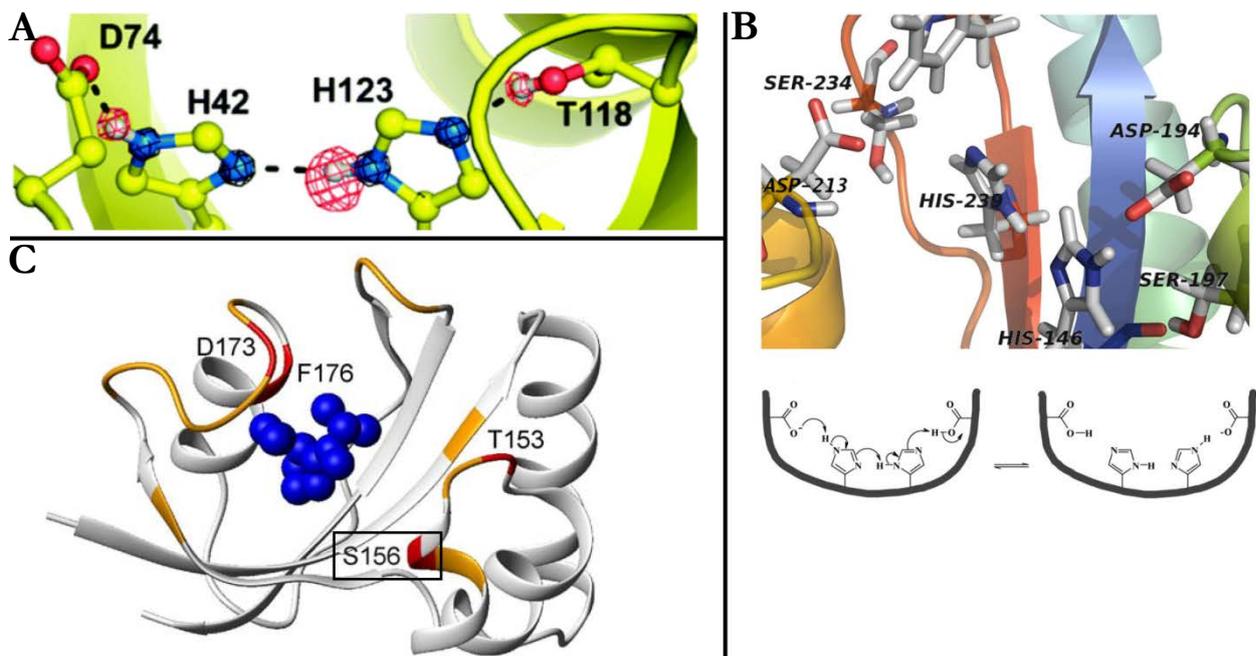


Abbildung 4.12: Hinweise auf ein Netzwerk in der Literatur

A: Netzwerktrape im aktiven Zentrum von hPar14, resultierend auf eine 0,8 Å-Kristallstruktur. Die Elektronendichten der Wasserstoffatome (rot) und Stickstoffatome (schwarz) sind als Gitter dargestellt. Die Autoren interpretierten dieses Netzwerk als Wasserstoffrückennetzwerk. Abbildung aus Mueller *et al.* 2011. **B:** Das aktive Zentrum des PrsA aus *S. aureus*, so wie die Autoren (Heikkinen *et al.* 2009) es bewerteten. Neben den in Abbildung 4.11 A erwähnten Resten S197, S234, H146 und H239 spielen hier auch die Aspartate D213 und D194 eine Rolle. Die Autoren entwickelten ein Modell, welches sie als *charge relay* bezeichneten. Sie sprachen als Erste von einer Protonentransport-gekoppelten Elektronentransportkette. **C:** PrsA (*B. subtilis*) mit einem A-P-Dipeptid (blau), das die Titration der Parvulindomäne mit Suc-AKPF-pNA visualisiert. In orange sind Reste, die schwache ($0,04 \text{ ppm} \leq \Delta\delta < 0,07 \text{ ppm}$), in rot Reste, die starke ($0,07 \text{ ppm} \leq \Delta\delta < 0,36 \text{ ppm}$) Veränderungen der chemischen Verschiebung erfahren. Der Kasten zeigt S156, das analog zu S45 in NmPin ist. (Tossavainen *et al.* 2006)

2009 postulierten Heikinnen *et al.* in der Veröffentlichung zur NMR-Struktur der Parvulin-Domäne von PrsA aus *S. aureus*, einen „charge relay“ (engl.: Ladungsschaltkreis) Sie gingen hierbei davon aus, dass die Deprotonierung eines Aspartatrestes durch die Weiterleitung der negativen Ladung über die zentralen Histidine stabilisiert wird. Abbildung 4.12 B (oben) zeigt die daran beteiligten Reste. Neben den Resten D194, D213, H146 und H239, welche die Autoren in ihr Modell [Abbildung 4.12B (unten)] aufnahmen, sind auch hier bereits die Serine S197 und S234, welche den Resten S45 und S82 in NmPin analog sind, aufgeführt.

Auch die Veröffentlichung der NMR-Struktur des PrsA aus *B. subtilis*, die von Tossavainen *et al.* 2006 veröffentlicht wurde und die keine Hinweise auf ein entsprechendes Netzwerk enthielt, taucht mit S156 ein zu S45 in NmPin analoger Rest in der Diskussion auf (Abbildung 4.12 C). Dieser Rest war einer der Reste, die am stärksten auf eine Titration mit Suc-AKPF-pNA, einem Substratanalogen des PrsA, reagierten, was auf eine Bindung des Substrates an diesen Rest hinweisen könnte. Dass die Autoren damals kein Netzwerk über die Reste S156, H122, H199 und T194 feststellten, verwundert etwas, da die Abstände zwischen den entsprechenden Atomen in keiner der bisher untersuchten NMR-Strukturen einen besseren Hinweis für ein Wasserstoffbrückennetzwerk oder eine potentielle Protonentransport-gekoppelte Elektronentransportkette lieferten (Abbildung 4.11B, Tabelle 4.1).

Nachdem nun Hinweise auf Ladungsnetzwerke innerhalb von Parvulin-Domänen aus *Archaea* und *Bacteria* besprochen wurden, bleibt zuletzt noch zu erwähnen, dass das stärkste Indiz für das Vorhandensein solcher Strukturen, wie bereits in Abschnitt 1.3.5 erläutert, aus einem 0,8 Å-Kristall des humanen Par14 stammt (Abbildung 4.12A) (Mueller *et al.* 2011).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in der Diskussion um den Mechanismus der Isomerisierungsreaktion durch PPIC-Typ PPIasen Ladungsnetzwerke wie oben beschrieben eine immer größere Bedeutung einnehmen. Für Parvulin-Domänen der *Prokaryota* wie auch der *Eukaryota* wurden derartige Netzwerke entweder bewiesen oder schlüssig postuliert. In welcher Art und Weise diese Netzwerke am Isomerisierungsprozess teilnehmen, ob sie reaktive Zwischenprodukte durch Ladungsabtransport stabilisieren oder Bindungen durch zusätzliche Ladungen destabilisieren oder völlig anders in den Isomerisierungsschritt eingreifen, bleibt ein Rätsel. Die Richtung der weiterführenden Forschungen zur entgeltigen Entschlüsselung dieses mechanistischen Geheimnisses führt jedoch nicht an diesem Netzwerk vorbei.

4.3 Ist NmPin ein Membranprotein?

Eine ganze Reihe Ergebnisse und Untersuchungen dieser Arbeit führen zu der Frage, ob es möglich ist, dass NmPin mit der Membran seines Wirts *Nitrosopumilus maritimus* interagiert. Dies ist für Par10, dem bakteriellen Homologen der archaealen Parvuline, nicht bekannt und wäre daher eine archaeale Besonderheit.

Den ersten Hinweis lieferte die Untersuchung des elektrostatischen Potentials (Abbildung 3.25). Hier zeigte sich, dass die thaumarchaealen Parvuline eine stark positiv geladene Fläche aufweisen, die wie geschaffen dafür scheint, mit der negativ geladenen Membran zu interagieren. Dass die Kopfgruppen der hauptsächlich aus Crenarchaeol (ein für *Crenarchaeota* typischer Glycerol-Dialkyl-Glycerol-Tetraether, der eine Cyklohexyl-Einheit trägt) bestehenden Zellmembran negativ geladen ist, zeigten Schouten *et al.* 2008 durch die Analyse der Kopfgruppen dieser Tetraether, welche hauptsächlich Hexosen, Dihexosen und Phosphohexosen sind.

Markiert man, wie in Abbildung 4.13, das Cystein 8 in einer Darstellung des elektrostatischen Potentials (ESPPME) der bisher gelösten thaumarchaealen Parvuline, so erkennt man, dass das Cystein 8 in beiden Fällen in einer Ausbuchtung inmitten der positiv geladenen Fläche liegt und dem Lösungsmittel zugänglich ist. Cysteine besitzen eine sehr reaktive Sulfurylgruppe, die zum Beispiel in PrsA, mit Resten verbunden sind, welche das entsprechende Protein in der Membran verankern (Diacylglycerin in PrsA; Hyyryläinen *et al.* 2001).

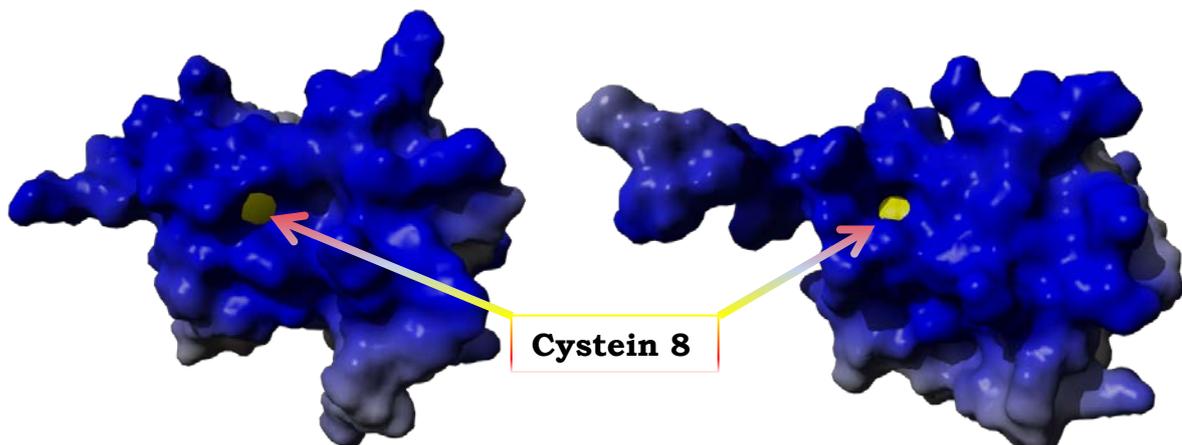


Abbildung 4.13: ESPPME von NmPin und CsPin mit markiertem Cystein 8

Die Abbildung zeigt des elektrostatische Potential durch *Particle-Mesh Ewald* (ESPPME) von NmPin (links) und CsPin (rechts). Des ESPPME wurde auf die molekulare Oberfläche der entsprechenden *average*-Strukturen projiziert. Die **blauen** Bereiche zeigen eine positiv geladene Region an. Zu Visualisierung der Ausbuchtung, an deren Ende sich das Cystein 8 befindet (Pfeile) wurde die Oberfläche der Lösungsmittelzugängigkeit des Cysteins 8 in **gelb** dargestellt. Beide Moleküle zeigen ein dem Lösungsmittel zugängiges Cystein 8 inmitten des positiv geladenen *patches*.

Die Verankerung in der Membran über ein Cystein wäre nur eine weitere Übereinstimmung zwischen PrsA und den thaumarchaealen Parvulinen, neben dem

Diskussion

NmPin, ein Membranprotein?

elektrostatischen Potential (Abbildung 4.10) und dem Ladungsnetzwerk des katalytischen Zentrums (Abbildung 4.11). Einen weiteren Hinweis für die Bedeutung des Cysteinrestes liefern die Abbildungen 4.4 und 4.5, in welchen die wichtigsten Reste für die Unterscheidbarkeit zwischen archaealen und bakteriellen Parvulinen auf die Strukturen von CsPin und NmPin übertragen wurden. Bereits hier zeigte sich, dass diese Reste ein positiv-geladenes *interface* um dieses Cystein bilden.

Die Frage die sich nun stellt, ist wie könnte das Cystein modifiziert sein um das Protein in der Membran zu verankern.

<u><i>Methanosphaerula palustris</i></u>	MVK QVSA ^{blau} AHI LVKT...	Euryarchaeota
<u><i>Methanoplanus petrolearius</i></u>	MAK KVR ^{blau} ASHI LVNS...	
<u><i>Methanococcus labreanum</i></u>	MVR -VK ^{blau} ASHI LVKT...	
<u><i>Methanoregula boonei</i></u>	MTT QVR ^{blau} ASHI LVTS...	
AACY023784421	-MA EVK ^{blau} ASHI LVGS...	
<u><i>Micrarchaeum acidiphilum</i></u> ; ARMAN-2	MAG KIR ^{blau} CAHI LVEK...	ARMANs
ACXJ01008586	MAE KIR ^{blau} CSHI LVEK...	
<u><i>Parvarchaeum acidiphilum</i></u> ; ARMAN-4	MVD KIR ^{blau} CAHI LVKK...	
AACY022114635	MSN KIK ^{blau} CSHI LVDK...	
AACY023104196	MSN KIK ^{blau} CSHI LVDK...	
AACY020912937	MSN KIK ^{blau} CSHI LVEK...	Thaumarchaeota
umcAD1000	MTN KIK ^{blau} CSHI LVEK...	
AACY020565072	MAQ KIK ^{blau} CSHI LVEK...	
AACY021994642	MAQ KIK ^{blau} CSHI LVEK...	
AACY023721900	MAN KIK ^{blau} CSHI LVEK...	
AACY023772022	MSN KIK ^{blau} CSHI LVKK...	
AY020521263	MSN KIK ^{blau} CSHI LVKK...	
<u><i>Nitrosopumilus maritimus</i></u>	MSN KIK ^{blau} CSHI LVSK...	
<u><i>Cenarchaeum symbiosum</i></u>	MAD KIK ^{blau} CSHI LVKK...	
ABEF01053500	MAN KIK ^{blau} CSHI LVQK...	
AACY020179599	MAD KIK ^{blau} CSHI LVEK...	Korarchaeota
AACY020172942	MVD KIK ^{blau} CSHI LVEK...	
AACY023450473	MAN KIK ^{blau} ASHI LVEK...	
hPin1	44 ...GGN AVK ^{blau} VRHI LCEK...	
<i>E.coli</i>	MAK TAA ^{blau} ALHI LVKE...	
hPar14	51 ...EPA RVR ^{blau} CSHL LVKH...	
	* : *	

Abbildung 4.14: Palmylierungsvorhersage mittels CSS Palm 3.0

Das *alignment* zeigt die Region um die von CSS Palm 3.0 (Tabelle 2.9) erkannte Palmylierungsstelle innerhalb der ARMAN und der *Thaumarchaeota*. Diese Sequenz ist weder innerhalb der *Euryarchaeota*, der *Bacteria* noch der *Eukarya* konserviert. Die Palmylierungssequenz ist in **blau** gezeigt, das Cystein in **rot**. **Braune** Sequenzen zeigen an, dass hier kein Palmylierungsmotiv vorliegt. hPar14 besitzt ein Cystein an entsprechender Stelle (**grün**), jedoch ist hier kein Palmylierungsmotiv gegeben.

Eine Antwort darauf könnte Abbildung 4.14 liefern. Das hier dargestellte *alignment* zeigt eine Region, in der das Palmylierungs-Vorhersageprogramm CSS Palm 3.0 (Ren *et al.* 2008) ein Palmylierungsmotiv innerhalb der *Thaumarchaeota* und ARMAN entdeckt hat. Palmyl-Reste sind bekannt dafür, Proteine in Membranen zu verankern (Bijlmakers und Marsh 2003) und der lange C16-Körper der gesättigten Fettsäure würde auch zu der Ausbuchtung passen, welche sowohl NmPin als auch CsPin aufweisen.

Diskussion

NmPin, ein Membranprotein?

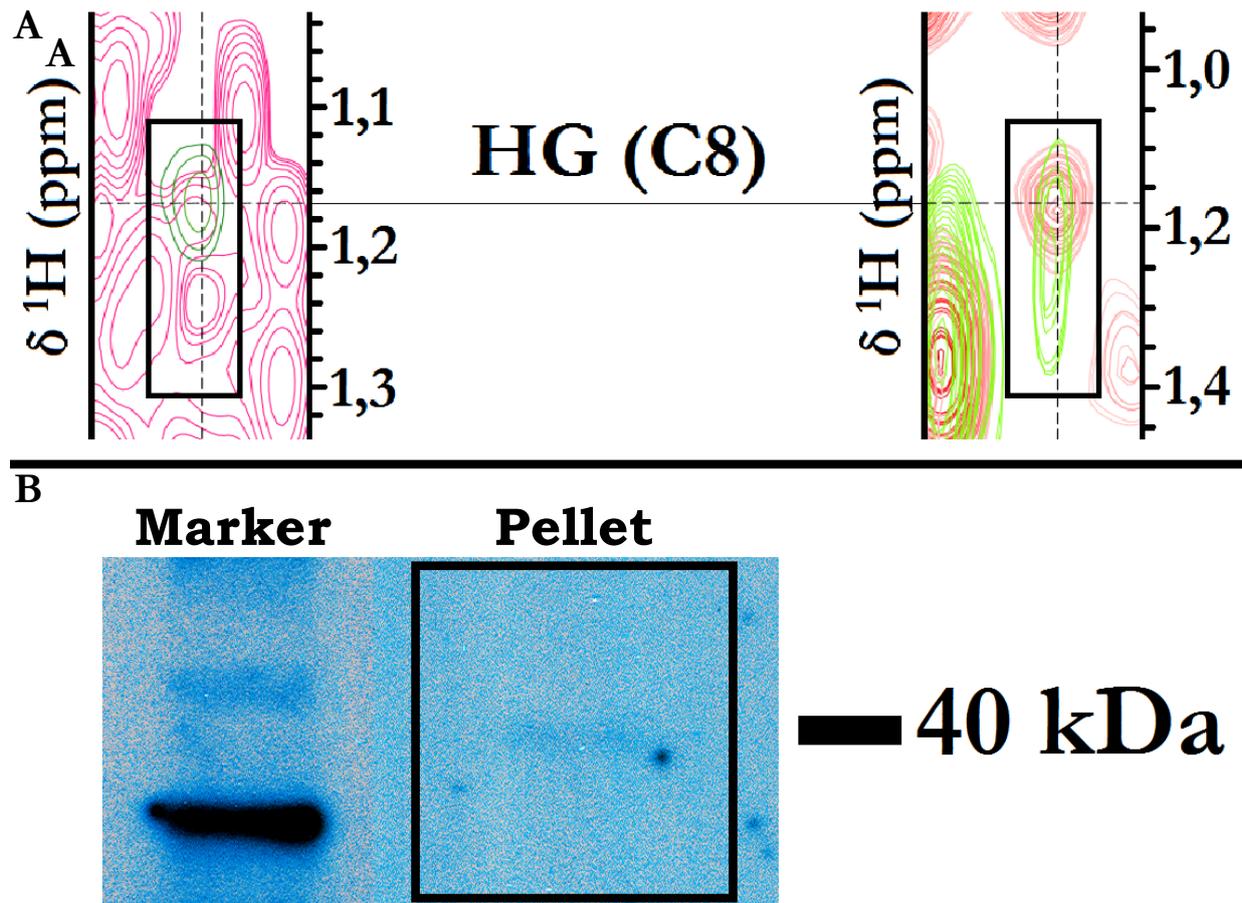


Abbildung 4.15: Abbildungsausschnitte Membranlokalisierung

A: vergrößerter Ausschnitt der Abbildung 3.16 B; zu sehen ist das eindeutige TOCSY-Signal (grün) der Kopplung HN-HG sowohl im 2D-TOCSY als auch im 3D- ^{15}N -HSQC-TOCSY. **B:** vergrößerter Ausschnitt der Abbildung 3.29; zu erkennen ist die einzige Bande, die in der Western Blot-Analyse des *N. maritimus*-Lysats mit *anti*-NmPin-Antikörper zu erkennen ist. Die Bande erscheint bei 40 kDa im Pellet.

Neben der Ladung, der Ähnlichkeiten mit dem Membranprotein PrsA, der Palmylierungs-Vorhersage, der Lage des Cysteins und der Lage der wichtigsten Reste zur Unterscheidung zwischen archaeal und bakteriell, ist die Tatsache wichtig, dass während der Zuordnung gezeigt werden konnte, dass das Cystein 8 in reduzierter Form vorliegt (Abbildung 4.15 A). Auch die Pelletfraktion, in der die einzige Proteinspezies des *N. maritimus*-Lysats mit Hilfe eines *anti*-NmPin-Antikörpers (Abschnitt 2.6) detektiert werden konnte, steht für Bindung an eine Membran. Die Größe dieser Proteinspezies ist mit 40 kDa jedoch weit entfernt von den 10 kDa der *sdPar*, was entweder auf falsche Behandlung des Lysats hinweist oder auf eine weitreichendere Modifikation des detektierten NmPin.

Alles in allem lässt sich zusammenfassen, dass all diese Hinweise die Wahrscheinlichkeit für die Membranständigkeit der thaumarchaealen Parvuline sehr hoch werden lassen.

4.4 Ausblick

So breitgefächert wie sich die Ergebnisse rund um das Protein NmPin aus *Nitrosopumilus maritimus* zeigten, so vielfältig sind auch die Einsatzmöglichkeiten dieses Proteins.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit phylogenetischen Ansätzen. Die letzten Veröffentlichungen wiesen, wie mehrfach erläutert, darauf hin, dass neben dem etablierten Reich der *Euryarchaeota* ein oder mehrere weitere Reiche existieren. In einem Punkt sind sich die Autoren einig: die Wurzel der *Eukarya* liegt entweder innerhalb der *Thaumarchaeota* oder sie bilden einen Schwesterzweig dazu. Um also mehr über unsere Herkunft zu erfahren und eventuell zu verstehen, wie sich das Leben im Allgemeinen entwickelte, ist es von großem Interesse, gerade die mesophilen *Archaea* genau zu betrachten. Einen Anstoß in diese Richtung könnten die in dieser Arbeit erstellten Primer bedeuten, die es möglich machen, neue oder auch bereits vorhandene Umweltproben nach Parvulinloci zu untersuchen und so das Phylum der Thaumarchaeota zu vergrößern. Des Weiteren lassen die festgestellten Ähnlichkeiten zwischen thaumarchaealen Parvulinen und den PrsA Parvulin-Domänen die Frage zu, inwiefern diese evolutionär verknüpft sind. Eine ausgiebige Datenbankrecherche zu diesem Thema könnte Licht in dieses Verhältnis bringen.

Das mehrfach angesprochene Ladungsnetzwerk, welches nicht nur die archaealen Parvuline, sondern auch PrsA und hPar14 zu besitzen scheinen, könnte Anlass geben, nicht nur weitere Parvulin-Domänen kristallographisch zu untersuchen, sondern auch bereits gelöste Strukturen unter diesem Gesichtspunkt erneut zu beleuchten.

Die Tatsache, dass mit CsPin (psychrophil) und NmPin (mesophil) zwei sehr nah verwandte Proteine bereits strukturell aufgelöst wurden, macht die Aufklärung eines eventuellen moderat thermophilen Parvulins (z. B.: aus *Micrarchaeum acidiphilum*) sehr interessant, um die molekularen Zusammenhänge der Temperaturadaption besser zu verstehen.

Zuletzt ist der interessanteste Aspekt zukünftiger Arbeit der, nachzuweisen, ob NmPin tatsächlich an Membranen bindet. Die Tatsache, dass *N. maritimus* einer der wenigen kultivierbaren Archaeen ist, eröffnet Möglichkeiten physiologischer Ansätze mit endogenen Material, die bei anderen *Archaea* schlichtweg nicht möglich sind. Western Blot-Analysen, *pull down*-Ansätze oder Ähnliches sind denkbar. *In vitro* kann die Bindung rekombinant hergestellten NmPins an künstliche Membranen mittels sogenannter *floating*-Experimente untersucht werden. Zusätzlich kann das Cystein 8 mit chemischen Methoden (z. B.: über eine jodierte Fettsäure) modifiziert und im Anschluss das Rückfaltungverhalten des rekombinanten Proteins mittels Fluoreszenz-, CD- und/oder NMR-Spektroskopie untersucht werden.

5 Zusammenfassung / abstract

5.1 Zusammenfassung

Der cis/trans-Übergang von X_{aa}-Pro-Peptidbindungen benötigt bei moderaten Temperaturen einer Katalyse. Die Proteine, welche für diese Katalyse zuständig sind, die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen (PPIasen) werden in drei sich in Primärsequenz, Sekundärstruktur und Funktionsweise unterscheidende Proteinfamilien eingeteilt. Zwei dieser Familien werden aufgrund ihrer Interaktion mit Immunsuppressiva als Immunophiline bezeichnet; die Cyclophiline binden Cyclosporin A, die FKBP (FK506 Bindeproteine) Tacrolimus.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der dritten PPIase-Familie, den Parvulinen. Der bestuntersuchte Vertreter dieser Familie hPin1 ist sowohl beteiligt an der Ausbildung neurodegenerativer Erkrankungen, wie *Morbus* Alzheimer und *Morbus* Parkinson, als auch am Alterungsprozess und der Entstehung zahlreicher Tumorarten. Trotz einer Vielzahl struktureller Studien, an Parvulinen aus *Eukarya*, *Bacteria* und *Fungi*, blieb der Mechanismus der Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerisierung durch die Parvuline ungeklärt. Im letzten Jahrzehnt stieg die Zahl gelöster archaealer Genome sprunghaft an und einige dieser Genome trugen auch Parvuline des Par10-Typ (*single domain* Parvulin). Um einen Beitrag zur Auflösung des Isomerisierungsmechanismus der PPIC-Typ-PPIasen zu leisten wurde das Parvulin des einzigen kultivierbaren Archaeen welcher ein Parvulingen codiert, *Nitrosopumilus maritimus*, für diese Arbeit gewählt.

Es konnte gezeigt werden, dass die archaealen und bakteriellen sdPar, sowohl durch phylogenetische Ansätze, als auch durch Experimente maschinellen Lernens voneinander unterschieden werden können. Des Weiteren wurde klar, dass die archaealen Parvuline ein echtes, „urtümliches“ Phylum darstellen und nicht etwa durch horizontalen Gentransfer aus *Bacteria* entstanden sind. Die verwendete *Maximum Likelihood*-Phylogenie lieferte in Kombination mit dem genetischen Hintergrund des archaealen Parvulingens sehr brauchbare evolutionäre Information. Die Datenbankanalysen ergaben zudem eine Korrelation zwischen hohen Lebensraumtemperaturen und geringen PPIase-Repertoire.

Die NMR-Struktur von NmPin, mit einer Auflösung über alle Atome von 0,80 Å, wies das typische β3αβ2β-Parvulinfaltungsmuster, sowie ein, in früheren Studien bereits für Par14 und PrsA gezeigtes, Ladungsnetzwerk im aktiven Zentrum auf. Untersuchungen des elektrostatischen Potentials zeigten, das NmPin über eine positive geladene Interaktionsfläche verfügt, in deren Mitte ein reduziertes Cystein sitzt. Diese Beobachtung, sowie die Vorhersage eine möglichen Palmytylierung dieses Cysteins und immunobiochemische Experimente mit *N. maritimus*-Lysat, wiesen darauf hin, dass NmPin ein Membranprotein sein könnte.

5.2 Abstract

Structural and phylogenetical analysis of the archaeal parvulin NmPin from *Nitrosopumilus maritimus*

Cis/trans-isomerisation of X_{aa}-Pro-bonds depends on catalysis. The proteins responsible for this catalysis, the peptidyl-prolyl-cis/trans-isomerases (PPIases), are separated in three protein families, which differ in primary sequence, secondary structure and functionality. Two of these families are grouped as immunophilins because of their interaction with immunosuppressants; cyclophilins bind cyclosporin A, FKBP (FK506 binding proteins) bind tacrolimus.

This work deals with the third family of PPIases, the parvulins. The most studied parvulin, Pin1, is involved in the development of neurodegenerating diseases like *Morbus* Alzheimer and *Morbus* Parkinson as well as in aging and the development of many kinds of tumors. Despite numerous structural studies with parvulins from *Eukarya*, *Bacteria* and *Fungi* the mechanism of peptidyl-prolyl-cis/trans-isomerisation remained unsettled. During the last decade the number of solved archaeal genomes jumped up and some of these new genomes included Par10-type parvulins (single domain parvulins). To contribute in the elucidation of PPIC-type-PPIases isomerisation mechanism, the parvulin out of the only cultivatable *Archaea* including one, *Nitrosopumilus maritimus*, has been chosen for this work.

The possibility to separate archaeal from bacterial sdPars by using phylogenetics as well as machine learning approaches has been shown. Furthermore the evolution of archaeal parvulins through events of horizontal gene transfer could be excluded. The applied maximum likelihood phylogeny combined with genetic background analysis of the archaeal parvulin gene delivered satisfying information. Searching data bases led to a correlation between high living temperatures and small PPIase repertoires.

NmPin's NMR structure, exhibiting a 0.80 Å resolution over all atoms, showed the parvulin typical $\beta_3\alpha\beta_2\beta$ -fold as well as a charge relay system in the catalytic centre that Par14 and PrsA showed in former studies. Examining the electrostatic potential of NmPin's surface illustrated a positively charged interface bearing a central reduced cysteine. This fact as well as the prediction of a potential palmitoylation of this cysteine and immunobiochemical approaches with *N. maritimus* lysate gave evidence for NmPin to be a membrane associated protein.

Anhang

6 Anhang

Tabelle 6.1: Archaeales PPIase-Repertoire (komplett)

Species	Subgroup	FKBP	Cyclophilin		Parvulin
			eine Domäne	mehrere Domänen	
Aeropyrum pernix K1 (taxid:566a5)	Desulfurococcales	[GeneID: 7001995]			
Desulfurococcus kamchatkensis 1221n (taxid:490899)	Desulfurococcales	[GeneID: 7171348]			
Hyperthermus butylicus DSM 5456 (taxid:415426)	Desulfurococcales	[GeneID: 4781357]			
Ignicoccus hospitalis KIN4/1 (taxid:453591)	Desulfurococcales	[GeneID: 5561788]			
Ignisphaera aggregans DSM 17230 (taxid:583356)	Desulfurococcales	[GeneID: 9715359]			
Staphylothermus hellenicus (taxid:84599)	Desulfurococcales	[GeneID: 9234816]			
Staphylothermus marinus F1 (taxid:399550)	Desulfurococcales	[GeneID: 4907414]			
Thermosphaera aggregans DSM 11486 (taxid:633148)	Desulfurococcales	[GeneID: 9166293]			
Caldivirga maquilingensis IC167 (taxid:397948)	Thermoproteales	[GeneID: 5709608]			
Pyrobaculum aerophilum str. IM2 (taxid:178306)	Thermoproteales	[GeneID: 1465269]			
Pyrobaculum arsenaticum DSM 13514 (taxid:340102)	Thermoproteales	[GeneID: 5054545]			
Pyrobaculum calidifontis JCM 11548 (taxid:410359)	Thermoproteales	[GeneID: 4909273]			
Pyrobaculum islandicum DSM 4184 (taxid:384616)	Thermoproteales	[GeneID: 4618310]			
Thermofilum pendens Hrk 5 (taxid:368408)	Thermoproteales	[GeneID: 4601708]			
Thermoproteus neutrophilus V24Sta (taxid:444157)	Thermoproteales	[GeneID: 6165121]			
Vulcanisaeta distributa DSM 14429 (taxid:572478)	Thermoproteales	[GeneID: 9753294]			
Metallosphaera sedula DSM 5348 (taxid:399549)	Sulfolobales	[GeneID: 5104317]			
Sulfolobus acidocaldarius DSM 639 (taxid:330779)	Sulfolobales	[GeneID: 3474124]			
Sulfolobus islandicus Y.N.15.51 (taxid:419942)	Sulfolobales	[GeneID: 7811842]			
Sulfolobus islandicus Y.G.57.14 (taxid:439386)	Sulfolobales	[GeneID: 7806765]			
Sulfolobus islandicus L.S.2.15 (taxid:429572)	Sulfolobales	[GeneID: 7799103]			
Sulfolobus islandicus L.D.8.5 (taxid:425944)	Sulfolobales	[GeneID: 8761410]			
Sulfolobus islandicus M.16.4 (taxid:426118)	Sulfolobales	[GeneID: 7939888]			
Sulfolobus islandicus M.16.27 (taxid:427318)	Sulfolobales	[GeneID: 7814194]			
Sulfolobus islandicus M.14.25 (taxid:427317)	Sulfolobales	[GeneID: 7793825]			
Sulfolobus solfataricus 98/2 (taxid:555311)	Sulfolobales	[NCBIRefSeq: ZP_06388952.1]*			
Sulfolobus solfataricus P2 (taxid:273057)	Sulfolobales	[GeneID: 1455021]			
Sulfolobus tokodaii str. 7 (taxid:273063)	Sulfolobales	[GeneID: 1458264]			
Candidatus Korarchaeum cryptofilum OPF8 (taxid:374847)		[GeneID: 6094685]			
Archaeoglobus fulgidus DSM 4304 (taxid:224325)	Archaeoglobales	[GeneID: 1485214]			
Archaeoglobus profundus (taxid:84156)	Archaeoglobales	[GeneID: 8739784]			
Ferroglobus placidus (taxid:54261)	Archaeoglobales	[GeneID: 8778595]			
Ferroplasma acidarmanus fer1 (taxid:333146)	Thermoplasmatales	[NCBIRefSeq: ZP_05570485.1]	[NCBIRefSeq: ZP_05570770.1]		
Picrophilus torridus DSM 9790 (taxid:263820)	Thermoplasmatales	[GeneID: 2844276]	[GeneID: 2844972]		
Thermoplasma acidophilum DSM 1728 (taxid:273075)	Thermoplasmatales	[GeneID: 1456533]			
Thermoplasma volcanium GSS1 (taxid:273116)	Thermoplasmatales	[GeneID: 1441094]			
Pyrococcus abyssi GE5 (taxid:272844)	Thermococcales	[GeneID: 1496093]			
Pyrococcus furiosus DSM 3638 (taxid:186497)	Thermococcales	[GeneID: 1469277]			
Pyrococcus horikoshii OT3 (taxid:70601)	Thermococcales	[GeneID: 1443723]			
Thermococcus barophilus MP (taxid:391623)	Thermococcales	[GeneID: 7426805] [GeneID: 7426996]			

Anhang

Thermococcus gammatolerans EJ3 (taxid:593117)	Thermococcales	[GeneID: 7988442] [GeneID: 7988769]	
Thermococcus kodakarensis KOD1 (taxid:69014)	Thermococcales	[GeneID: 3234635] [GeneID: 3234052]	
Thermococcus onnurineus NA1 (taxid:523850)	Thermococcales	[GeneID: 7016901] [GeneID: 7017347]	
Thermococcus sibiricus MM 739 (taxid:604354)	Thermococcales	[GeneID: 8095145] [GeneID: 8096967]	
Thermococcus sp. AM4 (taxid:246969)	Thermococcales	[GeneID: 7418919] [GeneID: 7419996]	
Halalkalicoccus jeotgali B3 (taxid:795797)	Halobacteriales	[GeneID: 9419389] [GeneID: 9418425]	[GeneID: 9418521]
Haloarcula marismortui ATCC 43049 (taxid:272569)	Halobacteriales	[GeneID: 3127862] [GeneID: 3128230]	[GeneID: 3128306]
Halobacterium salinarum R1 (taxid:478009)	Halobacteriales	[GeneID: 5952907]	[GeneID: 5954432]
Halobacterium sp. NRC1 (taxid:64091)	Halobacteriales	[GeneID: 1447940]	[GeneID: 1448405]
Haloferax volcanii DS2 (taxid:309800)	Halobacteriales	[GeneID: 8924699] [GeneID: 8925005] [GeneID: 8923307]	[GeneID: 8925930]
Haloquadratum borinquense DSM 11551 (taxid:469382)	Halobacteriales	[NCBIRefSeq: ZP_04000362.1]	[NCBIRefSeq: ZP_03999137.1]
Halomicrobium mukohataei DSM 12286 (taxid:485914)	Halobacteriales	[GeneID: 8411845]	[GeneID: 8411113]
Haloquadratum walsbyi DSM 16790 (taxid:362976)	Halobacteriales	[GeneID: 4194314] [GeneID: 4194313] [GeneID: 4194312]	[GeneID: 4194498]
Halorhabdus utahensis DSM 12940 (taxid:519442)	Halobacteriales	[GeneID: 8382782] [GeneID: 8384584]	[GeneID: 8384143]
Halorubrum lacusprofundi ATCC 49239 (taxid:416348)	Halobacteriales	[GeneID: 7400771] [GeneID: 7402232]	[GeneID: 7400425]
Haloterrigena turkmenica DSM 5511 (taxid:543526)	Halobacteriales	[GeneID: 8742261]	[GeneID: 8741099]
Natrialba magadii ATCC 43099 (taxid:547559)	Halobacteriales	[GeneID: 8826329]	[GeneID: 8825771]
Natronomonas pharaonis DSM 2160 (taxid:348780)	Halobacteriales	[GeneID: 3702947] [GeneID: 3702948]	[GeneID: 3703045]
Methanocaldococcus fervens AG86 (taxid:573064)	Methanococcales	[GeneID: 8365604] [GeneID: 8364799]	
Methanocaldococcus infernus (taxid:67760)	Methanococcales	[GeneID: 9131349] [GeneID: 9132173]	
Methanocaldococcus jannaschii DSM 2661 (taxid:243232)	Methanococcales	[GeneID: 1451708] [GeneID: 1451133]	
Methanocaldococcus sp. FS40622 (taxid:644281)	Methanococcales	[GeneID: 8804103] [GeneID: 8805198]	
Methanocaldococcus vulcanius M7 (taxid:579137)	Methanococcales	[GeneID: 8512450] [GeneID: 8513737]	
Methanococcus aeolicus Nankai3 (taxid:419665)	Methanococcales	[GeneID: 5326237] [GeneID: 5326811] [GeneID: 5327109]	
Methanococcus maripaludis strain S2 (taxid:267377)	Methanococcales	[GeneID: 2761543] [GeneID: 2762184]	[GeneID:2761226] [GeneID:2762628]
Methanococcus maripaludis C5 (taxid:402880)	Methanococcales	[GeneID: 4928726] [GeneID: 4929282]	[GeneID: 4928849] [GeneID: 4928828]
Methanococcus maripaludis C6 (taxid:444158)	Methanococcales	[GeneID: 5739045] [GeneID: 5737737]	[GeneID: 5737739] [GeneID: 5737327]
Methanococcus maripaludis C7 (taxid:426368)	Methanococcales	[GeneID: 5328019] [GeneID: 5328180]	[GeneID: 5328199] [GeneID: 5328198]
Methanococcus vannielii SB (taxid:406327)	Methanococcales	[GeneID: 5324844] [GeneID: 5325600]	[GeneID: 5325337]
Methanococcus voltae A3 (taxid:456320)	Methanococcales	[GeneID: 9275343] [GeneID: 9275600]	[GeneID: 9275576]
Methanocella paludicola SANA E (taxid:304371)	Methanocellales	[GeneID: 8681611] [GeneID: 8681613] [GeneID: 8682716] [GeneID: 8682163]	[GeneID: 8680336]
Methanopyrus kandleri AV19 (taxid:190192)	Methanopyrales	[GeneID: 1477826]	
Methanohalophilus mahii DSM 5219 (taxid:547558)	Methanosarcinales	[GeneID: 8983418] [GeneID: 8982542] [GeneID: 8982568] [GeneID: 8982618]	[GeneID: 8984001]
Methanosarcina acetivorans C2A (taxid:188937)	Methanosarcinales	[GeneID: 1474709] [GeneID: 1475030] [GeneID: 1475031] [GeneID: 1475032]	[GeneID: 1473549]
Methanosarcina barkeri str. Fusaro (taxid:269797)	Methanosarcinales	[GeneID: 3626252] [GeneID: 3627606] [GeneID: 3627607] [GeneID: 3624750]	[GeneID: 3626318]
Methanosarcina mazei Go1 (taxid:192952)	Methanosarcinales	[GeneID: 1478722] [GeneID: 1478723] [GeneID: 1478724] [GeneID: 1480998]	[GeneID: 1481171]

Anhang

Methanococcoides burtonii DSM 6242 (taxid:259564)	Methanosarcinales	[GeneID: 3997468] [GeneID: 3997208] [GeneID: 3997207]	[GeneID: 3998383]	
Methanosaeta thermophila PT (taxid:349307)	Methanosarcinales	[GeneID: 4462468] [GeneID: 4462528]	[GeneID: 4462737]	
Methanobrevibacter ruminantium M1 (taxid:634498)	Methanobacteriales	[GeneID: 8771571]	[GeneID: 8769764]	
Methanobrevibacter smithii ATCC 35061 (taxid:420247)	Methanobacteriales	[GeneID: 5217512]	[GeneID: 5216835]	
Methanobrevibacter smithii str. DSM 2374 (taxid:521002)	Methanobacteriales	[NCBIRefSeq: ZP_05975630.1]	[NCBIRefSeq: ZP_05975200.1]	
Methanobrevibacter smithii str. DSM 2375 (taxid:483214)	Methanobacteriales	[NCBIRefSeq: ZP_03607742.1]	[NCBIRefSeq: ZP_03608184.1]	
Methanosphaera stadtmanae DSM 3091 (taxid:339860)	Methanobacteriales	[GeneID: 3855930]	[GeneID: 3855043]	
Methanothermobacter marburgensis (taxid:145263)	Methanobacteriales	[GeneID: 9705217]	[GeneID 9705431]	
Methanothermobacter thermautotrophicus str. Delta H (taxid:187420)	Methanobacteriales	[GeneID: 1471533]	[GeneID: 1471055]	
Methanothermus fervidus DSM 2088 (taxid:523846)	Methanobacteriales	[GeneID: 9962176]		
Candidatus Methanoregula boonei 6A8 (taxid:456442)	Methanomicrobiales	[GeneID: 5411405] [GeneID: 5411786] [GeneID: 5411319]	[GeneID: 5412153] [GeneID: 5412152]	[GeneID: 5411813]
Methanocorpusculum labreanum Z (taxid:410358)	Methanomicrobiales	[GeneID: 4794580] [GeneID: 4795207] [GeneID: 4795418]	[GeneID: 4795487]	[GeneID: 4795525]
Methanoculleus marisnigri JR1 (taxid:368407)	Methanomicrobiales	[GeneID: 4847319] [GeneID: 4847837] [GeneID: 4847823] [GeneID: 4848080]	[GeneID: 4846938]	
Methanoplanus petrolearius DSM 11571 (taxid:679926)	Methanomicrobiales	[GeneID: 9743706] [GeneID: 9744011] [GeneID: 9744558] [GeneID: 9743704]	[GeneID: 9742482]	[GeneID: 9742630]
Methanosphaerula palustris E19c (taxid:521011)	Methanomicrobiales	[GeneID: 7271116]	[GeneID: 7270787] [GeneID: 7270788]	[GeneID: 7271584]
Methanospirillum hungatei JF1 (taxid:323259)	Methanomicrobiales	[GeneID: 3922974] [GeneID: 3921981]	[GeneID: 3922973]	
Cenarchaeum symbiosum A (taxid:414004)	Cenarchaeales	[GeneID: 6371728]	[GeneID: 6371618]	[GeneID: 6371363]
Nitrosopumilus maritimus SCM1 (taxid:436308)	Nitrosopumilales	[GeneID: 5773731]	[GeneID: 5773982]	[GeneID: 5772970]
uncultured methanogenic archaeon RCI (taxid:351160)	Environmental samples	[GeneID: 5144689] [GeneID: 5143556] [GeneID: 5144961] [GeneID: 5143608]	[GeneID: 5144163]	[GeneID: 6372024]
Candidatus Micrarchaeum acidiphilum ARMAN2 (taxid:425595)	Undefined Euryarchaeota	[GenBank: EET90174.1] [GenBank: EET89914.1]		[GeneID: 5773972] [GenBank: EET90507.1]
Candidatus Parvarchaeum acidiphilum ARMAN4 (taxid:662760)	Undefined Euryarchaeota	[GenBank: EEZ92935.1] [GenBank: EEZ92550.1] [GenBank: EEZ92554.1]		[GenBank: EEZ92924.1]
Candidatus Parvarchaeum acidophilus ARMAN5 (taxid:662762)	Undefined Euryarchaeota	[GenBank: EFD92809.1] [GenBank: EFD93075.1] [GenBank: EFD93064.1]		
Nanoarchaeum equitans Kin4M (taxid:228908)	Nanoarchaeales			

Tabelle 6.2: Abkürzungsübersicht Abbildung 3.1

Bezeichnung	Erklärung	Bezeichnung	Erklärung
1	hypothetisches Protein censa_1187 (<i>Cenarchaeum</i> spezifisch, [GeneID: 6371367])	hp1	hypothetisches Protein BJBARM4_0439 (<i>Parvarchaeum</i> spezifisch), [GenBank: EEZ92926.1]
2	hypothetisches Protein censa_1186 (<i>Cenarchaeum</i> spezifisch), [GeneID: 6371366]	hp2	hypothetisches Protein BJBARM4_0438 (<i>Parvarchaeum</i> spezifisch), [GenBank: EEZ92925.1]
ADC	Acetolaktat Decarboxylase, [GeneID: 5411158]	hp3	hypothetisches Protein BJBARM4_0436 (<i>Parvarchaeum</i> spezifisch), [GenBank: EEZ92923.1]
AEF	Auxin efflux carrier, [GeneID: 7271583]	hy1	hypothetisches Protein (spezifisch für <i>Thaumarchaeota</i> und <i>umc</i>), [GenBank: ACF09649.1]
AKR	Adenylatkinase-verwandtes Protein, [GenBank: EET90508.1]	hy2	hypothetisches Protein (spezifisch für <i>Thaumarchaeota</i> und <i>umc</i>), [GenBank: ACF09648.1]
AM	Antibiotikabiosynthese Monooxygenase, [GenBank: EEZ92921.1]	hy3	hypothetisches Protein (<i>umc</i> -spezifisch), [GenBank: ACF09644.1]
AT1/2	Aminotransferase Klasse I und II, [GenBank: AACY023450473.1]	hyp	hypothetisches Protein mit einer möglichen konservierten Domäne DUF726, [GenBank: AACY020565072.1]
ATS	Asparagyl-tRNA-synthetase, [GenBank: ACXJ01008586.1]	hyp1	hypothetisches Protein MBOO_0211, [GeneID: 5411157]
Aumc	hypothetisches Protein (<i>umc</i> -spezifisch, [GenBank: ABEF01053500.1]	hyp2	hypothetisches Protein MBOO_0214, [GeneID: 5411814]
C2	Cupin 2 konserviertes <i>barrel</i> , [GeneID: 9742629]	M10	<i>methan mark</i> 10, [GeneID: 4795594]
CK	Carbamatkinase, [GeneID: 9742627]	MCM	MCM <i>family</i> Protein, [GeneID: 7271582]
DAM	DNA Adenin Methylase, [GeneID: 9742631]	MCST	Methyl-akzeptierender Chemotaxis-Signalweiterleiter mit Pas/Pac-Sensor, [GeneID: 7271585]
DOS	Dihydropterat Synthase, [GeneID: 5411815]	MDP	metallabhängige Protease (COG 1310), [GenBank: ACF09647.1]
GCN5	GCN5-verwandte N-Acetyltransferase, [GeneID: 7271586]	NED	NAD-abhängige Epimerase/Dehydratase, [GenBank: EET90510.1]

Anhang

h1	hypothetisches Protein nmar_0943 (<i>Nitrosopumilus</i> spezifisch), [GeneID: 5773171]	OCT	Ornithine-Carbamoyltransferase, [GeneID: 9742628]
h2	hypothetisches Protein nmar_0945 (<i>Nitrosopumilus</i> spezifisch), [GeneID: 5774572]	PDP	Pirin-Domänen Protein, [GenBank: EEZ92922.1]
hA1	hypothetisches Protein UNLARM2_0040 (<i>ARMAN</i> spezifisch), [GenBank: EET90506.1]	RIII	Ribonuklease III, [GeneID: 4795607]
HAD	HAD- <i>superfamily</i> Hydrolase, [GenBank: EET90509.1]	S1	S1- <i>tex</i> -ähnliches Protein, [GenBank: AACY023784421.1]
HEAT	HEAT-Wiederholung-enthaltendes Protein, [GeneID: 4795375]	SdM	SAM-abhängige Methyltransferase, [GeneID: 4795613]
HIT	Histidin Triade Protein, [GenBank: ACF09643.1]	SMC	SMC-Domäne-enthaltendes Protein, [GeneID: 4795178]
HMCS	3-hydroxy-3-Methylglutaryl CoA Synthase, [GenBank: EET90505.1]	ToIB	ToIB-ähnliches Protein, [GeneID: 9742632]

Anhang

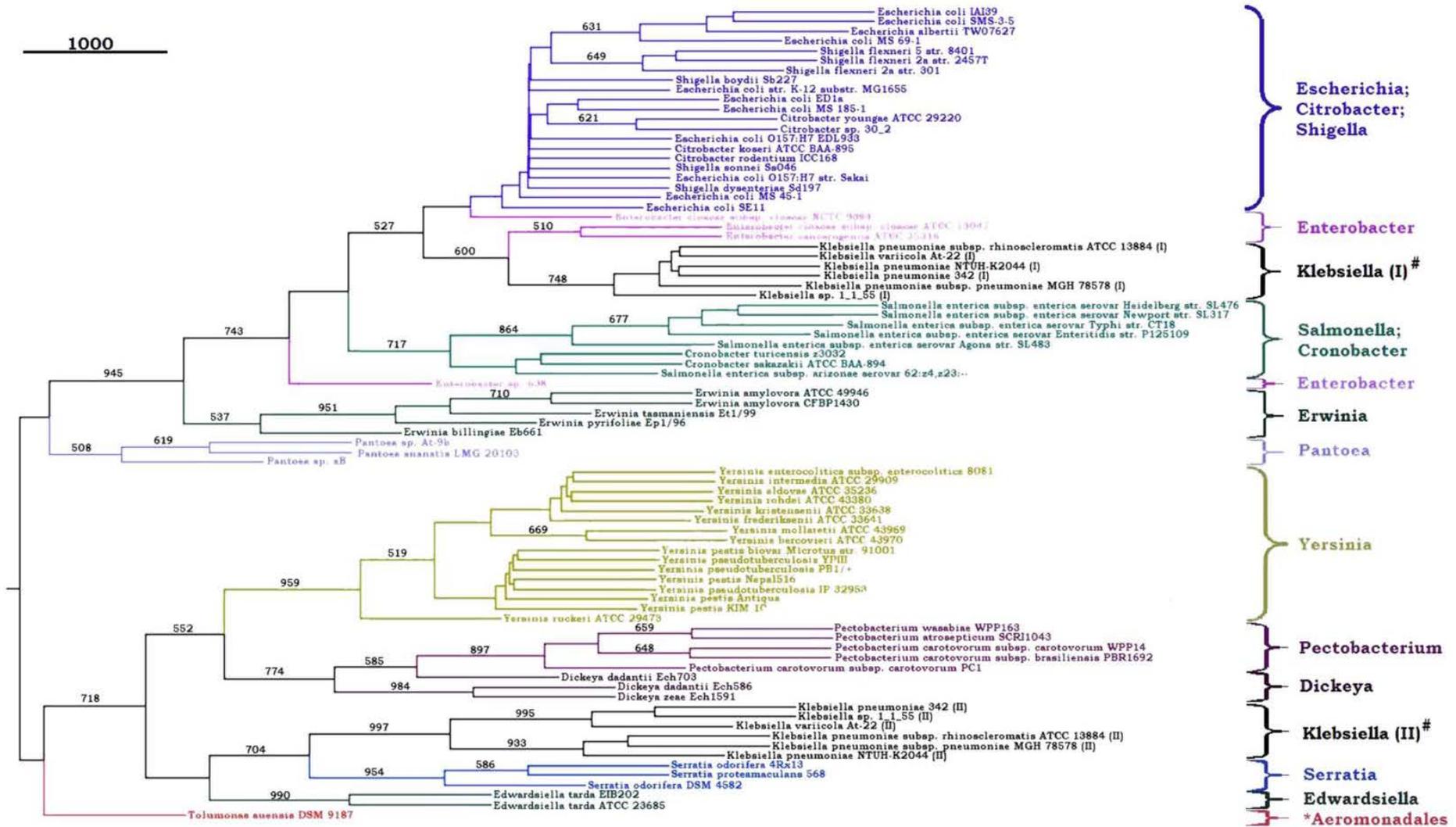


Abbildung 6.1: Erste phylogenetische Berechnung; *Enterobacteriales*

Zu sehen ist der Enterobacterialeszweig der ersten phylogenetischen Berechnung mit dem ungefilterten Datensatz von 326 Sequenzen. #: Die Spezies *Klebsiella* besitzt zwei Parvulinkopien. Diese Paralogen können leicht identifiziert und aussortiert werden. *: An die Basis der Enterobacteriales gerutschte Spezies der *Aeromonadales* (nur 100 Stellen zur Berechnung). MLP-Baum mit 1000 bootstraps. Topologie ausreichend definiert.

Anhang

Abbildung 6.2: ¹⁵N-HSQC-NOESY

```
; Ehnhsqcnoe
; msnoehsqcf3
; no 13C decoupling / pulses !!
; add 45 degree on ph1 to get optimum raditaion
damping !?

;$OWNER=nmrsv
#include <Grad.incl>
#include <Avance.incl>

"p2=p1*2"
"p6=p5*2"

"d4=2.6m" ; 1/4J
"d14=d4+p6"
"d27=p16+d16+20u"
"d8=p1"
"d9=p5"
"d17=6u+p2+d16"
"d0=3u+in0/2"
"d29=6u+p6"
;d10=3u+in10/2
"d10=3u"

aqseq 312

1 ze
2 d1 do:f3
  10m
3 30m
4 15m
5 20m
6 20u pl1:f1 pl3:f3
  (p1 ph1:r):f1 ; PHCOR1=45
  d10 ; t1/2 (1H)
  (p6 ph0):f3
  d10 ; t1/2 (1H)
  (p2 ph0):f1
  d29
  (p1 ph3):f1
  d25 ; NOE mixing time
  100u UNBLKGRAD
  p16:gp1
  d16
  (p1 ph4):f1
  d4
  (p6 ph0):f3
  (p2 ph0)
  d14
  (p1 ph5):f1
  3u
  (p27:sp11 ph27:r):f1 ; H2O sel. sinc1.1000 , 1.0m
  3u
  p16:gp2
  d16 pl1:f1
  (p5 ph6):f3
  d0
  (p2 ph0):f1
  d0
  p16:gp3*EA
  d16
  (p6 ph0):f3
  p16:gp3*EA*1
  d17
  (p5 ph7):f3
  d8 ;=p1
  (p1 ph11):f1
  d4
  (p6 ph0):f3
  (p2 ph0):f1
  d4
  (p5 ph16):f3
  d9 ;=p5
```

```
(p1 ph12):f1
d4
(p6 ph0):f3
(p2 ph0):f1
d14
(p1 ph0):f1
d27
(p2 ph0):f1
  p16:gp4
  d16 pl13:f3
  20u BLKGRAD
  go=2 ph31 cpd3:f3
  d1 do:f3 wr #0 if #0 zd
  5m ip16
  5m ip16 igrad EA
  lo to 3 times 2 ; E/AE 15N
  10m id0
  5m ip6
  5m ip6
  5m ip31
  5m ip31
  lo to 4 times 10 ; 15N
  10m rd0
  5m ip1
  lo to 5 times 2
  10m id10
  lo to 6 times 110 ; 1H
exit

ph0=0
ph1=0 2
ph2=0
ph3=0
ph4=0
ph5=1
ph12=1
ph6=0 0 0 2 2 2 2
ph7=0 0 2 2
ph16=1 1 3 3
ph8=1
ph11=0
ph27=2 ; 2 for 90 deg wfb pulse
ph31=0 2 2 0 2 0 2

;d25 NOE mixing time
;p16 600u gradient duration
;d16 200u gradient recovery
;gpz1 40
;gpz2 70
;gpz3 50
;gpz4 10.1
;gpnam1 SINE.100
;gpnam2 SINE.100
;gpnam3 SINE.100
;gpnam4 SINE.100
;spnam11 Sinc1.1000 wfb 90 deg
;p27 1m wfb 90deg
```

Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

- Anfinsen, C. B. (1973): Principles that Govern the Folding of Protein Chains. In: *Science* 181 (4096), S. 223–230.
- Antonoaea, Raluca; Fürst, Michaela; Nishiyama, Ken-ichi; Müller, Matthias (2008): The Periplasmic Chaperone PpiD Interacts with Secretory Proteins Exiting from the SecYEG Translocon †. In: *Biochemistry* 47 (20), S. 5649–5656.
- Bailey, Melanie L.; Shilton, Brian H.; Brandl, Christopher J.; Litchfield, David W. (2008): The dual histidine motif in the active site of Pin1 has a structural rather than catalytic role. In: *Biochemistry* 47 (44), S. 11481–11489.
- Baker, Brett J.; Tyson, Gene W.; Webb, Richard I.; Flanagan, Judith; Hugenholtz, Philip; Allen, Eric E.; Banfield, Jillian F. (2006): Lineages of acidophilic archaea revealed by community genomic analysis. In: *Science* 314 (5807), S. 1933–1935.
- Bao, Lere; Kimzey, Amy; Sauter, Guido; Sowadski, Janusz M.; Lu, Kun Ping; Wang, Da-Gong (2004): Prevalent overexpression of prolyl isomerase Pin1 in human cancers. In: *Am. J. Pathol* 164 (5), S. 1727–1737.
- Barlow, Miriam: What Antimicrobial Resistance Has Taught Us About Horizontal Gene Transfer, S. 397–411.
- Barns, S. M.; Delwiche, C. F.; Palmer, J. D.; Pace, N. R. (1996): Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93 (17), S. 9188–9193.
- Barns, S. M.; Fundyga, R. E.; Jeffries, M. W.; Pace, N. R. (1994): Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91 (5), S. 1609–1613.
- Bayer, Elena; Goettsch, Sandra; Mueller, Jonathan W.; Griewel, Bernhard; Guiberman, Elena; Mayr, Lorenz M.; Bayer, Peter (2003): Structural analysis of the mitotic regulator hPin1 in solution: insights into domain architecture and substrate binding. In: *J. Biol. Chem* 278 (28), S. 26183–26193.
- Behrens, S.; Maier, R.; Cock, H. de; Schmid, F. X.; Gross, C. A. (2001): The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity. In: *EMBO J* 20 (1-2), S. 285–294.
- Behrsin, C. D.; Bailey, M. L.; Bateman, K. S.; Hamilton, K. S.; Wahl, L. M.; Brandl, C. J. et al. (2007): Functionally important residues in the peptidyl-prolyl isomerase Pin1 revealed by unigenic evolution. In: *J. Mol. Biol* 365 (4), S. 1143–1162.
- Bijlmakers, Marie-José; Marsh, Mark (2003): The on-off story of protein palmitoylation. In: *Trends Cell Biol* 13 (1), S. 32–42.
- Bitto, Eduard; McKay, David B. (2002): Crystallographic structure of SurA, a molecular chaperone that facilitates folding of outer membrane porins. In: *Structure* 10 (11), S. 1489–1498.
- Bitto, Eduard; McKay, David B. (2003): The periplasmic molecular chaperone protein SurA binds a peptide motif that is characteristic of integral outer membrane proteins. In: *J. Biol. Chem* 278 (49), S. 49316–49322.
- Blainey, Paul C.; Mosier, Annika C.; Potanina, Anastasia; Francis, Christopher A.; Quake, Stephen R. (2011): Genome of a low-salinity ammonia-oxidizing archaeon determined by single-cell and metagenomic analysis. In: *PLoS ONE* 6 (2), S. e16626.
- Breiman, Leo (2001): Using iterated bagging to debias regressions. Random Forests. Hg. v. Mach. Learn. 45, zuletzt aktualisiert am 05.03.2012, zuletzt geprüft am 05.03.2012.
- Brenkman, Arjan B.; Keizer, Peter L. J. de; van den Broek, Niels J. F.; van der Groep, Petra; van Diest, Paul J.; van der Horst, Armando et al. (2008): The peptidyl-isomerase Pin1 regulates p27kip1 expression through inhibition of Forkhead box O tumor suppressors. In: *Cancer Res* 68 (18), S. 7597–7605.
- Brochier-Armanet, Céline; Boussau, Bastien; Gribaldo, Simonetta; Forterre, Patrick (2008): Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. In: *Nat. Rev. Microbiol* 6 (3), S. 245–252.
- Buée, L.; Bussièrre, T.; Buée-Scherrer, V.; Delacourte, A.; Hof, P. R. (2000): Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. In: *Brain Res. Brain Res. Rev* 33 (1), S. 95–130.

Literaturverzeichnis

- Cavanagh, John; Rance, Mark (1990): Sensitivity improvement in isotropic mixing (TOCSY) experiments. In: *Journal of Magnetic Resonance (1969)* (Volume 88, Issue 1, 1 June 1990,), S. 72–85.
- Ciccarelli, Francesca D.; Doerks, Tobias; Mering, Christian von; Creevey, Christopher J.; Snel, Berend; Bork, Peer (2006): Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. In: *Science* 311 (5765), S. 1283–1287.
- Clantin, Bernard; Leyrat, Cédric; Wohlkönig, Alex; Hodak, Hélène; Ribeiro, Euripedes Almeida de; Martinez, Nicolas et al. (2010): Structure and plasticity of the peptidyl-prolyl isomerase Par27 of *Bordetella pertussis* revealed by X-ray diffraction and small-angle X-ray scattering. In: *J. Struct. Biol* 169 (3), S. 253–265.
- CLEMEDSON, C. J.; HULTMAN, H. I.; SORBO, B. (1954): The antidote effect of some sulfur compounds and rhodanese in experimental cyanide poisoning. In: *Acta Physiol. Scand* 32 (2-3), S. 245–251.
- Clubb, R. T.; Thanabal, V.; Fejzo, J.; Ferguson, S. B.; Zydowsky, L.; Baker, C. H. et al. (1993): Secondary structure and backbone resonance assignments of the periplasmic cyclophilin type peptidyl-prolyl isomerase from *Escherichia coli*. In: *Biochemistry* 32 (25), S. 6391–6401.
- Cordingley, M. G.; Callahan, P. L.; Sardana, V. V.; Garsky, V. M.; Colonno, R. J. (1990): Substrate requirements of human rhinovirus 3C protease for peptide cleavage in vitro. In: *J. Biol. Chem* 265 (16), S. 9062–9065.
- Cox, Cymon J.; Foster, Peter G.; Hirt, Robert P.; Harris, Simon R.; Embley, T. Martin (2008): The archaeobacterial origin of eukaryotes. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105 (51), S. 20356–20361.
- Dartigalongue, Claire; Raina, Satish (1998): A new heat-shock gene, *ppiD*, encodes a peptidyl-prolyl isomerase required for folding of outer membrane proteins in *Escherichia coli*. In: *EMBO J* 17 (14), S. 3968–3980.
- DeLong, E. F.; Wu, K. Y.; Prézélin, B. B.; Jovine, R. V. (1994): High abundance of Archaea in Antarctic marine picoplankton. In: *Nature* 371 (6499), S. 695–697.
- Derome, Andrew E.; Williamson, Michael P. (1990): Rapid-pulsing artifacts in double-quantum-filtered COSY. In: *Journal of Magnetic Resonance (1969)* (Volume 88, Issue 1), S. 177–185.
- Devasahayam, Gina; Chaturvedi, Vishnu; Hanes, Steven D. (2002): The *Ess1* prolyl isomerase is required for growth and morphogenetic switching in *Candida albicans*. In: *Genetics* 160 (1), S. 37–48.
- Dick, Gregory J.; Andersson, Anders F.; Baker, Brett J.; Simmons, Sheri L.; Thomas, Brian C.; Yelton, A. Pepper; Banfield, Jillian F. (2009): Community-wide analysis of microbial genome sequence signatures. In: *Genome Biol* 10 (8), S. R85.
- Dixon, R.; Kennedy, C.; Kondorosi, A.; Krishnapillai, V.; Merrick, M. (1977): Complementation analysis of *Klebsiella pneumoniae* mutants defective in nitrogen fixation. In: *Mol. Gen. Genet* 157 (2), S. 189–198.
- Drouault, S.; Anba, J.; Bonneau, S.; Bolotin, A.; Ehrlich, S. D.; Renault, P. (2002): The Peptidyl-Prolyl Isomerase Motif Is Lacking in *PmpA*, the PrsA-Like Protein Involved in the Secretion Machinery of *Lactococcus lactis*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 68 (8), S. 3932–3942.
- Eisenstark, A.; Miller, C.; Jones, J.; Levén, S. (1992): *Escherichia coli* genes involved in cell survival during dormancy: role of oxidative stress. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun* 188 (3), S. 1054–1059.
- Elkins, James G.; Podar, Mircea; Graham, David E.; Makarova, Kira S.; Wolf, Yuri; Randau, Lennart et al. (2008): A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105 (23), S. 8102–8107.
- Ellis, J. (1987): Proteins as molecular chaperones. In: *Nature* 328 (6129), S. 378–379.
- Erben, Esteban D.; Valguarnera, Ezequiel; Nardelli, Sheila; Chung, Janete; Daum, Sebastian; Potenza, Mariana et al. (2010): Identification of an atypical peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from trypanosomatids. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1803 (9), S. 1028–1037.
- Fanghänel, Jörg; Fischer, Gunter (2004): Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. In: *Front. Biosci* 9, S. 3453–3478.
- Fardini, Yann; Trotureau, Jérôme; Bottreau, Elisabeth; Souchard, Charlene; Velge, Philippe; Virlogeux-Payant, Isabelle (2009): Investigation of the role of the BAM complex and SurA chaperone in outer-membrane protein biogenesis and type III secretion system expression in *Salmonella*. In: *Microbiology (Reading, Engl.)* 155 (Pt 5), S. 1613–1622.
- Fischer, G.; Bang, H. (1985): The refolding of urea-denatured ribonuclease A is catalyzed by peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. In: *Biochim. Biophys. Acta* 828 (1), S. 39–42.
- Fischer, G.; Bang, H.; Mech, C. (1984): Nachweis einer Enzymkatalyse für die cis-trans-Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden. In: *Biomed. Biochim. Acta* 43 (10), S. 1101–1111.

Literaturverzeichnis

- Fischer, G.; Wittmann-Liebold, B.; Lang, K.; Kiefhaber, T.; Schmid, F. X. (1989): Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. In: *Nature* 337 (6206), S. 476–478.
- Forterre, Patrick; Gribaldo, Simonetta; Brochier-Armanet, Céline (2009): Happy together: genomic insights into the unique Nanoarchaeum/Ignicoccus association. In: *J. Biol* 8 (1), S. 7.
- Freeman, V. J. (1951): Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*. In: *J. Bacteriol* 61 (6), S. 675–688.
- Fuhrman, J. A.; McCallum, K.; Davis, A. A. (1992): Novel major archaeobacterial group from marine plankton. In: *Nature* 356 (6365), S. 148–149.
- Fujiyama, Sally; Yanagida, Mitsuaki; Hayano, Toshiya; Miura, Yutaka; Isobe, Toshiaki; Fujimori, Fumihiro et al. (2002): Isolation and proteomic characterization of human Parvulin-associating preribosomal ribonucleoprotein complexes. In: *J. Biol. Chem* 277 (26), S. 23773–23780.
- Fujiyama-Nakamura, Sally; Yoshikawa, Harunori; Homma, Keiichi; Hayano, Toshiya; Tsujimura-Takahashi, Teruko; Izumikawa, Keiichi et al. (2009): Parvulin (Par14), a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, is a novel rRNA processing factor that evolved in the metazoan lineage. In: *Mol. Cell Proteomics* 8 (7), S. 1552–1565.
- Gamow, G.; Ycas, M. (1955): Statistical correlation of protein and ribonucleic acid composition. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 41 (12), S. 1011–1019.
- Gasteiger, Elisabeth; Gattiker, Alexandre; Hoogland, Christine; Ivanyi, Ivan; Appel, Ron D.; Bairoch, Amos (2003): ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. In: *Nucleic Acids Res* 31 (13), S. 3784–3788.
- Gavini, N.; Tungtur, S.; Pulakat, L. (2006): Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerase-Independent Functional NifH Mutant of *Azotobacter vinelandii*. In: *Journal of Bacteriology* 188 (16), S. 6020–6025.
- Giuseppe, Priscila O.; Atzingen, Marina von; Nascimento, Ana Lúcia T. O.; Zanchin, Nilson I. T.; Guimarães, Beatriz G. (2011): The crystal structure of the leptospiral hypothetical protein LIC12922 reveals homology with the periplasmic chaperone SurA. In: *J. Struct. Biol* 173 (2), S. 312–322.
- Grant, Barry J.; Rodrigues, Ana P. C.; ElSawy, Karim M.; McCammon, J. Andrew; Caves, Leo S. D. (2006): Bio3d: an R package for the comparative analysis of protein structures. In: *Bioinformatics* 22 (21), S. 2695–2696.
- Grathwohl, Christoph; Wüthrich, Kurt (1976): The X-Pro peptide bond as an nmr probe for conformational studies of flexible linear peptides. In: *Biopolymers* 15 (10), S. 2025–2041.
- Greer, E. L.; Brunet, A. (2008): FOXO transcription factors in ageing and cancer. In: *Acta Physiol (Oxf)* 192 (1), S. 19–28.
- Grzesiek, Stephan; Bax, Ad (1992): An efficient experiment for sequential backbone assignment of medium-sized isotopically enriched proteins. In: *Journal of Magnetic Resonance (1969)* (Volume 99, Issue 1), S. 201–207.
- Göthel, S. F.; Marahiel, M. A. (1999): Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. In: *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 55 (3), S. 423–436.
- Guindon, Stéphane; Lethiec, Franck; Duroux, Patrice; Gascuel, Olivier (2005): PHYML Online--a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. In: *Nucleic Acids Res* 33 (Web Server issue), S. W557–9.
- Güntert, Peter (2004): Automated NMR Structure Calculation With CYANA. In: *Methods in Molecular Biology* (278), S. 353–378.
- Guy, Lionel; Ettema, Thijs J. G. (2011): The archaeal 'TACK' superphylum and the origin of eukaryotes. In: *Trends Microbiol* 19 (12), S. 580–587.
- Hallam, S. J.; Konstantinidis, K. T.; Putnam, N.; Schleper, C.; Watanabe, Y.-i; Sugahara, J. et al. (2006): Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (48), S. 18296–18301.
- Handschumacher, R. E.; Harding, M. W.; Rice, J.; Drugge, R. J.; Speicher, D. W. (1984): Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. In: *Science* 226 (4674), S. 544–547.
- Hani, J.; Schelbert, B.; Bernhardt, A.; Domdey, H.; Fischer, G.; Wiebauer, K.; Rahfeld, J. U. (1999): Mutations in a peptidylprolyl-cis/trans-isomerase gene lead to a defect in 3'-end formation of a pre-mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *J. Biol. Chem* 274 (1), S. 108–116.
- Hani, J.; Stumpf, G.; Domdey, H. (1995): PTF1 encodes an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae*, which shows strong homology with a new putative family of PPIases. In: *FEBS Lett* 365 (2-3), S. 198–202.

Literaturverzeichnis

- Harding, M. W.; Galat, A.; Uehling, D. E.; Schreiber, S. L. (1989): A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. In: *Nature* 341 (6244), S. 758–760.
- He, Z. (2004): Immunophilins and Parvulins. Superfamily of Peptidyl Prolyl Isomerases in Arabidopsis. In: *PLANT PHYSIOLOGY* 134 (4), S. 1248–1267.
- Heikkinen, Outi; Seppala, Raili; Tossavainen, Helena; Heikkinen, Sami; Koskela, Harri; Permi, Perttu; Kilpeläinen, Ilkka (2009): Solution structure of the parvulin-type PPLase domain of Staphylococcus aureus PrsA – Implications for the catalytic mechanism of parvulins. In: *BMC Struct Biol* 9 (1), S. 17.
- Hodak, Hélène; Wohlk onig, Alexandre; Smet-Nocca, Caroline; Drobecq, Hervé; Wieruszeski, Jean-Michel; S en chal, Magalie et al. (2008): The peptidyl-prolyl isomerase and chaperone Par27 of Bordetella pertussis as the prototype for a new group of parvulins. In: *J. Mol. Biol* 376 (2), S. 414–426.
- Howard, K. S.; McLean, P. A.; Hansen, F. B.; Lemley, P. V.; Koblan, K. S.; Orme-Johnson, W. H. (1986): Klebsiella pneumoniae nifM gene product is required for stabilization and activation of nitrogenase iron protein in Escherichia coli. In: *J. Biol. Chem* 261 (2), S. 772–778.
- Huang, H. K.; Forsburg, S. L.; John, U. P.; O'Connell, M. J.; Hunter, T. (2001): Isolation and characterization of the Pin1/Ess1p homologue in Schizosaccharomyces pombe. In: *J. Cell. Sci.* 114 (Pt. 20), S. 3779–3788.
- Huber, Harald; Hohn, Michael J.; Rachel, Reinhard; Fuchs, Tanja; Wimmer, Verena C.; Stetter, Karl O. (2002): A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. In: *Nature* 417 (6884), S. 63–67.
- Hyyryl inen, H. L.; Bolhuis, A.; Darmon, E.; Muukkonen, L.; Koski, P.; Vitikainen, M. et al. (2001): A novel two-component regulatory system in Bacillus subtilis for the survival of severe secretion stress. In: *Mol. Microbiol* 41 (5), S. 1159–1172.
- Ikura, Mitsuhiko; Kay, Lewis E.; Bax, Ad (1991): Improved three-dimensional ¹H–¹³C–¹H correlation spectroscopy of a ¹³C-labeled protein using constant-time evolution. In: *J Biomol NMR* 1 (3), S. 299–304.
- Iqbal, Khalid; Liu, Fei; Gong, Cheng-Xin; Alonso, Alejandra Del C.; Grundke-Iqbal, Inge (2009): Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. In: *Acta Neuropathol* 118 (1), S. 53–69.
- Jacobs, M.; Andersen, J. B.; Kontinen, V.; Sarvas, M. (1993): Bacillus subtilis PrsA is required in vivo as an extracytoplasmic chaperone for secretion of active enzymes synthesized either with or without prosequences. In: *Mol Microbiol* 8 (5), S. 957–966.
- Jaremko, L.; Jaremko, M.; Elfaki, I.; Mueller, J. W.; Ejchart, A.; Bayer, P.; Zhukov, I. (2011): Structure and Dynamics of the First Archaeal Parvulin Reveal a New Functionally Important Loop in Parvulin-type Prolyl Isomerases. In: *Journal of Biological Chemistry* 286 (8), S. 6554–6565.
- John T. Edsall (1995): Hsien Wu and the First Theory of Protein Denaturation (1931). In: *Advances in Protein Chemistry* (46), S. 1–5. Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065323308603290>, zuletzt geprüft am 23.01.2012.
- Johnson, Mark; Zaretskaya, Irena; Raytselis, Yan; Merezhuk, Yuri; McGinnis, Scott; Madden, Thomas L. (2008): NCBI BLAST: a better web interface. In: *Nucleic Acids Res* 36 (Web Server issue), S. W5–9.
- Jorgensen, William L.; Gao, Jiali (1988): Cis-trans energy difference for the peptide bond in the gas phase and in aqueous solution. In: *J. Am. Chem. Soc.* 110 (13), S. 4212–4216.
- Justice, Sheryl S.; Hunstad, David A.; Harper, Jill Reiss; Duguay, Amy R.; Pinkner, Jerome S.; Bann, James et al. (2005): Periplasmic peptidyl prolyl cis-trans isomerases are not essential for viability, but SurA is required for pilus biogenesis in Escherichia coli. In: *J. Bacteriol* 187 (22), S. 7680–7686.
- Justice, Sheryl S.; Lauer, Scott R.; Hultgren, Scott J.; Hunstad, David A. (2006): Maturation of intracellular Escherichia coli communities requires SurA. In: *Infect. Immun* 74 (8), S. 4793–4800.
- Kabsch, W.; Sander, C. (1983): Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. In: *Biopolymers* 22 (12), S. 2577–2637.
- Kale, A.; Phansopa, C.; Suwannachart, C.; Craven, C. J.; Rafferty, J. B.; Kelly, D. J. (2011): The Virulence Factor PEB4 (Cj0596) and the Periplasmic Protein Cj1289 Are Two Structurally Related SurA-like Chaperones in the Human Pathogen Campylobacter jejuni. In: *Journal of Biological Chemistry* 286 (24), S. 21254–21265.
- Kawashima, Shuichi; Pokarowski, Piotr; Pokarowska, Maria; Kolinski, Andrzej; Katayama, Toshiaki; Kanehisa, Minoru (2008): AAindex: amino acid index database, progress report 2008. In: *Nucleic Acids Res* 36 (Database issue), S. D202–5.
- Kay, J. E. (1996): Structure-function relationships in the FK506-binding protein (FKBP) family of peptidylprolyl cis-trans isomerases. In: *Biochem. J* 314 (Pt 2), S. 361–385.

Literaturverzeichnis

- Ke, H. (1992): Similarities and differences between human cyclophilin A and other beta-barrel structures. Structural refinement at 1.63 Å resolution. In: *J. Mol. Biol.* 228 (2), S. 539–550.
- Kelly Kruger; Paula J. Grabowski; Arthur J. Zaugg; Julie Sands; Daniel E. Gottschling; Thomas R. Cech (1982): Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena. In: *Cell* 1982 (31), S. 147–157. Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867482904147>, zuletzt geprüft am 23.01.2012.
- Kenyon, William J.; Humphreys, Sue; Roberts, Mark; Spector, Michael P. (2010): Periplasmic peptidyl-prolyl isomerases SurA and FkpA play an important role in the starvation-stress response (SSR) of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. In: *Antonie Van Leeuwenhoek* 98 (1), S. 51–63.
- Kessler, Daniel; Papatheodorou, Panagiotis; Stratmann, Tina; Dian, Elke Andrea; Hartmann-Fatu, Cristina; Rassow, Joachim et al. (2007): The DNA binding parvulin Par17 is targeted to the mitochondrial matrix by a recently evolved prepeptide uniquely present in Hominidae. In: *BMC Biol* 5, S. 37.
- Kibbe, W. A. (2007a): OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. In: *Nucleic Acids Research* 35 (Web Server), S. W43.
- Kiefhaber, T.; Grunert, H. P.; Hahn, U.; Schmid, F. X. (1990): Replacement of a cis proline simplifies the mechanism of ribonuclease T1 folding. In: *Biochemistry* 29 (27), S. 6475–6480.
- Könneke, Martin; Bernhard, Anne E.; La Torre, José R. de; Walker, Christopher B.; Waterbury, John B.; Stahl, David A. (2005): Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. In: *Nature* 437 (7058), S. 543–546.
- Kontinen, V. P.; Saris, P.; Sarvas, M. (1991): A gene (prsA) of *Bacillus subtilis* involved in a novel, late stage of protein export. In: *Mol Microbiol* 5 (5), S. 1273–1283.
- Kops, O.; Eckerskorn, C.; Hottenrott, S.; Fischer, G.; Mi, H.; Tropschug, M. (1998): Ssp1, a site-specific parvulin homolog from *Neurospora crassa* active in protein folding. In: *J. Biol. Chem* 273 (48), S. 31971–31976.
- Kouri, E. D.; Labrou, N. E.; Garbis, S. D.; Kalliampakou, K. I.; Stedel, C.; Dimou, M. et al. (2009): Molecular and Biochemical Characterization of the Parvulin-Type PPlases in *Lotus japonicus*. In: *PLANT PHYSIOLOGY* 150 (3), S. 1160–1173.
- Krieger, Elmar; Koraimann, Günther; Vriend, Gert (2002): Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA—a self-parameterizing force field. In: *Proteins* 47 (3), S. 393–402.
- Kühlewein, Angelika; Voll, Georg; Hernandez Alvarez, Birte; Kessler, Horst; Fischer, Gunter; Rahfeld, Jens-Ulrich; Gemmecker, Gerd (2004): Solution structure of *Escherichia coli*. In: *Protein Sci.* 13 (9), S. 2378–2387.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.
- Lake, James A. (1988): Origin of the eukaryotic nucleus determined by rate-invariant analysis of rRNA sequences. In: *Nature* 331 (6152), S. 184–186.
- Landrieu, I. (2000): The *Arabidopsis thaliana* PIN1At Gene Encodes a Single-domain Phosphorylation-dependent Peptidyl Prolyl cis/trans Isomerase. In: *Journal of Biological Chemistry* 275 (14), S. 10577–10581.
- Landrieu, Isabelle; Wieruszeski, Jean-Michel; Wintjens, René; Inzé, Dirk; Lippens, Guy (2002): Solution structure of the single-domain prolyl cis/trans isomerase PIN1At from *Arabidopsis thaliana*. In: *J. Mol. Biol.* 320 (2), S. 321–332.
- Lang, K.; Schmid, F. X.; Fischer, G.: Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. In: *Nature* 329 (6136), S. 268–270.
- Laskey, R. A.; Honda, B. M.; Mills, A. D.; Finch, J. T. (1978): Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. In: *Nature* 275 (5679), S. 416–420.
- Lazar, S. W.; Kolter, R. (1996): SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins. In: *J. Bacteriol* 178 (6), S. 1770–1773.
- Lederer, Christoph; Heider, Dominik; van den Boom, Johannes; Hoffmann, Daniel; Mueller, Jonathan W.; Bayer, Peter (2011): Single-domain parvulins constitute a specific marker for recently proposed deep-branching archaeal subgroups. In: *Evol. Bioinform. Online* 7, S. 135–148.
- Lee, Tae Ho; Pastorino, Lucia; Lu, Kun Ping (2011): Peptidyl-prolyl cis–trans isomerase Pin1 in ageing, cancer and Alzheimer disease. In: *Expert Rev. Mol. Med.* 13.

Literaturverzeichnis

- Lee, Tae Ho; Tun-Kyi, Adrian; Shi, Rong; Lim, Jormay; Soohoo, Christina; Finn, Greg et al. (2009): Essential role of Pin1 in the regulation of TRF1 stability and telomere maintenance. In: *Nat. Cell Biol* 11 (1), S. 97–105.
- Levinthal, Cyrus (1969): How to Fold Graciously. In: *Mossbauer Spectroscopy in Biological Systems: Proceedings of a meeting held at Allerton House, Monticello, Illinois*, S. 22–24.
- Li, Zhong; Li, Hongmin; Devasahayam, Gina; Gemmill, Trent; Chaturvedi, Vishnu; Hanes, Steven D.; van Roey, Patrick (2005): The structure of the *Candida albicans* Ess1 prolyl isomerase reveals a well-ordered linker that restricts domain mobility. In: *Biochemistry* 44 (16), S. 6180–6189.
- Liou, Yih-Cherng; Ryo, Akihide; Huang, Han-Kuei; Lu, Pei-Jung; Bronson, Roderick; Fujimori, Fumihito et al. (2002): Loss of Pin1 function in the mouse causes phenotypes resembling cyclin D1-null phenotypes. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99 (3), S. 1335–1340.
- Liou, Yih-Cherng; Sun, Anyang; Ryo, Akihide; Zhou, Xiao Zhen; Yu, Zhao-Xue; Huang, Han-Kuei et al. (2003): Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration. In: *Nature* 424 (6948), S. 556–561.
- Lippens, G.; Landrieu, I.; Smet, C. (2007): Molecular mechanisms of the phospho-dependent prolyl cis/trans isomerase Pin1. In: *FEBS J* 274 (20), S. 5211–5222.
- Liu, J.; Chen, C. M.; Walsh, C. T. (1991): Human and *Escherichia coli* cyclophilins: sensitivity to inhibition by the immunosuppressant cyclosporin A correlates with a specific tryptophan residue. In: *Biochemistry* 30 (9), S. 2306–2310.
- López-Méndez, Blanca; Güntert, Peter (2006): Automated protein structure determination from NMR spectra. In: *J. Am. Chem. Soc* 128 (40), S. 13112–13122.
- Lorenz, M. G.; Wackernagel, W. (1994): Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. In: *Microbiol. Rev* 58 (3), S. 563–602.
- Lotharius, Julie; Brundin, Patrik (2002): Impaired dopamine storage resulting from alpha-synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease. In: *Hum. Mol. Genet* 11 (20), S. 2395–2407.
- Lu, K. P.; Hanes, S. D.; Hunter, T. (1996): A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. In: *Nature* 380 (6574), S. 544–547.
- Lutzker, S. G.; Levine, A. J. (1996): Apoptosis and cancer chemotherapy. In: *Cancer Treat. Res* 87, S. 345–356.
- Malešević, Miroslav; Poehlmann, Angela; Hernandez Alvarez, Birte; Diessner, André; Träger, Mario; Rahfeld, Jens-Ulrich et al. (2010): The Protein-Free IANUS Peptide Array Uncovers Interaction Sites between *Escherichia coli* Parvulin 10 and Alkyl Hydroperoxide Reductase. In: *Biochemistry* 49 (39), S. 8626–8635.
- Maleszka, R.; Hanes, S. D.; Hackett, R. L.; Couet, H. G. de; Miklos, G. L. (1996): The *Drosophila melanogaster* dodo (dod) gene, conserved in humans, is functionally interchangeable with the ESS1 cell division gene of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93 (1), S. 447–451.
- Marchler-Bauer, Aron; Lu, Shennan; Anderson, John B.; Chitsaz, Farideh; Derbyshire, Myra K.; DeWeese-Scott, Carol et al. (2011): CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. In: *Nucleic Acids Res* 39 (Database issue), S. D225–9.
- Marion, Dominique; Driscoll, Paul C.; Kay, Lewis E.; Wingfield, Paul T.; Bax, Ad; Gronenborn, Angela M.; Clore, G. Marius (1989): Overcoming the overlap problem in the assignment of proton NMR spectra of larger proteins by use of three-dimensional heteronuclear proton-nitrogen-15 Hartmann-Hahn-multiple quantum coherence and nuclear Overhauser-multiple quantum coherence spectroscopy: application to interleukin 1.β. In: *Biochemistry* 28 (15), S. 6150–6156.
- Marklund, B. I.; Tennent, J. M.; Garcia, E.; Hamers, A.; Båga, M.; Lindberg, F. et al. (1992): Horizontal gene transfer of the *Escherichia coli* pap and prs pili operons as a mechanism for the development of tissue-specific adhesive properties. In: *Mol. Microbiol* 6 (16), S. 2225–2242.
- Martin-Cuadrado, Ana-Belen; Rodriguez-Valera, Francisco; Moreira, David; Alba, José C.; Ivars-Martínez, Elena; Henn, Matthew R. et al. (2008): Hindsight in the relative abundance, metabolic potential and genome dynamics of uncultivated marine archaea from comparative metagenomic analyses of bathypelagic plankton of different oceanic regions. In: *ISME J* 2 (8), S. 865–886.
- Maruyama, T.; Furutani, M. (2000): Archaeal peptidyl prolyl cis-trans isomerases (PPIases). In: *Front. Biosci* 5, S. D821–36.
- Maruyama, Tadashi; Suzuki, Rintaro; Furutani, Masahiro (2004): Archaeal peptidyl prolyl cis-trans isomerases (PPIases) update 2004. In: *Front. Biosci* 9, S. 1680–1720.

Literaturverzeichnis

- Matern, Yvonne; Barion, Birgitta; Behrens-Kneip, Susanne (2010): PpiD is a player in the network of periplasmic chaperones in *Escherichia coli*. In: *BMC Microbiol* 10, S. 251.
- Merrick, M.; Filser, M.; Kennedy, C.; Dixon, R. (1978): Polarity of mutations induced by insertion of transposons Tn5, Tn7 and Tn10 into the *nif* gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. In: *Mol. Gen. Genet* 165 (1), S. 103–111.
- Metzner, M.; Stoller, G.; Rücknagel, K. P.; Lu, K. P.; Fischer, G.; Luckner, M.; Küllertz, G. (2001): Functional replacement of the essential ESS1 in yeast by the plant parvulin D1Par13. In: *J. Biol. Chem* 276 (17), S. 13524–13529.
- Michnick, S. W.; Rosen, M. K.; Wandless, T. J.; Karplus, M.; Schreiber, S. L. (1991): Solution structure of FKBP, a rotamase enzyme and receptor for FK506 and rapamycin. In: *Science* 252 (5007), S. 836–839.
- Mikol, V.; Kallen, J.; Walkinshaw, M.D (1996): X-Ray structure of a monomeric cyclophilin A-cyclosporin A crystal complex at 2.1 angströms resolution.
- Mirsky, A. E.; Pauling, L. (1936): On the Structure of Native, Denatured, and Coagulated Proteins. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 22 (7), S. 439–447.
- Missiakas, D.; Betton, J. M.; Raina, S. (1996): New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* SurA, FkpA and Skp/OmpH. In: *Mol. Microbiol* 21 (4), S. 871–884.
- Moore, J. M.; Peattie, D. A.; Fitzgibbon, M. J.; Thomson, J. A. (1991): Solution structure of the major binding protein for the immunosuppressant FK506. In: *Nature* 351 (6323), S. 248–250.
- Mücke, M.; Schmid, F. X. (1992): Enzymatic catalysis of prolyl isomerization in an unfolding protein. In: *Biochemistry* 31 (34), S. 7848–7854.
- Mueller, Jonathan W.; Bayer, Peter (2008): Small family with key contacts: par14 and par17 parvulin proteins, relatives of pin1, now emerge in biomedical research. In: *Perspect Medicin Chem* 2, S. 11–20.
- Mueller, Jonathan W.; Link, Nina M.; Matena, Anja; Hoppstock, Lukas; Rüppel, Alma; Bayer, Peter; Blankenfeldt, Wulf (2011): Crystallographic proof for an extended hydrogen-bonding network in small prolyl isomerases. In: *J. Am. Chem. Soc* 133 (50), S. 20096–20099.
- Mueller, Jonathan Wolf; Kessler, Daniel; Neumann, Daniel; Stratmann, Tina; Papatheodorou, Panagiotis; Hartmann-Fatu, Cristina; Bayer, Peter (2006): Characterization of novel elongated Parvulin isoforms that are ubiquitously expressed in human tissues and originate from alternative transcription initiation. In: *BMC Mol. Biol* 7, S. 9.
- Muhandiram, D.R; Kay, John E. (1994): Gradient-Enhanced Triple-Resonance Three-Dimensional NMR Experiments with Improved Sensitivity. In: *Journal of Magnetic Resonance, Series B* (Volume 103, Issue 3), S. 203–216.
- Narasimharao, Priya; Podell, Sheila; Ugalde, Juan A.; Brochier-Armanet, Céline; Emerson, Joanne B.; Brocks, Jochen J. et al. (2011): De novo metagenomic assembly reveals abundant novel major lineage of Archaea in hypersaline microbial communities. In: *ISME J* 6 (1), S. 81–93.
- Neumann, Daniel (2006): Strukturelle und biochemische Charakterisierung der humanen PAPS-Synthetase 2. Diplomarbeit. Ruhruniversität Bochum, Bochum. Strukturelle und Medizinische Biochemie.
- Notredame, C.; Higgins, D. G.; Heringa, J. (2000): T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. In: *J. Mol. Biol* 302 (1), S. 205–217.
- Nunoura, Takuro; Takaki, Yoshihiro; Kakuta, Jungo; Nishi, Shinro; Sugahara, Junichi; Kazama, Hiromi et al. (2011): Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. In: *Nucleic Acids Res* 39 (8), S. 3204–3223.
- Osmani, S. A.; Pu, R. T.; Morris, N. R. (1988): Mitotic induction and maintenance by overexpression of a G2-specific gene that encodes a potential protein kinase. In: *Cell* 53 (2), S. 237–244.
- Palmer III, Artur G.; Cavanagh, John; Wright, Peter E.; Rance, Mark (1991): Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy. In: *Journal of Magnetic Resonance* (1969) (Volume 93, Issue 1), S. 151–170.
- Paper, Walter; Jahn, Ulrike; Hohn, Michael J.; Kronner, Michaela; Näther, Daniela J.; Burghardt, Tillmann et al. (2007): *Ignicoccus hospitalis* sp. nov., the host of 'Nanoarchaeum equitans'. In: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 57 (Pt 4), S. 803–808.
- Pastorino, Lucia; Sun, Anyang; Lu, Pei-Jung; Zhou, Xiao Zhen; Balastik, Martin; Finn, Greg et al. (2006): The prolyl isomerase Pin1 regulates amyloid precursor protein processing and amyloid-beta production. In: *Nature* 440 (7083), S. 528–534.

Literaturverzeichnis

- Pemberton, Trevor J. (2006). In: *BMC Genomics* 7 (1), S. 244.
- Pemberton, Trevor J.; Kay, John E. (2005): Identification and comparative analysis of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase repertoires of *H. sapiens*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, *S. cerevisiae* and *Sz. pombe*. In: *Comp. Funct. Genomics* 6 (5-6), S. 277–300.
- Pester, Michael; Schleper, Christa; Wagner, Michael (2011): The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. In: *Curr. Opin. Microbiol* 14 (3), S. 300–306.
- Petrova, N.; Gigova, L.; Venkov, P. (2000): NifH and NifM proteins interact as demonstrated by the yeast two-hybrid system. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun* 270 (3), S. 863–867.
- Ping Lu, Kun; Hanes, Steven D.; Hunter, Tony (1996): A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. In: *Nature* 380 (6574), S. 544–547.
- Piotto, M.; Saudek, V.; Sklenár, V. (1992): Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. In: *J. Biomol. NMR* 2 (6), S. 661–665.
- Podar, Mircea; Anderson, Iain; Makarova, Kira S.; Elkins, James G.; Ivanova, Natalia; Wall, Mark A. et al. (2008): A genomic analysis of the archaeal system *Ignicoccus hospitalis*-*Nanoarchaeum equitans*. In: *Genome Biol* 9 (11), S. R158.
- Rahfeld, J. U.; Rücknagel, K. P.; Schelbert, B.; Ludwig, B.; Hacker, J.; Mann, K.; Fischer, G. (1994a): Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl cis/trans isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin. In: *FEBS Lett* 352 (2), S. 180–184.
- Rahfeld, J. U.; Schierhorn, A.; Mann, K.; Fischer, G. (1994b): A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Escherichia coli*. In: *FEBS Lett* 343 (1), S. 65–69.
- Rambaut, A. (2009): FigTree.
- Ranganathan, R. (1997): Structural and Functional Analysis of the Mitotic Rotamase Pin1 Suggests Substrate Recognition Is Phosphorylation Dependent. In: *Cell* 89 (6), S. 875–886.
- Reimer, Tatiana; Weiwad, Matthias; Schierhorn, Angelika; Ruecknagel, Peter-Karl; Rahfeld, Jens-Ulrich; Bayer, Peter; Fischer, Gunter (2003): Phosphorylation of the N-terminal domain regulates subcellular localization and DNA binding properties of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase hPar14. In: *J. Mol. Biol* 330 (5), S. 955–966.
- Ren, J.; Wen, L.; Gao, X.; Jin, C.; Xue, Y.; Yao, X. (2008): CSS-Palm 2.0: an updated software for palmitoylation sites prediction. In: *Protein Engineering Design and Selection* 21 (11), S. 639–644.
- Ren, Ping; Rossetini, Anne; Chaturvedi, Vishnu; Hanes, Steven D. (2005): The Ess1 prolyl isomerase is dispensable for growth but required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. In: *Microbiology (Reading, Engl.)* 151 (Pt 5), S. 1593–1605.
- Rouvière, P. E.; Gross, C. A. (1996): SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. In: *Genes Dev* 10 (24), S. 3170–3182.
- Rulten, S.; Thorpe, J.; Kay, J. (1999): Identification of eukaryotic parvulin homologues: a new subfamily of peptidylprolyl cis-trans isomerases. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun* 259 (3), S. 557–562.
- Ryo, A. (2006): Prolyl-isomerase Pin1 Accumulates in Lewy Bodies of Parkinson Disease and Facilitates Formation of γ -Synuclein Inclusions. In: *Journal of Biological Chemistry* 281 (7), S. 4117–4125.
- Ryo, A.; Nakamura, M.; Wulf, G.; Liou, Y. C.; Lu, K. P. (2001): Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta-catenin by inhibiting its interaction with APC. In: *Nat. Cell Biol* 3 (9), S. 793–801.
- Ryo, Akihide; Suizu, Futoshi; Yoshida, Yasuhiro; Perrem, Kilian; Liou, Yih-Cherng; Wulf, Gerburg et al. (2003): Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. In: *Mol. Cell* 12 (6), S. 1413–1426.
- Sanger, F.; Donelson, J. E.; Coulson, A. R.; Kössel, H.; Fischer, D. (1973): Use of DNA polymerase I primed by a synthetic oligonucleotide to determine a nucleotide sequence in phage ϕ 1 DNA. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 70 (4), S. 1209–1213.
- Sasaki, Takeshi; Ryo, Akihide; Uemura, Hiroji; Ishiguro, Hitoshi; Inayama, Yoshiaki; Yamanaka, Shoji et al. (2006): An immunohistochemical scoring system of prolyl isomerase Pin1 for predicting relapse of prostate carcinoma after radical prostatectomy. In: *Pathol. Res. Pract* 202 (5), S. 357–364.
- Sayers, Eric W.; Barrett, Tanya; Benson, Dennis A.; Bolton, Evan; Bryant, Stephen H.; Canese, Kathi et al. (2012): Database resources of the National Center for Biotechnology Information. In: *Nucleic Acids Res* 40 (Database issue), S. D13–25.
- Schägger, H.; Jagow, G. von (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. In: *Anal. Biochem* 166 (2), S. 368–379.

Literaturverzeichnis

- Schanda, Paul; Brutscher, Bernhard (2005): Very Fast Two-Dimensional NMR Spectroscopy for Real-Time Investigation of Dynamic Events in Proteins on the Time Scale of Seconds. In: *J. Am. Chem. Soc.* 127 (22), S. 8014–8015.
- Schleper, C.; DeLong, E. F.; Preston, C. M.; Feldman, R. A.; Wu, K. Y.; Swanson, R. V. (1998): Genomic analysis reveals chromosomal variation in natural populations of the uncultured psychrophilic archaeon *Cenarchaeum symbiosum*. In: *J. Bacteriol* 180 (19), S. 5003–5009.
- Schleucher, J.; Schwendinger, M.; Sattler, M.; Schmidt, P.; Schedletzky, O.; Glaser, S.J et al. (1994): A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients. In: *J Biomol NMR* 4 (2).
- Scholz, C.; Rahfeld, J.; Fischer, G.; Schmid, F. X. (1997): Catalysis of protein folding by parvulin. In: *J. Mol. Biol* 273 (3), S. 752–762.
- Schouten, S.; Hopmans, E. C.; Baas, M.; Boumann, H.; Standfest, S.; Konneke, M. et al. (2008): Intact Membrane Lipids of "Candidatus Nitrosopumilus maritimus," a Cultivated Representative of the Cosmopolitan Mesophilic Group I Crenarchaeota. In: *Applied and Environmental Microbiology* 74 (8), S. 2433–2440.
- Schreiber, S. L. (1991): Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. In: *Science* 251 (4991), S. 283–287.
- Sekerina, E.; Rahfeld, J. U.; Müller, J.; Fanghänel, J.; Rascher, C.; Fischer, G.; Bayer, P. (2000): NMR solution structure of hPar14 reveals similarity to the peptidyl prolyl cis/trans isomerase domain of the mitotic regulator hPin1 but indicates a different functionality of the protein. In: *J. Mol. Biol* 301 (4), S. 1003–1017.
- Sidney Altman; Madeline Baer; Cecilia Guerrier-Takada; Agustin Vioque (1986): Enzymatic cleavage of RNA by RNA. In: *Trends in Biochemical Sciences* (11), S. 515–518. Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0968000486900861>, zuletzt geprüft am 23.01.2012.
- Siekierka, J. J.; Hung, S. H.; Poe, M.; Lin, C. S.; Sigal, N. H. (1989): A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. In: *Nature* 341 (6244), S. 755–757.
- Spillantini, M. G.; Schmidt, M. L.; Lee, V. M.; Trojanowski, J. Q.; Jakes, R.; Goedert, M. (1997): Alpha-synuclein in Lewy bodies. In: *Nature* 388 (6645), S. 839–840.
- Spitzfaden, C.; Weber, H. P.; Braun, W.; Kallen, J.; Wider, G.; Widmer, H. et al. (1992): Cyclosporin A-cyclophilin complex formation. A model based on X-ray and NMR data. In: *FEBS Lett* 300 (3), S. 291–300.
- Stewart, D. E.; Sarkar, A.; Wampler, J. E. (1990): Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures. In: *J. Mol. Biol* 214 (1), S. 253–260.
- Stymest, Krista H.; Klappa, Peter (2008): The periplasmic peptidyl prolyl cis–trans isomerases PpiD and SurA have partially overlapping substrate specificities. In: *FEBS Journal* 275 (13), S. 3470–3479.
- Sultana, Rukhsana; Boyd-Kimball, Debra; Poon, H. Fai; Cai, Jain; Pierce, William M.; Klein, Jon B. et al. (2006): Oxidative modification and down-regulation of Pin1 in Alzheimer's disease hippocampus: A redox proteomics analysis. In: *Neurobiol. Aging* 27 (7), S. 918–925.
- Surmacz, Tatiana Anna; Bayer, Elena; Rahfeld, Jens Ulrich; Fischer, Gunter; Bayer, Peter (2002): The N-terminal basic domain of human parvulin hPar14 is responsible for the entry to the nucleus and high-affinity DNA-binding. In: *J. Mol. Biol* 321 (2), S. 235–247.
- Takahashi, N.; Hayano, T.; Suzuki, M. (1989): Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. In: *Nature* 337 (6206), S. 473–475.
- Takai, K.; Horikoshi, K. (1999): Genetic diversity of archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. In: *Genetics* 152 (4), S. 1285–1297.
- Terada, T.; Shirouzu, M.; Fukumori, Y.; Fujimori, F.; Ito, Y.; Kigawa, T. et al. (2001): Solution structure of the human parvulin-like peptidyl prolyl cis/trans isomerase, hPar14. In: *J. Mol. Biol* 305 (4), S. 917–926.
- Thiele, Alexandra; Krentzlin, Karolin; Erdmann, Frank; Rauh, David; Hause, Gerd; Zerweck, Johannes et al. (2011): Parvulin 17 promotes microtubule assembly by its peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity. In: *J. Mol. Biol* 411 (4), S. 896–909.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. In: *Nucleic Acids Res* 22 (22), S. 4673–4680.
- Tormo, A.; Almirón, M.; Kolter, R. (1990): surA, an *Escherichia coli* gene essential for survival in stationary phase. In: *J. Bacteriol* 172 (8), S. 4339–4347.

Literaturverzeichnis

- Tossavainen, Helena; Permi, Perttu; Purhonen, Susanna L.; Sarvas, Matti; Kilpeläinen, Ilkka; Seppala, Raili (2006): NMR solution structure and characterization of substrate binding site of the PPLase domain of PrsA protein from *Bacillus subtilis*. In: *FEBS Lett* 580 (7), S. 1822–1826.
- Uchida, T.; Fujimori, F.; Tradler, T.; Fischer, G.; Rahfeld, J. U. (1999): Identification and characterization of a 14 kDa human protein as a novel parvulin-like peptidyl prolyl cis/trans isomerase. In: *FEBS Lett* 446 (2-3), S. 278–282.
- Uchida, Takafumi; Takamiya, Mari; Takahashi, Morito; Miyashita, Hitoshi; Ikeda, Hisafumi; Terada, Toru et al. (2003): Pin1 and Par14 peptidyl prolyl isomerase inhibitors block cell proliferation. In: *Chem. Biol* 10 (1), S. 15–24.
- Ueda, T.; Suga, Y.; Matsugushi, T. (1995): Molecular phylogenetic analysis of a soil microbial community in a soybean field. In: *Eur J Soil Science* 46 (3), S. 415–421.
- Vallon, O. (2005): Chlamydomonas Immunophilins and Parvulins: Survey and Critical Assessment of Gene Models. In: *Eukaryotic Cell* 4 (2), S. 230–241.
- van Duyne, G. D.; Standaert, R. F.; Karplus, P. A.; Schreiber, S. L.; Clardy, J. (1991): Atomic structure of FKBP-FK506, an immunophilin-immunosuppressant complex. In: *Science* 252 (5007), S. 839–842.
- Vitikainen, M. (2004): Structure-Function Analysis of PrsA Reveals Roles for the Parvulin-like and Flanking N- and C-terminal Domains in Protein Folding and Secretion in *Bacillus subtilis*. In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (18), S. 19302–19314.
- Volokhina, Elena B.; Grijpstra, Jan; Stork, Michiel; Schilders, Ingrid; Tommassen, Jan; Bos, Martine P. (2011): Role of the periplasmic chaperones Skp, SurA, and DegQ in outer membrane protein biogenesis in *Neisseria meningitidis*. In: *J. Bacteriol* 193 (7), S. 1612–1621.
- Vranken, Wim F.; Boucher, Wayne; Stevens, Tim J.; Fogh, Rasmus H.; Pajon, Anne; Llinas, Miguel et al. (2005): The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. In: *Proteins* 59 (4), S. 687–696.
- Walker, C. B.; La Torre, J. R. de; Klotz, M. G.; Urakawa, H.; Pinel, N.; Arp, D. J. et al. (2010): *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (19), S. 8818–8823.
- Walker, P. A.; Leong, L. E.; Ng, P. W.; Tan, S. H.; Waller, S.; Murphy, D.; Porter, A. G. (1994): Efficient and rapid affinity purification of proteins using recombinant fusion proteases. In: *Biotechnology (N.Y.)* 12 (6), S. 601–605.
- Waters, Elizabeth; Hohn, Michael J.; Ahel, Ivan; Graham, David E.; Adams, Mark D.; Barnstead, Mary et al. (2003): The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100 (22), S. 12984–12988.
- Watson, J. D.; Crick, F. H. (1953): Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. In: *Nature* 171 (4356), S. 737–738.
- Webb, H. M.; Ruddock, L. W.; Marchant, R. J.; Jonas, K.; Klappa, P. (2001): Interaction of the periplasmic peptidylprolyl cis-trans isomerase SurA with model peptides. The N-terminal region of SurA is essential and sufficient for peptide binding. In: *J. Biol. Chem* 276 (49), S. 45622–45627.
- Weigel, D.; Jäckle, H. (1990): The fork head domain: a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors? In: *Cell* 63 (3), S. 455–456.
- Weininger, Ulrich; Jakob, Roman P.; Kovermann, Michael; Balbach, Jochen; Schmid, Franz X. (2009): The prolyl isomerase domain of PpiD from *Escherichia coli* shows a parvulin fold but is devoid of catalytic activity. In: *Protein Science*, S. NA.
- Wilcox, Cathy B.; Rossetini, Anne; Hanes, Steven D. (2004): Genetic interactions with C-terminal domain (CTD) kinases and the CTD of RNA Pol II suggest a role for ESS1 in transcription initiation and elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Genetics* 167 (1), S. 93–105.
- Wilson, K.P.; Sintchak, M.D.; Thomson, J.A.; Navia, M.A. (1995): ATOMIC STRUCTURE OF FKBP12-FK506, AN IMMUNOPHILIN IMMUNOSUPPRESSANT COMPLEX.
- Woese, C. R.; Fox, G. E. (1977): Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 74 (11), S. 5088–5090.
- Woese, C. R.; Kandler, O.; Wheelis, M. L. (1990): Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 87 (12), S. 4576–4579.

Literaturverzeichnis

- Wu, X.; Wilcox, C. B.; Devasahayam, G.; Hackett, R. L.; Arévalo-Rodríguez, M.; Cardenas, M. E. et al. (2000): The Ess1 prolyl isomerase is linked to chromatin remodeling complexes and the general transcription machinery. In: *EMBO J* 19 (14), S. 3727–3738.
- Wulf, Gerburg M.; Liou, Yih-Cherng; Ryo, Akihide; Lee, Sam W.; Lu, Kun Ping (2002): Role of Pin1 in the regulation of p53 stability and p21 transactivation, and cell cycle checkpoints in response to DNA damage. In: *J. Biol. Chem* 277 (50), S. 47976–47979.
- Yaffe, M. B.; Schutkowski, M.; Shen, M.; Zhou, X. Z.; Stukenberg, P. T.; Rahfeld, J. U. et al. (1997): Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. In: *Science* 278 (5345), S. 1957–1960.
- Yao, J. L.; Kops, O.; Lu, P. J.; Lu, K. P. (2001): Functional conservation of phosphorylation-specific prolyl isomerases in plants. In: *J. Biol. Chem* 276 (17), S. 13517–13523.
- Yooseph, Shibu; Sutton, Granger; Rusch, Douglas B.; Halpern, Aaron L.; Williamson, Shannon J.; Remington, Karin et al. (2007): The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: expanding the universe of protein families. In: *PLoS Biol* 5 (3), S. e16.
- Zuckerandl, E.; Pauling, L. (1965): Molecules as documents of evolutionary history. In: *J. Theor. Biol* 8 (2), S. 357–

Danksagung

Danksagung

An erster Stelle meiner Danksagung möchte ich Peter danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit thematisch so zu gestalten, wie ich es für das Beste hielt. Zudem hat er einen großen Anteil an meiner wissenschaftlichen, aber auch menschlichen Entwicklung der letzten Jahre. Danke dafür, Peter.

Ich möchte unserer Frau Matena ein riesiges Dankeschön dafür aussprechen, dass sie nicht nur eine Traumkollegin war, sondern mich jetzt als Vorgesetzte (-; durch ihre Korrekturarbeiten tatkräftig beim Erstellen dieser Dissertationsschrift unterstützt hat.

Jonathan möchte ich dafür danken, dass er in Stunden der Frustration, aber auch in Stunden des Frohsinns ein gleichgesinnter Teilnehmer teilweise sehr langer Gespräche war und nicht zuletzt dafür, dass er durch fördern und fordern entscheidend am Gelingen dieser Arbeit beteiligt war.

Dem Bayer-Team Gila, Alma, Mina, Cristina und Peter Binz danke ich für die herzliche Aufnahme in die Gruppe und für all die Unterstützung bei der täglichen Arbeit, aber auch bei alltäglichen Dingen des außerwissenschaftlichen Lebens.

Der lieben Tina möchte ich danken, dass sie mich aufgerüttelt hat, wenn ich demotiviert war, dass sie mich getröstet hat, wenn ich kurz vorm Aufgeben war, dass sie so unglaublich niedlich ist, wenn sie sich aufregt und nicht zuletzt, dass sie sich über offensichtlich nicht ernst gemeinte Gemeinheiten dennoch aufregt. Kurz: ich bin froh, eine Freundin wie dich gefunden zu haben, hab dich lieb.

Dem Bumms und der Julia möchte ich danken, dass sie die Arbeit Probe gelesen haben und dann natürlich für das letzte Jahr dieser Arbeit, in dem ich mich manchmal wieder jünger gefühlt habe, als ich bin. Ich hoffe wir bleiben noch lange in Kontakt und trinken das ein oder andere Bier in der ein oder anderen Tapas Bar zusammen.

Aus all den Menschen die mir in den letzten Jahren begegnet sind und die ich hier alle gar nicht aufzählen kann, die aber dennoch alle ihren Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich noch den ein oder anderen hervorheben.

Dem André danke ich für schöne Stunden im KKC und die neusten News im Rollenspielsektor. Dem Daniel danke ich für die unterschwelligste Kritik an speziellen Abläufen im Labor: „Ich mach das ja so und so, aber is eh alles egal, ich sitz nur gern hier rum...“. Dem Andrey danke ich für den sinnlosen Versuch, mit mir in ein Fitness-Studio zu gehen, der bezaubernden Raffaella für ihr süßes Lächeln.

Danksagung

Ich möchte auch meiner Familie danken, dass sie immer zu mir hält, auch wenn ich nicht immer da und schon gar nicht immer einfach bin. Danke Eva, dass du mich nimmst wie ich bin. Danke Mama, dass ich immer auf dich zählen kann und danke Jürgen, dass du mich auch in schwierigen Phasen unterstützt hast, obwohl du es nicht hättest müssen.

Zum Schluss möchte ich dem Menschen danken, ohne den ich nicht nur nicht in der Lage gewesen wäre, diese Arbeit zu schreiben, oder irgendetwas in meinem Leben auf die Reihe zu kriegen, sondern ohne den es auch gar keinen Sinn machen würde es zu versuchen. Ich liebe Dich, Schatz!

Der Lebenslauf ist in der
Online-Version aus
Gründen des
Datenschutzes nicht
enthalten

Eidesstattliche Erklärungen

Eidesstattliche Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Strukturelle und phylogenetische Analyse des Parvulins NmPin aus *Nitrosopumilus maritimus*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Christoph Lederer befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den 06.06.2012

Prof. Dr. Peter Bayer

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 06.06.2012

Christoph Lederer

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den 06.06.2012

Christoph Lederer
