

**Synthese sulfatierter Substratpeptide zur Validierung eines
CCR5-Inhibitors
und
Charakterisierung posttranslationaler Modifikationen des
N-Terminus von *hPar14* anhand semisynthetisch
hergestellter Proteine und modifizierter Peptide**

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

der Fakultät für Biologie an der Universität Duisburg-Essen
Campus Essen
vorgelegt von

André Matena
aus Oberhausen

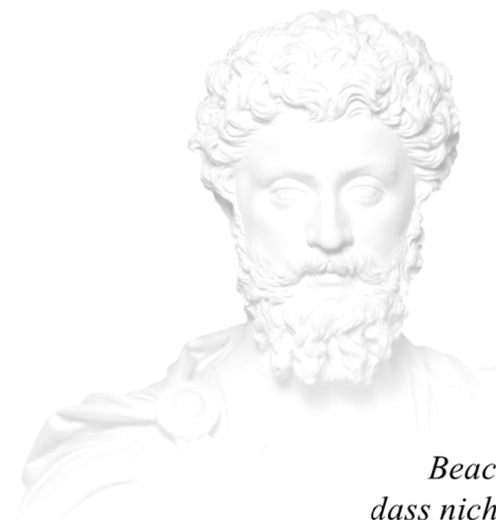
April 2014

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden in der Abteilung Strukturelle und Medizinische Biochemie am Zentrum für Medizinische Biotechnologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Bayer
2. Gutachter: Prof. Dr. Shirley Knauer
3. Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Markus Kaiser

Tag der mündlichen Prüfung: Montag, 02.06.2014



*Beachte stets,
dass nichts bleibt,
wie es ist und denke daran,
dass die Natur immer wieder ihre Formen wechselt.*

– Marcus Aurelius (121-180), röm. Kaiser

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X

1 Einleitung

1.1 Semisynthese	11
1.2 Posttranslationale Modifikationen (PTM)	13
1.2.1 Acetylierungen	13
1.2.2 Phosphorylierungen	14
1.2.3 Sulfatierungen	15
1.3 HIV und der CCR5-Rezeptor	15
1.4 Kernrezeptoren und Kernmigration von Proteinen	17
1.5 PPlasen	18
1.5.1 Eukaryotische Parvuline	20
1.6 Bromodomänen	21
1.8 Zielsetzung	23

2 Materialien & Methoden

2.1 Chemikalien	25
2.2 Pufferlösungen und Medien	26
2.3 Stamm- und Zelllinien	28
2.4 Enzyme	29
2.5 Baukastensysteme und Verbrauchsmaterialien	29
2.6 Geräte	30
2.7 Software	31
2.8 Gel-Marker	32
2.9 Verwendete Plasmide	33

2.10	Klonierung.....	33
2.10.1	Restriktion.....	35
2.10.2	Ligation.....	36
2.11	Einführen einer Punktmutation.....	36
2.12	Transformation kompetenter Zellen	36
2.13	Proteinexpression	37
2.14	Reinigung der hPar14-Cys34-Mutante	38
2.15	Reinigung der Bromodomänen	39
2.16	Quantifizierung von Proteinkonzentrationen	39
2.17	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	40
2.18	CD-Spektroskopie	41
2.19	Fluoreszenzanisotropie.....	41
2.20	Zellkultur und Fluoreszenzmikroskopie.....	42
2.20.1	Kultivierung von Zellen auf Kollagen I-beschichtete Deckgläschen	42
2.20.2	Transiente Transfektion von Plasmid-DNA.....	42
2.20.3	Direkte Mikroinjektion der ATTO488-Proteine ins Cytoplasma	42
2.20.4	Epifluoreszenzmikroskopie	42
2.20.5	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie.....	43
2.21	Festphasenpeptidsynthese (SPPS).....	43
2.21.1	Manuelle Synthese	44
2.21.2	Automatisierte Synthese	44
2.22	Semisynthese von hPar14-Varianten	46
2.23	LC-ESI-Massenspektrometrie (LC -MS)	48
2.24	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation und Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator (MALDI-TOF-MS)	48
2.25	Präparative Reversed Phase-Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	48
2.26	Gefriertrocknung (Lyophilisierung)	49

3 Ergebnisse

3.1	Chemische Synthese von CCR5-Peptiden.....	50
3.1.1	Darstellung von Peptiden zur Nutzung als Ligand für Affinitätschromatographie.....	51
3.1.2	Darstellung von Peptiden für Bindungsstudien mittels Fluoreszenzspektroskopie.....	55
3.1.2	Darstellung von Peptiden für Bindungsstudien mittels Fluoreszenzspektroskopie.....	56
3.1.3	Darstellung von Peptiden an säurelabilen Linkern.....	58
3.2	Semisynthese von hPar14	62
3.2.1	Chemische Synthese des ρ Ser19- und Ala19-N-Terminus von hPar14.	63
3.2.2	Methylierung des sekundären Amins am Resin-Linker der N-Termini.	64
3.2.3	Klonierung der Cys34-Variante von hPar14.....	66
3.2.4	Expressionstest der Cys34-Mutante von hPar14.....	67
3.2.5	Reinigung der Cys34-Mutante von hPar14.....	68
3.2.6	Massenspektroskopische Untersuchung der Cys34-Mutante von hPar14	70
3.2.7	Native chemische Ligation der ρ Ser19- und Ala19-N-Termini mit rekombinantem Cys34-hPar14-C-Terminus	70
3.2.9	CD-Spektroskopie der semisynthetischen Varianten des hPar14-Proteins	72
3.2.9	Sekundärstrukturanalyse der semisynthetischen hPar14-Proteine.....	74
3.2.10	Weitere Peptide zur semisynthetischen Darstellung eines hPar14-N-Terminus	74
3.3	Fluoreszenzmikroskopie transienter und injizierter hPar14-Konstrukte	78
3.3.1	Mikroskopie transient transfizierter Proteine	79
3.3.2	Mikroskopie injizierter Proteine	82
3.4	Bindungsstudien zwischen hPar14-Peptiden und den Bromodomänen PCAF, GCN5, BRDT(1) und BRD4(2)	86
3.4.1	Synthese von Peptiden aus der N-terminalen Sequenz des hPar14	87
3.4.2	Expression und Reinigung der Bromodomänen	88
3.4.2	Titrationen der Bromodomänen PCAF, GCN5, BRDT(1) und BRD4(2) gegen 4 unterschiedlich modifizierte Peptide aus hPar14	90

4	Diskussion	
4.1	Chemisch synthetisierte sulfatierte Peptide	93
4.2	Die Verwendung von Wang-Resin als Trägermatrix von Affinitätsäulen	95
4.3	Vorzüge und Nachteile der Fluorophore Mant, ATTO 488 und Rhodamin B ..	98
4.3.1	Mant.....	98
4.3.2	ATTO 488.....	99
4.3.3	Rhodamin B.....	100
4.4	Peptidfragmente als Bausteine für die Semisynthese.....	101
4.5	Veränderung der räumlichen Struktur durch Phosphorylierung	102
4.6	Einfluss der Phosphorylierung von hPar14 auf seine Lokalisation.....	102
4.7	hPar14 und seine Lokalisation in subnuklearen Strukturen.....	107
4.8	Bromodomänen als mögliche Bindungspartner für acetyliertes hPar14.....	109
4.9	Ausblick.....	111
5	Zusammenfassung/ Abstract	113
6	Literaturverzeichnis	117
7	Anhang	126
	Danksagung	135
	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Erklärungen.....	138

Abkürzungsverzeichnis

A.U.	Arbitrary Units
Abb	Abbildung
Ac	Acetyl
bp	Basenpaar(e)
°C	Grad Celsius
C	Cystein, Kohlenstoff
CCR5	CC-Motiv-Chemokin Rezeptors 5
CD4	<i>cluster of differentiation</i>
CK2	Casein Kinase 2
Cl	Chlorid
CLSM	<i>confocal laser scanning microscopy</i>
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokin Rezeptors 4
Da	Dalton
DIEPA	N,N-Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESI	Elektrosprayionisation
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
G	Glycin, GTP
gp	Glykoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
HAT	Histonacetyltransferase
HBTU	2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluronium-Hexafluorophosphat
HDAC	Histondeacetylasen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin, Polyhistidin- <i>tag</i> (6xHistidin)
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
k	Kilo (1000)
LC-MS	<i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>
M	Methionin, mitochondriale Erkennungssequenz, molar
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i>)

Me	Methyl
μ	Mikro
MPPA	Mercaptophenylacetat
MRW	<i>mean residue weight</i>
N	Amino, Amin
Na	Natrium
NA	Numerische Apertur
NAT	N-terminale Acetyltransferase
NCL	native chemische Ligation
NLS	Kernlokalisierungssignal (<i>nuclear localisation signal</i>)
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
OAc	Acetonitril
OH	Alkohol, Ende eines Carboxy Terms
P	Prolin, Phosphor, Phospho-
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat
Par	Parvulin
PO ₄ H ₂	Phosphat
PPIase	Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase
PTM	posttranslationale Modifikation
RNA	Ribonukleinsäure
S	Schwefel
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SO ₄ H	Sulfat
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
SPPS	Festphasenpeptidsynthese (<i>solid phase peptide synthesis</i>)
SUMO	<i>Small Ubiquitin-related Modifier</i>
T	Threonin, Thymus
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TMS	Trimethylsilylgruppe
TPST	Tyrosylprotein-Sulfotransferasen
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
Vis	<i>Visible</i>

Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Die <i>Capture/Rearrangement</i> -Methode	12
Abb.2: Schematische Darstellung der nativen chemischen Ligation (NCL).....	13
Abb.3: Darstellung des Chemokinrezeptorproteins CCR5	16
Abb.4: (A) Darstellung des HIV Eintritts über den CCR5-Rezeptor. (B) Maraviroc.....	17
Abb.5: Darstellung eines Importin-Komplexes	18
Abb.6: Die drei Klassen der PPlasen.....	19
Abb.7: Sequenzielle Gegenüberstellung der opisthokonten Parvuline	21
Abb.8: Phylogenetischer Baum der Bromodomänenfamilien.	22
Abb.9: Marker	32
Abb.10: Vektorkarte des pET SUMO adapt.....	33
Abb.11: Schematische Darstellung der Reinigung des His-SUMO-Par14-Fusionsproteins.....	38
Abb.12: Schematische Darstellung der Fmoc-Peptidsynthese	45
Abb.13: Reaktionsschema Semisynthese.....	47
Abb.14: Testabspaltung bei 5 % TFA	52
Abb.15: Lewis-Struktur-Darstellung des Peptids IN _x YYTSA an einem Wang-Linker gekoppelt.	53
Abb.16: ESI-Massenspektrum des Peptids IN ₅ YYTSA-OH.....	54
Abb.17: Lewis-Struktur-Darstellung des Peptids Mant-IN _x YYTSA.....	56
Abb.18: ESI-Massenspektrum des Peptids Mant-IN ₅ YYTSA-OH	58
Abb.19: Sieber-Amid-Linker mit Fmoc-Schutzgruppe.....	59
Abb.20: Lewis-Struktur Darstellung des Peptids Mant-IN _x YYTSA-NH ₂	59
Abb.21: ESI-Massenspektrum des Peptids Mant-IN ₅ YYTSA-NH ₂	61
Abb.22: Grafische Darstellung der Semisynthese-Komponenten.....	62
Abb.23: Pseudoproline	64
Abb.24: Methylierungsreaktion des sekundären Amins.....	65
Abb.25: ESI-MS-Spektren der beiden chemisch synthetisierten N-Termini	65
Abb.26: Schematische Darstellung der Herstellung des hPar14-C-Terminus	66
Abb.27: Das Ergebnis der Kolonie-PCR des Cys34-hPar14 Konstrukts.	67
Abb.28: SDS-Gele	68
Abb.29: Teilausschnitt des Chromatogramms des Reinigungslaufs von Cys34-hPar14.	69
Abb.30: 15 % SDS-Gel der SUMO-Protease.....	69
Abb.31: Massenspektrum des gereinigten Cys34-hPar14 C-Terminus.....	70
Abb.32: Grafische Gegenüberstellung für die Semisynthese von hPar14 durch NCL.....	71
Abb.33: MALDI Spektren der semisynthetischen Proteine von hPar14	71
Abb.34: CD-Spektren der synthetisierten N-Termini pSer19 und Ala19	73
Abb.35: CD-Spektren der beiden semisynthetischen Proteine und des Wildtyps hPar14	73
Abb.36: Sekundärstrukturanteile	74
Abb.37: Darstellung Fmoc-geschützter Wang-Peptid-Bausteine.....	75
Abb.38: Darstellung der ESI-Massenspektren.....	77
Abb.39: Charakterisierung der Fragmentsynthese	77
Abb.40: Aufnahmen fixierter U-2 OS Zellen des transfizierten hPar14 _{WT} -EYFP	79
Abb.41: Aufnahmen fixierter U-2 OS Zellen des transfizierten Proteins hPar14 _{WT} -EYFP	80
Abb.42: Aufnahmen transfizierter Plasmid-DNA des Proteins EYFP.....	80
Abb.43: Statistische Gegenüberstellung der gemittelten Fluoreszenzsignalintensitäten	81
Abb.44: Aufnahmen von Protein ATTO 488-pSer19-hPar14	82

Abb.45: Aufnahmen von Protein ATTO488-Ala19-hPar14.....	83
Abb.46: Kontrollaufnahme des injizierten Fluorophors ATTO 488	84
Abb.47: Statistische Gegenüberstellung der gemittelten Fluoreszenzsignalintensitäten	84
Abb.48: Übersichtsdarstellung der Strukturoberfläche der vier Bromodomänen	86
Abb.49: Lewis-Struktur und Aminosäuresequenz der synthetisierten Peptide.....	87
Abb.50: ESI-MS-Spektrum der Verbindung Rhodamin B-GSGKacAGKacGGAA-OH	88
Abb.51: Chromatogramm des Reinigungslaufs der Bromodomäne PCAF	89
Abb.52: 15 % SDS-PAGE-Gel der Bromodomäne PCAF	89
Abb.53: Titrationskurven der Bromodomäne PCAF.....	91
Abb.54: MALDI Spektren von Testabspaltungen des Peptids IN ₅ YYTSA-OH.....	94
Abb.55: Die hypothetische Bildung eines Ringschlusses in dem Peptid NYYTSA.....	96
Abb.56: IRS-PTB im Komplex mit einem Phosphotyrosin enthaltenem Peptid	97
Abb.57: Fluoreszenzanisotropie-Studien	97
Abb.58: Der Fluoreszenzfarbstoff ATTO 488.....	100
Abb.59: Darstellung statistisch gemittelter Fluoreszenzsignalintensitäten.....	104
Abb.60: Darstellung eines möglichen Transportmechanismus von hPar14 in den Nukleus.	105
Abb.61: Aminosäuresequenz von EYFP.....	106
Abb.62: Aufnahmen von fixierten U-2 OS Zellen mit hPar14 _{WT} -EYFP	107
Abb.63: Aufnahmen subnuklearer Strukturen.....	108
Abb.64: Sequenzvergleich zwischen den N-Termini von H4 und hPar14.	109
Abb.65: RMSD der Protein-Fragmente aus hPar14 und geometrischen Strukturanaloga	110

Tabellenverzeichnis

Tab.1: Chemikalien und Lösungsmittel	25
Tab.2: Harze (Fmoc-Synthese)	25
Tab.3: Fluoreszenzfarbstoffe (Fmoc-Synthese).....	25
Tab.4: Aminosäurebausteine (Fmoc-Synthese)	25
Tab.5: Pufferlösungen und Medien.....	26
Tab.6: Stamm- und Zelllinien	28
Tab.7: Verwendete Enzyme	29
Tab. 8: Verwendete Baukastensysteme.....	29
Tab.9: Verbrauchsmaterialien.....	29
Tab.10: Geräteliste.....	30
Tab.11: Software	31
Tab.12: Verwendeter PCR-Ansatz zur Amplifizierung eines Inserts.....	34
Tab.13: PCR-Cycler-Programm zur Amplifizierung eines Inserts	35
Tab.14: Reaktionsansatz zum Verdau des PCR-Produktes (Insert) und des Vektors.....	35
Tab.15: Verwendete Restriktionsenzyme, ihre Erkennungssequenzen.....	35
Tab.16: Ligationsansatz	36
Tab.17: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für SDS-PAGE	40
Tab. 18: Laser und Anregungswellenlängen des Leica TCS SP5 Systems	43
Tab. 19: Heptapeptide für Affinitätschromatographie, die Massen entsprechen freiem Peptid....	55
Tab. 20: Mant-gelabelte Peptide für fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen.....	58
Tab. 21: Mant-gelabelte Peptide mit amidiertem C-Terminus	61
Tab. 22: Peptide zur Fragmentkopplung mit unterschiedlichen Modifikationen	76
Tab. 23: Fluoreszenzmikroskopisch untersuchte Proteine und Moleküle	78
Tab. 24: Fluoreszenzpeptide für Anisotropie-Messungen mit ihren theoretischen Massen.....	88
Tab. 25: K_D -Werte für die Bindung zwischen Peptid und der Bromodomäne PCAF	91
Tab. 26: K_D -Werte für die Bindung zwischen CCR5-Peptiden und IRS-Proteinen	98

1 Einleitung

1.1 Semisynthese

Die Semisynthese kann als Erweiterung der Festphasensynthese von Peptiden (SPPS) angesehen werden und bietet die Möglichkeit funktionelle Einheiten in Proteinen zu studieren. Durch die Festphasensynthese von Peptiden (SPPS) können bis zu 40 Aminosäuren aneinander gekuppelt werden, die anschließend weiter in einer Fragmentkupplung zu größeren Peptiden zusammengefügt werden können [1]. Während mit der SPPS lineare Strukturen kurzer Teilsequenzen aus Proteinen dargestellt werden, haben die aneinander gereihten Aminosäuren oft keine ausgeprägte Sekundär- oder Tertiärstruktur. Auf der anderen Seite kann mit der rekombinanten Proteinbiosynthese ein Protein hergestellt werden, das seine natürliche räumliche Struktur einnimmt. Allerdings sind funktionelle Einheiten, wie beispielsweise posttranslationale Modifikationen, die studiert werden möchten durch rekombinante Methoden oft so nicht darstellbar. Die Semisynthese bietet in diesem Fall eine Methode, mit der chemisch funktionelle und nativ strukturelle Einheiten gleichermaßen miteinander verknüpft werden können. So wurden in chemisch hergestellten Peptiden bereits funktionelle Gruppen von Interesse eingebaut, die dann durch Ligation mit einem nativ strukturierten Protein, verknüpft wurden. Hierzu wurden zahlreiche chemoselektive Ligations- und Modifikationstechniken entwickelt, die von Kimmerlin *et. al.* in einem Übersichtsartikel zusammengefasst wurden [2]. Während bei der Peptidsynthese noch Schutzgruppen für die Seitenketten der Aminosäuren verwendet werden, hat sich der Trend bei den Ligationsmethoden mittels ungeschützter Fragmentkupplung durchgesetzt [3][4][5]. Erste Experimente auf dem Feld wurden von Wieland und Bokelmann durchgeführt und gelten als Basis für das, was man heute allgemein als *Capture/Rearrangement*-Methode bezeichnet [6]. Diese Methode ist der klassische Hauptreaktionsschritt in der nativen chemischen Ligation (NCL) und aktuell die am häufigsten verwendete Kupplungsreaktion in der Semisynthese (Abb. 1). Diese Methode macht sich die Reaktivität eines natürlichen Cysteins am C-Terminus der Proteinfragmente zunutze. Wieland und Bokelmann hatten festgestellt das, dass Glycinthioester des Cysteamins, im Gegensatz zu Thiophenolthioestern, nicht als solche synthetisiert und unter neutralen pH Bedingungen isoliert werden können (Abb. 1) [6] [7]. Dies lag an der zusätzlichen Aminogruppe, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft zur Thiolgruppe befindet.

S→N-Verschiebung

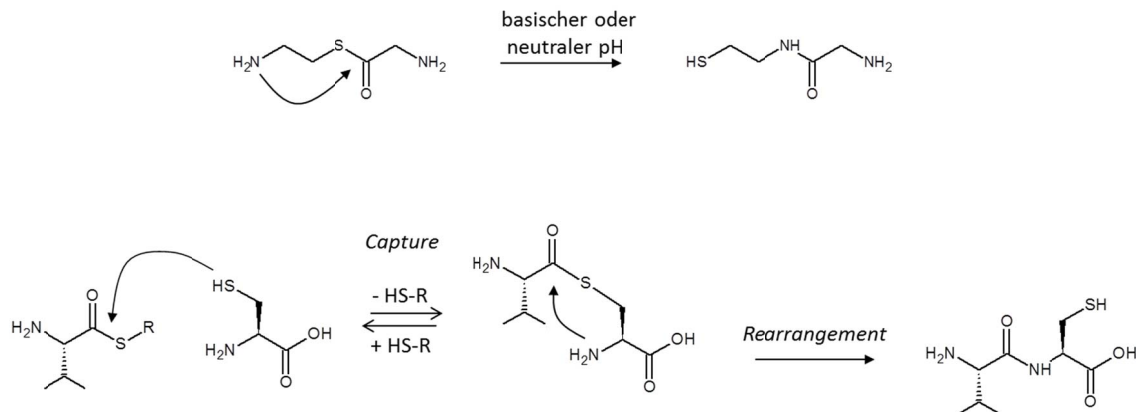


Abb.1: Die *Capture/Rearrangement*-Methode von Wieland *et al.*, aus dem Jahre 1953 ist die häufigste genutzte Synthese der nativen chemischen Ligation.

Hierbei bewirkt die zusätzliche Aminogruppe eine schnelle intramolekulare S→N-Verschiebung, die das Amid bildet. Diese Reaktion läuft bereits unter neutralen Bedingungen ab und geht mit steigendem pH-Wert noch schneller vonstatten. In Abb.1 ist ebenfalls zu sehen, wie diese Beobachtung auf einen Thiol-Thioester-Austausch übertragen und so durch die Synthese eines Val-Thiophenolthioesters mit Cystein umgesetzt wurde. Der nun entstandene Arylthioester tauscht sehr schnell mit der Schwefelgruppe des Cysteins aus (*Capture*) und lagert sich schließlich zu dem Dipeptid Valin-Cystein um (*Rearrangement*) [6]. Diese Methode verläuft chemoselektiv verläuft, ruft also keine Nebenreaktionen mit anderen Aminosäuren hervor [8]. Weiterhin werden keine zusätzlichen Cysteine in der Peptidkette an dieser Reaktion beteiligt [9], die S→N-Verschiebung findet also nur am N-terminalen Cystein statt.

Die NCL mit rekombinanten Proteinfragmenten ist vorteilhaft, da sie über ein natürliches, N-terminales Cystein vermittelt wird [10]. Hierbei werden die Zielproteine bereits auf genetischer Ebene mit einem *Reinigungstag* versehen, gefolgt von einer Schneidesequenz für eine spezifische Protease, die nach der Reinigung den Teil des Proteins bis zum N-terminal gelegenen Cystein entfernt (Abb. 2). Diese Art der Proteinbiosynthese wird häufig verwendet, wenn biophysikalische Sonden [11] oder chemisch modifizierte Aminosäuren [12] in ein Protein eingebaut werden sollen. Die Untersuchung schwer zugänglicher, biologischer Makromoleküle, wie beispielsweise Membranrezeptoren oder posttranslational modifizierter Proteine, kann so ermöglicht werden [13].

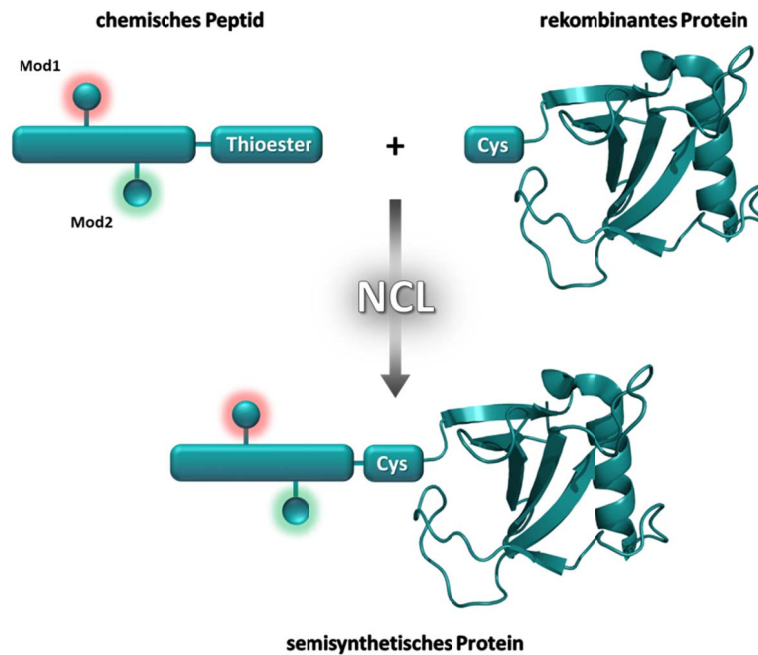


Abb.2: Schematische Darstellung der nativen chemischen Ligation (NCL). Die beiden Edukte, das chemische Peptid (oben links) und das rekombinante Protein (oben rechts), werden in einer Thiololyse-Reaktion, dirigiert durch eine S→N-Verschiebung über ein Cystein miteinander verknüpft.

1.2 Posttranslationale Modifikationen (PTM)

Kovalent eingebaute PTM sind die Grundlage für die Proteinkommunikation. Die Proteinmodifizierung spielt in vielen Stoffwechselwegen eine zentrale Rolle, so entscheiden beispielsweise Phosphorylierungen über die Aktivität oder den Ruhezustand eines Proteins. Dieser Einfluss ist bei den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gut erforscht, so weist ein phosphorylierter Rezeptor eine geringere Affinität zu G-Proteinen auf [14] [15]. Damit ist die Signaltransduktion über diesen Rezeptor unterbrochen. Neben den in den folgenden Abschnitten beschriebenen PTM, gibt es eine große Zahl an weiterer PTM. Dazu gehören beispielsweise die Biotinylierung [16], Sumoylierung [17], Ubiquitinierung [18] und Methylierung [19]. Auch das Zusammenspiel der PTM untereinander ist sehr komplex und noch weitestgehend unerforscht [20].

1.2.1 Acetylierungen

Neben der Seitenketten-Acetylierung gibt es eine N-terminale-Acetylierung, die allerdings nicht post-, sondern cotranslational an Proteinen vorgenommen wird. Die Enzyme, die diese Reaktionen katalysieren, werden N-terminale Acetyltransferasen (NATs) genannt und in sechs Klassen unterteilt [21]. Eine N-terminale Acetylierung hat Einfluss auf die Lokalisation eines Proteins, so kann es beispielsweise nicht in den Golgi-Apparat transportiert werden, wenn besagte N-terminale Acetylierung fehlt [22]. Auch die Beteiligung an apoptotischen Prozessen wird über die Acetylierung an N-Termini

gesteuert [23] [24]. Die NATs wurden in diesem Zusammenhang sowohl als Onco- wie auch Tumor-Suppressor-Proteine eingestuft, und als Indikatoren für eine Krebserkrankung herangezogen [25].

Die Seitenketten-Acetylierung findet nach heutigem Kenntnisstand ausschließlich an Lysinen statt und wurde bereits vor über dreißig Jahren entdeckt [26]. Bis 2009 wurden 3600 Lysinacetylierungen in 1750 Proteinen identifiziert [27]. Die Acetylgruppe wird von Acetyl-Coenzym A auf das ϵ -N-Atom des Lysins übertragen. Die regulatorischen Enzyme für den Prozess der Seitenketten-Acetylierung werden Histonacetyltransferasen (HATs), die für die Deacetylierung Histondeacetylasen (HDACs) genannt. Unberücksichtigt von ihrer historischen Namensgebung modifizieren sie ebenfalls Nicht-Histon-Proteine [28]. Acetylierungen dieser Art finden sich in der Regulation von Transkriptionsfaktoren, Effektor-Proteinen, Chaperonen und Cytoskelett-Proteinen wieder und haben hier eine ebenso wichtige Bedeutung wie die im Folgenden beschriebene Phosphorylierung [29]. Eine Kreuzbeziehung zwischen Acetylierung und Phosphorylierung wird ebenso häufig angenommen wie eine Interaktion mit anderen posttranslationalen Modifikationen, die an der dynamischen Signaltransduktion beteiligt sind [30].

1.2.2 Phosphorylierungen

Auf dem Stand vom Jahre 2013 existieren ca. 20.000 Proteine mit etwa 200.000 Phosphorylierungsstellen in menschlichen Zellen. Die Phosphorylierung ist eine Modifikation, die über den Aktivitätszustand eines Proteins entscheidet [31]. Durch diese Modifikation werden Proteine, die oft auch eine katalytische Funktion besitzen, posttranslational an- oder abgeschaltet. Da mit der Phosphatgruppe eine negative Ladung eingeführt wird, hat dies meist Konformationsänderungen innerhalb der phosphorylierten Proteine zur Folge [32]. Rezeptoren oder Transportproteine reagieren dementsprechend unterschiedlich auf die modifizierte Form eines Bindungspartners. Dadurch werden ganze metabolische Abläufe über Phosphorylierungen reguliert [33], weshalb ihnen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion zugesprochen wird. Phosphorylierungen sind an vitalen Zellfunktionen beteiligt, da sie dort bei der Regulation von Zellteilung, Apoptose, Wachstum und Translation sowie Lymphozyten-Aktivierung und der Muskelkontraktion auftreten [34]. Enzymatisch werden Proteine durch Proteinkinasen phosphoryliert [35]. Defekte dieser Enzyme spielen bei der Krebsentstehung eine Rolle, weshalb sie pharmakologisch von großer Bedeutung sind [36]. Phosphatasen sind die Enzyme die dafür sorgen, dass Phosphat wieder von den Proteinen entfernt wird [37] [38]. Diese Enzyme werden in vier Klassen unterteilt, so gibt es alkalische [39], Serin/Threonin-spezifische, Tyrosin-spezifische und dualspezifische Phosphatasen. Serin ist mit ca. 86 % die am häufigsten phosphorylierte Aminosäure [40].

1.2.3 Sulfatierungen

Chemisch gesehen ist die Sulfatierung nah mit der Phosphorylierung verwandt. Anders als bei der Phosphorylierung wird hier jedoch nicht die Seitenkette des Serins favorisiert, sondern die des Tyrosins [41]. Das Cosubstrat ist 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS) und wird von Enzymen namens Sulfotransferasen katalysiert [42][43]. Diese lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Zum einen gibt es die sogenannten löslichen Sulfotransferasen, die kleinere Substrate wie Flavonoide [44], Steroide [45], Neurotransmitter und Xenobiotika [46] umsetzen und somit maßgeblich an der Entgiftung von tierischen und pflanzlichen Organismen beteiligt sind [47][48]. Durch die Sulfat-Modifikation werden die Enzymsubstrate besser löslich und lassen sich gut über Nieren, Galle oder Schweißdrüsen sezernieren (Biotransformationsreaktion der Phase II). Zum anderen gibt es Sulfotransferasen, die als Substrate Kohlenhydrate und Proteine umsetzen [49]. Hierzu gehören die Tyrosylprotein-Sulfotransferasen (TPSTs). Nach heutigem Stand existieren im menschlichen Organismus zwei Isoformen dieses Enzyms, TPST1 und TPST2, die sowohl als Homodimer als auch als Heterodimer auftreten können [50]. TPSTs sind Membran-assoziierte Enzyme, die im Golgi-Apparat lokalisiert und mit einer einzelnen Transmembranregion von 17 Aminosäuren Länge in der Membran verankert sind [42]. Das katalytische Zentrum dieser Sulfotransferasen befindet sich im Lumen des Golgi-Apparats und interagiert fast ausschließlich mit zu sezernierenden oder Plasmamembran-Proteinen [43] [51]. Sulfatierte Proteine sind in wichtigen biologischen und physiologischen Prozessen wie der inflammatorischen Regulation, Leukozyten-Bewegung und -Adhäsion sowie der Endo- und Exozytose involviert. Ebenso sind sulfatierte Proteine an der Zell-Zell-Kommunikation und nicht zuletzt am viralen Eintritt in die Zelle beteiligt. Ein Prozess, der besonders gut studiert wurde, ist die Invasion des humanen Immundefizienz-Virus (HIV), über sulfatierte Tyrosine des CC-Motiv-Chemokin Rezeptors 5 (CCR5) [52]. Da sich ein Teil dieser Arbeit thematisch mit diesem Prozess beschäftigt, wird im folgenden Abschnitt ausführlicher auf den Mechanismus eingegangen.

1.3 HIV und der CCR5-Rezeptor

Der HI-Virus ist der wohl bekannteste Vertreter der Retroviren [53] [54]. Der Name Retrovirus setzt sich aus der Bezeichnung für Reverse Transkriptase Onkoviren zusammen und steht für eine Gruppe von Viren, die über einzelsträngige RNA ihr Erbgut mittels reverser Transkription in DNA umschreiben, die dann wiederum in das Genom der Wirtszelle eingebaut wird [55]. Bevor es dazu kommt, muss der Virus zunächst in die Wirtszelle eindringen. Wie zuvor bereits erwähnt, nutzt der HI-Virus sulfatierte Proteine

für sein Eindringen in die Zelle. Hierbei handelt es sich um die beiden Chemokinrezeptoren CXCR4 [56] und CCR5 (Abb. 3) [57], die mit sieben Transmembranhelices in die Zellmembran der T-Zellen eingebettet sind und einen extrazellulär exponierten N-Terminus besitzen. Sie gehören zu der Gruppe der G-Proteingekoppelten-Rezeptoren und sind hauptsächlich in Zellen des Immunsystems vertreten. Die Nomenklatur der Chemokinrezeptoren leitet sich aus der Struktur ihrer Substrate, den Chemokinen ab, die aufgrund der Anzahl und Position ihrer N-terminalen Cystein vermittelten Disulfidbrücken in vier Unterklassen unterteilt werden (CC-,CXC,CX3C und C) und hauptsächlich für das Auslösen der Chemotaxis verantwortlich sind [58].

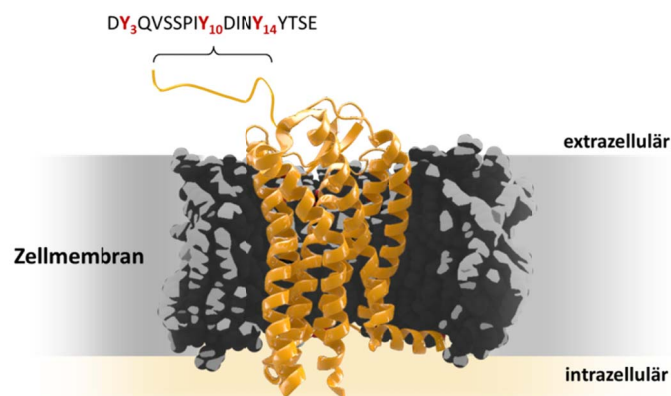


Abb.3: Darstellung des 352 Aminosäuren großen Chemokinrezeptorproteins CCR5 mit den sieben Transmembranhelices und der N-terminalen Aminosäuresequenz. Gekennzeichnet sind die am häufigsten vorkommenden sulfatierten Tyrosine in rot. Verändert nach Thomas Splettstoesser [59].

Diese binden üblicherweise an den N-Terminus des Chemokinrezeptors, der daraufhin aktiv wird und die Zelle in Richtung der höchsten Chemokinkonzentration wandern lässt [59]. Der CCR5 hat in seiner N-terminalen Aminosäuresequenz je nach Modifikationslage zwischen zwei und vier Sulfotyrosine, die es dem HI-Virus erlauben über den sog. V3 Loop, einer strukturellen Einheit des viruseigenen Glykoproteins gp120, an ihn zu binden. Über einen zuvor gebildeten Komplex zwischen gp120 und dem CD4-Rezeptor der menschlichen T-Lymphozyten tritt eine Konformationsänderung im V3-Loop ein und das Virus kann darauf hin an der Zelle andocken (Abb. 4). Hierbei wird dem Rezeptor suggeriert, dass es sich um einen Prozess der Immunabwehr handelt, wobei das Virus nun über das, durch konformationelle Veränderung freigelegte, Transmembranprotein gp41 an die Zellmembran bindet. Die Hülle des Virus verschmilzt mit der Membran der Zielzelle und die Virus-RNA wird ins Zellinnere entlassen [60].

Um den Vorgang der Zellmigration zu stoppen, wurden bisher erst wenige Medikamente zugelassen [61]. Die beiden auf dem Markt befindlichen *entry* Inhibitoren sind Maraviroc

(ViiV Healthcare) und Enfuvirtid (Hoffmann La-Roche). Bei Enfuvirtid handelt es sich um ein Medikament gegen HIV-1. Chemisch betrachtet ist es ein 4,5 kDa großes Peptid mit acetyliertem N-Terminus und amidiertem C-Terminus, welches die Konformationsänderung des gp41-Proteins durch Anlagerung verhindert und somit das Eindringen in die Zelle unmöglich macht [62]. Maraviroc ist ein künstlich synthetisiertes Molekül mit einer molaren Masse von $513,67 \text{ g mol}^{-1}$ und wirkt spezifisch auf den CCR5-Rezeptor. Es inhibiert den Rezeptor allosterisch, wodurch er eine Konformationsänderung erfährt, die ein Binden des V3-loops von gp120 an die ECL2-Region des CCR5 verhindert (Abb. 4) [63]. CXCR4 bevorzugende HIV-Stämme bleiben von Maraviroc unbeeinflusst.

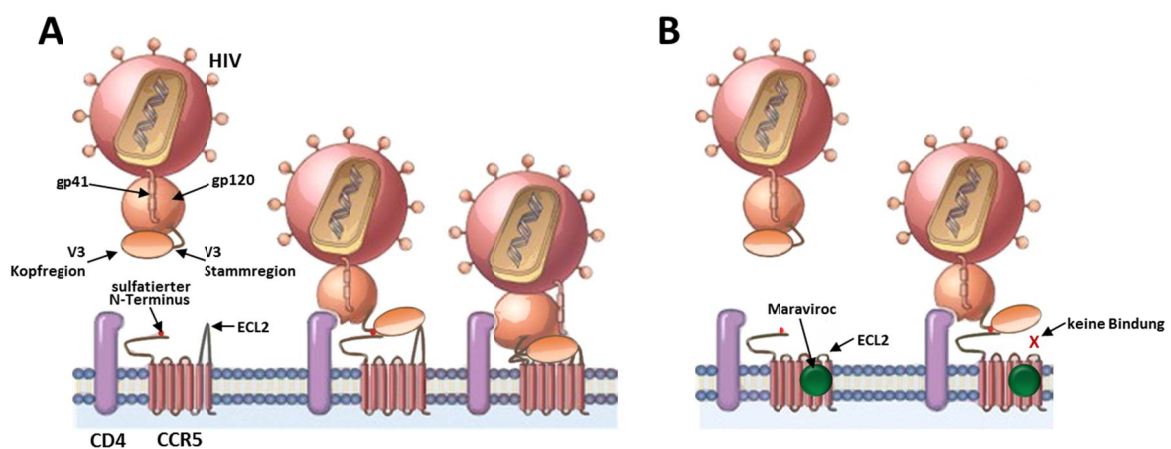


Abb.4: (A) Darstellung des HIV Eintritts über den CCR5-Rezeptor. Sobald gp120 an CD4 gebunden hat, ändert der V3-loop seine Konformation und bindet mit der V3-Kopfregion an die ECL2-Schleife des CCR5 und mit der V3-Stammregion an den sulfatierten N-Terminus. (B) Der Wirkmechanismus von Maraviroc. Durch die Inhibition des CCR5-Rezeptors, ist die ECL2-Schleife nicht mehr zugänglich für die V3-Kopfregion und das Virus kann nicht mehr in die Zelle eindringen. Bild verändert nach Kumar *et al.* [64].

1.4 Kernrezeptoren und Kernmigration von Proteinen

Proteintransport findet nicht nur an der Zellmembran statt; handelt es sich z. B. um Proteine, die eine Funktion in Transkriptionsprozessen haben oder eine andere wichtige Aufgabe im Kern erfüllen, so müssen sie auch die Möglichkeit haben, in den Zellkern eindringen zu können. Der Zellkern wird von einer Doppelmembran umschlossen, die durch Kernporen passiert werden kann. Die Kernporen bestehen aus hochfunktionellen Proteinkomplexen, die das Eindringen und Austreten von Proteinen, RNA, Ribonukleotid-Komplexen und anderen kleinen Molekülen regulieren. Hierbei gibt es mehrere Wege, die sehr spezifisch auf die Größe der Moleküle abgestimmt sind. Beträgt die Größe eines Proteins unter 5 kDa, so diffundiert es frei durch die Kernpore [65]. Ab einer Größe von ca. 17 kDa benötigt es bereits zwei Minuten [66]. Sind Proteine größer als 40 kDa, so ist ein passiver Transport nicht mehr möglich [65]. Für den aktiven Transport in den Zellkern

besitzen Proteine eine sogenannte Kernlokalisationssequenz (NLS), über die sie von Importinen [67] erkannt und in einem Komplex transportiert werden (Abb. 5). Die NLS wurde erstmals in einem Protein des SV40-Virus beschrieben [68]. Mittlerweile sind eine Reihe von NLS bekannt, wobei sich die klassische Variante aus ca. 10 basischen Aminosäuren zusammensetzt [69], die im Fall einer zweiteiligen NLS durch neutrale und saure Aminosäuren eine Aufnahmeverbesserung erfahren können [70]. Wurde die NLS von Importin α erkannt und gebunden, schließt sich das Protein Importin β an den Komplex an, welches für den Kontakt zum Kernporenkomplex verantwortlich ist [71].

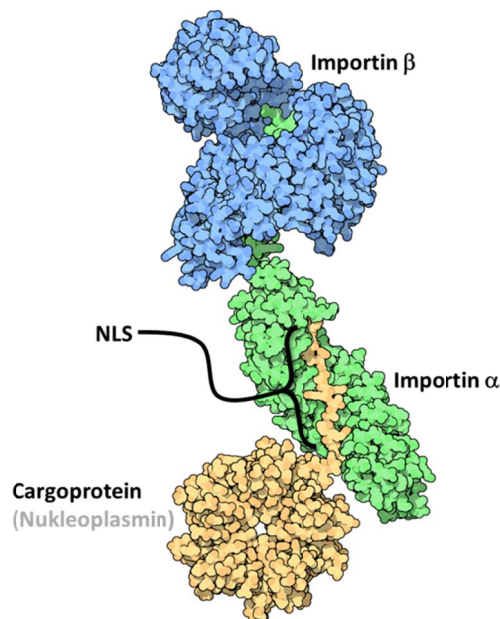


Abb.5: Darstellung eines Importin-Komplexes: Zuerst wird die NLS des Cargoproteins (gelb) von einem spezifischen Importin α (grün) erkannt und gebunden, anschließend bindet Importin β (blau) an die Importin α -Untereinheit und transportiert in einem Ran-GTP gesteuerten Mechanismus das Cargoprotein durch die Kernpore. Bild verändert nach Goodsell [72].

1.5 PPlasen

Die Abkürzung PPlasen steht für Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen und benennt eine Gruppe von Enzymen, die maßgeblich an der Proteinfaltung beteiligt sind [73]. Sie katalysieren den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Faltung von Proteinen, indem sie eine Bindungsachsenrotation in der Prolin-Amid-Bindung hervorrufen. Die Prolin-spezifische enzymatische Aktivität wurde erstmals 1984 von Gunther Fischer *et al.* vorgestellt [74]. Dieser Prozess ist für die korrekte Funktion eines Enzyms sehr wichtig, wenn man bedenkt, dass ein aktives Zentrum nur durch eine exakt definierte Oberflächenanordnung der Aminosäuren ein substratspezifisches Bindemotiv aufweist. PPlasen gehören zu den Chaperonen [75] und existieren in fast jedem biologisch höher entwickelten Organismus [76]. Die Isomerisierung ist ebenfalls eine Art der posttranslationalen Modifikation. Daher ist es nicht verwunderlich, dass diese Proteine

ubiquitär exprimiert werden und hoch konserviert vorliegen [77]. Durch ihre Substratspezifität und der Primärsequenzhomologie können PPlasen in drei Klassen eingeteilt werden (Abb. 6).

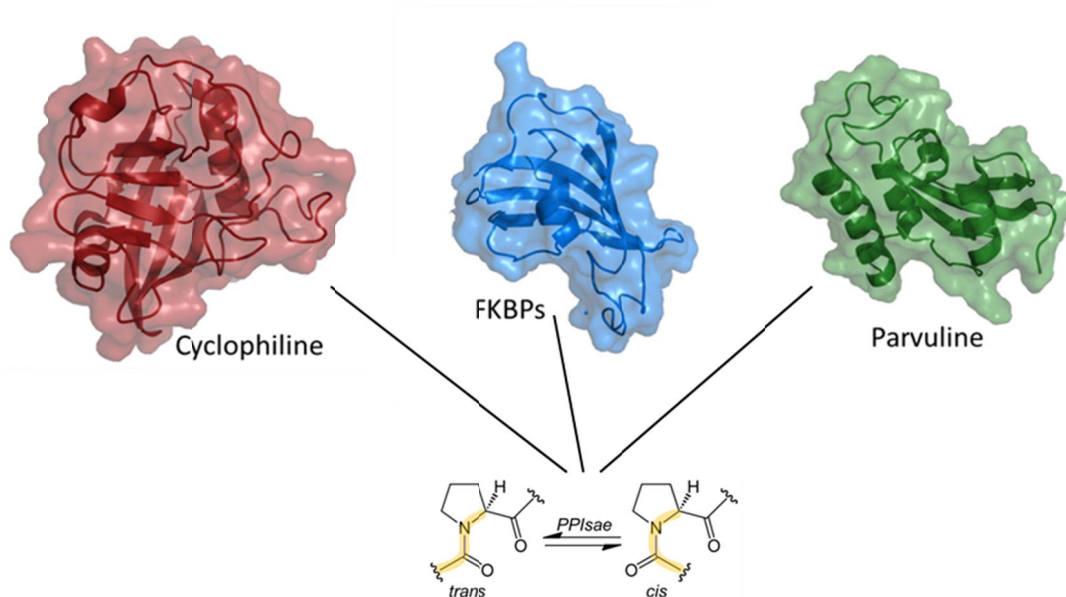


Abb.6: Die drei Klassen der PPlasen: Rot dargestellt die Cyclophiline, blau die FK506-bindenden Proteine und in grün die Parvuline. Alle drei Gruppen besitzen die katalytische Eigenschaft, cis/trans-Isomerisierungen in anderen Proteinen zu katalysieren.

Eine Klasse bilden die Cyclophiline. Cyclophiline können mit Cyclosporin, einem cyclischem Peptid, das als Immunsuppressivum eingesetzt wird, interagieren. Cyclosporin bildet z.B. einen Komplex mit Cyclophilin A und kann so die Phosphatase Calcineurin inhibieren. [78]. Aus diesem Grund wird Cyclosporin beispielsweise in der Transplantationstechnik eingesetzt um Abstoßungsreaktionen zu verhindern. Ebenfalls wird es seit einigen Jahren erfolgreich gegen kreisrunden Haarausfall angewendet [79]. Eine weitere Gruppe bilden die sogenannten FK506 und Rapamycin bindenden Proteine, kurz FKBP. Diese haben sich seit 2010 als hilfreiches Werkzeug bei der chemisch induzierten Dimerisierung von Biomolekülen behauptet [80]. Die letzte der drei Klassen bilden die Parvuline, die kleinsten Vertreter ihrer Gruppe und funktionell weitestgehend unerforscht. Par10 war das erste, aus *E. coli* charakterisierte Parvulin [81]. Ein Parvulin mit zwei PPlase-Domänen wurde mit SurA ebenfalls in *E. coli* gefunden [82]. Lange unerforscht blieben Vertreter in Archaeen, deren phylogenetische Einordnung in der Arbeit von Lederer *et al.* veröffentlicht wurde [83]. Eine, zu Bakterien strukturell ähnliche Parvulinvariante mit einer zusätzlichen katalytischen Einheit wurde 2011 mittels NMR charakterisiert [84]. Viele prokaryotische Parvuline sind membranassoziiert und an Prozessen beteiligt, die Proteine auf die Sekretion aus der Zelle vorbereiten [85].

1.5.1 Eukaryotische Parvuline

Auch die eukaryotischen Parvuline lassen sich, in Gruppen unterteilen. So gibt es phosphatspezifische und nicht phosphatspezifische Parvuline. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Phosphat-affinen Parvuline durch Juglon hemmen lassen [86]. Charakteristisch für diese Gruppe ist das Vorhandensein einer WW-Domäne [87], die selbst p Ser-Pro und p Thr-Pro Motive erkennt und bindet [88]. Dadurch, dass die WW-Domäne eine sehr kleine strukturell charakterisierte Domäne ist, konnte an ihr der Mechanismus der Proteinfaltung gut studiert werden [89] [90] [91]. 2010 wurde eine detaillierte, atomare Charakterisierung veröffentlicht [92]. Neben der guten strukturellen Aufklärung, ist über die phosphatspezifischen PPlasen bekannt, dass sie an zellulär relevanten Prozessen beteiligt sind [93]. Vor kurzem wurde von Steven D. Hanes ein Review über die in Hefe vorhandene PPlase Ess1 veröffentlicht, in der beschrieben wird, dass Ess1 ein Regulationsenzym für die RNA-Polymerase II ist und somit essentiell für den kompletten Reproduktionszyklus [94]. Weitaus weniger ist über die Vertreter der nicht phosphatspezifischen PPlasen bekannt. Neben dem WW-Domänen tragenden Pin1 gibt es im menschlichen Organismus ein weiteres Gen, das für zwei Parvulin-Varianten codiert, für hPar14 und hPar17 [95]. Während die PPlase-Domäne von hPar14 bereits 2000 mittels NMR strukturell charakterisiert wurde [96], weist der N-Terminus dieses Proteins eine hohe Flexibilität auf. In der Sequenz des N-Terminus befindet sich ein Kernlokalisationsignal ebenso wie ein Phosphorylierungsmotiv, dass durch die Casein-Kinase PK2 *in vitro* auch phosphoryliert wird [97]. Die Bindung des N-Terminus an DNA wurde 2002 von Surmacz *et al.* gezeigt [98]. In der Veröffentlichung von Fujyama-Nakamura *et al.* wurde gezeigt, dass hPar14 an Prozessen beteiligt ist, die der ribosomalen Biogenese zuzuordnen sind [99]. Des Weiteren ist eine, dem N-Terminus vorausgestellte, kurze Sequenz als mitochondriales Erkennungssignal in hPar17 identifiziert worden, die den Unterschied zwischen den beiden humanen nicht phosphospezifischen PPlasen ausmacht [100]. Bis heute ist kein spezifischer Bindungspartner für diese Enzyme bekannt. Durch den Nachweis von Acetylierungen, ebenfalls im N-Terminus [27], ist eine Interaktion mit Bromodomänen möglich, daher könnte hPar14, wie viele Bromodomänen auch, an der Transkriptionsregulation beteiligt sein. In Abb. 7 ist ein Überblick der eukaryotischen Parvulinvertreter gezeigt, der den Unterschied zwischen den beiden Parvulin-Gruppen deutlich macht.

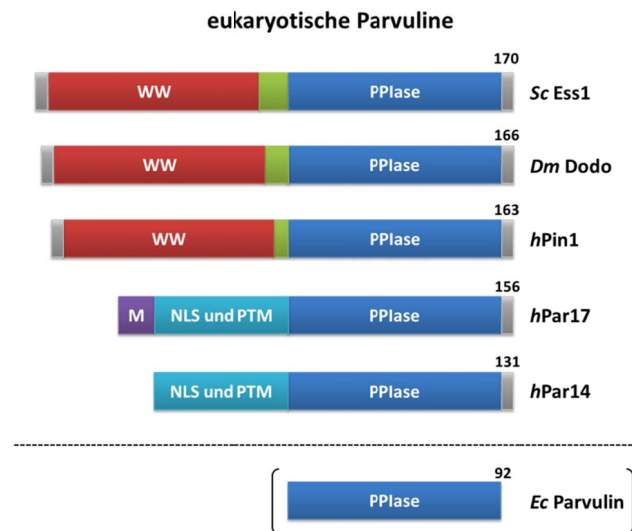


Abb.7: Sequenzielle Gegenüberstellung der opisthokonten Parvuline mit ihren phosphospezifischen WW-Domänen und den charakteristischen PPlase-Domänen. hPar17 besitzt zusätzlich eine mitochondriale Erkennungssequenz (M) und die nuklearen Lokalisationssequenzen (NLS) und posttranslationale Modifikationsbereiche (PTM) in hPar14/17. Von oben nach unten: Ess1 aus *Saccharomyces cerevisiae*, Dodo aus *Drosophila melanogaster*, humanes Pin1, humanes Par17 und Par14. Als Vergleich ist Parvulin aus *E. coli* mit aufgeführt.

1.6 Bromodomänen

Bromodomänen erkennen über ihre helikalen Strukturen ausschließlich acetylierte Lysine als Substrat [101]. Dabei liegen sie hoch konserviert in vielen Organismen von der Hefe bis zum Menschen vor. Das menschliche Genom codiert für 61 Bromodomänen (BRDs), die sich in 8 humane Bromodomänen-Familien unterteilen lassen und zumeist an acetylierte Lysinen von Histonen binden. [102]. In Abb. 8 ist eine phylogenetische Analyse der Bromodomänen dargestellt, wobei sich die acht Gruppen wie folgt unterteilen lassen: Gruppe I bilden die HATs; Gruppe II Proteine, aus der BET-Familie; in Gruppe III sind Proteine zusammengefasst, die ATP-abhängig arbeiten und in Komplexen der Chromatin Rückfaltung vorhanden sind (BAZ1B); Gruppe IV klassifiziert Chromatin- und Zinkfinger-bindende Proteine; Gruppe V beinhaltet Proteine die als transkriptionelle Coaktivatoren fungieren (TRIM/TIF1, TAFs); Gruppe VI vertritt die kleine Gruppe der Methyltransferasen (MLL); in Gruppe VII befinden sich transkriptionelle Mediatoren wie TAF1 und Gruppe VIII bildet die letzte hier klassifizierte Gruppe mit nuklearen Gerüstproteinen (PB1) und Helikasen (SMARCA). Insgesamt wurden in dieser Arbeit 29 Kristallstrukturen veröffentlicht, die alle bisher bekannten Bromodomänen-Klassifizierungen abdecken.

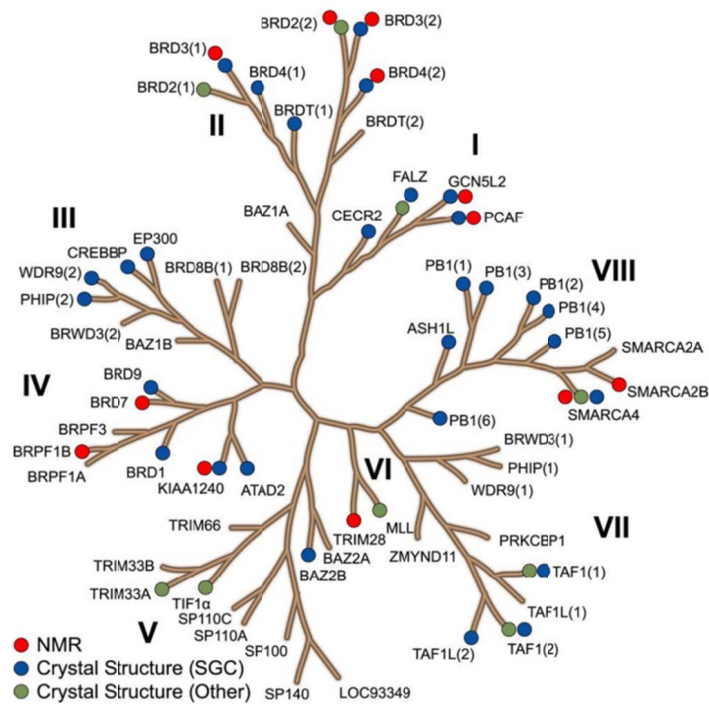


Abb.8: Phylogenetischer Baum der Bromodomänenfamilien. Die farbigen Punkte zeigen, mit welcher Methode die Struktur des jeweiligen Proteins aufgelöst wurde. In rot sind NMR-Strukturen der Bromodomänen vorhanden, in blau sind die Kristall-Strukturen, die durch SGC (*structural genomics consortium*) aufgeklärt wurden gekennzeichnet und in grün sind die Strukturen markiert, die aus anderen Veröffentlichungen stammen. Abb.verändert nach Filippakopoulos *et al.* [102].

Im Zusammenhang mit der Strukturaufklärung der Bromodomänen wurde eine weitere Studie veröffentlicht, die eine große Anzahl von Histon-Peptiden und verwandten Verbindungen als Substrat von Bromodomänen charakterisiert [103]. Hier konnte gezeigt werden, dass einige Bromodomänen oft eine höhere Affinität zu mehrfach acetylierten Substraten aufweisen, auch Kombinationen aus acetylierten und phosphorylierten Motiven wurden gefunden.

Besonders interessant ist die Gruppe der BET-Bromodomänen. Proteine die der BET-Familie (*bromodomain and extra terminal*) zugehörig sind, tragen zwei Bromodomänen in ihrer Sequenz und sind häufig in Prozessen wie der Chromatin-Rückfaltung oder der Transkriptionskontrolle involviert [104]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass BET-Proteine in Proteinkomplexen zusammen mit der Casein-Kinase II (CK2) und verschiedenen Vertretern der TAF-Gruppe an Regulationsprozessen von Condensin, beteiligt sind [105]. Condensine sind Proteinkomplexe, die für die Chromosomenkondensation während der Mitose verantwortlich sind [106].

1.8 Zielsetzung

Viren sind nicht in der Lage, sich selbständig zu vermehren, da sie weder eine eigenständige Replikation noch einen eigenen Metabolismus besitzen. Daher benötigt ein Virus zur Reproduktion eine geeignete Wirtszelle. HIV bildet zu diesem Zweck einen Komplex über gp120 mit CD4, um dann an den CCR5-Rezeptor zu binden und in die Wirtszelle einzudringen (Abb. 4). Dabei bindet der V3-Loop des gp120 mit seiner Stammregion an den sulfatierten N-Terminus des CCR5-Rezeptors. Viele Medikamente wirken so, dass sie versuchen den V3-Loop zu maskieren [107], sodass gp120 nicht mehr an CCR5 binden kann. Da Viren allerdings einer schnellen Mutationsrate unterworfen sind, können Medikamente gegen den V3-Loop schnell unwirksam werden. Daher wäre es sinnvoll, den sulfatierten N-Terminus des CCR5-Rezeptors zu maskieren. Das heißt, man sucht in vitro hochaffine Binder auf Peptidbasis, die an den CCR5-Rezeptor binden können. Dafür ist es nötig sulfatierte Peptide vorliegen zu haben. Die Synthese eines solchen Peptids mit sulfatierten Aminosäuren stellt heutzutage trotz moderner Synthesetechniken immer noch eine Herausforderung dar [108]. Aufgabe dieser Arbeit war daher die Etablierung einer stabilen Synthesestrategie von sulfatierten Peptiden aus der N-terminalen Sequenz des CCR5-Rezeptors. Die Peptide sollten anschließend als Ligand einer Säulenmatrix für die Affinitätschromatographie benutzt werden, um einen möglichst affinen und spezifischen Binder aus einer Proteinbibliothek zu fischen. Um die Bindungsstärke der gefundenen Proteine charakterisieren zu können, sollten zusätzlich Peptide mit einem fluoreszierenden Farbstoff synthetisiert werden, die eine anschließende Analyse mittels Fluoreszenz-Anisotropie ermöglichen. Damit die Affinität der Binder zu sulfatierten Peptiden bewiesen werden kann, war es nötig phosphorylierte und unmodifizierte Peptide als Kontrollgruppe herzustellen.

Das zweite Projekt beschäftigt sich mit der Untersuchung der N-terminalen Funktion von hPar14. Während die PPLase-Domäne als katalytische Einheit dieses Proteins bereits charakterisiert wurde [96], ist das Wissen über die Funktion seines unstrukturierten basischen N-Terminus noch lückenhaft. Es ist bekannt, dass hPar14 an Aminosäure Ser19 durch die Casein-Kinase II phosphoryliert werden kann und dass eine Substitution dieser Aminosäure durch Glutamat eine Anreicherung an der Zellkernmembran bewirkt [97]. Da die Herstellung einer ρ Ser19-Mutante mit konventionellen rekombinanten Biosynthesemethoden nicht möglich ist, konnte das Verhalten einer solchen Proteinvariante noch nicht untersucht werden.

Ziel war die semisynthetische Darstellung eines modifizierten hPar14 Proteins, welches die Phosphorylierung an Position Ser19 trägt. Der C-terminale Sequenzabschnitt sollte mittels rekombinanter Biosynthese hergestellt werden, wobei für die anschließende native chemische Ligation ein N-terminales Cystein Voraussetzung war. Der N-Terminus

sollte chemisch durch Peptidfestphasensynthese (SPPS) hergestellt werden. Um den Einfluss der Phosphorylierung untersuchen zu können, sollten zwei N-terminale Sequenzen synthetisiert werden, die sich in ihrer Aminosäuresequenz durch ρ Ser19 und Ala19 unterscheiden. Eine anschließende Betrachtung der beiden semisynthetischen Proteine in humanen Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie sollte die Auswirkung der Phosphorylierung auf die Lokalisation zeigen. Hierfür sollte N-terminal ein Fluoreszenzfarbstoff gekuppelt werden.

Von Choundhary *et al.* 2009 wurde gezeigt, dass hPar14 neben Phosphorylierungen auch Lysin-Acetylierungen besitzt [27]. Die Funktion der Acetylierungen ist jedoch weiterhin unbekannt. 2012 erschien eine Veröffentlichung von Filippakopoulos *et al.* in der acetylierte Substrate für Bromodomänen vorgestellt wurden, unter anderem Peptidsequenzen aus dem Histonprotein H4 [103]. Aufgrund der sequenziellen Ähnlichkeit zwischen den N-Termini des H4 und hPar14 sollte überprüft werden, ob Bromodomänen acetylierte Peptide des hPar14 binden. Im Einzelnen sollten nun neben den beiden HAT-Bromodomänen GCN5 und PCAF zwei Vertreter der BET-Familie auf ihre Bindungsaffinität zu hPar14 überprüft werden. Zu diesem Zweck sollten unterschiedlich acetylierte Peptide aus der N-terminalen Sequenz von hPar14 mit Fluoreszenzmarker synthetisiert und anschließend mittels Fluoreszenzanisotropie auf Bindung zu den vier Bromodomänen untersucht werden.

2 Materialien & Methoden

2.1 Chemikalien

Chemikalien, die hier nicht aufgeführt wurden, stammen von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Seelze) oder Merck (Darmstadt) in dem für die jeweilige Anwendung angemessenem Reinheitsgrad.

Tab.1: Chemikalien und Lösungsmittel

Chemikalie	Hersteller
HBTU	Acros, Geel (Belgien)
Diisopropylethylamin	Sigma-Aldrich, Seelze
<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon	Sigma-Aldrich, Seelze
Piperidin	Sigma-Aldrich, Seelze
Trifluoressigsäure	Acros, Geel (Belgien)
Dimethylformamid	Normapur, Darmstadt
Diethylether	Normapur, Darmstadt

Tab.2: Harze (Fmoc-Synthese)

Harz	Hersteller
Fmoc-Ala-Wang Resin (100-200 mesh)	Merck, Darmstadt
Fmoc-Gly-Wang Resin (100-200 mesh)	Merck, Darmstadt
Fmoc-Gly-4-Sulfamylbutyryl Rink Amide AM	Merck, Darmstadt
Sieber Amide Resin	Merck, Darmstadt

Tab.3: Fluoreszenzfarbstoffe (Fmoc-Synthese)

Farbstoff	Hersteller
ATTO 488 Carboxy	ATTO-TEC, Siegen
Mant	Acros, Geel (Belgien)
Rhodamin B	Sigma-Aldrich, Seelze

Tab.4: Aminosäurebausteine (Fmoc-Synthese)

Baustein	Hersteller
Fmoc-Ala-OH	Merck, Darmstadt
Fmoc-Asp(OBzl)-OH	Merck, Darmstadt
Fmoc-Gln-OH	Merck, Darmstadt

Fmoc-Glu(OBzl)-OH	Merck, Darmstadt
Fmoc-Gly-OH	Merck, Darmstadt
Fmoc-Gly-Ser(ψMe,Mepro)-OH	Merck, Darmstadt
Fmoc-His(Trt)-OH	Merck, Darmstadt
Fmoc-Ile-OH	Merck, Darmstadt
Fmoc-Leu-OH	Merck, Darmstadt
Fmoc-Lys-OH	Merck, Darmstadt
Fmoc-Lys(Ac)-OH	Merck, Darmstadt
Fmoc-Lys(Boc)-OH	Merck, Darmstadt
Fmoc-Met-OH	Merck, Darmstadt
Fmoc-Pro-OH	Merck, Darmstadt
Fmoc-Ser(tBu)-OH	Merck, Darmstadt
Fmoc-Ser(PO ₃ H ₂)-OH	Merck, Darmstadt
Fmoc-Thr(tBu)-OH	Merck, Darmstadt
Fmoc-Tyr-OH	Merck, Darmstadt
Fmoc-Tyr(SO ₃ *NnBu ₄)-OH	Merck, Darmstadt
Fmoc-Tyr(PO ₃ H ₂)-OH	Merck, Darmstadt
Fmoc-Val-OH	Merck, Darmstadt

2.2 Pufferlösungen und Medien

Tab.5: Pufferlösungen und Medien

Name	Zusammensetzung
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-Sammelgelpuffer	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) Sammelgelpuffer, 1 % (v/v) 10 % SDS, 1 % (v/v) 10 % APS-Lösung in H ₂ O, 0,033 % (v/v) TEMED
Laemmli-Trenngel (12,5 %)	17% (v/v) 30 % AA/Bis, 70% (v/v) ddH ₂ O, 10 % (v/v) Trenngelpuffer, 1 % (v/v) 10 % SDS, 1 % (v/v) 10 % APS-Lösung in H ₂ O, 0,1 % (v/v) TEMED
LB-Medium	1 % (w/v) Typton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,17 M NaCl, ddH ₂ O (pH 7,0)
LB-Plattenmedium	1,5 % (w/v) Agar-Agar, LB- Medium
Niedrigsalzpuffer	20 mM Tris-HCl 50mM NaCl ddH ₂ O (pH 7,4)
SOC-Medium	0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ ,

	20 mM Glukose, ddH ₂ O
TAE-Puffer	1mM Na ₂ EDTA, 0,1142 % (v/v) Eisessig, 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
Hepes-Äquilibrationspuffer	50 mM Hepes, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol, 0,5 mM DTT
Hepes-Waschpuffer	50 mM Hepes, 500 mM NaCl, 30 mM Imidazol, 0,5 mM DTT
Hepes-Elutionspuffer	50 mM Hepes, 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 0,5 mM DTT

2.3 Stamm- und Zelllinien

Tab.6: Stamm- und Zelllinien

Stamm-/Zelllinie	Genotyp	Hersteller
E. coli shoxx cells/ Lagerungsstamm für Plasmide	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 ara Δ139 Δ(ara, leu)7697 galU galK rpsL(StrR) nupG λ	Bioline, Luckenwalde
E. coli BL21(DE3)T1r / Expressionsstamm	F- ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm λ(DE3) tonA	Sigma-Aldrich, Seelze

U-2 OS human Osteosarkoma-Zellen	Erhalten von AG Nalbant, Universität Duisburg-Essen
-------------------------------------	---

2.4 Enzyme

Tab.7: Verwendete Enzyme

Enzym	Verwendung	Hersteller
Fast Digest Apal	Restriktionsendonuklease	Fermentas, St. Leon-Rot
Fast Digest BamHI	Restriktionsendonuklease	Fermentas, St. Leon-Rot
Fast Digest Bsal	Restriktionsendonuklease	Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase	Ligation	Metabion, Martinsried
Lysozym (Huhn)	Zellwandlyse von Bakterien	Sigma-Aldrich, Seelze
Pfu-DNA-Polymerase	PCR	Metabion, Martinsried
DreamTaq DNA-Polymerase	PCR	Metabion, Martinsried
PreScission-Protease	Sequenzspezifisches Schneiden	Institutsint. Herstellung
SUMO-Protease	Sequenzspezifisches Schneiden	Institutsint. Herstellung

2.5 Baukastensysteme und Verbrauchsmaterialien

Tab. 8: Verwendete Baukastensysteme

Kit	Verwendung	Hersteller
<i>Nucleo Spin® Plasmid</i>	Plasmidpräparation (Mini)	Macherey-Nagel, Düren
<i>Nucleo Bond® Xtra Midi</i>	Plasmidpräparation (Midi)	Macherey-Nagel, Düren
<i>Nucleo Spin® Gel and PCR clean up</i>	DNA-Reinigung	Macherey-Nagel, Düren
<i>Quik-Change®</i>	Einführen von Punktmutationen	Agilent technologies, Waldbronn

Tab.9: Verbrauchsmaterialien

Material	Ausführung	Hersteller
dNTPs (2,5 mM)		Metabion, Martinsried
Filter	Rotilabo®-Spritzenfilter, PVDF, 0,22 µm Porengröße	Carl Roth, Karlsruhe
	Rotilabo®-Spritzenfilter,	Carl Roth, Karlsruhe

	PVDF, 0,45 µM Porengröße	
Maldi-Target-Platte	MTP 384 <i>ground steel</i>	Bruker Daltonics, Bremen
Küvetten	108F-QS, 10×4 mm (Fluoreszenz)	Hellma Analytics, Müllheim
FPLC-Säulen	GSTrap FF 16/10, 20 ml HiTrap Q HP, 5 ml	GE-Healthcare, Solingen GE-Healthcare, Solingen

2.6 Geräte

Tab.10: Geräteliste

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	H+P Varioklav 25T	H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim
Batch-Reaktor	200 mL Volumen	Universität DUE, Essen
CD-Spektrometer	J-710	Jasco Analytical Instruments, USA
Elektroporator	<i>MicroPulserTM</i>	BioRad, Berkeley, USA
Fluoreszenzspektrometer	<i>Cary Eclipse</i> mit temp. <i>Multicell Holder</i>	Agilent Technologies, Waldbronn
FPLC-Anlage	DuoFlow mit QuadTec UV-Vis Detektor und BioFrac Fraktionssammler	Biorad, Berkeley, USA
Gelkammer (DNA)	<i>Mini Subcell</i> GT	BioRad, Berkeley, USA
Gelkammer (PAGE)	XCell Mini <i>Protean</i> 3	BioRad, Berkeley, USA
HPLC-Anlage	Shimadzu HPLC-System (Prominence UFLC)	Shimadzu, Duisburg
Konfokalmikroskop	TCS SP ₅	Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim
LC-MS- Massenspektrometer	Thermo Scientific LCQ Fleet TM	Thermo Scientific, Langenselbold
Magnetrührgerät	MR 3000	Heidolph Instruments, Schwabach
MALDI- Massenspektrometer	<i>autoflex speed</i>	Bruker Daltonik, Bremen
Peptidsynthesizer	<i>Syrol</i>	Multisyntech, Witten
pH-Meter	<i>SevenEasy</i>	Mettler-Toledo, Gießen

PCR-Gerät	Elektrode: InLab® Routine pro pH <i>Thermocycler T3000</i>	Biometra, Göttingen
Reinstwasseranlage	MilliQ Biocel	Millipore, Schwalbach
Sterilbank	HERA <i>safe</i>	Thermo Scientific, Langenselbold
Tischphotometer	<i>NanoDrop ND 1000</i>	Peqlab, Erlangen
Tischschüttler	Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf, Hamburg
UV-Vis-Spektrometer	Cary 100	Agilent Technologies, Waldbronn
Vakuumpumpe	KNF-LAB	KNF, Freiburg
Zellaufschlussanlagen	SONOPULS	Bandelin, Hamburg
Zentrifugen	Avanti JE mit JLA 9.1000 Rotor	Beckman coulter, Krefeld
	Optima LE-80K Ultrazentrifuge mit Ti45 Rotor	Beckman coulter, Krefeld
	Tisch-Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
	Tisch-Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
	Tischzentrifuge MiniSpin Plus	Eppendorf, Hamburg

2.7 Software

Tab.11: Software

Programm	Verwendung	Referenz
Flex Control	Auswertung von MALDI-Spektren	Bruker Daltonics, Bremen
GraphPad Prism 5.04	Lineare und nichtlineare Regressionen, Darstellung von Graphen	[109]
Image J 1.46r	Visualisierung und Bearbeitung von Mikroskopie-Bildern	[110]
OligoCalc	Berechnung der Eigenschaften von Primern	[111]
PyMOL 1.2r1	Visualisierung von Proteinstrukturen	[112]
Protparam	Berechnung von Proteinparametern, basierend auf deren Primärstruktur	[113]

2.8 Gel-Marker

Die verwendeten DNA-Marker für Agarosegele sind von der Firma Metabion (Abb. 9), namentlich sind das der Marker mi-100 bp+ DNA Marker Go und mi-1 kb (-) DNA Marker Go. Für SDS-Gele wurden der PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) und Mark 12™ Unstained Standard (life technologies) verwendet.

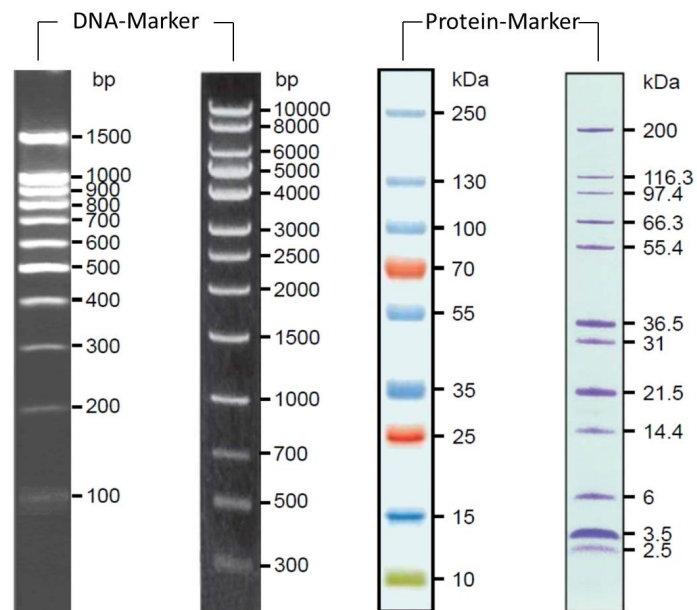


Abb.9: Marker, von links nach rechts: mi-100 bp+ DNA Marker Go, mi-1 kb (-) DNA Marker Go, PageRuler Plus Prestained Protein Ladder und Mark 12™ Unstained Standard.

2.9 Verwendete Plasmide

In dieser Arbeit wurde neben dem Vektor pET SUMO adapt (Invitrogen, Abb. 10) der pEYFP N1 und pNIC28-Bsa4 verwendet.

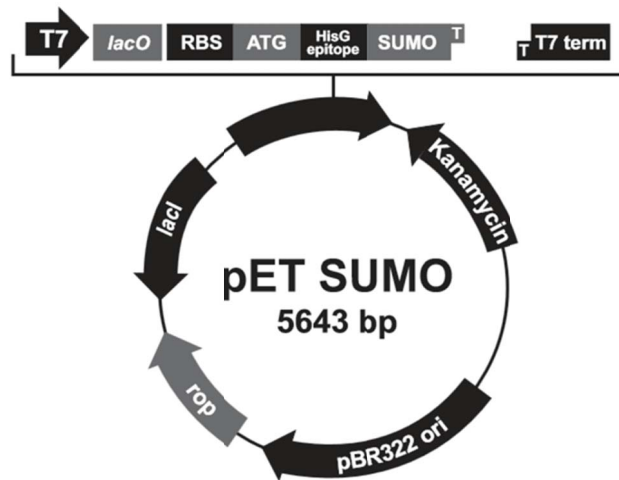


Abb.10: Vektorkarte des pET SUMO adapt (Invitrogen) welcher eine Erkennungssequenz für die SUMO-Protease mit vorangestelltem His-tag und eine eingebaute Kanamycin-Resistenz besitzt. Die Nukleotidsequenzen der Parvulin-Proteine, die im Rahmen dieser Arbeit exprimiert wurden, sind über die Schnittstellen BamHI und BsaI in den pET SUMO-Vektor kloniert worden.

2.10 Klonierung

Die Parvulin-Nukleotidsequenzen, die im Rahmen dieser Arbeit zur Expression von Proteinen genutzt wurden, sind über die Schnittstellen BamHI und BsaI in den pET SUMO adapt-Vektor kloniert worden. Der Vektor ist mit einem Resistenzgen gegen das Antibiotikum Kanamycin versehen. Die Bakterienzellen, welche dieses Plasmid besitzen, wurden so mittels Kanamycin selektiert. Durch ein vorhandenes lac-Operons wird über die Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) die Induktion der entsprechenden Translation eines Fusionsproteins ermöglicht. Dieses besteht aus den über die Schnittstellen BamHI und BsaI eingeführten Nukleotidsequenzen des SUMO-Proteins (*Small Ubiquitin-related MODifier*) und des C-terminalen hPar14-Proteins. N-terminal befindet sich dabei ein His6-tag, der als Erkennungssequenz für die spätere Reinigung über Nickel NTA-Säulen benötigt wird. Die hierfür verwendeten Schnittstellen sind BamHI und BsaI.

Die Primer für das Konstrukt des Cys-hPar14-Fusionsprotein lauten:

Forward: 5'- AAC AGG TCT CAT GGT TGT GAA AAA CAT GGC AAA ATC -3'

Reverse komplementär: 5'- GGT TGG GGA TCC CTT ACT TTC TTC CTT CGA CCA TAA T -3'

Alle Nukleotidsequenzen der Bromodomänen stammen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Knapp (Oxford University) und wurden dort in einen pNIC28-Bsa4-Vektor kloniert. Dieser Vektor ist ebenfalls bevorzugt geeignet für *E. coli* BL21-Wirtszellen und mit dem institutseigenen Expressionsverfahren kompatibel.



Abb. 2.4: Der Polylinker des Champion™ pET SUMO-Expressionssystems der Firma Invitrogen. Das PCR-Produkt beginnt direkt hinter der Sequenz für die spätere Schnittstelle der SUMO-Protease. Im Folgenden stehen die Ansätze und Programme, die für die Klonierung der Konstrukte verwendet worden sind.

Tab.12: Verwendeter PCR-Ansatz zur Amplifizierung eines Inserts

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration
Ausgangs DNA	1	2 ng/µl
Forward-Primer	5	1 µM
Reverse-Primer	5	1 µM
dNTPs (10 mM)	2,5	0.5 mM
Buffer green (10x)	5	1x
DMSO	0,5	1 %
DreamTaq DNA-Polymerase	1	5 U
Nuklease-freies Wasser	30	
Gesamt	50	

Tab.13: PCR-Cycler-Programm zur Amplifizierung eines Inserts

Zyklen	Prozess	Dauer [sec]	Temperatur [°C]
	Initiale Denaturierung	120	95
3	Denaturierung	30	95
	Annealing	30	$T_m - 9\text{ °C}$
	Elongation	30/500 bp	72
30	Denaturierung	30	95
	Annealing	30	$T_m - 6\text{ °C}$
	Elongation	30/500 bp	72
	Terminale Elongation	600	72

Nach der PCR wurde das Produkt auf ein Agarosegel (1 %) aufgetragen und bei 80 Volt laufen gelassen (Mini Subcell GT und PowerPac basic, BioRad) bis die Lauffront den Rand des Agarosegels erreicht hat. Die DNA wurde mit Midori Green® angefärbt. Anschließend wurde die Bande aus dem Gel isoliert und gereinigt (Nucleo Spin Extract II Kit, Macherey & Nagel).

2.10.1 Restriktion

Nach der Reinigung des Inserts wurden zum einen der Zielvektor, zum anderen das PCR-Produkt in ein Reaktionsgefäß gegeben. Durch Zugabe der Restriktionsenzyme (Fast Digest, Fermentas) wurde der Verdau bei 37 °C initiiert.

Tab.14: Reaktionsansatz zum Verdau des PCR-Produktes (Insert) und des Vektors

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration
DNA	x	0,04 µg/µl
Restriktionsenzym A	1	1 FDU
Restriktionsenzym B	1	1 FDU
Buffer green (10x)	5	1x
Nuklease-freies Wasser	ad 50	
Gesamt	50	

Tab.15: Verwendete Restriktionsenzyme, ihre Erkennungssequenzen und ihr Restriktionsschnitt

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz	Restriktionsschnitt
BamHI	5'-GGATCC-3'	5'-G GATCC-3'
	3'-CCTAGG-5'	3'-CCTAG G-5'
BsaI	5'-GGTCTC-3'	5'-GGTCTCN NNNN-3'
	3'-CCAGAG-5'	3'-CCAGAGNNNNN -5'

2.10.2 Ligation

Das Verhältnis von Insert zu Vektor betrug 3:1 und wurde für 1 Stunde bei 16 °C im *Thermomixer comfort* (Eppendorf) inkubiert. Im Anschluss an die Ligation wurde 1 µl des Plasmids in elektrisch kompetente Shox-Zellen transformiert. Die Zellen wurden auf Agarplatten ausplattiert, die bereits eine Impfung mit Kanamycin besaßen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Tab.16: Ligationsansatz

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration
Vektor	x	2,5 ng/µl
Insert	x	7,5 ng/µl
T4-Ligase	0,5	125 U
Puffer (10x)	2	1x
Nukease-freies Wasser	ad 20	
Gesamt	20	

2.11 Einführen einer Punktmutation

Es wurde eine Punktmutation in der Nukleotidsequenz von EYFP-hPar14 (BC638) vorgenommen. Das Konstrukt BC638 befindet sich in einem pEYFP N1 Vektor. Hier wurde S19 gegen A19 ausgetauscht. Die Punktmutation wurde mittels eines Quick-Change® Kits (Agilent technologies, Waldbronn) eingeführt. Folgende *Primer* wurden hierfür verwendet:

S19A-Mutante:

Forward: 5'- G GGA GCA GCC gcc GGG AGT GAC A -3'

Reverse: 5'- CCT TTC CCC GCT TTT CCA G -3'

2.12 Transformation kompetenter Zellen

In dieser Arbeit wurden zwei kompetente Zelltypen verwendet, elektrisch kompetente Shox-Zellen und chemisch kompetente BL21-Zellen. Für die Transformation der elektrisch kompetenten Shox-Zellen wurden 50 µl-Aliquots für 10 min auf Eis aufgetaut. Danach wurde 1 µl des Ligationsansatzes (2-4 ng) oder entsprechend reine DNA (40-50 ng) für 1 min zu den Zellen gegeben und auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine vorgekühlte, sterile Elektroporationsküvette (0,2 cm Elektrodenabstand, BioRad) gegeben und mittels Programm EC2 in einem Elektroporationsgerät (*MicroPulser™*, BioRad) gepulst. Die Zellsuspension wurde nach der Elektroporation in 200 µl SOC-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C und 400 rpm

inkubiert (*Thermomixer comfort*, Eppendorf). 100 µl der transformierten Zellen wurden anschließend auf LB-Agarplatten mit Kanamycin gegeben und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Die Transformation der chemisch kompetenten BL21-Zellen erfolgte unter Hitze-Schock bei offener Flamme eines Bunsenbrenners. Hierfür wurden 50 µl-Aliquots der Zellen für 10 min auf Eis gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit 50 ng DNA für 20 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte für 45 sec ein Hitzeschock bei 42 °C im Heizblock (*Thermomixer comfort*, Eppendorf). Daraufhin wurden die Zellen für weitere 2 min auf Eis zusammen mit der DNA inkubiert und anschließend in 200 µl LB-Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde für 1 h bei 37 °C und 400 rpm inkubiert (*Thermomixer comfort*, Eppendorf), danach auf eine LB-Agarplatte mit dem Antibiotikum Kanamycin ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.13 Proteinexpression

Die auf den beiden Vektoren pET-SUMO und pNIC28-Bsa4 basierenden Plasmide, welche die DNA-Sequenzen des Cys34-C-Terminus-Parvulin14 und der Bromodomänen enthielten, wurden mittels chemischer Transformation in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3)T1r transformiert. Hierfür wurden chemisch kompetente Zellen dieses Stammes mit 1 µl DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für ca. 1 min einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Nach weiteren zwei Minuten Inkubation auf Eis, wurden die Zellen mit 200 µl LB-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37 °C und 500 rpm inkubiert. Dieser Ansatz wurde zum einen direkt zur Herstellung einer Übernachtskultur (in LB-Medium) verwendet, zum anderen wurden 50 µl des Ansatzes auf LB-Platten (mit Kanamycin) ausplattiert und ebenfalls bei 37 °C über Nacht inkubiert. Alle Übernachtskulturen für die Expression der Proteine wurden in LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin hergestellt. Hierfür wurden in der Regel 4 l dieses Mediums mit 10 ml Übernachtskultur pro Liter Medium angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,8 wurde die Expression der Proteine mittels 0,2 mM IPTG induziert. Zur Expression wurden alle Konstrukte bei 18 °C und 180 rpm über Nacht geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterienzellen abzentrifugiert, mit sterilem Niedrigsalzpuffer gewaschen und erneut abzentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden dann mit Niedrigsalzpuffer resuspendiert und mit dem Serinprotease-Inhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) versetzt. Danach wurden die Pellets bis zur Reinigung schockgefroren und bei -25 °C gelagert.

2.14 Reinigung der hPar14-Cys34-Mutante

Das Pellet des exprimierten His-SUMO-Fusionsproteins wurde in einem Wasserbad aufgetaut. Daraufhin wurde eine Spatelspitze Lysozym aus dem Hühnereiweiß in dem Puffersystem gelöst und zu dem Pellet gegeben. Diese Suspension wurde für eine Stunde bei 4 °C mit einem Magnetrührer durchmischt. Anschließend wurden die Bakterienzellen mit Hilfe eines Ultraschallpuls-Geräts (5 Pulse für 20-30 s bei 60 % Intensität) aufgeschlossen. Feste Zellbestandteile wurden daraufhin durch 70-90 min Ultrazentrifugation bei 4 °C und 35000 rpm pelletiert. Die eigentliche Reinigung erfolgte an einer Biorad *DuoFlow*-FPLC-Anlage (BioRad, Berkeley, USA). Das gelöste His-SUMO-Fusionsprotein wurde an einer Nickel-NTA (Abb. 11) Säule gebunden. Die Säule wurde mit dem HEPES-Waschpuffer (siehe Tab.6) gewaschen. Unspezifisch an die Säule gebundene Proteine wurden ebenfalls durch das Waschen mit mehreren Säulenvolumina des HEPES-Waschpuffers entfernt.

Es wurden im Laufe der Reinigung Flussraten zwischen 0,5 und 1,5 ml/min eingestellt. Das eluierte Protein wurde anschließend mit einem Centricon (3000 MWCO) konzentriert und durch die Verwendung von Imidazol-freiem HEPES-Puffer von Imidazol befreit. 1 µl SUMO-Protease wurde pro 6 mg HIS-SUMO-Fusionsprotein hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Das abgeschnittene His-SUMO-Fragment wurde daraufhin durch erneutes Reinigen mittels einer Nickel-NTA Säule entfernt. Das Protokoll der His-Reinigung befindet sich im Anhang.

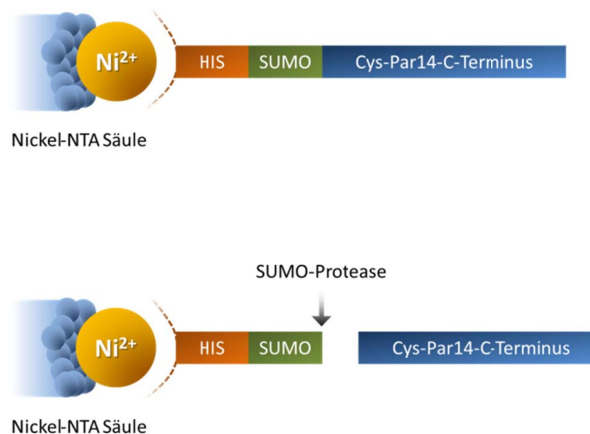


Abb.11: Schematische Darstellung der Reinigung des His-SUMO-Par14-Fusionsproteins. Zuerst wird das gesamte His-Fusionskonstrukt über eine Nickel-NTA-Säule gereinigt, anschließend mithilfe der SUMO-Protease gezielt geschnitten und am Ende erneut über Ni^{2+} -NTA das His-SUMO-Fragment entfernt.

2.15 Reinigung der Bromodomänen

Bei den Bromodomänen-Proteinen handelt es sich um Konstrukte der Bromodomänen GCN5, PCAF sowie BRDT1 und BRD4(2), die jeweils N-terminal mit einem His-*tag* versehen sind. Die DNA-Konstrukte stammen aus der Arbeitsgruppe von Stefan Knapp (Oxford University, GB) und konnten alle nach dem gleichen Prinzip gereinigt werden. Zunächst wurde das Pellet der exprimierten His-Bromodomänen aufgetaut. Eine Spatelspitze Lysozym wurde in Niedrigsalzpuffer gelöst und zu dem Pellet gegeben. Die Suspension wurde bei 4 °C für eine Stunde gerührt. Die Bakterienzellen wurden mittels Ultraschallpuls-Gerät (5 Pulse für 20-30 s bei 60 % Intensität) aufgeschlossen. Nach 70-90 min Ultrazentrifugation bei 4 °C und 35000 rpm bildeten die festen Zellbestandteile ein Pellet, der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert. Die anschließende Proteinreinigung erfolgte an einer Biorad *DuoFlow*-FPLC-Anlage (BioRad, Berkeley, USA). Das in Lösung befindliche His-Protein wurde an einer Nickel-NTA (Abb. 11) Säule gebunden. Die restliche auf der Säule verbleibende Suspension wurde mit HEPES-Waschpuffer (siehe Tab.2.6) von der Säule gespült. Auch unspezifisch gebundene Proteine wurden durch das Waschen mit mehreren Säulenvolumina des HEPES-Waschpuffers entfernt.

Im Laufe der Reinigung wurden Flussraten zwischen 0,5 und 1,5 ml/min eingestellt. Das eluierte Protein wurde anschließend in einem Centricon (3000 MWCO) konzentriert und durch die Verwendung von Imidazol-freiem HEPES-Puffer von Imidazol befreit. Das Protokoll der His-Reinigung befindet sich im Anhang

2.16 Quantifizierung von Proteinkonzentrationen

Sämtliche Proteinkonzentrationen wurden photometrisch mittels der spezifischen Extinktionskoeffizienten ϵ der Proteine über das Lambert-Beer'sche Gesetz

$$E_{\lambda} = \lg \left(\frac{I_0}{I_1} \right) = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (\text{Gl. 2.1})$$

quantifiziert. Die Koeffizienten bei 280 nm wurden mit Hilfe des Programmes Protparam berechnet. Keines der verwendeten Proteine zeigte nach Aufnahme eines UV-Vis-Spektrums Absorptionen von 320 nm. Daher konnte auf eine Streulicht-Korrektur verzichtet werden. Konzentrationen von Protein-Stocklösungen wurden an einem *NanoDrop* ND 1000 gemessen, wobei mindestens drei Absorptionmessungen gemittelt wurden.

2.17 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Analyse von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (disk. SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) verwendet. Zur Auftrennung der Proteine wurden 15 %ige SDS-Gele verwendet (Tab. 18). Nachdem das Trenngel gegossen wurde, wurde Isopropanol zur Bildung einer geraden horizontalen Linie auf das Gel gegeben. Nach der Aushärtung des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel gegossen. Für den Probenauftrag wurden Kämme in das Sammelgel eingeführt, die eine Anzahl von 10 bzw. 15 Taschen nach Aushärtung hinterließen. Die Lagerung der Gele erfolgte bei 4 °C. Durch Einschlagen in feuchtes Zellstoffpapier konnte das Austrocknen verhindert werden. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Ansätze für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert (*Thermomixer comfort*, Eppendorf). Um eine spätere Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine vornehmen zu können, wurde zusätzlich ein Protein-Marker (Abb. 9) mit aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine in vertikalen Kammern (BioRad) erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 Volt so lange, bis die Lauffront das Ende des Gels erreichte.

Die Gele wurden nach Entfernen der Glasplatten in Coomassie-Färbelösung gefärbt. Um den Entwicklungsprozess zu beschleunigen, wurden die Gele 1 min in der Mikrowelle erhitzt und anschließend für 15 min geschüttelt. Zum Entfärben wurde der Entfärber auf das Gel gegeben und auf dem Schüttler für 15 min inkubiert. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis das Gel ausreichend entfärbt war.

Tab.17: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für SDS-PAGE

Komponente	Trenngel (4x)	Sammelgel (4x)
AA/Bis	10 ml	850 µl
Aqua bidest.	5,2 ml	3,5 ml
Trenngelpuffer	4,4 ml	---
Sammelgelpuffer	---	400 µl
SDS (10 %)	200 µl	40 µl
APS (10 %)	200 µl	40 µl
TEMED	8 µl	4 µl

2.18 CD-Spektroskopie

Die CD-spektroskopischen Messungen wurden mit einem JASCO J-710 CD-Spektrometer (Jasco Analytical Instruments, USA) durchgeführt. 1 ml der Proben (0,15 mg/ml) wurden in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,4 in eine Absorptionsküvette mit einer Schichtdicke von 1 mm (Hellma Analytics, Müllheim) gefüllt. Folgende Parameter wurden für die Aufnahme der Spektren im Bereich von 200-260 nm (Fern-UV-Spektrum) verwendet:

data pitch: 0,2 nm, *scanning mode*: *continuous*, Scan-Geschwindigkeit: 100 nm/min, *response time*: 0,5 s, *bandwidth*: 2 nm, Temperatur: 20 °C. Je Probe wurden 20 *scans* gemittelt. Das Spektrum des Puffers wurde von den jeweiligen Protein-Spektren abgezogen, indem die beiden Spektren so auf der y-Achse verschoben wurden, bis die Datenpunkte von 250-260 nm Null ergaben. Anschließend wurde die mdeg-Einheit des Differenzspektrums mit Hilfe des mittleren Molekulargewichtes pro Aminosäure (*mean residue weight* = MRW) und der gemessenen Proteinkonzentration (mg/ml) in den Wert des mittleren CD-Extinktionskoeffizienten pro Aminosäure ($\Delta \epsilon$ MRW) transformiert. Die Sekundärstrukturanteile der Proteine wurden auf Basis eines so prozessierten Spektrums mit den Programmen CDSSTR [115], Selcon3 [116] und ContinLL [117] ermittelt.

2.19 Fluoreszenzanisotropie

In dieser Arbeit wurden die Fluoreszenzanisotropie-Messungen mit einem *Cary Eclipse* Fluoreszenzspektrometer durchgeführt. Es wurden unterschiedliche Peptide mit N-terminal über eine pseudo-Peptidbindung gekoppeltem Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Für herkömmliche Fluoreszenzmessungen wurde der Farbstoff Mant verwendet, während für anisotropische Messungen Rhodamin B benutzt wurde. Die Proteine wurden in einer Verdünnungsreihe (siehe Anhang) gemessen, hier wurde sich an der maximalen Proteinkonzentration des jeweiligen Proteins orientiert. Alle Messungen wurden in HEPES-Puffer (Tab.5: Äquilibriumspuffer ohne Imidazol) bei 20 °C durchgeführt. Rhodamin B wurde bei 540 nm angeregt und die Emission bei 557 nm detektiert. Mant wurde bei 335 nm angeregt und die Emission bei 440 nm detektiert. Zum Ausgleich der unterschiedlichen Durchlässigkeit der horizontalen und vertikalen Polarisatoren für Licht dieser Wellenlängen wurde ein G-Faktor von 1,685 verwendet. Die Anregungs- und Emissionsspaltbreiten betragen bei den Messungen 10 bzw. 20 nm und die Detektorspannung 600 V. Der Anregungsfilter wurde automatisch eingestellt und der Emissionsfilter auf „open“ gestellt. Die Messungen wurden in dem Kinetik-Modus des Gerätes mit einer Mittelungszeit von 10 s und einer Gesamtmesszeit von mindestens 8 min pro Messung durchgeführt.

2.20 Zellkultur und Fluoreszenzmikroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die die Mikroskopie betreffenden Experimente ausgegliedert. Die entsprechenden Zellkulturexperimente und Mikroskopie-bedingten Fluoreszenzprobenvorbereitungen wurden von Manuela Kowalczyk (Mikrobiologie, Uni DUE) durchgeführt. Die Mikroinjektionsversuche wurden von Perihan Nalbant (Mikrobiologie, Uni DUE) durchgeführt. Der Vollständigkeit halber werden die angewandten Methoden hier erwähnt.

2.20.1 Kultivierung von Zellen auf Kollagen I-beschichtete Deckgläschen

Verwendet wurden Zellen des Typs U2OS (human, Osteosarcoma). Diese wurden auf Kollagen I-beschichtete runde Deckgläschen (Durchmesser 1,3 cm; 24-Loch Platten) ausplattiert. Die verwendeten Deckgläschen wurden in 70 % Ethanol aufbewahrt. Um den Ethanol aus den Deckgläschen zu entfernen, wurde dreimal mit PBS-Puffer gewaschen. Um die Adhärenz der Zellen zu verbessern, wurden die Deckgläschen für 2 h bei 37 °C mit 10 µg/ml Kollagen I (Sigma-Aldrich, C8919) beschichtet. Danach wurde die Lösung entfernt und einmalig mit PBS gewaschen, bevor die Zellen ausplattiert wurden. Für die Experimente wurde eine Zelldichte von 3x10⁴ Zellen/Deckgläschen angegeben.

2.20.2 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA

24 h nach dem Ausplattieren der Zellen auf Kollagen I-beschichtete Deckgläschen erfolgte die transiente Transfektion von Plasmid-DNA. Pro Deckgläschen wurden ca. 50 ng DNA transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamine™ 2000 (Life Technologies (Invitrogen)) verwendet. Hier wurden 0,25 µl Transfektionsreagenz pro Deckgläschen ausgebracht.

2.20.3 Direkte Mikroinjektion der ATTO488-Proteine ins Cytoplasma

Die zu injizierenden Proteine hatten eine Konzentration von 100 µM in Kaliumphosphat-Puffer (KPi-Puffer). Vor der Mikroinjektion wurde die Proteinlösung 30 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Zeitraum der Injektion umfasste 15 min. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C inkubiert. Darauf folgten die Fixierung der Zellen mit Formaldehyd und die Färbung der Kerne mit DAPI.

2.20.4 Epifluoreszenzmikroskopie

Die in dieser Arbeit durchgeführten Epifluoreszenz-mikroskopischen Analysen von transient transfizierten Proteinen wurden an einem inversen Mikroskop der Firma Nikon (Eclipse Ti, Nikon Inverted Microscope, Nikon; Kamera: Cool Snap HQ2 Roper Scientific) durchgeführt, das mit einem elektrischen Probenstisch sowie einer beheizbaren

Inkubationskammer für Lebendzellbeobachtungen ausgestattet war. Verwendet wurden dabei ein 4x Luft-Objektiv (NA: 0,13), ein 20x Luft-Objektiv (NA: 0,45) und ein 60x Öl-Objektiv (NA: 1,4). Die für die Epifluoreszenz verwendeten Filterkombinationen sind im entsprechenden Ergebnisteil zu finden.

2.20.5 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

Die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM, *confocal laser scanning microscopy*) ermöglicht es, emittiertes Licht einer Probe selektiv aus der Fokusebene zu sammeln. Das Streulicht, außerhalb dieser Fokusebene, wird unterdrückt. Die Ergebnisse der CLSM sind wesentlich kontrastreicher gegenüber der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie. Fluoreszenzmarkierte Proben werden durch einen Laserstrahl definierter Wellenlänge angeregt. So wird die Probe Punkt für Punkt abgerastert. Das emittierte Licht der Probe wird auf eine im Durchmesser veränderbare Lochblende (*pinhole*) fokussiert und von einem dahinter liegenden Detektor erfasst. Da der Fokuspunkt und die Lochblende in konjugierten Ebenen liegen, das heißt, konfokal sind, kann nur Licht aus dem Fokuspunkt durch die Lochblende dringen. Für die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie wurde das Leica TCS SP5 System der Firma Leica verwendet. In Tab.2.19 stehen die Laser und Anregungswellenlängen des Systems.

Tab. 18: Laser und Anregungswellenlängen des Leica TCS SP5 Systems

Laser	Wellenlänge [nm]
Diode	405
Argon	458/476/488/496/514
DPSS	561
Helium-Neon	594/633

2.21 Festphasenpeptidsynthese (SPPS)

Alle Peptide wurden nach dem Fmoc-Prinzip synthetisiert. Es wurden unterschiedliche Harze für die jeweiligen Synthesen verwendet. Orthogonal zur basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe wurden ausschließlich säurelabile Schutzgruppen für die Seitenketten modifizierter und unmodifizierter Aminosäuren ausgewählt. Die Aktivierung der Aminosäurebausteine wurde mit 0,5 M HBTU-Lösung in DMF und einer DIEPA-Lösung in NMP (3:2 v/v) vorgenommen. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde mit 20 % v/v Piperidin in DMF durchgeführt. Je nach verwendetem Resin wurden die Aminosäuren mit unterschiedlich starken TFA-Konzentrationen abgespalten: 5 % TFA für sulfatierte, 95 % TFA für andere Peptide. Durch die Verwendung säurelabiler Seitenkettenschutzgruppen wurden alle Aminosäuren beim Abspalten vom Harz gleichzeitig entschützt.

2.21.1 Manuelle Synthese

Die kürzeren Peptide (unter 18 Aminosäuren) in dieser Arbeit wurden per Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS) hergestellt. Für die manuelle Synthese wurde ein sogenannter Batch-Reaktor verwendet, der in der hausinternen Glasbläserei nach Vorbild eines kommerziellen Reaktors gefertigt wurde. Das Synthesevolumen beträgt ca. 50 ml. Bei der Synthese wurde das Fmoc-Schutzgruppenprinzip angewendet. Alle verwendeten Aminosäuren besitzen eine N-terminale Fmoc-Schutzgruppe. Die Kupplung der Aminosäuren erfolgt somit basenkatalytisch. Dementsprechend wurden für die Seitenketten säurelabile Schutzgruppen gewählt, die im Anschluss an die Abspaltung des Peptides vom Harz gleichzeitig mit entfernt wurden.

2.21.2 Automatisierte Synthese

Peptide mit einer längeren Sequenz (über 18 Aminosäuren) wurden automatisch hergestellt. Die automatisierte Fertigung der Peptide erfolgte über einen Peptide-Synthesizer (Syrol, Multisynthetech). Das Programm arbeitet nach dem Fmoc-Prinzip. Bei der maschinellen Herstellung wurden die Arbeitsschritte analog zur manuellen Synthese durchgeführt. Die Reaktionszeiten wurden gegenüber der manuellen Variante erhöht und ab einer Größe von mehr als 10 AS wurde eine Doppelkupplung der Fmoc-Bausteine durchgeführt. Zusätzlich wurden bei dieser Synthese sogenannte Pseudoproline [Fmoc-Gly-Ser(ψ Me,Mepro)-OH] verwendet, welche nach saurer Abspaltung in die Aminosäuren Glycin und Serin überführt wurden. Weitere Einzelheiten sind dem Syntheseprotokoll zu entnehmen, welches sich im Anhang befindet.

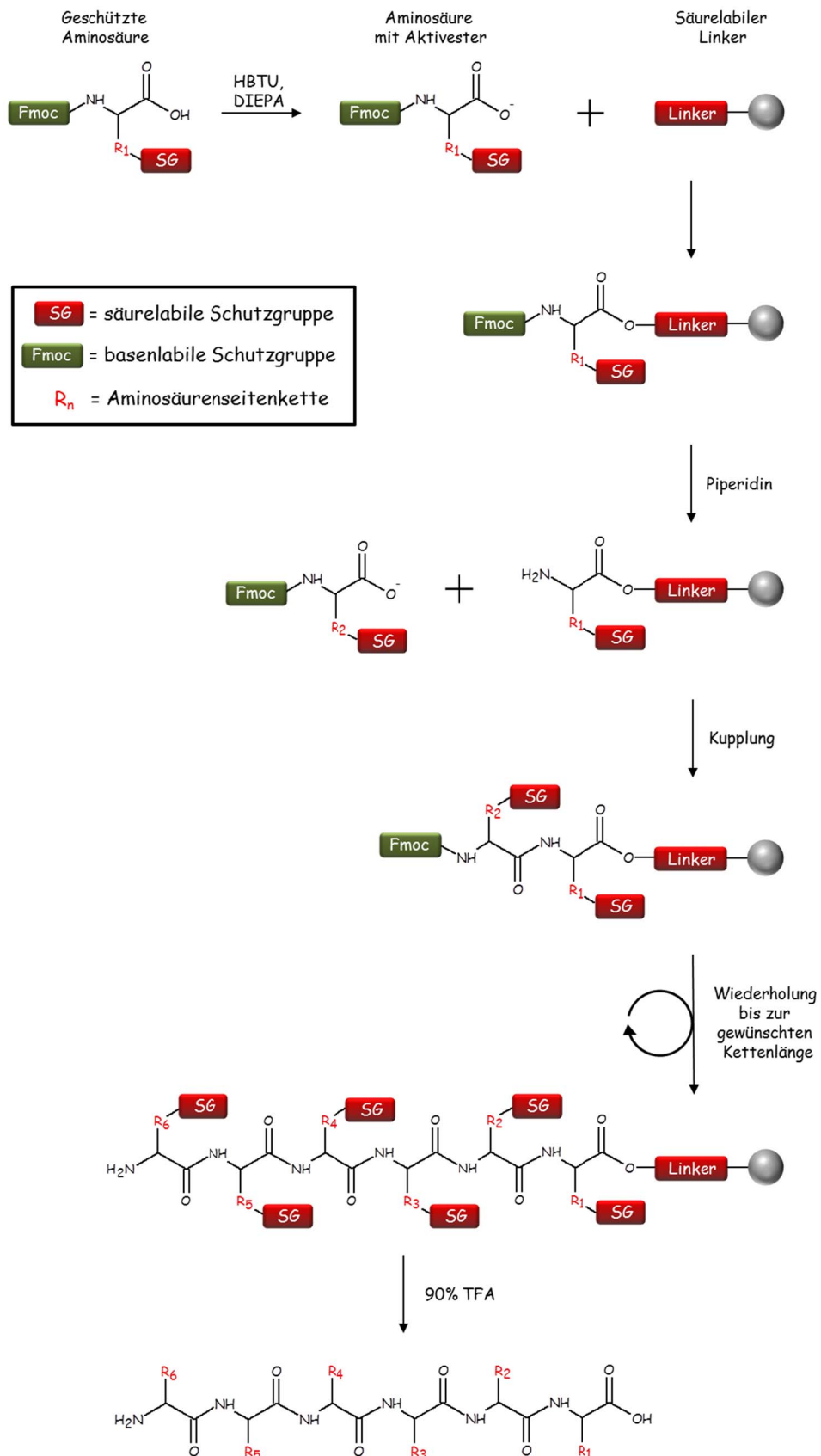


Abb.12: Schematische Darstellung der Fmoc-Peptidsynthese

2.22 Semisynthese von hPar14-Varianten

Die N-Termini der beiden herzustellenden Proteine ATTO 488-Ala19-hPar14 und ATTO 488-pSer19-hPar14, welcher aus der automatisierten Synthese hervorgingen, wurde im finalen Schritt vor der Abspaltung mit einem Fluoreszenzfarbstoff (ATTO₄₈₈) versehen. Anschließend wurde eine Methylgruppe mittels Trimethylsilyldiazomethan (TMS-CHN₂) eingeführt, die für die anschließende Thioesterbildung benötigt wurde. Pro 40 mg Resin wurden 100 µl 1M TMS-CHN₂-Lösung (Diethylether) verwendet. Dazu wurde die TMS-CHN₂-Lösung in 2 mL Hexan/DCM 1:1 überführt und anschließen in den Spritzenreaktor zum Peptid-Resin gegeben. Nach 1,5 h wurde die Abspaltung mit 95 % TFA vorgenommen. Die eigentliche Reaktion zum Thioester wurde *in situ* mit der chemischen Ligation durchgeführt. Für die Ligationsreaktion wurden 1 M Guanidiniumhydrochlorid (GnHCl), 60 mM 4-Mercaptophenylacetat (MPAA) in 0,2 M Phosphatpuffer, pH 7,5, zusammen mit dem chemisch synthetisierten N-Terminus und dem rekombinanten Oligopeptid gegeben. Der N-terminale Thioester formte zusammen mit dem C-terminalen Cystein einen intermediären Übergangszustand. Diese Reaktion, die sogenannte native chemische Ligation, lässt zwischen den beiden Reaktanten ein natürliches Cystein und somit ein maßgeschneidertes Protein entstehen.

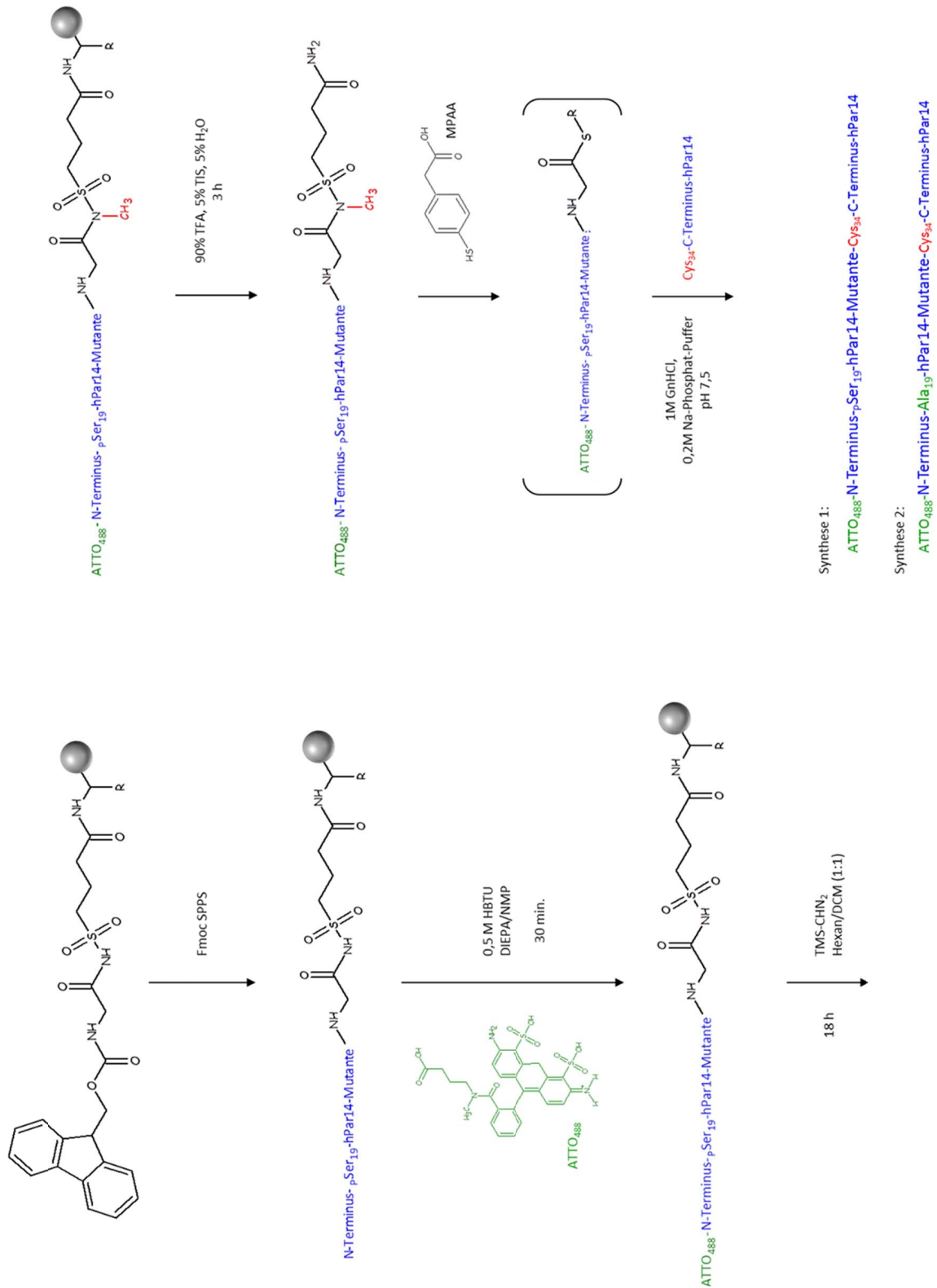


Abb.13: Reaktionsschema für die beiden semisynthetischen Proteine *p*Ser19-hPar14-Mutante und Ala19-hPar14-Mutante. Im Detail wird hier die Einführung des Fluorophors, die Methylierung vor der Abspaltung und die Erzeugung des Thioesters dargestellt.

2.23 LC-ESI-Massenspektrometrie (LC-MS)

LC-MS-Analysen wurden mittels eines LC-MS-Systems von Thermo Scientific mit einer Eclipse XDB-C18 (5 μm) Säule von Agilent (Peak-Detektion bei 210 nm) und einem Thermo Scientific LCQ FleetTM ESI-Spektrometer durchgeführt. Die Messungen im Positiv-Modus folgten einem linearen Gradienten von Lösungsmittel B (0,1 % Ameisensäure Acetonitril) zu Lösungsmittel A (0,1% Ameisensäure in Wasser) bei 1 ml/min Volumenstrom. Messungen im Negativ-Modus folgten einem linearen Gradient von Lösungsmittel C (5 mM NH₄OAc in Acetonitril) zu Lösungsmittel D (5 mM NH₄OAc in H₂O) bei 1 ml/min Volumenstrom.

Gradient für Positiv-Modus : 0 min/10 % B → 1 min/10 % B → 10 min/100 % B → 12 min/100% B → 15min/10% B

Gradient für Negativ-Modus : 0 min/10 % C → 1 min/10 % C → 10 min/100 % C → 12 min/100 % C → 15 min/10% C

2.24 Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation und Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator (MALDI-TOF-MS)

Zur massenspektrometrischen Analyse der größeren Proteine wurde ein Autoflex *speed* MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen) verwendet. Die Probe wurde mit Supel-Tips C18 (Sigma-Aldrich, Seelze) gereinigt und in 2 μL eines 1:1-Gemisches (v/v) Acetonitril, 0,1 % TFA/H₂O eluiert. Danach wurde die Probe im Verhältnis 1:1:1 (v/v) mit 2 % TFA/H₂O und Matrixlösung versetzt. Die Zusammensetzung der Matrixlösung bestand aus 7,6 mg 2',5'-Dihydroxyacetophenon in 375 μl analytischem Ethanol und 125 μl einer 18 mg/ml-Lösung von Di-Ammoniumhydrogencitrat (in H₂O). 0,5 μl des Gemisches wurden auf eine Trägerplatte MTP 384 *ground steel Tartget* (Bruker Daltonics, Bremen) aufgebracht. Nach Trocknung der aufgetragenen Probe (*Dried droplet* Methode) wurde die Trägerplatte zur Analyse ins Massenspektrometer gegeben und mittels „Flex Control“ ausgewertet.

2.25 Präparative Reversed Phase-Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Die Reinigung der Peptide erfolgte durch ein Shimadzu HPLC-System (Prominence UFLC) mit einer RP-C18-Säule von Phenomenex (Phenomenex Luna[®] 5 μm C18 (2), 100 x 21,20 mm)) deren maximale Detektion zwischen 210 und 254 nm liegt.

Die Proben wurden über einen linearen Gradienten von Lösungsmittel B (0,1 % TFA in Acetonitril) zu Lösungsmittel A (0,1% TFA in Wasser) in einem 25 ml/min Volumenstrom aufgetragen.

2.26 Gefriertrocknung (Lyophilisierung)

Die Gefriertrocknung oder Lyophilisation wurde unter Verwendung einer Gefriertrocknungsanlage ALPHA 2-4 LD Plus (CHRIST) durchgeführt.

Wässrige Lösungen der synthetisierten Peptide wurden separat in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (1,5 ml) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die durch Stickstoff schockgefrorenen Proben wurden so in den Gefriertrockner gestellt und bei -90 °C unter Vakuum getrocknet. Die Proben konnten innerhalb von 24-48 h trocken aus der Anlage entnommen werden.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich in drei Teilabschnitte gliedern. In allen drei Teilen wird die Synthese von posttranslational modifizierten Peptiden beschrieben, wobei sich der Schwerpunkt der einzelnen Teilabschnitte auf unterschiedliche Themen konzentriert: Im ersten Teilabschnitt wird die chemische Synthese von Peptiden aus der Sequenz des CCR5-Rezeptors beschrieben, dessen biologische Funktion vom HI-Virus für den Zelleintritt genutzt wird und daher für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze von Interesse ist. Besondere Herausforderung war hier die Etablierung einer Synthese von Peptiden, die als posttranslationale Modifikation ein sulfatiertes Tyrosin enthalten und zusätzlich für die säulenchromatographische Untersuchung von Proteinen eines Ribosomen-Displays dienen sollten.

Der zweite Teilabschnitt des Ergebnisteils beschreibt die semisynthetische Darstellung zweier hPar14-Proteine. Hier soll in erster Linie die Rolle der Phosphorylierung an Serin19, aus dem basischen N-Terminus des Proteins, im biologischen Kontext untersucht werden. Als Referenz wurde ebenfalls eine Alanin19-Variante semisynthetisch hergestellt. Hauptaugenmerk ist die Etablierung der Semisynthese zwischen chemisch synthetisierten N-Termini unterschiedlicher Modifikation und dem rekombinant gewonnen C-Terminus des hPar14, die anschließend durch native chemische Ligation (NCL) zusammengeführt und charakterisiert werden. Außerdem wird hier eine Synthesestrategie vorgestellt, die die Herstellung des hPar14-N-Terminus aus kleineren Fragmenten mit unterschiedlichen PTMs ermöglicht. Durch Fluoreszenzmikroskopie sollen die beiden semisynthetischen Proteine auf ihre Kernlokalisierung hin untersucht werden. Zusätzlich wird in der mikroskopischen Betrachtung der Unterschied zwischen transient transfizierten DNA-Plasmiden, fluoreszierender hPar14-EYFP-Fusionsproteine und den semisynthetischen Produkten untersucht.

Im letzten Teilabschnitt werden potentielle Acetylungsmotive an Lysinen aus dem N-terminalen Bereich des hPar14 untersucht. Hier werden Bindungsstudien zwischen unterschiedlich, posttranslational modifizierten Dekapeptiden gleicher Sequenz und ausgewählten Bromodomänen mittels Fluoreszenzanisotropie durchgeführt.

3.1 Chemische Synthese von CCR5-Peptiden

Der CCR5-Rezeptor dient dem HI-Virus als Ziel, um in menschliche Zellen einzudringen. Dies geschieht über den sogenannten V3-Loop des viralen gp120-Proteins, der über seine Stammregion an den N-Terminus des CCR5-Rezeptor bindet, während er mit seiner Kopfregeion die ECL2-Domäne des CCR5 kontaktiert, was zu einer Konformationsänderung

in gp120 führt und das Glykoprotein gp41 in die Lage versetzt, die Zellmembran mit der Virushülle zu fusionieren [118]. Daher ist es pharmakologisch von Interesse den CCR5-Rezeptor so zu manipulieren, dass es dem Virus nicht mehr möglich ist, an ihm zu binden. Aktuelle Medikamente versuchen das bereits durch allosterische Inhibition des CCR5-Rezeptors (Maraviroc), was dazu führt, dass die ECL2-Domäne dem Virus nicht mehr zugänglich gemacht wird [63]. Enfuvirtid setzt einen Schritt später an und komplexiert das gp41-Protein, wodurch die Fusion zwischen Virus und Zelle verhindert wird [62]. Ein medikamentöser Ansatz, der sich mit der Komplexierung der V3-Stammregion beschäftigt, wurde bislang nicht vorgenommen. Dies mag der Tatsache geschuldet sein, dass der N-Terminus des CCR5-Rezeptors sulfatierte Tyrosine enthält, die nach der klassischen Fmoc-Peptidsynthese schwierig herzustellen sind [108]. Um ein biologisch aktives Protein für die Maskierung des Rezeptors zu designen ist es wichtig Peptide mit sulfatierten CCR5-Sequenzen zu verwenden. Genau hier setzt diese Arbeit an. Die ursprüngliche Idee besteht darin, ein Ribosomen-Display [119] [120] zu nutzen, um geeignete hochaffine Binder für die V3-Stammregion zu entwickeln. Als Gerüstprotein (*scaffold*) wurde die IRS-PTB gewählt, ein Protein das phosphorylierte Tyrosine als Substrat erkennt. Dieses Protein wurde an einigen Positionen in der Aminosäuresequenz randomisiert, um eine erhöhte Affinität der Bindetasche auf Sulfonyltyrosine zu erlangen. Die so entstandene Substanzbibliothek bildet die Basis für das Ribosomen-Display. Zusätzlich wird eine immobilisierte Form von Peptiden benötigt, um effektive Binder zu finden. Dafür wurde hier eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, den besten Binder des Ribosomen-Peptid-mRNA-Komplexes, analog zu einer konventionellen Affinitätschromatographie [121], zu selektieren.

3.1.1 Darstellung von Peptiden zur Nutzung als Ligand für Affinitätschromatographie

Das Trägermaterial für die Affinitätschromatographie (AC) bildet in diesem Fall das Wang Resin [122]. Der Polystyrol-Linker eignet sich gut als inertes Trägermaterial, ähnlich wie quervernetzte Dextrane, die bereits seit den 1960er Jahren erfolgreich als stationäre Phase in der AC eingesetzt werden [123] [124]. Die gleichzeitige Verwendung des Synthese-Linkers als Matrix für die AC hat den Vorteil, dass einem Ausbeuteverlust durch Abspaltung und anschließende Neukoppelung an eine Matrixsubstanz vorgebeugt wird. Zusätzlich ist bei der Fmoc-basierten Bausteinsynthese, aufgrund der hohen Säurestabilität des Sulfonyltyrosins, mit Ausbeuteverlusten zu rechnen. Dies ging aus Testabspaltungen von Fmoc-Tyr(SO₃H)-OH mit Trifluoressigsäure hervor (Abb. 14). In der LC-MS-Analyse wurde eine doppelte Masse detektiert, die potentiell durch einen π -Stacking-Effekt erklärt werden kann [125], der auf die Wechselwirkungen der aromatischen Systeme untereinander zurückzuführen ist [126].

Um nun die Proteine aus der Proteinbibliothek des Ribosomen-Displays chromatographisch auf ihre potentielle Bindungsaffinität zum CCR5-Rezeptor hin zu untersuchen, wurden Heptapeptide aus der N-terminalen Sequenz des Chemokinrezeptors an den Wang-Linker synthetisiert. Die native Aminosäuresequenz beinhaltet eine Sulfatierung an Tyrosin14, die *in vivo* essentiell für die Bindung des CD4-gp120-Komplexes ist [127]; dementsprechend wurde eine Sequenz gewählt, die dieses Tyrosin mit einbezieht. Es wurden insgesamt drei unterschiedliche Peptide synthetisiert, die der Kontrolle der Bindungsaffinität dienen sollen. Über das phosphorylierte Peptid soll gezeigt werden, dass die ursprüngliche Bindedomäne aus der IRS-PTB, die naturgemäß an Phosphotyrosine bindet [128] [129], auch die synthetisierte Sequenz erkennt, während das sulfatierte Peptid eine höhere Affinität zu den Mutanten der IRS-PTB-Bibliothek aufweisen soll. Die unmodifizierte Variante dient als negativ-Kontrolle und sollte keine hochaffine Bindung zeigen. Da alle Peptide nach der Synthese kovalent am Harz verbleiben und als nativer Linker dienen sollten, war es notwendig, auf die Verwendung von Seitenkettenschutzgruppen zu verzichten.

Abspaltung mit 5 % TFA

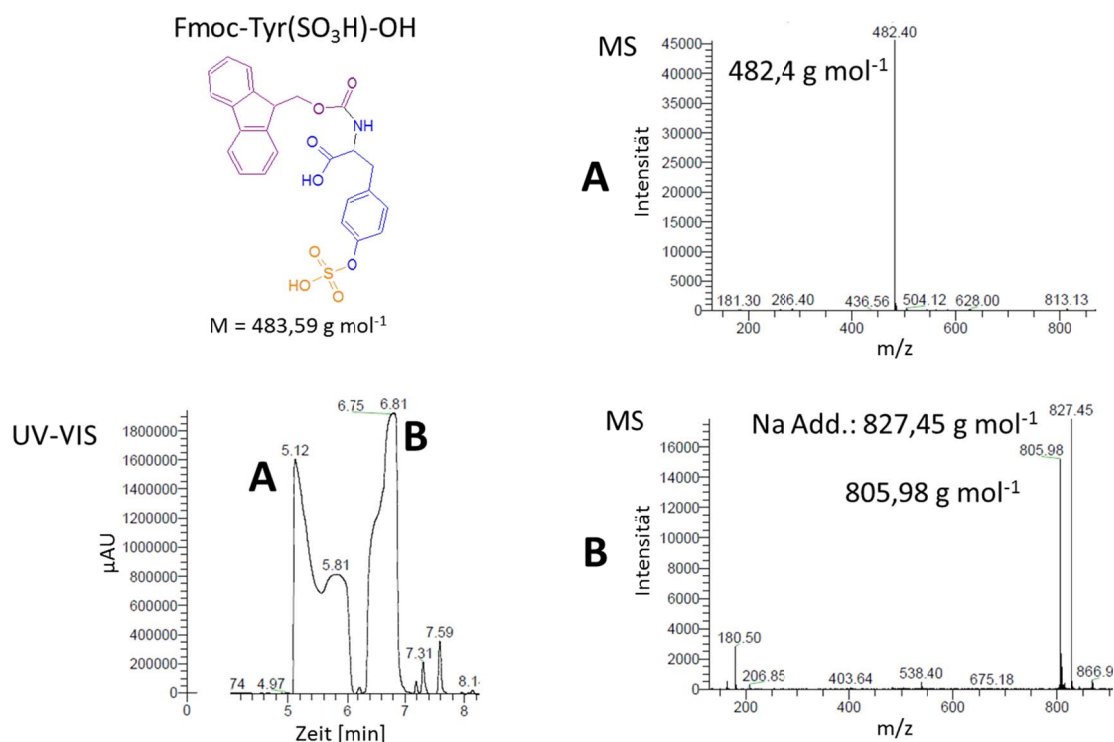


Abb.14: Gezeigt ist das Ergebnis der Testabspaltung bei 5 % TFA, oben links ist die Strukturformel mit der theoretischen Masse des Fmoc-Tyr(SO₃H)-OH von $483,59 \text{ g mol}^{-1}$ zu sehen, darunter befindet sich der Teilausschnitt des UV-Spektrums aus der LC-MS-Analyse, in dem die Peaks der beiden Spezies aus der Abspaltreaktion bei 210 nm detektiert wurden. Die Massenspektren auf der rechten Seite zeigen die Massen aus den UV-Peaks A und B. A entspricht der gewünschten Masse des Fmoc-Tyr(SO₃H)-OH, während in B die doppelte Masse des unsulfatierten Moleküls und sein Na⁺-Addukt zu sehen sind. Die doppelte Masse ist auf den π -Stacking-Effekt zwischen den aromatischen Systemen zurückzuführen [126]. Der

relative Massenunterschied der beiden Moleküle beträgt 80 g mol^{-1} , was der Masse der abgespaltenen Sulfatgruppe entspricht. Die Probe wurde zuvor mit 5 % TFA für 2 h abgespalten und zeigt bereits bei diesen geringen Mengen an Säure einen Verlust der Sulfatgruppe von ca. 55 %, was aus den Intensitätsdifferenzen der zeitaufgelösten UV-Signale hervorgeht.

Synthese der IN_xYYTSA -Wang-Resin-Peptide

Die für die Synthese verwendete Aminosäuresequenz wurde so gewählt, dass sie einer möglichst hohen Affinität zum CCR5-Rezeptor entspricht (Abb. 15). Aus der Dissertation von T. Kühnemund geht hervor, dass neben den sulfatierten Tyrosinen die hydrophoben Aromaten maßgeblich zur Bindung an gp120 beitragen [130]. Die Bindungsaffinität wird durch eine Sulfatierung an Tyr14 noch einmal um Faktor 3 verbessert. Dies geht aus STD-NMR-Studien Kühnemunds hervor. Deshalb wurde die Sulfatierung an AS-Position Tyr14 gewählt, wobei die benachbarte AS Tyr15 ebenfalls im Peptid enthalten sein sollte. C- und N-Terminal wurde die Sequenz um jeweils zwei benachbarte Aminosäuren der nativen Sequenz ergänzt, außerdem wurde die negativ geladene AS Glutamat durch Alanin ersetzt, um einer möglichen Ladungsirritationen des *scaffolds* bei der Affinitätschromatographie aus dem Weg zu gehen. Im Folgenden wird der genaue Syntheseprozess beschrieben:

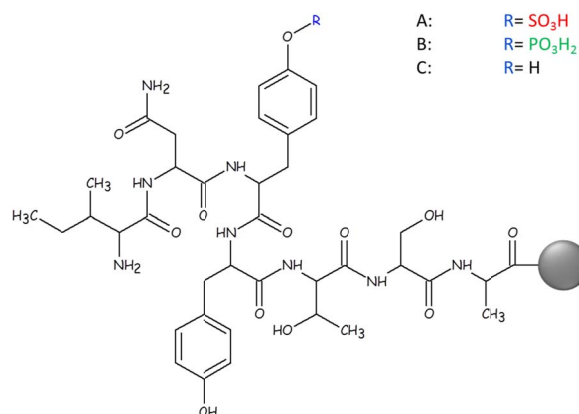


Abb.15: Lewis-Struktur-Darstellung des Peptids IN_xYYTSA an einem Wang-Linker gekoppelt. Insgesamt wurden drei Peptide mit unterschiedlichen Seitenkettenmodifikationen (siehe Legende) hergestellt.

Es wurden 300 mg Fmoc-Ala-Wang-Resin für 2 Stunden in DMF quellen gelassen. Nach Abziehen des Lösungsmittels durch Anlegen eines Vakuums wurde zur Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe 2 ml einer 20 %igen Piperidin/DMF-Lösung für 15 min auf das gequollene Resin gegeben. Während der Einwirkzeit der Piperidinlösung wurden 5 eq Fmoc-Ser-OH mit je 2 ml 5 M HBTU/DMF- und DIEA/NMP-Lösung zur Bildung eines Aktivesters auf den Aminosäurebaustein gegeben. Anschließend wurde 1 min lang nach der *continuous-flow*-Methode gewaschen. Hierauf folgte die Kopplung der aktivierten Fmoc-Ser-OH-Aminosäure. Die Reaktion wurde unter gelegentlichem Aufwirbeln der sich absetzenden Resinkügelchen mittels eines Glasstabes für 20 min durchgeführt. Die

Reaktionslösung wurde wieder 1 min mit DMF gewaschen, gefolgt von der erneuten Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe. Mit den folgenden Aminosäuren wurde wie oben beschrieben fortgefahren, bis zum Abspalten der letzten Fmoc-Schutzgruppe des Isoleucin. Der Fmoc-Baustein des sulfatierten Tyrosins wurde 30 min gekoppelt.

Das am Wang-Resin befindliche Peptid wurde so anschließend als Säulenmaterial für die Affinitätschromatographie genutzt. Es wurde eine Testabspaltung für die massenspektrometrische Untersuchung im LC-MS durchgeführt. Um dem Ausbeuteverlust durch längere Säuredisposition gering zu halten, wurde die Abspaltungszeit auf 30 min herabgesetzt. Hierfür wurde eine Spatelspitze (ca. 5-10 mg) aus dem Reaktionsvolumen entfernt, getrocknet und in einem 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß mit 5 ml eines Gemischs aus 95 % TFA; 2,5 % DIEPA und 2,5 % ddH₂O für 30 min auf einen rotierenden Schüttler inkubiert. Nach 30 min wurde durch Zugabe von Diethylether (7 ml) das abgespaltene Peptid präzipitiert. Die organische Phase mit dem ausgefallenen Peptid wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und für 15 min bei 3000 rpm und 4 °C in eine Zentrifuge gegeben. Anschließend wurde das überschüssige Lösungsmittel abgegossen und das am Boden des Reaktionsgefäßes befindliche Peptid in 2 ml Wasser wieder aufgenommen. Zur anschließenden Untersuchung wurden 10 µl des in Wasser gelösten Peptids mit 90 µl ddH₂O und 100 µl Acetonitril gemischt und in ein Messgefäß für die LC-MS Analytik gegeben (Abb. 16). Auf diese Weise wurden alle drei Peptide hergestellt, wobei die Abspaltungszeiten der beiden anderen Variante 2 h und die Kopplungszeiten aller AS 20 min betragen. Zusammenfassende Daten befinden sich in Tab. 19, weitere Spektren im Anhang.

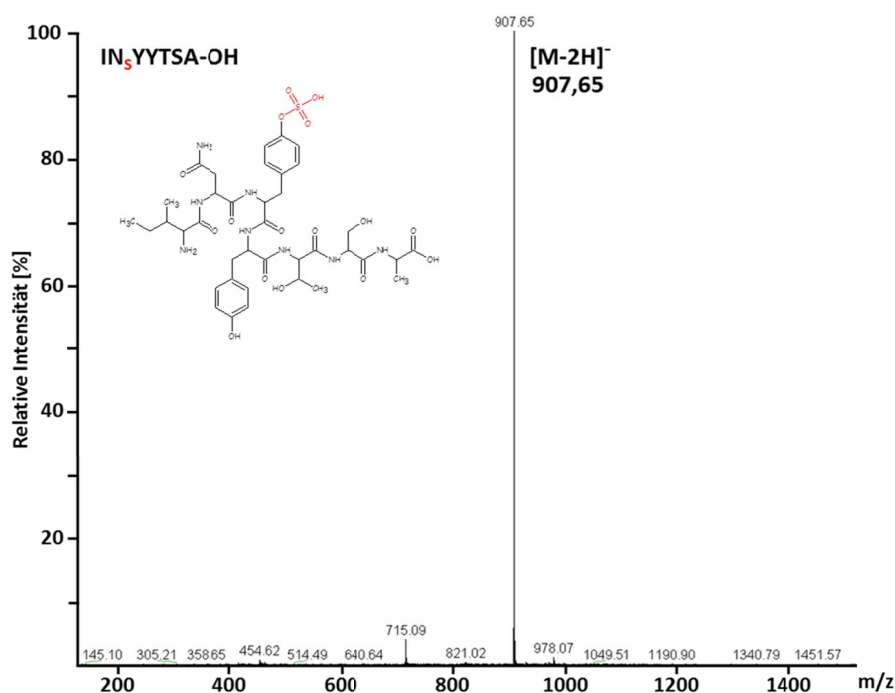


Abb.16: ESI-Massenspektrum des Peptids $\text{IN}_5\text{YYTSA-OH}$, gemessen im negativ Modus (Abschnitt 2.23).

Tab. 19: Heptapeptide für Affinitätschromatographie, die Massen entsprechen freiem Peptid

Peptid	Theor. Masse [g mol ⁻¹]	Gem. Masse [g mol ⁻¹]
INYYTSA(-Wang-Resin)	803,80	827,75
IN _S YYTSA(-Wang-Resin)	909,86	907,65
IN _P YYTSA(-Wang-Resin)	909,78	909,26

3.1.2 Darstellung von Peptiden für Bindungsstudien mittels Fluoreszenzspektroskopie

Um die Proteine, die aus dem Ribosomen-Display erhalten wurden auf ihre tatsächliche Bindungsaffinität zum Peptid überprüfen zu können, wurden die gleichen Peptide erneut synthetisiert, allerdings wurde ihre Sequenz N-Terminal um einen Fluoreszenzfarbstoff erweitert, damit ihre Affinität mittels Fluoreszenzanisotropie untersucht werden kann. Der Fluorophor wurde im letzten Schritt der Syntheseabfolge kovalent an das Peptid gekuppelt. Bei dem Fluorophor handelt es sich um Mant, einem 151,16 g mol⁻¹ großen Molekül, mit einer Emission von 440 nm bei einer Extinktion von 335 nm. Für die Kupplung wurde die Carboxy-Gruppe des Mant-Fluorophors analog zu den anderen Fmoc-geschützten Aminosäure-Bausteinen mit den gängigen Kupplungsreagenzien aktiviert und in Form einer Peptidbindung an den N-terminalen Teil des Peptids synthetisiert. Durch diese Modifikation sind die Peptide für weitere Aminosäurebausteine nicht mehr zugänglich. Im Gegensatz zu den Peptiden aus Abschnitt 3.1.1, die nach der Synthese auf dem Harz blieben, da dieses als Säulenmatrix verwendet wurde, wurden die Peptide in diesem Fall komplett abgespalten, weshalb auf eine Seitenkettenschützung nicht verzichtet werden musste. In Abb. 17 ist die Aminosäuresequenz der Mant-Peptide gezeigt.

3.1.2 Darstellung von Peptiden für Bindungsstudien mittels Fluoreszenzspektroskopie

Um die Proteine, die aus dem Ribosomen-Display erhalten wurden auf ihre tatsächliche Bindungsaffinität zum Peptid überprüfen zu können, wurden die gleichen Peptide erneut synthetisiert, allerdings wurde ihre Sequenz N-Terminal um einen Fluoreszenzfarbstoff erweitert, damit ihre Affinität mittels Fluoreszenzanisotropie untersucht werden konnte. Der Fluorophor wurde im letzten Schritt der Syntheseabfolge kovalent an das Peptid gekoppelt. Bei dem Fluorophor handelt es sich um Mant, ein $151,16 \text{ g mol}^{-1}$ großes Molekül, mit einer Emission von 440 nm bei einer Extinktion von 335 nm. Für die Kopplung wurde die Carboxy-Gruppe des Mant-Fluorophors analog zu den anderen Fmoc-geschützten Aminosäure-Bausteinen mit den gängigen Kupplungsreagenzien aktiviert und in Form einer Peptidbindung an den N-terminalen Teil des Peptids gekoppelt. Durch diese Modifikation sind die Peptide für weitere Aminosäurebausteine nicht mehr zugänglich. Im Gegensatz zu den Peptiden aus Abschnitt 3.1.1, die nach der Synthese auf dem Harz blieben, da dieses als Säulenmatrix verwendet wurde, wurden die Peptide in diesem Fall komplett abgespalten, weshalb auf eine Seitenkettenschützung nicht verzichtet werden konnte. In Abb. 17 ist die Aminosäuresequenz der Mant-Peptide gezeigt.

Synthese der Mant-IN_xYYTSA-OH Peptide

Die Peptide besitzen alle einen N-terminalen Fluorophor, der bei der Synthese wie ein Aminosäurebaustein behandelt werden konnte, da er eine Carboxylfunktion trägt, die durch Aktivierungsreagenzien der Peptidsynthese zugänglich gemacht werden kann. Die Synthese verlief wie weiter unten beschrieben.

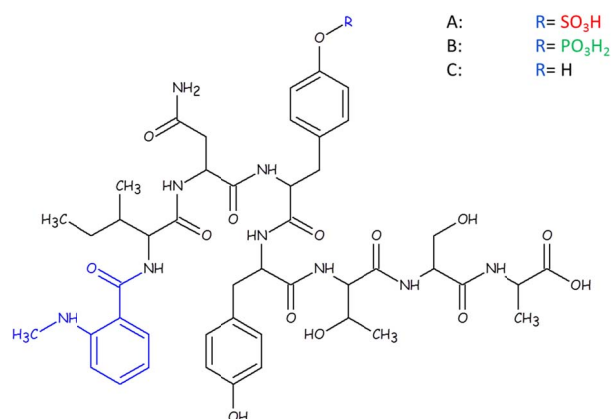


Abb.17: Lewis-Struktur-Darstellung des Peptids Mant-IN_xYYTSA, hier mit freiem C-Terminus und fluoreszenz-gelabeltem N-Terminus. Die Modifikationen am Tyrosin sind mit R gekennzeichnet und der Legende zu entnehmen.

300 mg Fmoc-Ala-Wang-Resin wurden für 2 Stunden in DMF quellen gelassen. Anschließend wurde das Lösungsmittel durch ein angelegtes Vakuum entfernt. Zur Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe wurden 2 ml einer 20%igen Piperidin/DMF-Lösung für 15 min auf das gequollene Resin gegeben. Parallel wurden 5 eq Fmoc-Ser-OH mit je 2 ml 5 M HBTU/DMF- und DIEA/NMP-Lösung zur Bildung eines Aktivesters auf den Aminosäurebaustein gegeben. Nach 1 min waschen mit DMF folgte die Kopplung der aktivierten Fmoc-Ser-OH-Aminosäure.

Die Reaktion wurde 20 min unter gelegentlichem Rühren laufen gelassen. Die Reaktionslösung wurde wieder 1 min mit DMF gewaschen, gefolgt von der erneuten Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe. Mit den folgenden Aminosäuren wurde wie oben beschrieben fortgefahren, bis zum Abspalten der letzten Fmoc-Schutzgruppe des Isoleucins. Auch hier wurde der Fmoc-Baustein des sulfatierten Tyrosins 30 min gekoppelt. Im letzten Kopplungsschritt wurde an das entschützte Isoleucin der Fluorophor Mant über seine Carboxylgruppe an die freie Aminogruppe des Isoleucins kovalent gebunden, sodass eine herkömmliche Peptidbindung entstand. Die Aktivierung des Fluorophors wurde analog zu der der anderen Aminosäuren durchgeführt.

Nach Entfernen des Lösungsmittels, wurde das komplette Peptid aus dem Reaktor in ein 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 5 ml eines Gemischs aus 95 % TFA; 2,5 % DIEPA und 2,5 % ddH₂O für 30 min auf einem rotierenden Schüttler inkubiert. Nach 30 min wurde durch Zugabe von 7 ml Diethylether das abgespaltene Peptid präzipitiert. Die organische Phase mit dem ausgefallenen Peptid wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und für 15 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das überschüssige Lösungsmittel wurde abgegossen und das am Boden des Reaktionsgefäßes befindliche Peptid wieder in 2 ml Wasser aufgenommen. Zur massenspektrometrischen Untersuchung wurden 10 µl des in Wasser gelösten Peptids mit 90 µl ddH₂O und 100 µl Acetonitril gemischt und in ein Messgefäß für die LC-MS-Analytik gegeben. Das Spektrum ist in Abb.18 zu sehen. Auf diese Weise wurden auch die drei anderen Peptide hergestellt (Tab. 20).

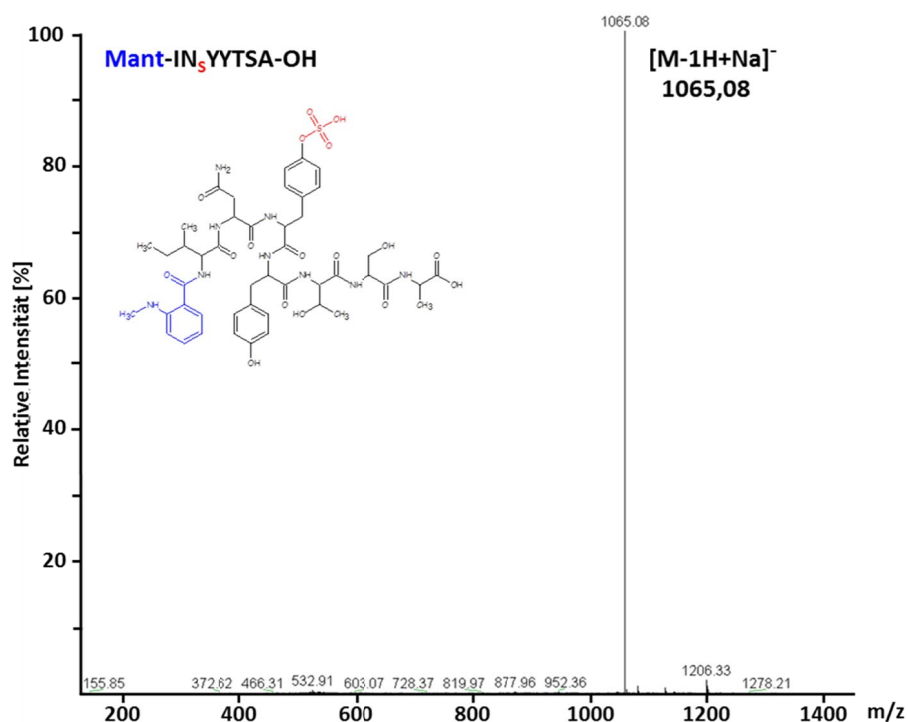


Abb.18: ESI-Massenspektrum des Peptids **Mant-IN₅YYTSA-OH**, als Na⁺-Addukt detektiert, gemessen im negativ Modus (Abschnitt 2.23). Die Spektren der anderen, hier synthetisierten Peptide befinden sich im Anhang.

Tab. 20: Mant-gelabelte Peptide für fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

Peptid	Theor. Masse [g mol ⁻¹]	Gem. Masse [g mol ⁻¹]
Mant-IN _Y YYTSA-OH	963,98	964,59
Mant-IN _S YYTSA-OH	1044,04	1065,08
Mant-IN _P YYTSA-OH	1043,96	1043,96

3.1.3 Darstellung von Peptiden an säurelabilen Linkern

Bei der herkömmlichen Abspaltung von Peptiden, die eine stark säurelabile Modifikation tragen, kann es vorkommen, dass die Modifikation durch die Behandlung mit hohen Säurekonzentrationen des Abspaltmediums verloren geht. Um den Ausbeuteverlust bei solchen Reaktionen gering zu halten, wurde ein säurelabiles Harz verwendet (Abb. 19), welches schon bei sehr geringen Konzentrationen an TFA die Spaltung des Peptids ermöglicht. Die geringe Konzentration an Säure reicht dennoch aus, um die Seitenkettenschutzgruppen in diesem Schritt mit zu entfernen, wie durch anschließende Massen-Analyse gezeigt werden konnte (Tab. 21). Ebenfalls tragen die Peptide nach der Spaltung keinen nativen Carboxy-Terminus, sondern einen amidierten C-Terminus.

Dadurch verschwindet die negative Ladung dieser funktionellen Gruppe, was für die Überprüfung des Affinitätsverhaltens der Proteine aus dem Ribosomen-Display von Bedeutung ist. Diese können durch eine zusätzliche Ladung beeinträchtigt werden [131], wodurch evtl. falsch-positive oder sogar falsch-negative Bindungsaffinitäten gemessen werden können.

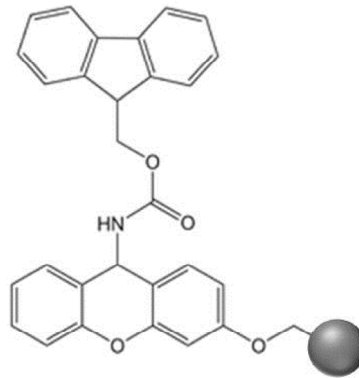


Abb.19: Sieber-Amid-Linker mit Fmoc-Schutzgruppe. Der, aufgrund seiner Xanthenyl-Gruppe, hoch säurelabile Linker, hinterlässt nach der Abspaltung des Peptids einen amidierten C-Terminus [132].

Synthese der Mant-IN_xYYTSA-NH₂ Peptide

Bei den hier hergestellten Peptiden (Abb. 20) entspricht der amidierte C-Terminus nach der Abspaltung durch einen neutralen Ladungszustand in diesem Bereich eher dem Peptid an der Säulenmatrix. Dort wurde ebenfalls über eine Substitution der AS Glutamat durch Alanin eine negative Ladung weggenommen. Die Synthese verlief im Einzelnen wie folgt:

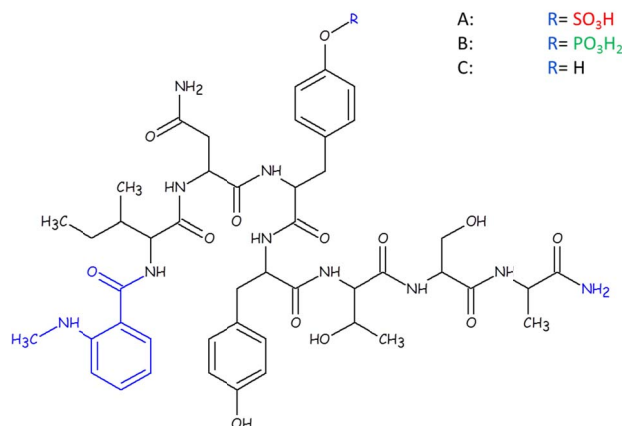


Abb.20: Lewis-Struktur Darstellung des Peptids Mant-IN_xYYTSA-NH₂. Die C-terminale Amid-Gruppe wurde durch die milde Abspaltung der Peptide vom Sieber-Amid-Linker erreicht.

Es wurden 300 mg Fmoc-Ala-Wang-Resin eingewogen und für 2 Stunden in DMF quellen gelassen. Anschließend wurde das Lösungsmittel abgesaugt. Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurden 2 ml einer 20 %igen Piperidin/DMF-Lösung für 15 min auf das gequollene Resin gegeben. Während der Reaktionszeit der Spaltreaktion wurden 5 eq Fmoc-Ser-OH mit je 2 ml 5 M HBTU/DMF- und DIEA/NMP-Lösung zur Bildung eines Aktivesters auf den Aminosäurebaustein gegeben. Es folgte das Waschen mit DMF für 1 min und anschließend die Kopplung der aktivierten Fmoc-Ser-OH-Aminosäure.

Die Reaktion wurde 20 min unter gelegentlichem Rühren laufen gelassen. Die Reaktionslösung wurde wieder 1 min mit DMF gewaschen, gefolgt von der erneuten Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe. Mit den folgenden Aminosäuren wurde wie oben beschrieben fortgefahren, bis zum Abspalten der letzten Fmoc-Schutzgruppe des Isoleucins. Auch hier wurde der Fmoc-Baustein des sulfatierten Tyrosins 30 min gekoppelt.

Um das Peptid im Fluoreszenzspektrometer untersuchen zu können, wurde im letzten Kopplungsschritt N-terminal an das entschützte Isoleucin der Fluorophor Mant über seine Carboxylgruppe an die freie Aminogruppe des Isoleucins kovalent gebunden. Die Aktivierung des Fluorophors wurde analog zu der der anderen Aminosäuren durchgeführt.

Nach Entfernen des Lösungsmittels, wurde das komplette Peptid in ein 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 5 ml eines Gemischs aus 95 % TFA; 2,5 % DIEPA und 2,5 % ddH₂O für 2 h auf einem rotierenden Schüttler inkubiert. Nach 2 h wurde durch Zugabe von 7 ml Diethylether das abgespaltene Peptid präzipitiert. Die organische Phase mit dem ausgefallenen Peptid wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und für 15 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das überschüssige Lösungsmittel wurde abgossen und das am Boden des Reaktionsgefäßes befindliche Peptid in 2 ml Wasser aufgenommen. Zur massenspektrometrischen Untersuchung wurde, wie in Abschnitt 2.21 beschrieben, das Peptid aufbereitet und in die LC-MS Analytik gegeben. In Abb.21 ist das Massenspektrum des sulfatierten Peptids zu sehen. Tab. 21 fasst die so synthetisierten Peptide zusammen.

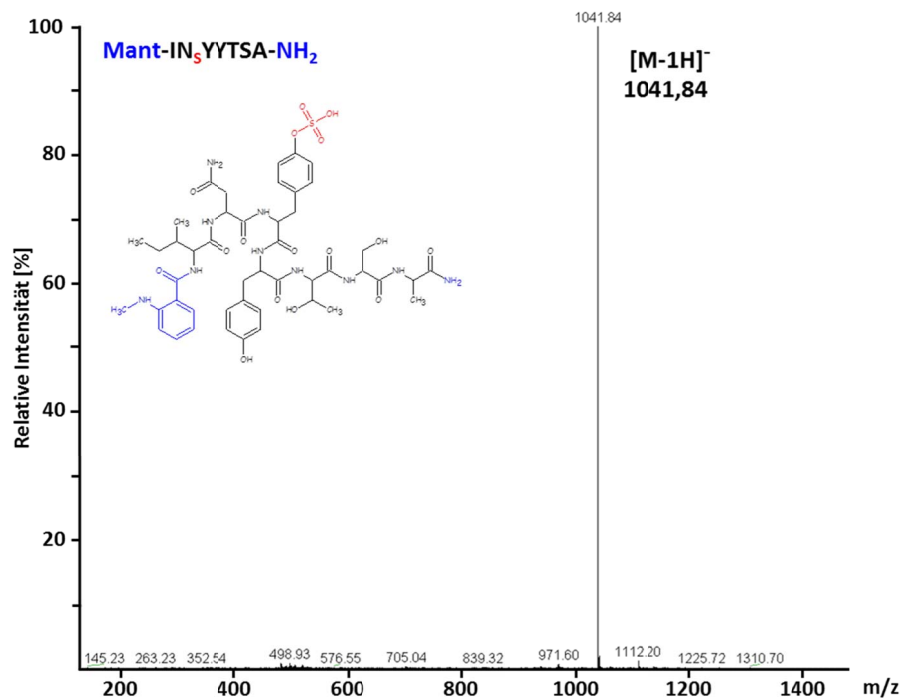


Abb.21: ESI-Massenspektrum des Peptids $\text{Mant-IN}_5\text{YYTSA-NH}_2$, gemessen im negativ Modus. Die anderen Spektren befinden sich im Anhang.

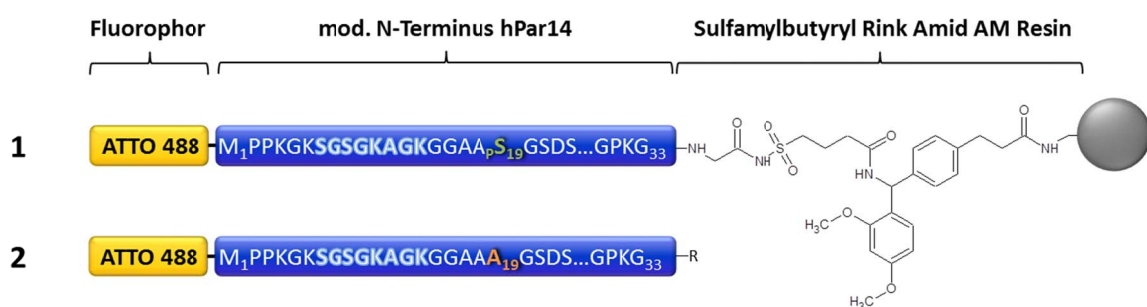
Tab. 21: Mant-gelabelte Peptide mit amidiertem C-Terminus

Peptid	Theor. Masse [g mol^{-1}]	Gem. Masse [g mol^{-1}]
Mant-INYYTSA-NH_2	962,99	964,51
$\text{Mant-IN}_5\text{YYTSA-NH}_2$	1043,05	1041,84
$\text{Mant-IN}_P\text{YYTSA-NH}_2$	1042,97	1040,09

3.2 Semisyntese von hPar14

Neben der PPlase-Domäne besitzt hPar14 einen unstrukturierten N-Terminus, der ab Gly33 einen aus drei Glycinen bestehenden flexiblen Linker hat, der gleichzeitig den Übergang zur strukturierten Region des Proteins bildet. Im N-terminalen Bereich des hPar14 befindet sich ein Kernlokalisationsignal (NLS), das laut Reimer von Ser7 bis K14 reicht und damit kein klassisches NLS ist [97]. Hier wurde auch gezeigt, dass eine *in vitro* Phosphorylierung an Ser19 durch die Casein Kinase II (CK2) katalysiert wird. Was zufolge von Rihs *et al.* [133] einen schnelleren Kernimport begünstigt. Neben der Bestätigung, dass der Wildtyp (WT) von hPar14 im Zellkern lokalisiert ist, konnten Mutationsvarianten von hPar14 zu Ser19/Glu19 und Ser19/Ala19 indirekt zeigen, dass eine Phosphorylierung an Ser19 beim Kernimport involviert ist [134]. Um diese Ergebnisse zu untermauern und evtl. neue Erkenntnisse über das Verhalten von hPar14 zu erlangen, wurden in dieser Arbeit zwei semisyntetische Versionen des Proteins mit einer echten Phosphorylierung an Ser19 und eine Ser19/Ala19-Mutante hergestellt. Zum einen wurden hierfür N-terminale Peptide chemisch synthetisiert, zum anderen der C-Terminus mit proteinbiochemischen Methoden hergestellt (Abb. 22).

chemisch synthetisierte Peptide (N-Terminus)



rekombinante Cys-Mutante (C-Terminus)

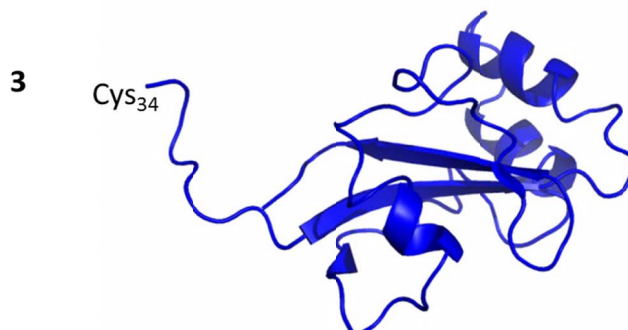


Abb.22: Grafische Darstellung der Semisyntese-Komponenten. **1** und **2** zeigen die beiden chemisch synthetisierten N-Termini mit den Modifikationen an Ser19 zu _pSer19 (**1**) und Ala19 (**2**), mit einem N-Terminus gelabelten ATTO 488-Fluorophor und dem Sulfamylbutyryl-Linker für die spätere native chemische Ligation (NCL). Das Kernlokalisationsignal wurde leicht hervorgehoben dargestellt. **3** zeigt die rekombinante Cystein-Mutante des hPar14-C-Terminus von AS 34-131.

Die beiden größeren chemisch synthetisierten Peptide stellen zwei komplette N-terminale Sequenzen mit einer Länge von 33 AS dar, womit sie genau an der flexiblen Linker-Region mit Gly33 abschließen. Ebenfalls beinhalten die beiden Peptide die jeweils sequenzielle Veränderung zu ρ Ser19 und Ala19, sowie einen N-terminal gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff (ATTO488). Durch ein spezielles Harz (Sulfamylbutyryl Rink Amid AM Resin) können die Peptide direkt nach der Abspaltung mit dem rekombinanten Teil durch native chemische Ligation (NCL) mit dem C-Terminus vereinigt werden [135]. Der rekombinante Teil umfasste den kompletten C-Terminus des Proteins, von Gly34 bis K131, an dessen N-terminalem Ende Gly34 gegen ein Cystein ausgetauscht wurde, das ebenfalls für die spätere NCL benötigt wird. Die durch NCL dargestellten Proteine bildeten die Grundlage für die anschließenden fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen. Die Synthese erfolgte an einem Peptidsynthesizer mit automatisierten Kopplungsschritten (Abschnitt 2.19.2). Die Abspaltung vom Resin wurde manuell vorgenommen.

Da hPar14 neben Phosphorylierungen auch Acetylierungen besitzt, wurde zusätzlich eine weitere Synthesestrategie entwickelt, die es ermöglicht den N-Terminus über kleinere Fragmente zusammenzusetzen. Dadurch ist es möglich PTMs im N-Terminus zu variieren, wodurch eine breite Palette an Kombinationsmöglichkeiten zur Verfügung steht. Außerdem kann man bei kleineren Teilpeptiden, je nach Bedarf, Fragmente substituieren ohne gleich den kompletten N-Terminus synthetisieren zu müssen. So kann der Frage nachgegangen werden, ob es funktionelle Einflüsse der PTMs untereinander gibt oder eine gewisse Kombination aus PTMs die Bindung an einen Interaktionspartner überhaupt erst möglich macht. Für die fragmentierte N-Terminus-Synthese wurde ein handelsübliches Wang-Resin verwendet, bei dem das C-terminale Glycin chemisch durch Thiolyse in einen aktiven Thioester umgewandelt werden kann [136].

3.2.1 Chemische Synthese des ρ Ser19- und Ala19-N-Terminus von hPar14

Die Peptide wurden vollständig in einem automatisierten Verfahren an einem Synthesizer des Modells Syrol (MultisynTech, Witten) parallel hergestellt. Als Trägermaterial der festen Phase wurde ein Fmoc-Gly-4-Sulfamylbutyryl Rink Amide AM Resin verwendet. Es wurden 150 mg Resin pro Ansatz mit einem Substitutionsvolumen von 0,26 mmol/g vorgelegt. Alle Aminosäuren wurden in einem vierfachen molaren Überschuss eingewogen und in 0,1 M HOBt/DMF gelöst. Die Aminosäuren wurden 20 min nach Zugabe der Aktivierungsreagenzien zur Bildung des Aktivesters nacheinander gekoppelt. Vor jedem Kopplungsschritt wurde die Fmoc-Schutzgruppe mittels einer 20 % Piperidin/DMF-Lösung entfernt. Pro Aminosäure wurde eine Kopplungszeit von 30 min eingehalten. Ab der 10. Aminosäure wurde eine Doppelkopplung durchgeführt, um die Effizienz der Synthese zu erhöhen. An Position 21 und 9 kamen sogenannte Pseudoproline zum Einsatz (Abb. 23),

dadurch wurde jeweils ein Syntheseschritt gespart, da es sich bei den Bausteinen um Dipeptide handelt [137]. Die Gesamtzeit der Synthese betrug 2 Tage, 11 Stunden und 30 Minuten. Abschließend wurde manuell der Fluorophor ATTO₄₈₈ mit einer Reaktionszeit von 15 min gekoppelt. Dieser wurde in einem Gemisch aus 1 ml 0,5 M HBTU-Lösung und 1 ml DIEPA/NMP-Lösung aktiviert, wobei die HBTU-Lösung zuerst zum Feststoff gegeben wurde. Nach 15 min wurde der Aktivester wie ein herkömmlicher Fmoc-Baustein an das Peptid gekoppelt.

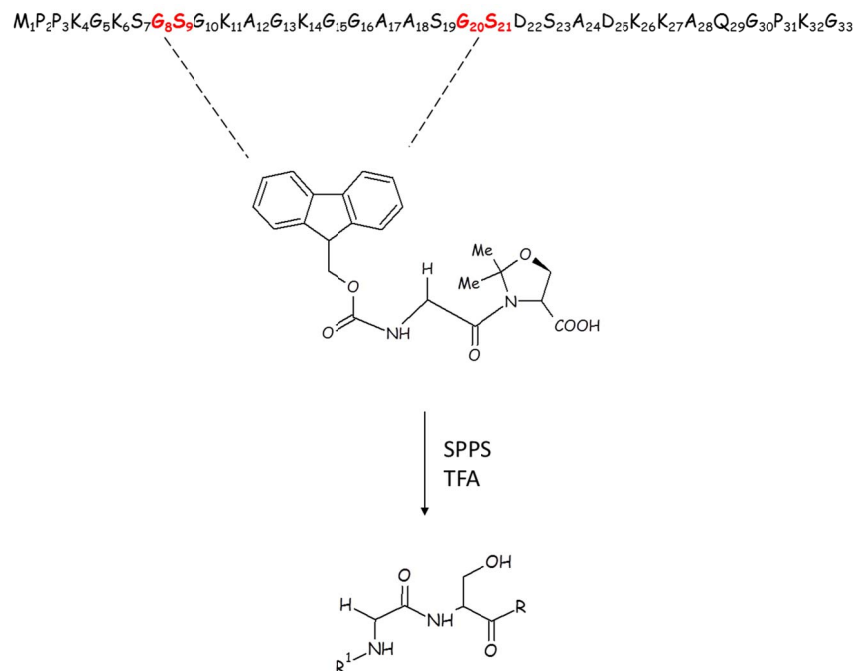


Abb.23: Für die Sequenzfolge Ala-Ser bzw. Gly-Ser können sogenannte Pseudoprolinone eingesetzt werden, die nach saurer Abspaltung von der Prolin-ähnlichen Struktur in die native Form der Aminosäuren Alanin und Serin bzw. Glycin und Serin übergehen. In der N-terminalen Sequenz von Par14 befinden sich drei solcher Stellen, von denen aufgrund einer posttranslationalen Modifikation an Ser19 nur zwei genutzt werden konnten.

3.2.2 Methylierung des sekundären Amins am Resin-Linker der N-Termini

Ohne eine Methylierung des sekundären Amins am Resin-Linker bestünde die Möglichkeit, dass das Peptid mit sich selbst in einer Art Capture/Rearrangement-Mechanismus reagiert und die funktionellen Gruppen für die anschließende NCL nicht mehr zugänglich wären [6]. Durch die Methylierung in unmittelbarer Nähe zur Sulfonylgruppe wird die Reaktivität des sekundären Amins herabgesetzt und ermöglicht eine Abspaltung ohne Nebenreaktionen, dadurch verbessert sich die Handhabbarkeit und die Ausbeute für die bevorstehende NCL (Abb. 24). Die Methylierungsreaktion und anschließende Abspaltreaktion wurde für beide Peptide nach folgendem Schema durchgeführt:

40 mg Resin wurden mit 100 μ l 1 M TMS-CHN₂-Lösung (Diethylether) methyliert. Dazu wurde die TMS-CHN₂-Lösung in 2 ml Hexan/DCM 1:1 überführt und anschließen in den

Spritzenreaktor zum Resin gegeben. Nach 18 h wurde die intensiv rot gefärbte Lösung aus dem Spritzenreaktor entfernt. 1 ml einer Lösung bestehend aus 90 % TFA, 5 % H₂O und 5 % TIS wurde in den Spritzenreaktor gesogen, sodass die Abspaltreaktion zwischen Peptid und Resin gestartet werden konnte. 2 h nach der Spaltung wurden die TFA-Lösung mit dem Peptid in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, der Filter des Spritzenreaktor mit nochmals mit 1 ml TFA-Lösung gespült und die 2 ml TFA-Lösung mit 10 ml Diethylether versetzt. Das Peptid präzipitierte und konnte abzentrifugiert werden. Anschließend wurde es wieder in 2 ml H₂O aufgenommen und über Nacht lyophilisiert. Danach wurde zur Charakterisierung der Peptide ein ESI-MS-Spektrum aufgenommen (Abb. 25).

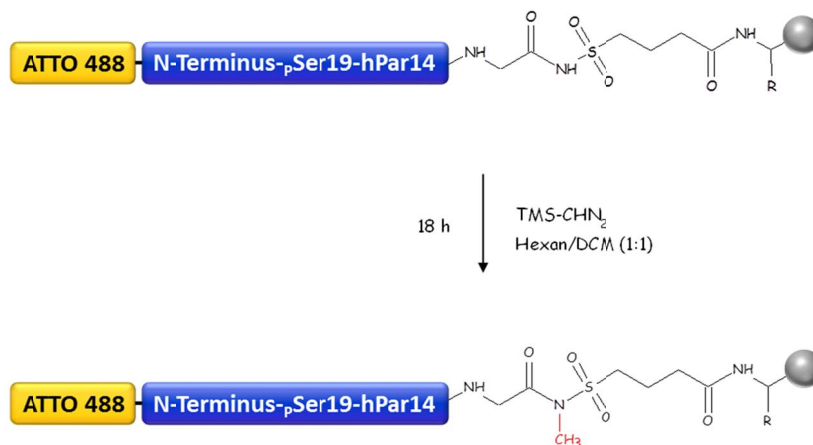


Abb.24: Methylierungsreaktion des sekundären Amins anhand des pSer19-N-Terminus dargestellt. Die Methylgruppe wird eingeführt, um Nebenreaktionen bei der nachfolgenden Thiolysse und der gleichzeitig stattfindenden nativen chemischen Ligation (NCL) zu vermeiden.

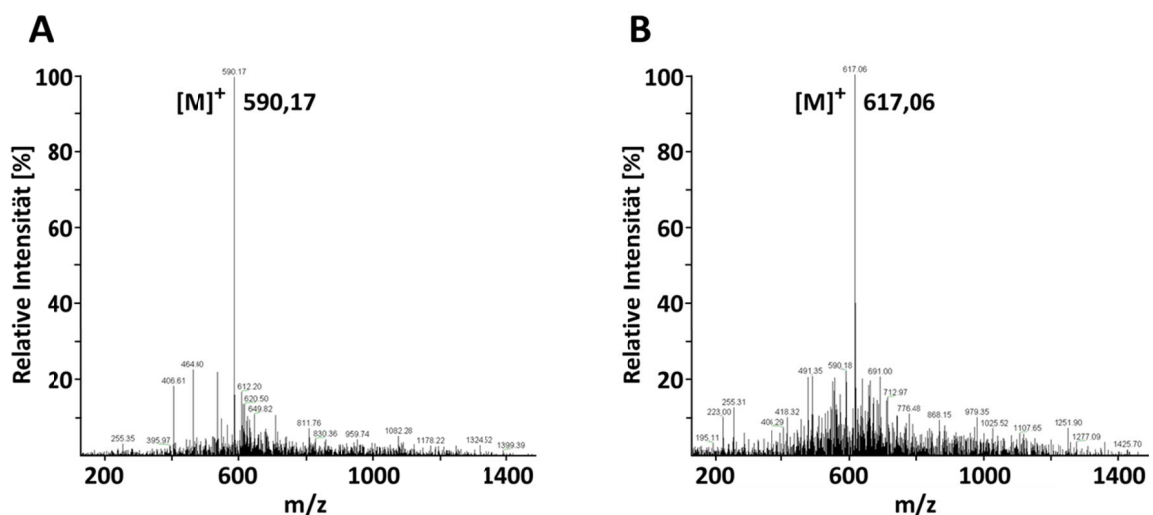


Abb.25: ESI-MS-Spektren der beiden chemisch synthetisierten N-Termini: A zeigt das Spektrum des ATTO 488-Ala19-hPar14, B das Spektrum des ATTO 488-pSer19-hPar14-Polypeptids. Die niedrigen Massen kommen Aufgrund der Mehrfachladungen der Peptide zustande.

3.2.3 Klonierung der Cys34-Variante von hPar14

Für die Semisyntese von hPar14 wurde der C-Terminus rekombinant hergestellt (Abb. 26). Die für dieses Experiment benötigte Sequenz sollte N-terminal an Position 34 mit einem Cystein beginnen und den kompletten C-Terminus mit der funktionellen PPlase-Domäne enthalten, sodass nach der chemischen Ligation mit den synthetischen N-Termini zwei unterschiedliche Proteine des Typs hPar14 entstehen. Zum einen die pSer19-Variante, zum anderen, die Ala19-Variante.

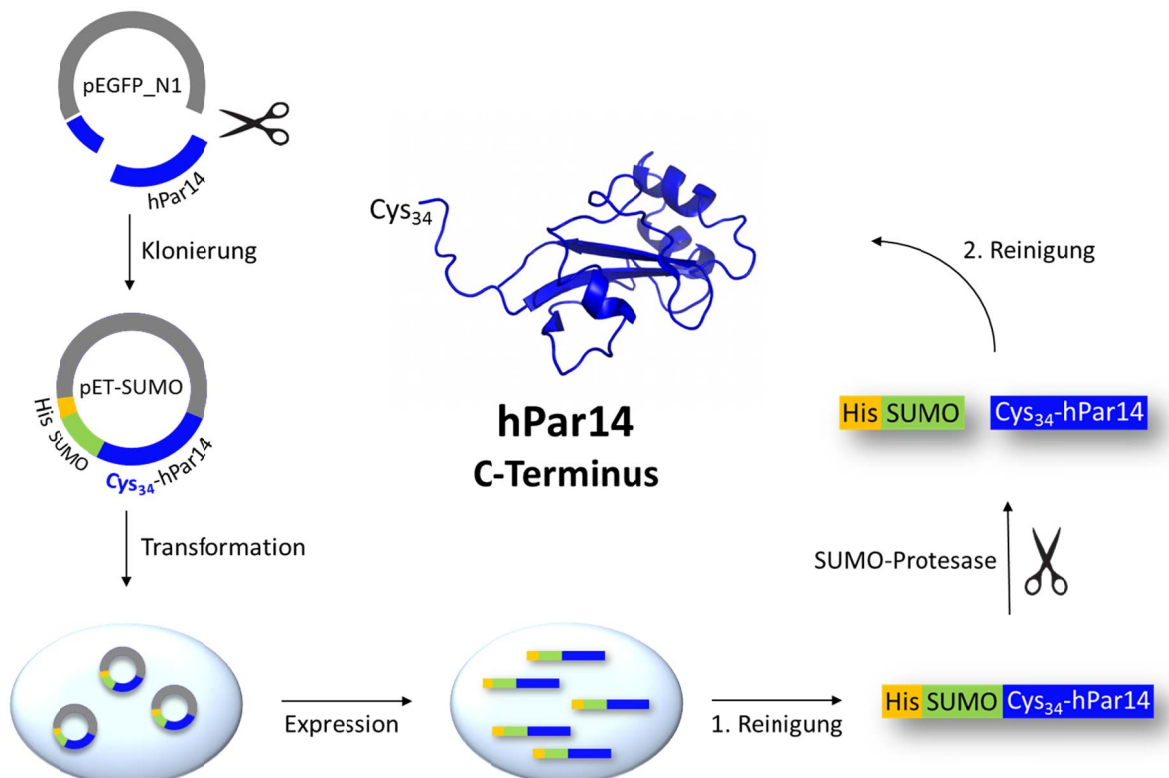


Abb.26: Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte bei der Herstellung der Cys-Mutante des hPar14-C-Terminus: Oben links wird gezeigt wie die gewünschte DNA-Fragment des hPar14 aus dem pEGFP Vektor geschnitten und anschließend in den pET-SUMO-Vektor, mit gleichzeitiger Mutation der AS Gly34 zu Cys34, kloniert wird. Nach der Transformation in den Expressionsstamm BL21 und der darauffolgenden Proteinexpression, wird das Konstrukt über den His-tag des Fusionsproteins gereinigt. Mit Hilfe der SUMO-Protease wird der gewünschte C-Terminus direkt vor dem Cys34 geschnitten und nach der zweiten Reinigung der His-SUMO-tag entfernt.

Die Basis bildete das institutseigene Konstrukt BC520, ein Konstrukt, das das Genom eines *full length* hPar14-EGFP trägt. Als Zielvektor wurde ein pET-SUMO-Vektor mit Kanamycinresistenz verwendet, wie er in Abschnitt 2.7 beschrieben steht. Der *Forward*-Primer (Metabion, Martinsried) ist so gewählt, dass direkt bei der Klonierung die Nukleotide für das gewünschte Cystein an Position 34 in die Sequenz eingebaut wird. Nach der Expression des Cys34-hPar14-Fusionsproteins befindet sich N-terminal ein His-tag, der für die Affinitätsreinigung genutzt wird.

Zuerst wurde die Nukleotidsequenz mittels PCR amplifiziert und in den Vektor kloniert. Mit Hilfe der Restriktionsenzyme BamHI und BsaI konnte das gewünschte PCR-Fragment in den Zielvektor eingebracht werden. Nach der Ligation wurde das Plasmid in elektrokompetente Zellen transformiert, diese auf einer LB-Agarplatte mit 0,1 % Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Von den gewachsenen Kolonien wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt und die Proben über ein Agarosegel analysiert (Abb. 27). Die Banden aus Tasche 1, 3, 5, 7 und 9 wurden aus dem Gel ausgeschnitten und nach einer Miniprep zur Sequenzierung geschickt.

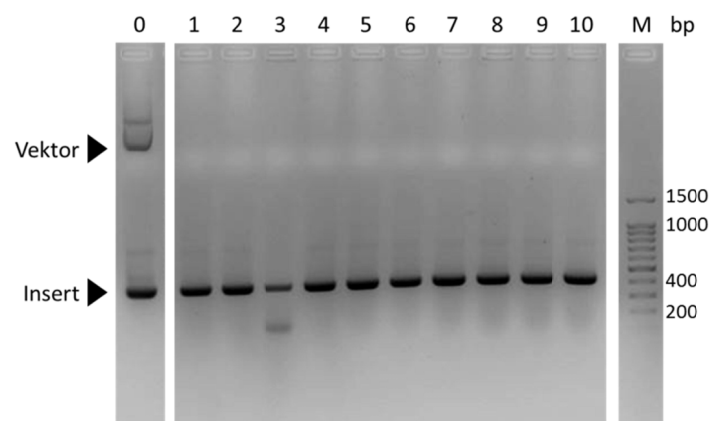


Abb.27: Das Ergebnis der Kolonie-PCR des Cys34-hPar14 Konstrukts. Erklärung erfolgt von links nach rechts. Zuerst ist der Vektor und das Insert zur Kontrolle aufgetragen worden (0), gefolgt von den Banden der einzeln aufgetragenen Kolonien (1-10), rechts ist der Marker mi-100 bp+ DNA Marker Go zu sehen (M).

3.2.4 Expressionstest der Cys34-Mutante von hPar14

Um die optimalen Bedingungen zur Expression des rekombinanten Proteins zu erhalten, wurde ein Expressionstest durchgeführt. Das Vektorkonstrukt Cys34-hPar14 wurde in den Expressionsstamm BL21(DE3)T1r transformiert und über Nacht in LB-Medium, bei 37 °C und 180 rpm schüttelnd inkubiert. Die Kultur wurde am folgenden *tag* zu 100 ml LB-Medium gegeben und alles bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,8 wachsen gelassen. Daraufhin wurden 0,2 % IPTG hinzugefügt und somit die Expression initialisiert. Der Ansatz wurde in drei Proben aufgeteilt und bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen (25 °C, 30 °C und 37 °C) inkubiert. Anschließend wurden die Proben jeweils zum gewünschten Zeitpunkt entnommen, abzentrifugiert, das Pellet in Niedrigsalzpuffer aufgenommen, sonifiziert, nochmals zentrifugiert und sowohl der Überstand als auch das Pellet für den Auftrag auf ein SDS-Gel vorbereitet (Abb. 28). Das Resultat zeigt eine unter allen getesteten Temperaturbedingungen (25 °C, 30 °C und 37 °C) im Gel eine deutlich sichtbare Expression des Proteins.

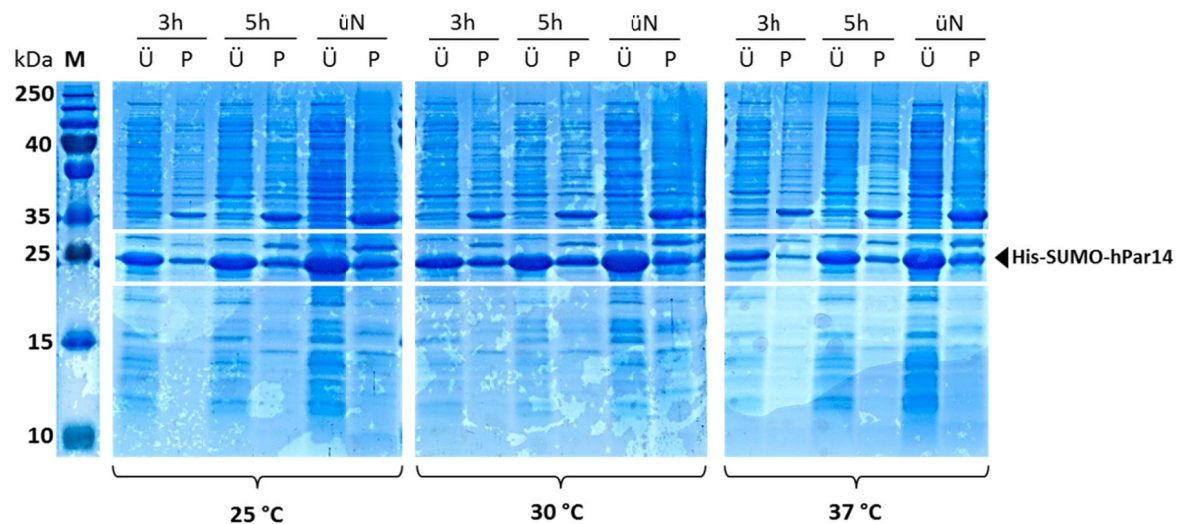


Abb.28: Die SDS-Gele zeigen die Banden exprimierter Proteine bei unterschiedlichen Temperaturen. Jeder Temperaturbereich beinhaltet 3 Proben, die je nach 3 h, 5 h und über Nacht Expression genommen wurden. Der Auftrag erfolgte in der angegebenen Reihenfolge, zuerst Überstand (Ü) und dann Pellet (P). Als Marker wurde der PageRuler Plus Prestained Protein Ladder verwendet.

Da anhand der Ergebnisse des Expressionstest, alle Temperaturbereich gleich gut für die Expression geeignet waren, wurde für die Expression der Hauptkultur eine Temperatur von 37 °C über Nacht gewählt. Die weiteren Einzelheiten zur Expression sind in Kapitel 2.11 aufgeführt.

3.2.5 Reinigung der Cys34-Mutante von hPar14

Nach der Expression des His-SUMO-Cys34-hPar14-Konstruktes folgte die Reinigung des Proteins über den His-tag. Der Überstand aus der Proteinexpression wurde auf eine Nickel-NTA-Säule unter der Verwendung eines HEPES-Äquilibrationpuffers aufgetragen (Abschnitt 2.14). Das gelöste His-SUMO-Fusionsprotein wurde an eine Nickel-NTA-Säule gebunden (Abb. 11). Sämtliche in der Suspension befindlichen unerwünschten Proteine wurden mit dem HEPES-Waschpuffer (siehe Tab. 5) von der Säule gewaschen. Durch mehrmaliges Waschen mit HEPES-Waschpuffer wurden auch unspezifisch an die Säule gebundene Proteine entfernt. Nachdem alle störenden Proteine aus dem System entfernt wurden, konnte das His-SUMO-Fusionsprotein mittels HEPES-Elutionspuffer eluiert und in Fraktionen gesammelt werden. Anhand der Elutionskurve, die bei 280 nm detektiert wurde, konnten Protein-enthaltende Fraktionen bestimmt und je 10 µl einer Fraktion als Probe für eine SDS-Gelelektrophorese entnommen werden. Der im Fusionsprotein enthaltene His-SUMO-tag wurde durch die SUMO-Protease entfernt. 1 µl SUMO-Protease wurde pro 6 mg His-SUMO-Fusionsprotein hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Das abgeschnittene His-SUMO-Fragment wurde daraufhin durch erneutes Reinigen mittels einer Nickel-NTA-Säule entfernt. Der das Cys34-hPar14 enthaltene Waschschrift

wurde diesmal fraktioniert gesammelt und anschließend entsprechend für SDS-Proben vorbereitet. das Chromatogramm des Reinigungslaufes in Abb. 29. Die gesamte Reinigung wurde an einer Biorad *DuoFlow*-FPLC-Anlage (BioRad, Berkeley, USA) durchgeführt. Das SDS-Gel ist in Abb. 30 dargestellt, wo die Fraktionen zwischen 5 und 55 aus dem Reinigungslauf aufgetragen wurden.

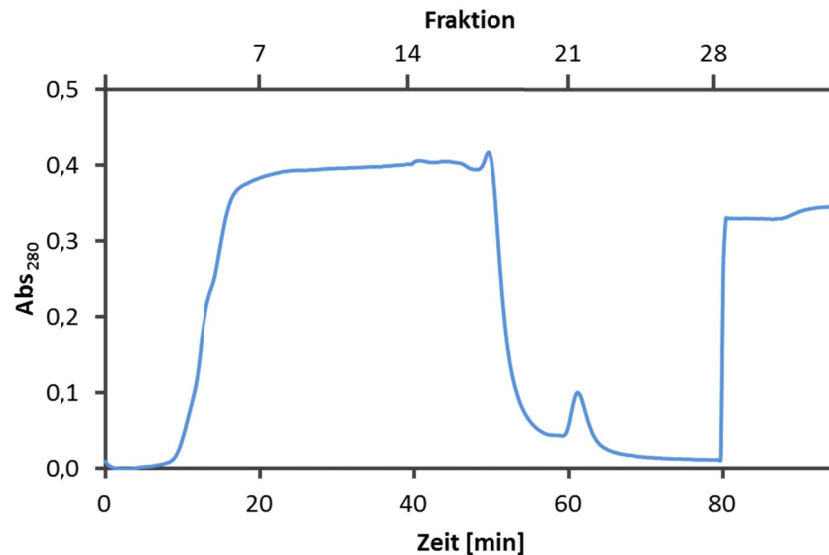


Abb.29: Teilausschnitt des Chromatogramms des Reinigungslaufes von Cys34-hPar14. Es wurden von der ersten Minute an Fraktionen gesammelt, da das Produkt nicht an der Säule bindet, sondern der zuvor geschnittene HIS-SUMO-*tag*. Anhand des steigenden Elutionspeaks ist zu erkennen, dass der His-SUMO-*tag* nach Cys34-hPar14 von der Säule kam. Von den Fraktionen 5, 11, 17, 21, 24, 45 und 55 wurde anschließend eine SDS-PAGE Analyse gemacht.

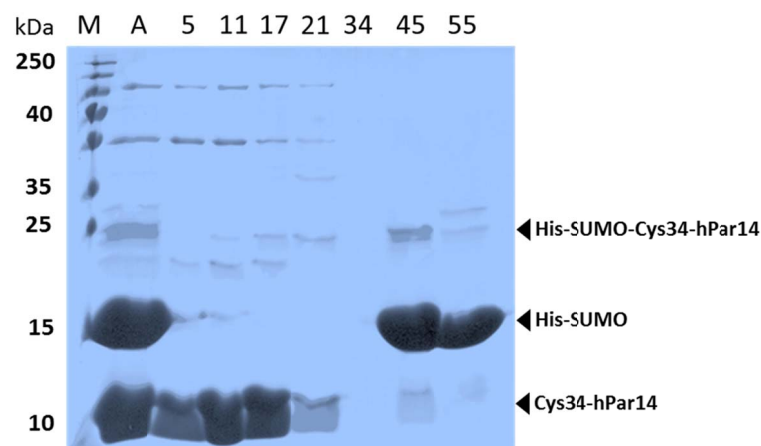


Abb.30: 15 % SDS-Gel mit Auftrag (A) direkt aus dem SUMO-Protease Gemisch, gefolgt von Fraktion 5, 11, 17 und 21 aus dem Durchlauf, Fraktion 34 aus dem Waschschrift und 45 und 55 aus dem Elutionslauf. Bei 25 kDa ist ein Rest ungeschnittenes Protein, bei 15 kDa der His-SUMO-*tag* und bei ca. 11 kDa ist das Produkt Cys34-hPar14 zu sehen.

3.2.6 Massenspektroskopische Untersuchung der Cys34-Mutante von hPar14

Da das Produkt für die anstehende NCL rein sein muss, wurde zusätzlich ein MALDI-MS aus Fraktion 11 des Reinigungsprozesses gemacht. Hierfür wurde das Protein in eine DHAP-Matrix (1:1) eingebettet und das Gemisch auf eine Stahlobjektträger-Kassette (Bruker Daltonik, Bremen) aufgetragen. Das Spektrum zeigte ein homogenes Signal bei 10884,7 Da (Abb. 31), was im Bereich der theoretischen Masse von 10873,7 Da liegt. Die Differenz kann durch Protonenanlagerung zustande gekommen sein. Damit konnte abschließend gezeigt werden, dass die Herstellung des Cys34-hPar14-Konstruktes für die Semisynthese gut funktioniert hat und das Produkt die gewünschte Reinheit besitzt.

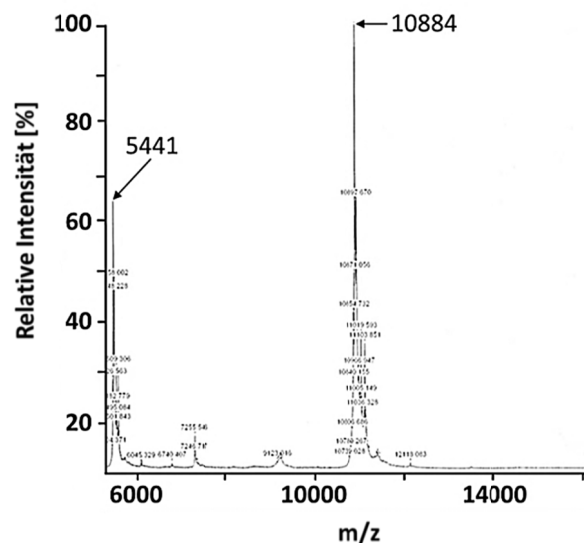


Abb.31: Massenspektrum des gereinigten Cys34-hPar14 C-Terminus.

3.2.7 Native chemische Ligation der ρ Ser19- und Ala19-N-Termini mit rekombinantem Cys34-hPar14-C-Terminus

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die Darstellung der drei für die Semisynthese benötigten Komponenten erläutert. Anschließend an die Synthese wurden die beiden chemisch hergestellten N-Termini separat voneinander mit je einem Cys34-hPar14-C-Terminus in einer NCL zusammengeführt (Abb. 32). Um den N- und den C-Terminus durch chemische Ligation über eine in situ-Thiolyse miteinander zu verbinden, mussten die Edukte erst chemisch aktiviert werden. Dafür wurden 40 mg des synthetischen Peptids in 1 M GnHCl, 60 mM 4-Mercaptophenylacetylsäure (MPPA), 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,5 gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde für 4 Stunden auf den Schüttler inkubiert. Die anschließende Isolierung der Edukte vom Produkt erfolgte über ein Ultracel YM-10-Centricon (Millipore, Schwalbach). Zur Analyse der Reaktion wurden ein MALDI-MS-Spektren gemessen (Abb. 33) und eine CD-Spektralanalyse (3.2.9) durchgeführt.

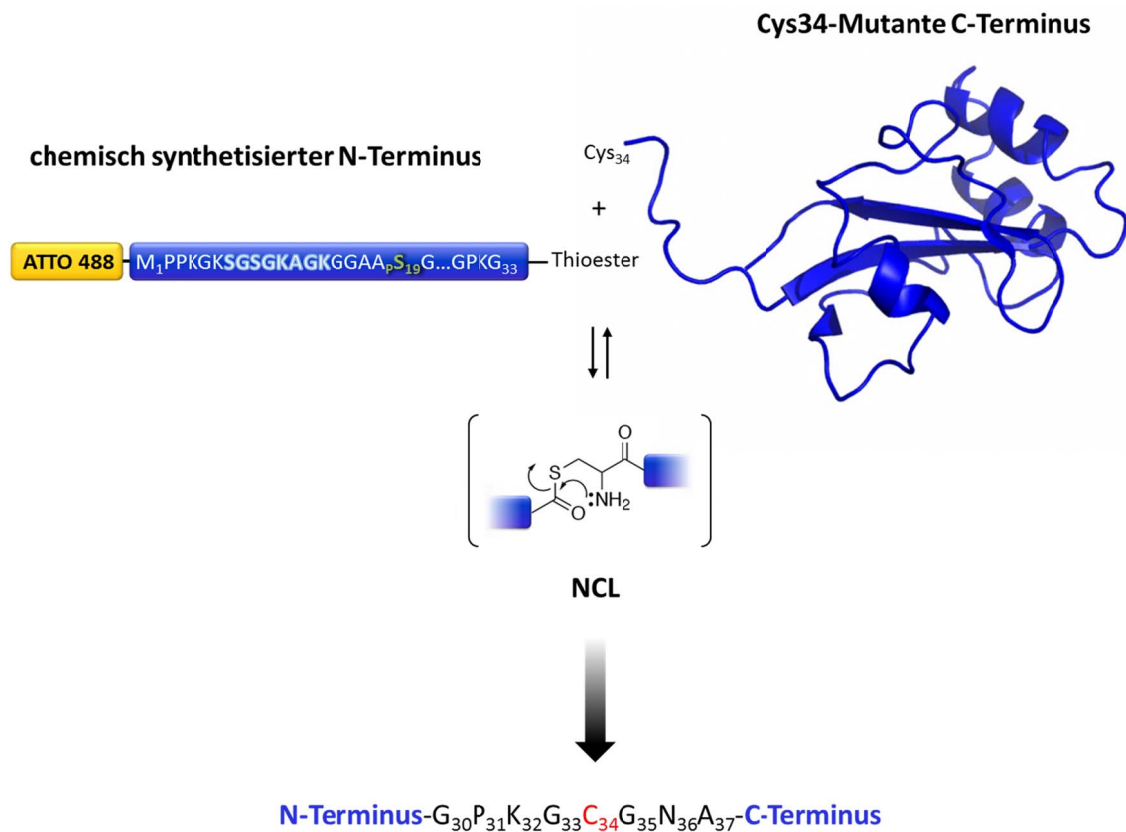


Abb.32: Grafische Gegenüberstellung des pSer19-N-Terminus und des rekombinanten C-Terminus für die Semisyntese von hPar14, die durch NCL zusammengefügt werden. Bei der NCL wird durch einen nukleophilen Angriff des Amins am Carbonylkohlenstoff des Thioesters ein Cystein gebildet. Dieser Schritt ist reversibel und wird durch den Zusatz von Thiolen Richtung Produkt dirigiert. Hier wurde der Übersicht halber auf die Darstellung der Ala19-Variante verzichtet.

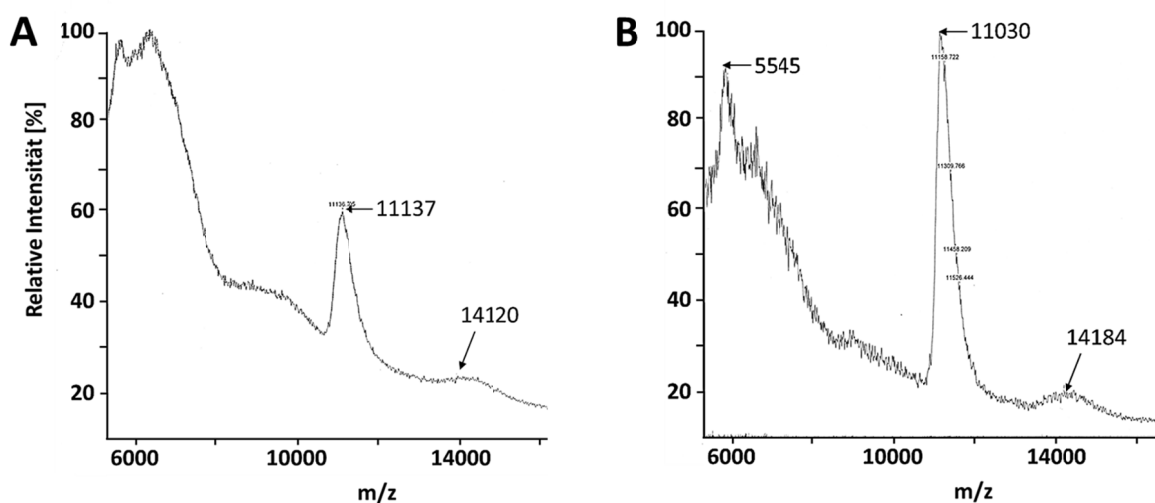


Abb.33: MALDI Spektren der semisynthetischen Proteine von hPar14. (A) Zeigt das Spektrum des ATTO 488-Ala19-hPar14, (B) das Spektrum des ATTO 488-PSer19-hPar14. In beiden Spektren ist ein sehr großer Anteil an Cys34-hPar14 zu erkennen, zusätzlich eine große Schulter am linken Rand beider Spektren. Gemessen wurden die Spektren an einem Autoflex speed MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen).

3.2.9 CD-Spektroskopie der semisynthetischen Varianten des hPar14-Proteins

Die Sekundärstruktur der Proben wurde mittels Circular dichroismus-Spektroskopie (CD) überprüft, um zu klären, ob das semisynthetische Protein im gefalteten Zustand vorliegt und somit der nativen Form des Proteins hPar14 gleicht. Hierfür wurden zunächst die Einzelkomponenten der Semisyntese auf strukturelle Übereinstimmung anhand der CD-Spektren untersucht. Zum einen wurden die einzelnen N-Termini (ρ Ser19 und Ala19) gemessen, zum anderen die Cys34-C-Terminus-Mutante. Als Vergleich diente eine native Referenzprobe, die ebenfalls gemessen wurde. Bei der Referenzprobe handelt es sich um die rekombinante Wildtyp-Form des hPar14 (Expressionsprodukt des Klons BC 880). Je Probe sind 200 μ l mit einer Konzentration von 0,15 mg/ml gemessen worden und es wurde von jedem Spektrum der Pufferbeitrag abgezogen. Da hier unterschiedlich lange Aminosäuresequenzen gemessen wurden, mussten die Daten für einen Vergleich aufeinander abgestimmt werden. Dazu wurde zunächst ein Differenzspektrum der gemessenen Elliptizität von der Referenzprobe (131 AS) und dem Cys34-C-Terminus (98 AS) gebildet. Um nun einen vergleichbaren Wert für die N-Termini (33 AS) zu erlangen, wurden die Daten über die Formel

$$[\theta]_{MRE} = \frac{\theta \cdot 100}{c \cdot d \cdot N} \quad (\text{Gl. 3.1})$$

in die mittlere molare Elliptizität (*mean residue ellipticity*) pro Aminosäurerest $[\theta]_{MRE}$ umgerechnet werden. θ ist die gemessene Elliptizität in Grad, c die Konzentration des Proteins in Mol pro Liter, d die Schichtdicke der Küvette in cm und N die Anzahl der Aminosäurereste im Protein [138]. Nun konnten die Kurven des berechneten N-Terminus aus der gemessenen Referenzprobe und der gemessenen N-Termini ρ Ser19 und Ala19 gegenübergestellt werden (Abb. 34 A) Jede Kurve zeigt eine Mittelung aus zwanzig Spektren pro Probe. Analog würde für die Darstellung C-terminaler Strukturen vorgegangen. Hier wurde ein Differenzspektrum aus der gemessenen Elliptizität der Referenzprobe (131 AS) und des Ala19-N-Terminus (33 AS) gebildet und anschließend nach Gl. 3.1 ein theoretisches Spektrum für den C-Terminus (98 AS) von hPar14 ermittelt. Dieses theoretische Spektrum wurde mit dem gemessenen Spektrum von Cys34-C-Terminus gemeinsam in Abb. 34 B dargestellt.

Ohne für die Spektren der N- und C-Termini eine zusätzliche Sekundärstrukturanalyse gemacht zu haben, kann anhand des Kurvenverlaufs eine Aussage über die strukturelle Ähnlichkeit der jeweiligen Spezies untereinander gemacht werden. Vergleicht man die drei Kurven des Spektrums A aus Abb. 34 mit Spektren aus der Fachliteratur, so entspricht deren Verlauf den klassischen Kurven eines unstrukturierten Proteins [139]. Bei den Kurven aus Abb. 34 B zeigen die C-Termini eher β -Faltblatt-Charakter.

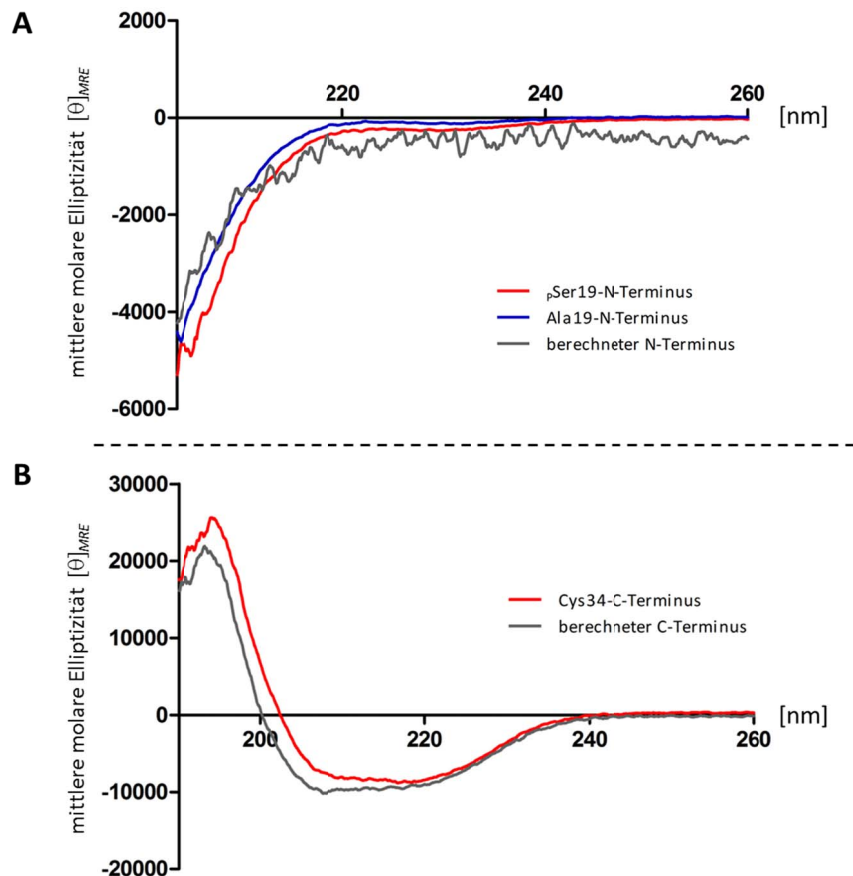


Abb.34: CD-Spektren der mittleren molaren Elliptizität $[\theta]_{MRE}$ für (A) den berechneten N-Terminus aus der Referenzprobe (hPar14) und den beiden chemisch synthetisierten N-Termini ρ Ser19 und Ala19 und für (B) den nach der Formel für die mittlere molare Elliptizität $[\theta]_{MRE}$ berechneten C-Terminus aus der Referenzprobe (hPar14) und dem rekombinanten Cys34-C-Terminus.

Um die Sekundärstruktur der drei vollständigen Proteine mittels CD-Spektroskopie zu vergleichen, wurden die beiden, durch NCL erzeugten Proteine ATTO 488-Ala19-hPar14 und ATTO 488- ρ Ser19-hPar14 zusammen mit dem Wildtyp hPar14 (BC880) gemessen und im folgenden Spektrum dargestellt (Abb. 35).

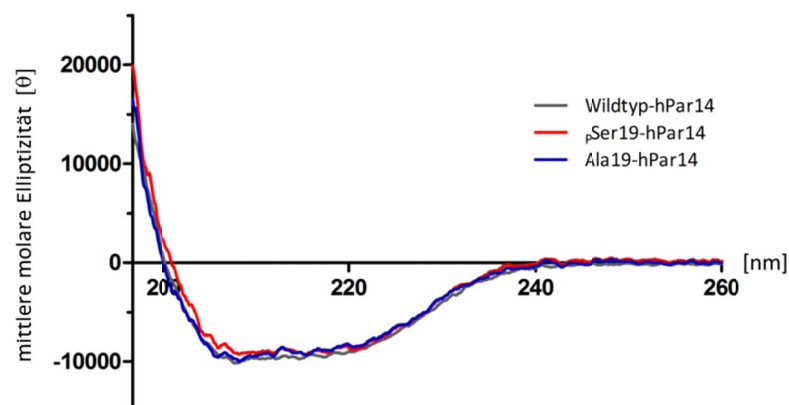


Abb.35: CD-Spektren der beiden semisynthetischen Proteine ATTO 488-Ala19-hPar14, ATTO 488- ρ Ser19-hPar14 und des nativen Wildtyps hPar14 (BC 880).

3.2.9 Sekundärstrukturanalyse der semisynthetischen hPar14-Proteine

Um eine Aussage über die tatsächliche, strukturelle Zusammensetzung der einzelnen Proteine treffen zu können, wurden die Daten aus den vorherigen CD-spektroskopischen Messungen jeweils einzeln mit dem Programm CDSSTR einer statistischen Sekundärstrukturanalyse unterzogen. Das Ergebnis der Analyse ist in Abb. 36 dargestellt, wobei sich die Sekundärstrukturanteile in vier unterschiedliche Bereiche einteilen lassen: Helikale Strukturen, β -Faltblatt-Strukturen, Schleifen (*turns*) und unstrukturiert (*coil*).

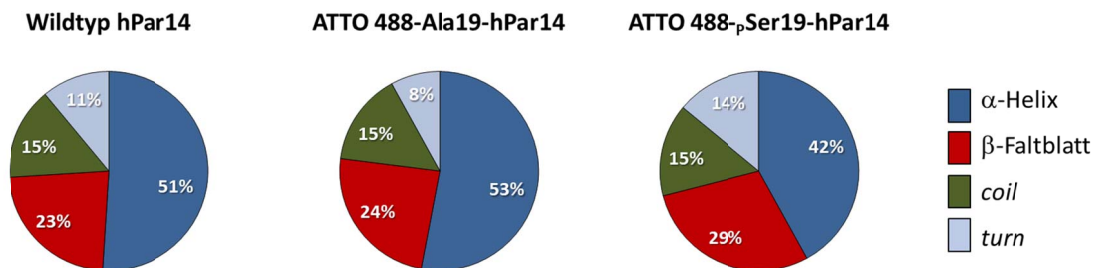


Abb.36: Sekundärstrukturanteil eines rekombinanten hPar14 und beider semisynthetischen Mutanten. Während sich h-Par14 und die Ala19-Mutante strukturell sehr ähnlich sind, zeigt die pSer19-Mutante leichte Abweichungen.

Damit konnte gezeigt werden, dass sich beide semisynthetischen Proteine, nach der nativen chemischen Ligation wieder in einer nativen Struktur organisierten. Wobei das semisynthetische ATTO 488-Ala19-hPar14 Protein eine sehr große Übereinstimmung mit dem Wildtyp des hPar14 aufweist. Das ATTO 488-pSer19-hPar14 hingegen zeigt laut Berechnung eine Abweichung im α -helikalen Bereich von 9 %, im β -Faltblatt Bereich von 6% und im *turn*-Bereich von 3 % auf.

3.2.10 Weitere Peptide zur semisynthetischen Darstellung eines hPar14-N-Terminus

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Peptide zur chemischen Darstellung eines hPar14 N-Terminus synthetisiert. Hierbei wurde speziell darauf geachtet, kleine Sequenzabschnitte zu wählen, die bei Bedarf aneinander gekoppelt werden können (Abb. 37). Der Grund hierfür lag in einer höheren Flexibilität der Variationsmöglichkeiten posttranslationaler Modifikationen. Da hPar14 neben phosphorylierten auch acetylierte Aminosäuren besitzt, ist es interessant zu erfahren, ob sich diese beiden Modifikationen, abhängig voneinander, auf das Bindevverhalten zu möglichen Substraten auswirken. Aus diesem „Baukastensystem“ können nun beispielsweise Sequenzabschnitte mit Phosphorylierung und Acetylierung, nur mit Phosphorylierung oder nur mit Acetylierung zusammengefügt werden. Das Verhalten dieser drei unterschiedlich modifizierten Varianten kann daraufhin in Bindungsassays mit potentiellen Substraten studiert werden. Die in Abb. 38 A gezeigten Peptidfragmente sind in der Reihenfolge ihrer Aminosäuresequenz von 1-4 durchnummeriert worden, wobei das M für Modul steht und

der Buchstabe hinter der Zahl zur Unterscheidung von Sequenzhomologen mit anderer PTMs dient. Des Weiteren wird sich, durch die Belassung der posttranslational modifizierten Peptidfragmente (M2A-M2C) am Wang-Harz, die Option offengehalten, eine spätere Substitution der Fmoc-Schutzgruppe durch ein Fluorophor vorzunehmen. Dadurch können diese Peptide alleine in einem Fluoreszenz-Assay eingesetzt werden.

hPar14 N-Terminus



A Peptidfragmente

- M1: QGPKG-Wang
 M2A: Fmoc-KAGK_{ac}GGAASG-Wang *
 M2B: Fmoc-KAGKGGAA_pSG-Wang *
 M2C: Fmoc-KAGK_{ac}GGAA_pSG-Wang *
 M3: Fmoc-SDSADKKA-OH
 M4: Mant-MPPKKGKSGSG-OH

B *hPar14 N-Terminus Varianten*

- Mant-MPPKKGKSGSG|KAGK_{ac}GGAASG|SDSADKKA|QGPKG-Wang
 ➤ Mant-MPPKKGKSGSG|KAGKGGAA_pSG|SDSADKKA|QGPKG-Wang
 ➤ Mant-MPPKKGKSGSG|KAGK_{ac}GGAA_pSG|SDSADKKA|QGPKG-Wang

Abb.37: Darstellung Fmoc-geschützter Wang-Peptid-Bausteine (A) und deren Kombinations-möglichkeiten, für N-terminale Varianten von hPar14 (B). Zur modifikationsabhängigen Bindungsstudie mit Substraten sind die N-Termini der Peptide mit dem Fluorophor Mant ausgestattet. Die mit * versehenen Peptidfragmente können nachträglich N-terminal modifiziert werden.

Alle sechs in Abb. 3.21 A gezeigten Peptide, wurden manuell mittels SPPS hergestellt: Es wurden 300 mg Fmoc-Ala-Wang-Resin eingewogen und für 2 Stunden in DMF quellen gelassen. Anschließend wurde das Lösungsmittel abgesaugt. Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurden 2 ml einer 20 %igen Piperidin/DMF-Lösung für 15 min auf das gequollene Resin gegeben. Während der Reaktionszeit der Spaltreaktion wurden 5 eq des ersten Fmoc-Bausteins mit je 2 ml 5 M HBTU/DMF- und DIEA/NMP-Lösung zur Bildung eines Aktivesters auf den Aminosäurebaustein gegeben. Es folgte das Waschen mit DMF für 1 min und anschließend die Kopplung der aktivierten Fmoc-Aminosäure. Die Reaktion wurde 20 min unter gelegentlichem Rühren laufen gelassen. Die Reaktionslösung wurde wieder 1 min mit DMF gewaschen, gefolgt von der erneuten Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe. Mit den folgenden Aminosäuren wurde wie oben beschrieben fortgefahren, auf das Abspalten der letzten Fmoc-Schutzgruppe wurde vorerst verzichtet, da die einzelnen Peptide wiederum als Bausteine für größere Fragmente genutzt werden sollen. Einzig bei dem Peptid MPPKKGKSGSG (M1) wurde direkt im Syntheseverlauf der Fluorophor Mant gekoppelt, da es sich bei diesem Peptid um die N-terminale Abschlussequenz handelt. Hierzu wurde im letzten Kopplungsschritt Mant über seine

Carboxylgruppe an die freie Aminogruppe des Methionins kovalent gebunden. Die Aktivierung des Fluorophors wurde analog zu der der anderen Aminosäuren durchgeführt. Nach Entfernen des Lösungsmittels, wurde die Peptide in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und für weitere Versuche aufbewahrt. Alle synthetisierten Peptide dieses Abschnitts wurden in Tab. 22 zusammengefasst. Die Massenspektren der charakterisierten Peptide sind in Abb. 38 gezeigt. Ein Polypeptid aus den Fragmenten M1, M2B, M3 und M4 wurde anschließend hergestellt um zu zeigen, dass die Schrittweise Zusammenführung der Komponenten funktioniert. Das Produkt wurde per SDS-PAGE und LC-ESI-MS charakterisiert (Abb. 39).

Tab. 22: Peptide zur Fragmentkopplung mit unterschiedlichen Modifikationen

Peptid	Modul	Theor. Masse [g mol ⁻¹]	Gem. Masse [g mol ⁻¹]
Mant-MPPKGKSGSG	M1	1078,2	1079,36
Fmoc-KAGK _{ac} GGAASG	M2A	1067,2	1067,08
Fmoc-KAGKGGAA _p SG	M2B	1105,1	1138,31
Fmoc-KAGK _{ac} GGAA _p SG	M2C	1147,1	1195,84
Fmoc-SDSADKKA	M3	1044,8	1044,20
QGPKG-Wang	M4	485,5	486,82

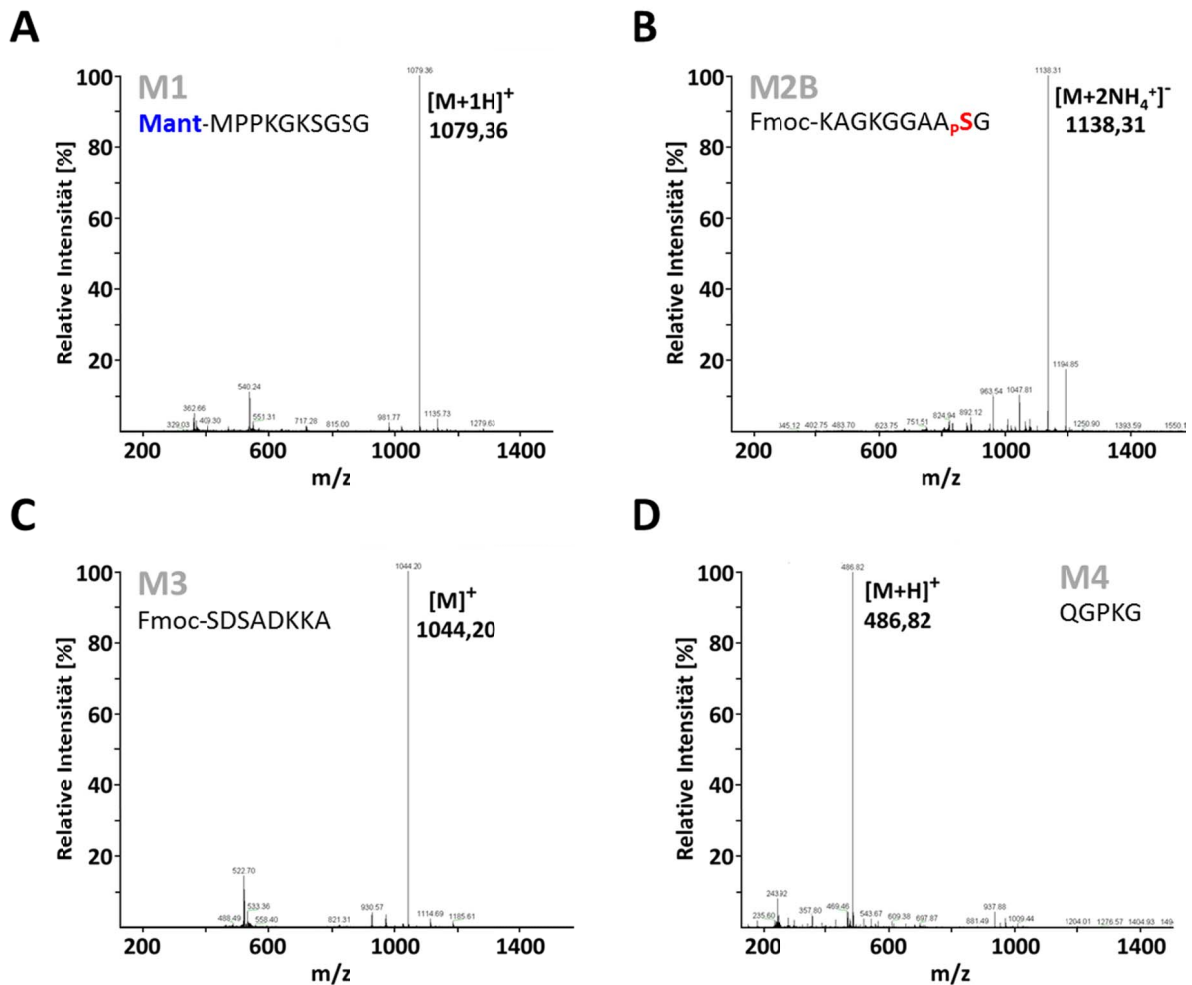


Abb.38: Darstellung der ESI-Massenspektren aller Fragmentpeptide M1(A), M2B(B), M3(C) und M4(D) die anschließend aneinander gekoppelt wurden, um einen hPar14-N-Terminus zu erzeugen. Das Fragmentpeptid M2B wurde im Negativ-Modus gemessen, die anderen Peptide im Positiv Modus (Abschnitt 2.23).

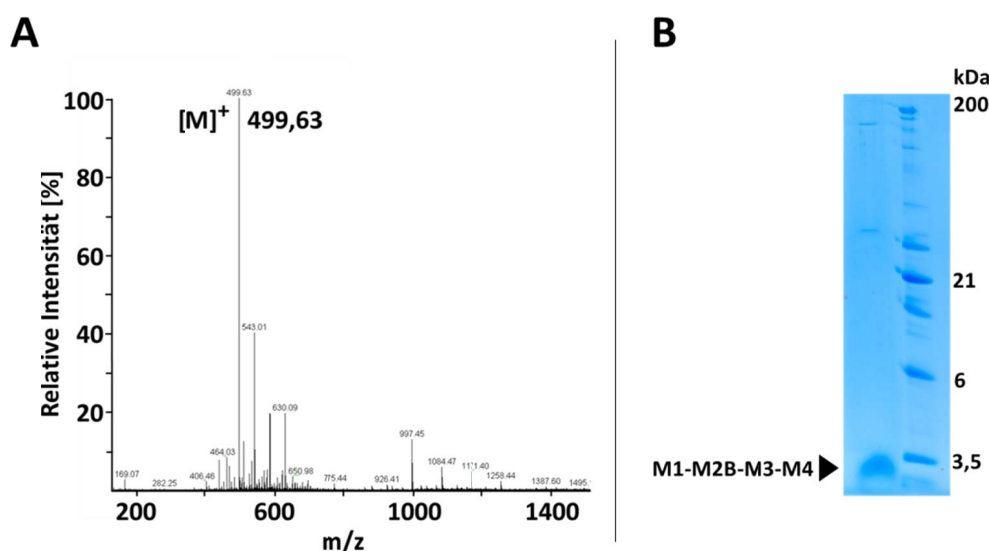


Abb.39: Charakterisierung der Fragmentsynthese aus den Modulen M1, M2B, M3 und M4. **A** zeigt das Spektrum der LC-ESI-MS-Analyse, wobei die detektierte Masse dem 6-fach positiv geladenen Polypeptid entspricht. **B** zeigt das SDS-PAGE-Gel, in dem das Polypeptid bei ca. 3000 Da zu sehen ist. Die Sequenz des synthetisierten Peptids lautet Mant-MPPKGKSGSGKAGKGGAA_pSGSDSADKKAQGPKG.

3.3 Fluoreszenzmikroskopie transienter und injizierter hPar14-Konstrukte

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die semisynthetischen Proteine eine native Faltung aufweisen, daher kann davon ausgegangen werden, dass das Protein biologisch aktiv ist und somit in Zellen seiner natürlichen Funktion nachkommen kann. Um nun zu sehen, welchen Einfluss das phosphorylierte Serin (p Ser19) auf die Funktion des Proteins hat, wurden zunächst drei fluoreszierende Proteine transient in U-2 OS Zellen transfiziert. Hierfür wurde das institutseigene Konstrukt BC 638 verwendet, ein *full length* hPar14, das C-terminal einen EYFP-tag trägt. Aus dem Konstrukt wurde zusätzlich, mittels *Quick-Change*[®] (Agilent technologies), eine Mutation an Aminosäureposition 19 zu Alanin vorgenommen (Ser19/Ala19). Dadurch lässt sich das Protein an dieser Stelle nicht mehr posttranslational modifizieren. Das dritte Protein, welches untersucht wurde, ist EYFP und dient als Kontrolle. Dazu wurde das institutseigene Konstrukt BC 615 verwendet, ein EYFP-Leervektor. Anschließend wurden die semisynthetischen Proteine (Abschnitt 3.2) ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch in U-2 OS Zellen untersucht. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Versuchen, wurden die Proteine in das Cytosol der Zellen injiziert. Als Kontrolle wurde der reine Fluoreszenzfarbstoff ATTO 488 analog zu den semisynthetischen Proteinen in U-2 OS Zellen injiziert und mikroskopiert. Alle Fluoreszenzmikroskopisch untersuchten Proben sind in Tab. 23 noch einmal zusammengefasst.

Anmerkung:

Diese Versuche wurden in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe „Molekulare Zellbiologie“ der Universität Duisburg Essen unter Leitung von Frau Prof. Dr. Perihan Nalbant durchgeführt. Es wurden insgesamt sechs unterschiedliche Proben, Proteine und Fluorophore in Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht, wobei die zellbiologischen Vorbereitungen von Frau Manuela Kowalczyk und die Injektionen von Frau Prof. Dr. Perihan Nalbant vorgenommen wurden.

Tab. 23: Fluoreszenzmikroskopisch untersuchte Proteine und Moleküle

Fluoreszierende Molekül	Klassifizierung
hPar14 _{WT} -EYFP	rekombinantes Protein
hPar14 _{Ala19} -EYFP	rekombinantes Protein
EYFP	Fluorophor
ATTO 488- p Ser19-hPar14	semisynthetisches Protein
ATTO 488-Ala19-hPar14	semisynthetisches Protein
ATTO 488	Fluorophor

3.3.1 Mikroskopie transient transfizierter Proteine

Die drei zu untersuchenden Proben, hPar14_{WT}-EYFP, hPar14_{Ala19}-EYFP und EYFP wurden als Plasmid DNA transient transformiert und in Osteosarkomazellen des Typs U-2 OS kultiviert, wie es in Abschnitt 2.20 beschrieben steht. Anschließend wurden die Proben in einem konfokal Mikroskop (2.20.4) der Firma Nikon fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Abb. 40 zeigt die Aufnahmen von U-2 OS Zellen mit sichtbar gemachtem hPar14_{WT}-EYFP, Zellkernen (DAPI) und F-Aktin (Alexa Fluor® 633 Phalloidin). In den Zellen ist zu sehen, dass hPar14_{WT}-EYFP eine starke Kernlokalisierung aufweist, im Zellkern selber ist eine verstärkte Fluoreszenz in subnuklearen Strukturen zu sehen. Im umgebenden Cytosol ist hPar14_{WT}-EYFP ebenfalls vertreten, allerdings wurde hier ein vergleichsweise geringes Fluoreszenzsignal detektiert.

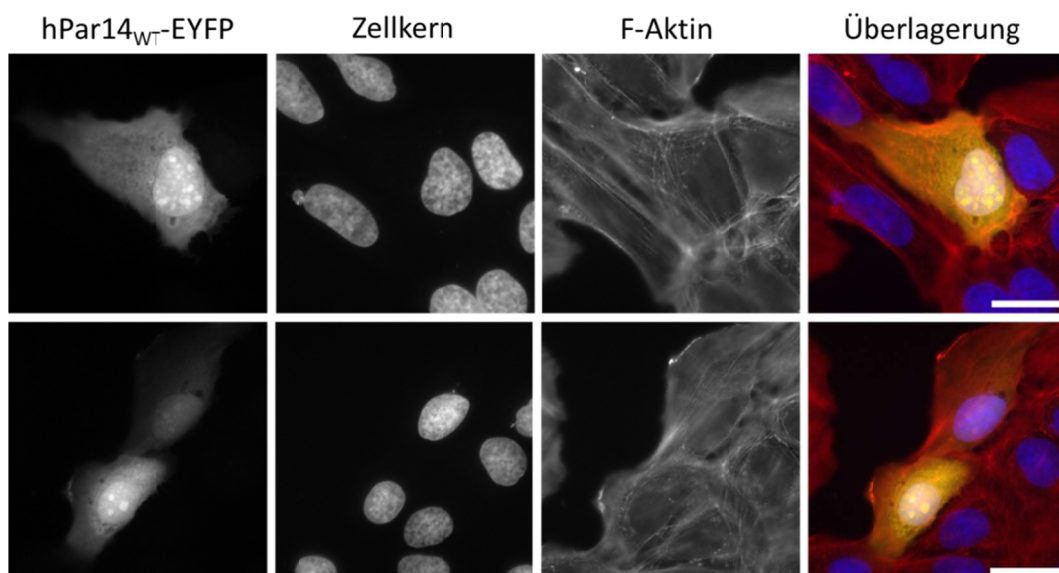


Abb.40: Oben und unten sind zwei repräsentative Aufnahmen fixierter U-2 OS Zellen zur Lokalisation des zuvor transient transfizierten Proteins hPar14_{WT}-EYFP zu sehen. Die monochromen Aufnahmen zeigen von links nach rechts hPar14_{WT}-EYFP, den Zellkern und die F-Aktin-Filamentstruktur der Zelle, ganz rechts ist eine Überlagerung der eingefärbten Kanäle gezeigt. Die Zellkerne wurden mit DAPI, das Aktin-Zytoskelett (F-Aktin) mit Alexa Fluor® 633 Phalloidin angefärbt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Größe von 25 µm.

In Abb. 41 sind die Aufnahmen der fixierten U-2 OS Zellen mit transient transfiziertem hPar14_{Ala19}-EYFP, angefärbtem Zellkernen (DAPI) und angefärbtem F-Aktin-Fasern (Alexa Fluor® 633 Phalloidin) zu sehen. Auch bei der Beobachtung des hPar14_{Ala19}-EYFP-Signals ist eine deutliche Kernlokalisierung festzustellen. Die Proteine zeigen auch hier eine gehäufte Ansammlung in den subnuklearen Strukturen, wobei das hPar14_{Ala19}-EYFP-Fusionsproteins eine schwächere Fluoreszenzintensität im Cytosol zeigt.

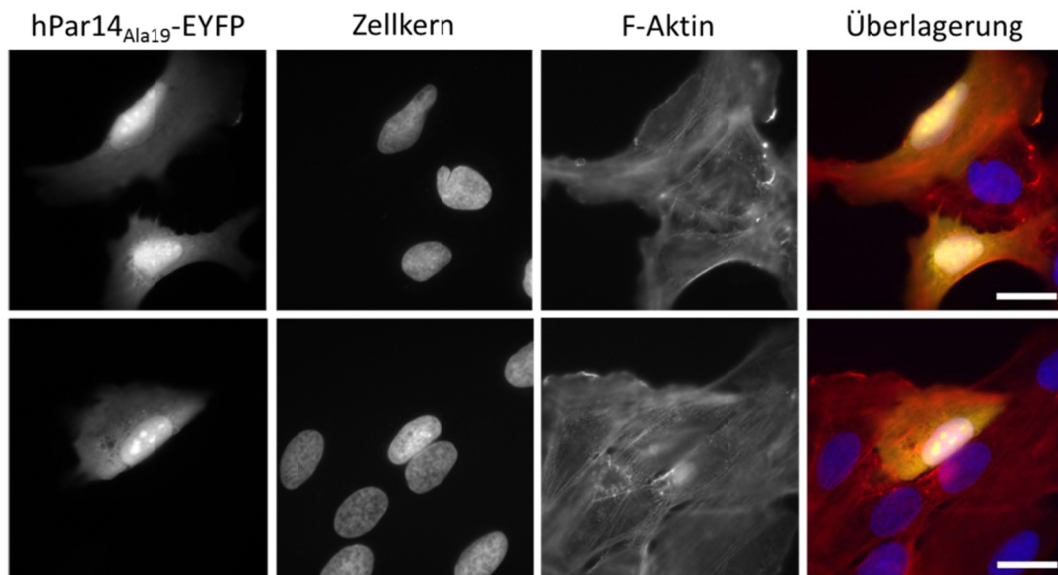


Abb.41: Oben und unten sind zwei repräsentative Aufnahmen fixierter U-2 OS Zellen zur Lokalisation des zuvor transient transfizierten Proteins hPar14_{WT}-EYFP zu sehen. Die monochromen Aufnahmen zeigen von links nach rechts hPar14_{Ala}-EYFP, den Zellkern und die F-Aktin-Filamentstruktur der Zelle, ganz rechts ist eine Überlagerung der eingefärbten Kanäle gezeigt. Die Zellkerne wurden mit DAPI, das Aktin-Zytoskelett (F-Aktin) mit Alexa Fluor® 633 Phalloidin angefärbt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Größe von 25 µm.

Zur Kontrolle wurden weitere Aufnahmen mit einem EYFP-Leervektor gemacht. Hierzu wurden, analog zu vorherigen Versuchen, 50 ng Plasmid-DNA in U-2 OS Zellen transient transfiziert. Die Aufnahmen in Abb. 42 zeigen eine deutliche Kernlokalisierung von EYFP.

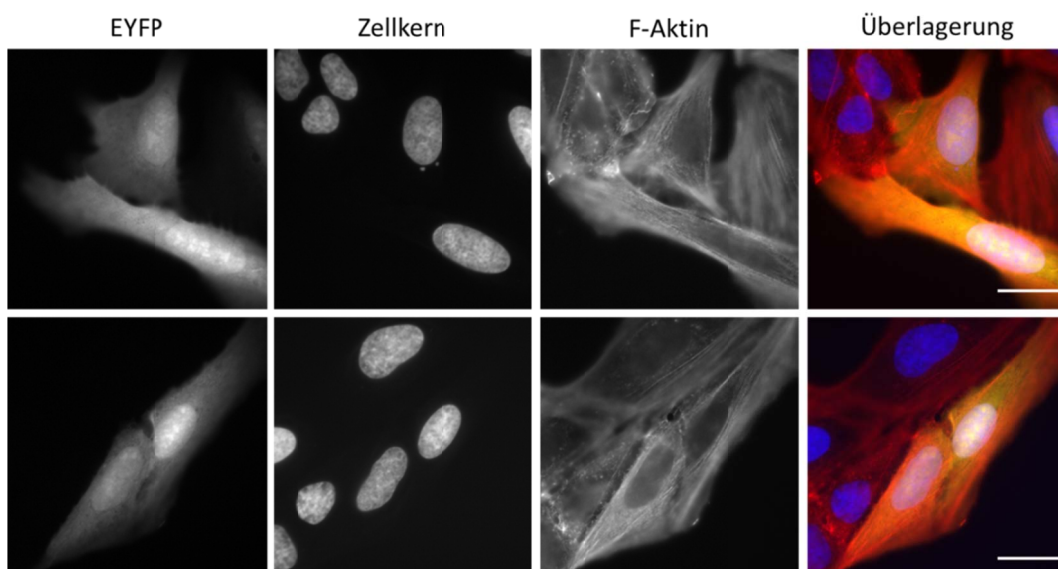


Abb.42: Zwei repräsentative Aufnahmen von 50 ng transient transfizierter Plasmid-DNA des Proteins EYFP in anschließend fixierten U-2 OS Zellen. In der Abb. sind von links nach rechts EYFP, die Zellkerne und F-Aktin dargestellt, ganz rechts ist die Überlagerung der Kanäle gezeigt. Die Zellkerne wurden mit DAPI, das Aktin-Zytoskelett (F-Aktin) mit Alexa Fluor® 633 Phalloidin angefärbt. Die Fokussierung wurde auf die Kerne eingestellt. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Größe von 25 µm.

Zur Analyse der Zellaufnahmen wurde die Software ImageJ verwendet. Das Programm kann Bilder zellmikroskopischer Aufnahmen, anhand der vom Mikroskop verwendeten Filter, in ihre einzelnen Kanäle zerlegen. Mit dem Freihand-Zeichentool des Programms wurde zunächst die gesamte Zelle im EYFP-Kanal umrandet. Um nun einen Intensitätsunterschied der EYFP-Fluoreszenz zwischen Kern und Cytosol messen zu können, wurde anschließend der Kern der bereits umrandeten Zelle im DAPI-Kanal selektiert. Die im DAPI-Kanal markierte Fläche des Kerns wurde im EYFP-Kanal von der Fläche der gesamten Zelle abgezogen, und so indirekt die Fläche des Cytosols bestimmt. Neben der Fläche berechnet das Programm ImageJ gleichzeitig die von dem markierten Bereich ausgehende Leuchtintensität. Diese Werte wurden für den Kern und das Cytosol jeder aufgenommenen Zelle erfasst und in einem Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel 2010) statistisch ausgewertet. Die Leuchtintensität der hellsten Komponente (in diesem Fall der Kern) wurde pro Zelle auf 100 % und die Leuchtintensität der dunkleren Komponente (Cytosol) wurde in das entsprechende, prozentuale Verhältnis gesetzt. Insgesamt wurden 19 Zellen mit transient transformiertem hPar14^{WT}-EYFP und 15 Zellen mit hPar14^{Ala19}-EYFP ausgezählt und bewertet (Abb. 43).

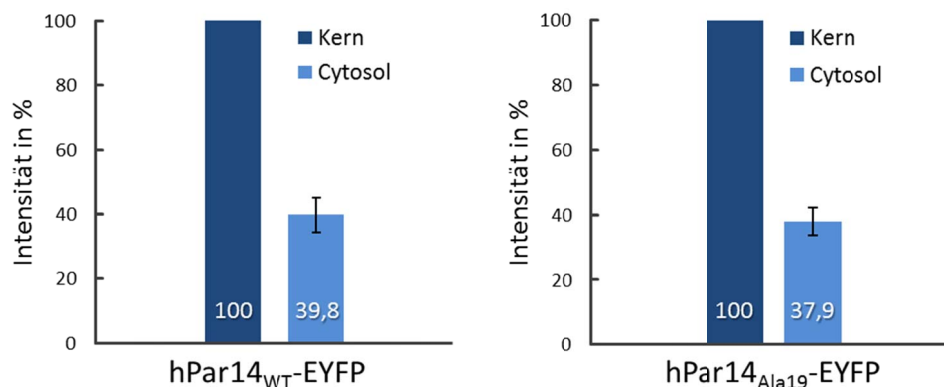


Abb.43: Statistische Gegenüberstellung der gemittelten Fluoreszenzsignalintensitäten der transient transfizierten hPar14-EYFP-Proteine. Die Leuchtintensität des Zellkerns wurde in beiden Messungen auf 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardfehler von 19 (hPar14^{WT}) bzw. 15 (hPar14^{Ala19}) Zellen.

Die Auswertung der Aufnahmen zeigt zwischen dem Wildtyp des hPar14-EYFP und der Ala19-Mutante des gleichen Proteins keinen signifikanten Unterschied. Jedoch zeigen beide Proteine eine stärkere Fluoreszenzintensität in den Kernen, wobei subnukleare Strukturen die stärkste Signalintensität aufwiesen.

3.3.2 Mikroskopie injizierter Proteine

Um die biologische Aktivität der in dieser Arbeit semisynthetisch hergestellten Proteine (3.2) zu testen, wurden sie unter gleichen zellbiologischen Bedingungen wie die transient transfizierten Proteine untersucht. Bei den vorliegenden Experimenten wurden die beiden semisynthetischen Proteine des hPar14 in das Cytosol von Osteosarkomazellen des Typs U-2 OS injiziert. Die zu injizierenden Proteine hatten eine Konzentration von 100 μM in 0,2 M Kaliumphosphat-Puffer (KPi -Puffer) bei einem pH von 7,5. Vor der Mikroinjektion wurde die Proteinlösung 30 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Zeitraum der Injektion umfasste 15 min. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C inkubiert. Darauf folgten die Fixierung der Zellen mit Formaldehyd und die Färbung der Kerne mit DAPI. Nach der Injektion wurden die Proben in einem konfokalen Laser-Raster Mikroskop (2.20.5) der Firma Leica fluoreszenzmikroskopisch untersucht, wobei hier das Licht definierter Wellenlängen für die spezifischen Fluoreszenzsignale der eingesetzten Farbstoffe durch die in Tab. 18 angegebenen Filter selektiert wurde. In Abb. 44 werden zwei repräsentative Aufnahmen der ρSer19 -Variante mit dem Fluorophor ATTO 488 gezeigt, zusätzlich sind die mit DAPI angefärbten Kernstrukturen in der mittleren Abb. zu sehen. Hier kann man eine Abgrenzung der ATTO 488- ρSer19 -hPar14-Proteine zum Kern deutlich erkennen, auch eine Anreicherung der Proteine in den subnuklearen Strukturen ist deutlich sichtbar. Generell ist festzustellen, dass das Intensitätsverhältnis der Fluoreszenzsignale bei diesen Aufnahmen nicht so stark divergent wie bei den Aufnahmen der transient transfizierten Proben ist.

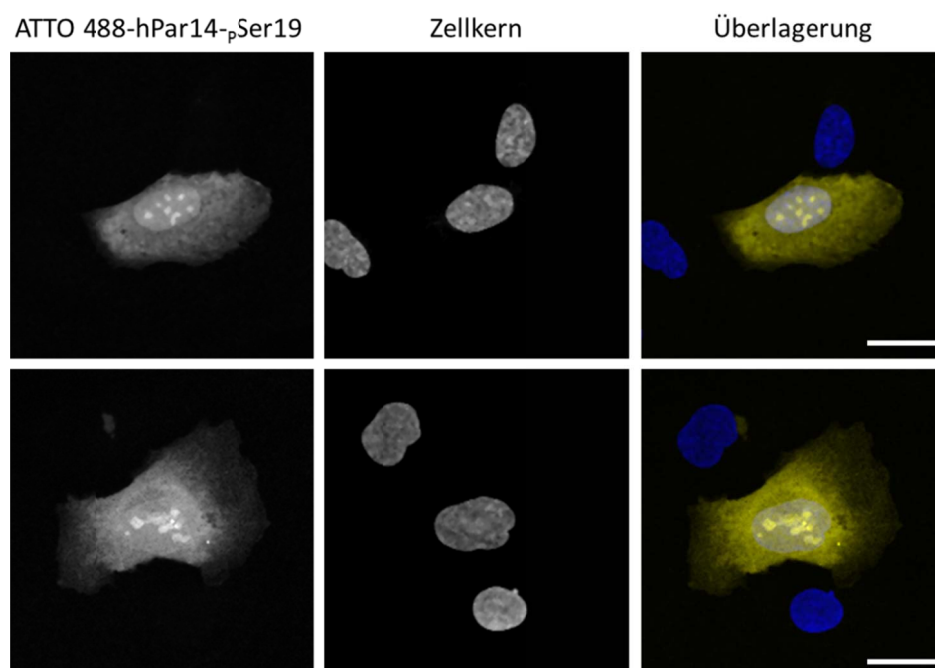


Abb.44: Ausgewählte Aufnahmen von fixierten U-2 OS-Zellen zur Lokalisation von zuvor injiziertem Protein ATTO 488- ρSer19 -hPar14. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Ganz links sind die monochrom

dargestellten Fluoreszenzsignale des ATTO 488- ρ Ser19-hPar14 Proteins gezeigt, wobei eine verstärkte Intensität von subnuklearen Strukturen ausgeht. Rechts daneben sind die mit DAPI gefärbten Zellkerne zu erkennen und ganz rechts ist die Überlagerung der beiden aufgenommenen Kanäle dargestellt. Die Injektionskonzentrationen der Proteine betragen $100 \mu\text{M}$ in $0,2 \text{ M}$ Kaliumphosphat-Puffer (KP_i -Puffer), bei einem pH von 7,5. Der Maßstab wird über den weißen Balken in den rechten Bildern definiert, dieser entspricht einer Größe von $25 \mu\text{m}$.

In der folgenden Abb. wird analog zu den gezeigten Bildern in Abb. 45, eine repräsentative Auswahl der Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von U-2 OS Zellen mit injizierten, semisynthetisch hergestellten Ala19-Varianten gezeigt. Hier wurde, ebenso wie in der vorherigen Darstellung, eine Färbung des Zellkerns mit DAPI vorgenommen, um eine spätere Signalanalyse zu ermöglichen und die Lokalisation des Proteins in der Zelle besser zuordnen zu können. In diesen Aufnahmen ist anhand des Fluoreszenzsignals eine wesentlich schwächere Kernlokalisation auszumachen. Dennoch zeigt sich auch hier wieder die Anlagerung des Proteins in subnuklearen Kompartimenten, daher

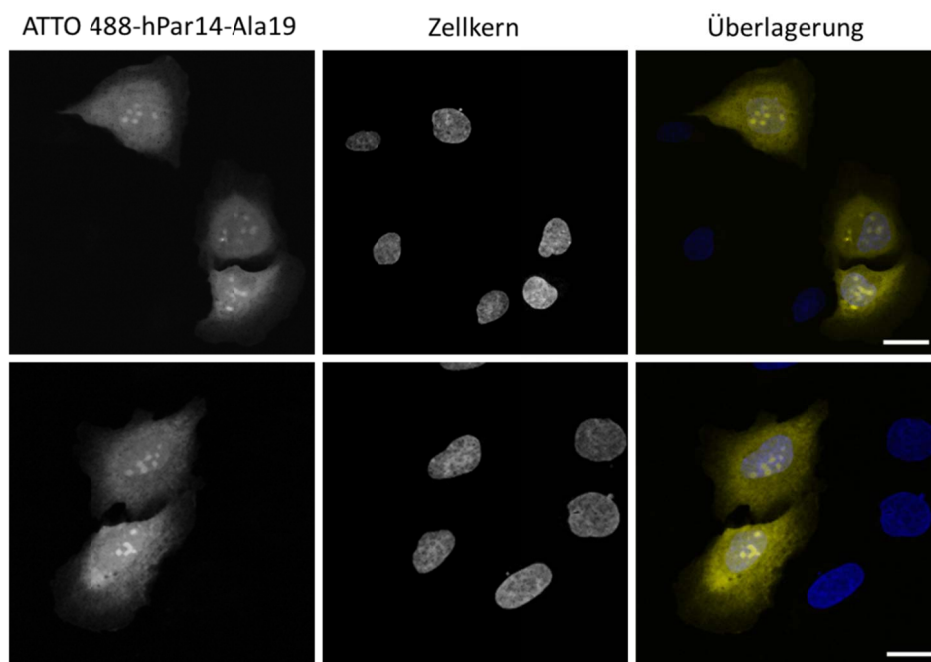


Abb.45: Zwei ausgewählte repräsentative Aufnahmen fixierter U-2 OS-Zellen zur Lokalisation von zuvor injiziertem Protein ATTO488-Ala19-hPar14. Ganz links sind in monochromer Darstellung die Fluoreszenzsignale des ATTO 488- ρ Ser19-hPar14 Proteins gezeigt. Daneben sind die mit DAPI angefärbten Zellkerne zu sehen (mittleres Bild). Rechts eine Überlagerung beider Kanäle. Die Konzentration der injizierten Proteine betragen $100 \mu\text{M}$ in $0,2 \text{ M}$ Kaliumphosphat-Puffer (KP_i -Puffer) bei einem pH von 7,5. Der Maßstab wird über den weißen Balken in den rechten Bildern definiert, dieser entspricht einer Größe von $25 \mu\text{m}$.

Neben den beiden semisynthetischen Proteinen wurde eine Kontrollinjektion des reinen Farbstoffs in das Cytosol der U-2 OS Zellen vorgenommen, um einen möglichen Effekt des Farbstoffs auf die Proteine ausschließen zu können. Die mikroskopischen Aufnahmen sind in Abb. 46 dargestellt. Die Aufnahmen zeigen keine gehäufte Kernlokalisation des

Farbstoffs, womit ein positiv dirigierender Effekt auf die Lokalisation der Proteine ausgeschlossen werden kann.



Abb.46: Kontrollaufnahme des injizierten Fluorophors ATTO 488 in anschließend fixierten U-2 OS Zellen. Im mittleren Bild sind die Zellkerne, angefärbt mit DAPI, zu sehen. Die Injektionskonzentrationen des Farbstoffs betrug 100 μM in 0,2 M Kaliumphosphat-Puffer. Als Maßstabsreferenz dient der weiße Balken im rechten Bilde, dies entspricht einer Größe von 25 μm .

Für eine statistische Analyse wurden die Zellaufnahmen mittels der Software ImageJ ausgewertet. Die Markierung und Subtraktion der beiden Flächen wurde genau wie in den zuvor analysierten Aufnahmen der transfizierten Proteine vorgenommen. Die Fluoreszenzintensitäten wurden für den Kern und das Cytosol aller aufgenommenen Zellen erfasst und in einem Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel 2010) statistisch ausgewertet. Die Intensität der hellsten Komponente (in diesem Fall der Kern) wurde pro Zelle auf 100 % und die Intensität der dunkleren Komponente (Cytosol) in das entsprechende, prozentuale Verhältnis gesetzt. Die Statistik umfasst für das Protein ATTO488-hPar14-pSer19 insgesamt 18 Zellen, für das Protein ATTO488-hPar14-Ala19 wurden Bilder von 21 Zellen ausgewertet.

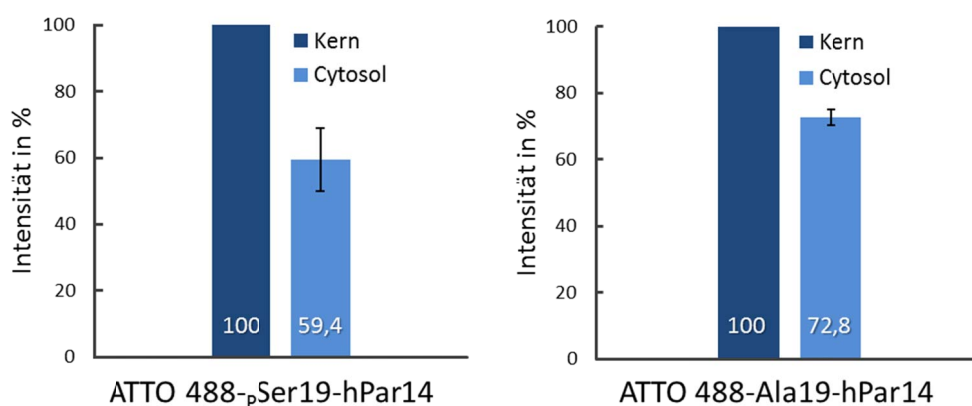


Abb.47: Statistische Gegenüberstellung der gemittelten Fluoreszenzsignalintensitäten der injizierten semisynthetischen hPar14 Proteine. Die Leuchtintensität des Zellkerns wurde in beiden Messungen auf 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardfehler von 18 (ATTO 488-pSer19-hPar14) bzw. 21 (ATTO 488-Ala19-hPar14) Zellen.

Bei der Betrachtung der statistischen Auswertung (Abb. 47) wurde ein minimal signifikanter Unterschied zwischen den beiden Protein-Varianten festgestellt. Abgeleitet aus der Leuchtintensität des Fluorophors zeigt die pSer19 -Variante eine 40,6 % geringere cytosolische Fluoreszenz gegenüber dem Kern. Wobei die cytosolische Fluoreszenz bei der Ala19-Variante nur ganze 27,2 % schwächer ist als die Fluoreszenz des Proteins im Kern.

Daher lässt sich beim alleinigen Vergleich der hier ermittelten Ergebnisse, unbeachtet möglicher Nebeneinflüsse, die Aussage treffen, dass hPar14 durch die Phosphorylierung der Aminosäure Serin 19 eine marginal höhere Kernlokalisierung aufweist, als ihr durch Alanin 19 substituiertes Pondon. Damit ist die Auswirkung der PTM an dieser Stelle vermutlich zwar förderlich, allerdings nicht ausschließlich für eine Kernlokalisierung verantwortlich.

3.4 Bindungsstudien zwischen hPar14-Peptiden und den Bromodomänen PCAF, GCN5, BRDT(1) und BRD4(2)

Neben den möglichen Phosphorylierungen, besitzt hPar14 im N-terminalen Bereich sehr viele Lysine, die als potentielle Acetylierungsmotive dienen können. Der Nachweis von Acetylierungen in Parvulin 14 wurde 2009 veröffentlicht [27]. Ähnlich wie hPar14 besitzen auch Histone N-terminal unstrukturierte Enden ohne katalytische Domänen. Von den Histonen ist bereits bekannt, dass sie in zahlreichen Fällen acetyliert vorliegen [103]. Bei den Substraten, die in der Veröffentlichung genannt werden, handelt es sich hauptsächlich um Peptide aus den Histonen 3 und 4. Um nun herauszufinden ob Bromodomänen hPar14 als Substrat ebenfalls erkennen, wurden die Plasmide aus der Veröffentlichung angefordert. Diese wurden mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. Stefan Knapp (Oxford University, GB) zur Verfügung gestellt. Es wurden hier die DNA-Konstrukte der Bromodomänen von PCAF, GCN5, BRDT(1) und BRD4(2) gewählt um zu überprüfen, ob sie an hPar14 binden, da diese Substrate mit der acetylierten Sequenz KGG binden, die auch in hPar14 vorkommt. Mit BRDT1 und BRD4(2) sind zwei Vertreter der BET-Bromodomänen-Familie darunter, die sich dadurch auszeichnen auch doppelt oder mehrfach acetylierte Motive zu erkennen und an sie zu binden [102]. Für die Bindungsstudien von hPar14 an oben genannten Bromodomänen wurden daher 4 unterschiedliche Peptide über Fmoc-basierte SPPS synthetisiert (Abschnitt 2.21.1). Die Peptide bestehen aus den Aminosäuren 8-18 aus der Sequenz des N-Terminus von hPar14 (Abb. 48). Dieser Sequenzabschnitt beinhaltet zwei Lysine, die in den Peptiden in allen Variationsmöglichkeiten (acetyliert und unacetyliert) eingebaut wurden. Um eine Bindungsstudie mittels Anisotropie-Messungen vornehmen zu können, wurde ein Fluoreszenzlabel (Rhodamin B) N-terminal an alle 4 Peptide synthetisiert.

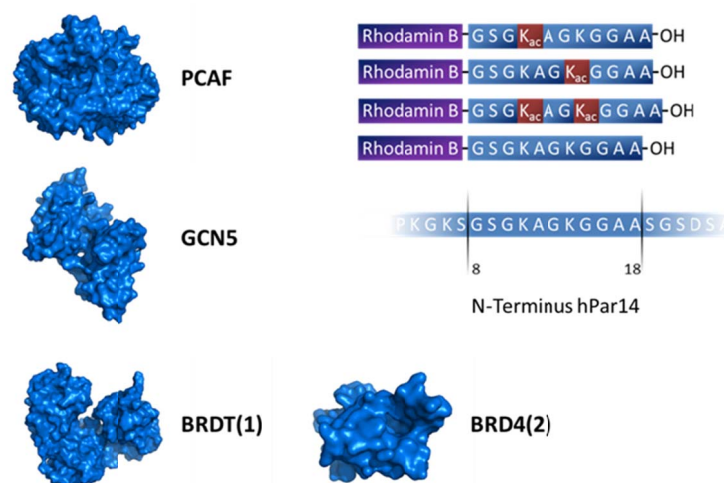


Abb.48: Übersichtsdarstellung der Strukturoberfläche der vier Bromodomänen PCAF, GCN5, BRDT(1) und BRD4(2) sowie der synthetisierten Peptide aus der N-terminalen Sequenz von hPar14 für Fluoreszenzanisotropie-Spektroskopie. Die Peptide sind unterschiedlich acetyliert und N-terminal mit Rhodamin B markiert.

3.4.1 Synthese von Peptiden aus der N-terminalen Sequenz des hPar14

Die Synthese von acetylierten Peptiden erwies sich in der SPPS nach dem Fmoc-Prinzip als unproblematisch, da durch die Acetylierung des Seitenkettenamins von Lysin, eine zu Nebenreaktionen neigende, positive Ladung neutralisiert wird. Für die hier synthetisierten Peptide wurde mit einem klassischen Wang-Resin gearbeitet, an dem die erste Aminosäure (C-terminal) bereits vorinstalliert ist. Für die anschließende Fluoreszenzanisotropie Messung wurde N-terminal der Fluorophor Rhodamin B gekoppelt. Alle Variationen an synthetisierten Peptiden sind in Abb. 49 dargestellt.

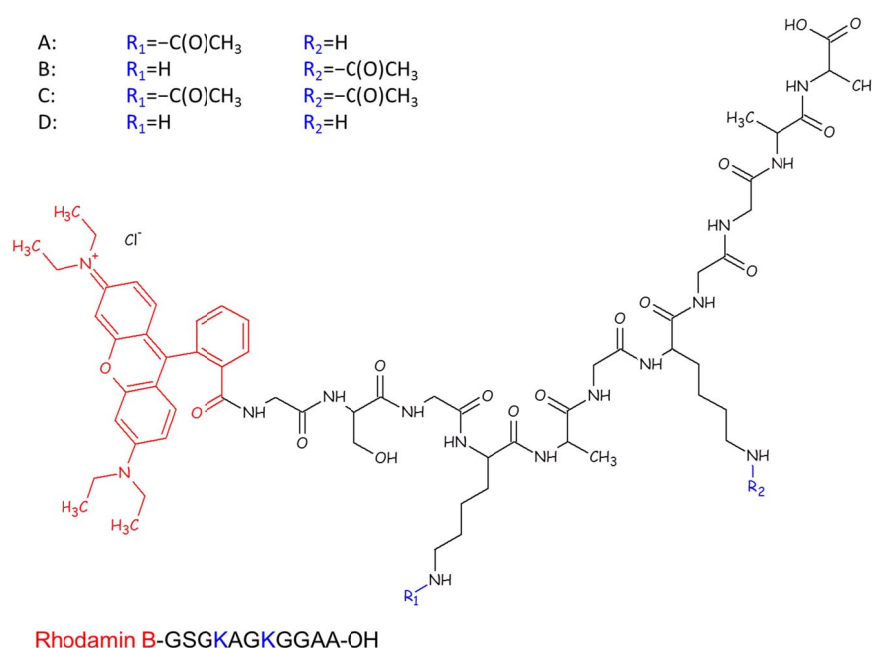


Abb.49: Lewis-Struktur und Aminosäuresequenz der synthetisierten Peptide, hier rot dargestellt der Fluorophor Rhodamin B und in blau die Variationen an Acetylierungen (A-D).

Vor Synthesebeginn wurden 300 mg Fmoc-Ala-Wang-Resin für 2 h in DMF aufgequollen. Nach dem Quellen des Resins wurde das Lösungsmittel unter Anlegen eines Vakuums abgesaugt. Die vorinstallierte Fmoc-Schutzgruppe wurde mit 2 ml einer 20%igen Piperidin/DMF Lösung für 15 min abgespalten. Die hier verwendeten acetylierten Aminosäurebausteine wurden in einer doppelten Kopplung aufgebracht. Für die Anisotropie-Messungen wurde das Fluorophor Rhodamin B N-terminal an das Peptid gekoppelt. Durch die para-ständige Carboxylgruppe am Benzylring des Rhodamin B konnte der Fluorophor mit den Aktivierungsreagenzien HBTU und DIEPA in einen Aktivester überführt und wie eine Aminosäure N-terminal an das Peptid gekoppelt werden. Rhodamin B wurde im vierfachen molaren Überschuss eingewogen. Die chemische Installation des Fluorophors fand unter Lichtausschluss statt, um einen

mögliche vorzeitige Zersetzung des Farbstoffs zu verhindern. Nach der Synthese wurde das Peptid in ein 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 5 ml eines Gemischs aus 95 % TFA; 2,5 % DIEPA und 2,5 % ddH₂O vom Resin abgespalten. Für die Reaktionszeit von 2 Stunden wurde das Falcon-Reaktionsgefäß gegen UV-Einstrahlung geschützt, um Lichtreaktionen des Fluorophors zu unterbinden. Auf diese Weise wurden insgesamt vier verschiedene Peptide hergestellt (Tab. 24). Die unterschiedlichen Acetylierungen in den Peptiden wurden entsprechend der Sequenz der PPlase hPar14, an Aminosäurepositionen K11 und K14 eingebaut. Als Referenzspektrum ist in Abb. 50 das ESI-MS-Spektrum des Peptids Rhodamin B-GSGK_{ac}AGK_{ac}GGAA-OH gezeigt, weitere Spektren befinden sich im Anhang.

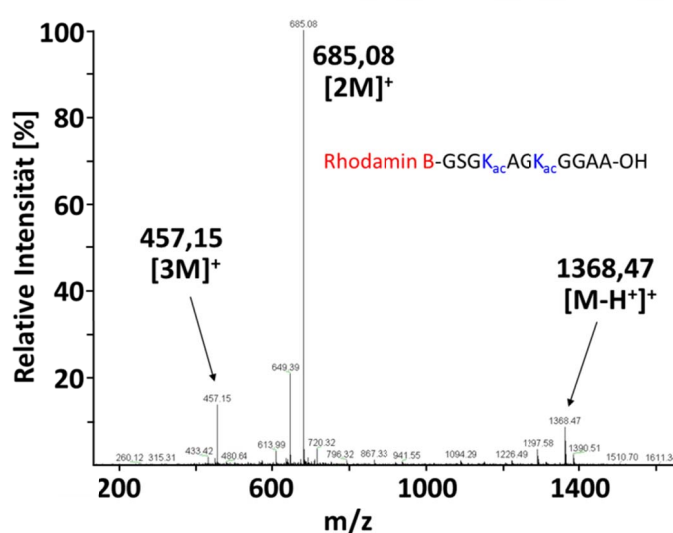


Abb.50: ESI-MS-Spektrum der Verbindung Rhodamin B-GSGK_{ac}AGK_{ac}GGAA-OH, mit der charakteristischen Masse von 1368,47. Neben der Masse des einfach geladenen Moleküls, ist ebenfalls die doppelte und dreifache Masse im ESI-MS detektiert worden. Das Peptid wurde im positiv-Modus gemessen.

Tab. 24: Fluoreszenzpeptide für Anisotropie-Messungen mit ihren theoretischen Massen.

hPar14-Peptid	Theor. Masse [g mol ⁻¹]	Gem. Masse [g mol ⁻¹]
Rhodamin B-GSGK _{ac} AGKGGAA-OH	1327,5	664,15
Rhodamin B-GSGKAGK _{ac} GGAA-OH	1327,5	664,15
Rhodamin B-GSGK _{ac} AGK _{ac} GGAA-OH	1369,5	685,13
Rhodamin B-GSGKAGKGGAA-OH	1285,5	429,22

3.4.2 Expression und Reinigung der Bromodomänen

Exemplarisch wird an dieser Stelle die Expression und Reinigung der Bromodomäne PCAF beschrieben, analog dazu fand die Expression und Reinigung der Bromodomänen GCN5, BRD4(2) und BRDT1 statt. Das Plasmid der Bromodomäne aus dem Protein PCAF wurde in den *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3)T1r transformiert. Das Fusionsprotein des

pNIC28-Bsa4-Vektors trägt vor der Bromodomäne einen N-terminalen His-tag für die nachfolgende Reinigung über eine Ni-NTA-Säule. Die Expression erfolgte nach Induktion durch Zugabe von IPTG bei einer optischen Dichte von 0,8 über Nacht bei 18 °C. Am folgenden Tag wurde das abzentrifugierte Pellet in Niedrigsalz-Puffer resuspendiert und der Proteaseinhibitor PMSF zugefügt. Die Zellen wurden durch Zugabe von Lysozym und einen Ultraschall-Sonifikator aufgeschlossen. Anschließend wurde durch Ultrazentrifugation die Proteinsuspension von den übrigen Zellbestandteilen getrennt. Für die FPLC-Reinigung des His-Fusionsproteins wurde HEPES-Puffer verwendet und über einen Konzentrationsgradienten durch Imidazol wurde das Protein eluiert. Das FPLC-Chromatogramm zeigte in allen vier Fällen einen einzelnen Peak. Exemplarisch ist hier der Reinigungslauf der Bromodomäne PCAF dargestellt (Abb. 51). Die Reinheit wurde durch eine 15 %ige SDS-PAGE kontrolliert (Abb. 52). Die Konzentrierung des Proteins erfolgte anschließend in einem 15 ml Amicon™ Ultra (Millipore) für Proteindurchmesser von 10kDa, wodurch es gleichzeitig umgepuffert wurde.

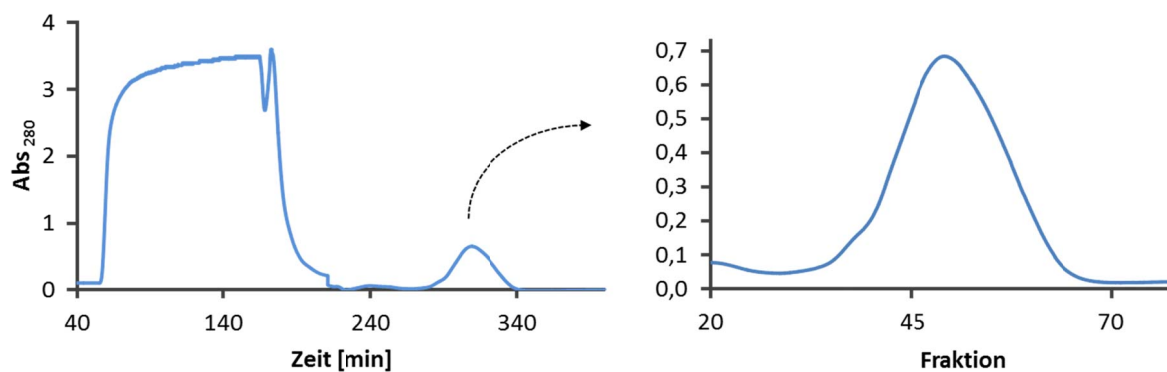


Abb.51: Chromatogramm des Reinigungslaufs der Bromodomäne PCAF. Links der komplette Lauf bei einer Detektion von 280 nm, rechts der Elutionspeak aus dem Zeitintervall von 270 bis 350 min vergrößert, auf der X-Achse sind die Fraktionsnummern angegeben. Aus den Fraktionen 41-49 wurden selektiv Proben für SDS-PAGE entnommen.

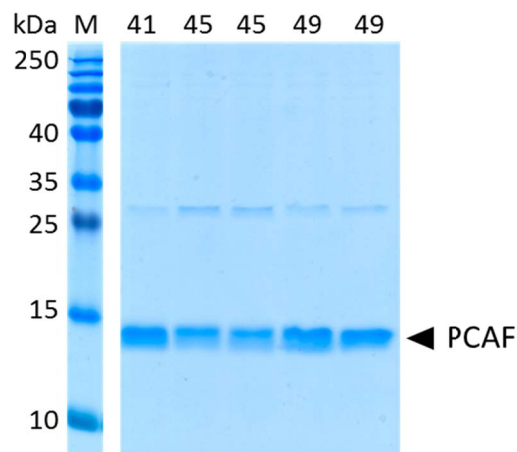


Abb.52: 15 % SDS-PAGE-Gel mit ausgewählten Fraktionen aus dem FPLC-Reinigungslauf der Bromodomäne PCAF. In einigen Fraktionen sind zusätzlich bindende Proteine zu sehen.

3.4.2 Titrationsen der Bromodomänen PCAF, GCN5, BRDT(1) und BRD4(2) gegen 4 unterschiedlich modifizierte Peptide aus hPar14

Mit Hilfe der Fluoreszenzanisotropie wurden die synthetisierten Peptide auf ihre Bindungsaffinität zu den einzelnen Bromodomänen hin untersucht. Jedes Peptid besitzt eine unterschiedlich starke Affinität für ein jeweiliges Acetylierungsmuster. Die Fluoreszenzanisotropie wurde über Rhodamin B ermittelt. Eine Zunahme des Anisotropie-Signals kann als Zeichen einer Bindung des Farbstoff-gekoppelten Peptids an die Bromodomäne gedeutet werden. Dieser Effekt ist auf die längere Rotationskorrelationszeit zurückzuführen, die sich durch eine Bindung des Farbstoff-Peptids an die verhältnismäßig großen Bromodomänen ergibt. Um eine genaue Bindungsvorhersage treffen zu können, wurden für alle Bromodomänen Titrationskurven mit 8 Messpunkten erstellt. Es wurden 1 μM Peptid vorgelegt und die Bromodomänen mit steigender Konzentration hinzutitriert. Die Konzentration der Bromodomäne wurde in jedem Titrationsschritt verdoppelt, sodass bei einer Bindung ein hyperboler Verlauf erwartet werden konnte. In den folgenden Abschnitten werden die Titrationskurven in Bezug auf je eine Bromodomäne beschrieben. Gemessen wurde in HEPES-Puffer (Tab. 5) bei einem pH von 7,5. Die Konzentrationen der Bromodomänen richteten sich nach ihrer Stabilität in HEPES-Puffer. Eine zu hohe Konzentrierung der Probe führte bei der Bromodomäne BRDT1 zu Präzipitation.

3.4.2.1 Affinitätsstudie der hPar14 Peptide zu den Bromodomänen PCAF, GCN5, BRDT1 und BRD4(2) mittels Fluoreszenzanisotropie

Mithilfe der Fluoreszenzanisotropie sollte gezeigt werden, ob acetylierte Lysinmotive im N-Terminus von hPar14 als möglicher Bindungspartner für die vier Bromodomänen in Frage kommen. Jedes Peptid wurde mit 11 μM vorgelegt und die Bromodomäne PCAF mit steigender Konzentration von 1,4 μM bis 176,4 μM hinzu pipettiert. Die Titrationskurven sind in Abb. 53 dargestellt. Die Datenpunkte wurden anschließend mit dem Programm GraphPadPrism ausgewertet und über die Funktion ‚one site specific binding‘ eine Regressionsanalyse vorgenommen, die in Tab. 25 zusammenfassend dargestellt sind.

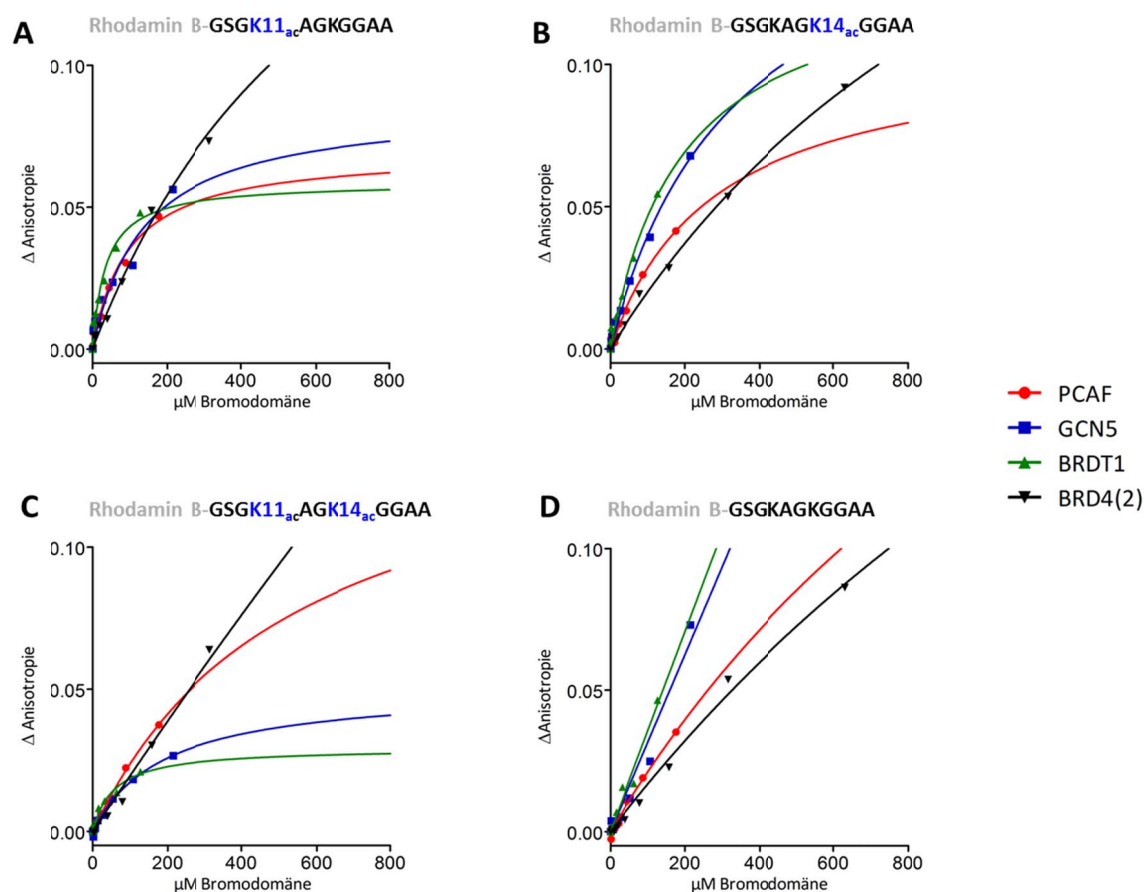


Abb.53: Titrationskurven der Bromodomäne PCAF gegen die vier unterschiedlich modifizierten Peptide. Bei der Titration wurde die Fluoreszenzanisotropie des Farbstoffs Rhodamin B gemessen. Die Konzentration des vorgelegten Peptids betrug in allen Messungen 1 μM .

Tab. 25: K_D -Werte für die Bindung zwischen Peptid und der Bromodomäne PCAF

hPar14-Peptid	Bromodomäne	K_D -Wert [μM]
Rhodamin B-GSGK _{ac} AGKGGAA	PCAF	95,5
	GCN5	138
	BRDT1	36
	BRD4(2)	743
Rhodamin B-GSGKAGK _{ac} GGAA	PCAF	280,3
	GCN5	335,8
	BRDT1	195,9
	BRD4(2)	1354
Rhodamin B-GSGK _{ac} AGK _{ac} GGAA	PCAF	550,8
	GCN5	192
	BRDT1	57,23
	BRD4(2)	9033
Rhodamin B-GSGKAGKGGAA	PCAF	1650
	GCN5	>10000
	BRDT1	>10000
	BRD4(2)	2548

Abschließend lässt sich über die Affinitätsversuche sagen, dass die acetylierte Sequenz von K11 von der Bromodomäne BRDT1 als Substrat gebunden wird. Der K_D -Wert liegt bei 36 μM . Auch die beiden Bromodomänen PCAF und GCN5 liegen mit K_D -Werten von 95,5 μM und 138 μM unter denen der anderen Peptide. BRD4(2) besitzt dagegen einen K_D -Wert von 743 μM und kann somit als Binder für die Variante ausgeschlossen werden. Die doppeltacetylierte Variante zeigt gegenüber BRDT1 mit 57 μM die höchste Affinität. Somit konnte gezeigt werden, dass BRDT1 als möglicher Bindungspartner für hPar14 in Frage kommt, sowohl für die einfache Acetylierung an K11 als auch für die doppeltacetylierte Form an K11 und K14.

4 Diskussion

4.1 Chemisch synthetisierte sulfatierte Peptide

Ziel war es eine stabile Synthese für sulfatierte Peptide zu entwickeln. Da Sulfat unter sauren Bedingungen nicht stabil ist [140], treten Probleme bei der Abspaltung der Peptide von der festen Phase auf. Dies ist oft mit hohen Ausbeuteverlusten verbunden. Die Darstellung sulfatierter Peptide bereitete zu Beginn dieser Arbeit nicht nur chemisch bedingt große Schwierigkeiten. Die Massenspektroskopische Analyse, wie sie im späteren Verlauf der Arbeit angewandt wurde, konnte anfangs nicht durchgeführt und musste aufwendig weggeschickt werden, da es kein geeignetes Massenspektrometer im Institut gab. Erst durch die Inbetriebnahme eines MALDI Massenspektrometers und später durch ein LC-MS war es möglich Spektren der synthetisierten Verbindungen direkt vor Ort zu messen. Dadurch konnten Testabspaltungen der Peptide innerhalb kurzer Zeitabstände gemessen, analysiert und optimiert werden.

Zunächst wurde versucht die Peptide unter herkömmlichen Bedingungen mit 95% TFA und einer Reaktionszeit von 3,5 h abzuspalten, um zu sehen, wieviel der gewünschten PTM durch die saure Abspaltung verloren gegangen ist. Später wurden die Säuremengen und Reaktionszeiten verringert, bis ein optimales Ergebnis erreicht wurde. In Abb.54 sieht man zwei MALDI Spektren, die einmal mit 95 % TFA (A) und einmal bei 50 % TFA (B) mit einer Reaktionszeit von 1 h abgespalten wurden.

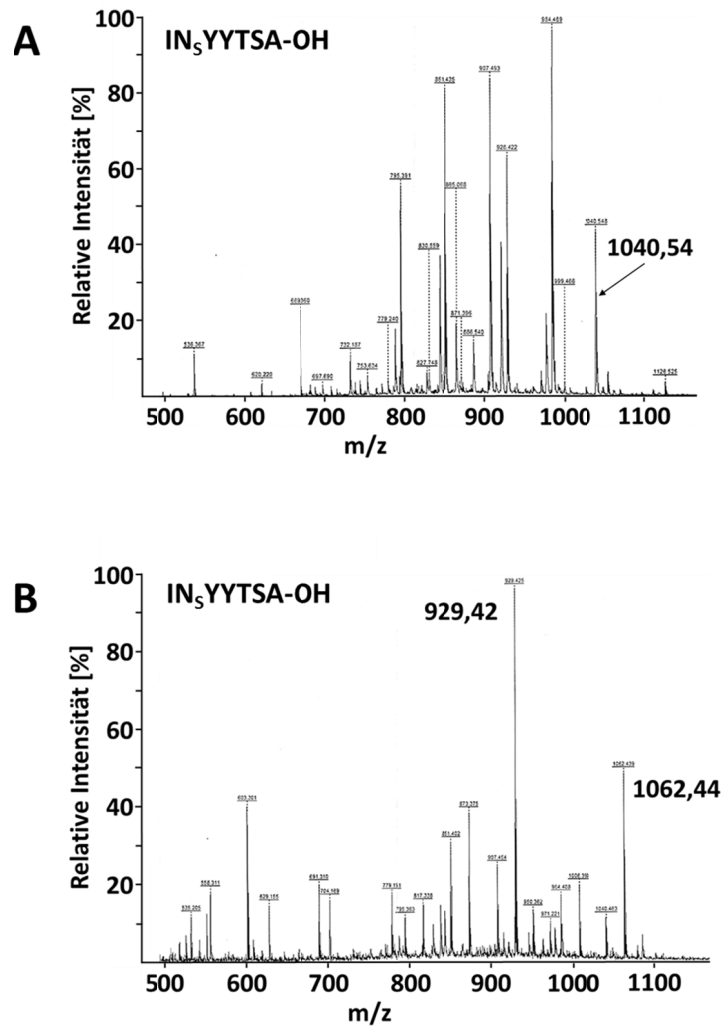


Abb.54: MALDI Spektren von Testabspaltungen des Peptids $IN_5YYTSA-OH$ von Wang-Resin. (A) zeigt ein Spektrum des Peptids nach 95 % TFA Behandlung nach 1 h, (B) das gleiche Peptid unter Verwendung von 50 % TFA, ebenfalls nach einer Stunde Reaktionszeit.

Erst in späteren Experimenten, als die LC-MS-Analytik vorhanden war, konnten durch zeitaufgelöste UV-VIS-Spektren genauere Aussagen über den prozentualen Massenanteil der einzelnen Fragmente gemacht werden (Abschnitt 3.1). Für die Synthese der Peptide am Wang-Linker genügte ein Nachweis für das Vorhandensein der Peptide über ihre spezifischen Masse, da sie für weitere Versuche an der festen Phase bleiben. Mit 50 % TFA und 30 min Reaktionszeit erhielt man zwar sulfatierte Peptide, die halbwegs rein waren aber die Ausbeuten waren mit teilweise weniger als 5 %, gemessen an den Edukten, unbefriedigend. Für die Synthese der fluoreszenzaktiven Peptide wurden neue Harze verwendet. Harze mit säurelabilen Linker (Sieber Amid und Chlortrityl-Linker) zwischen Harz und der ersten Aminosäure konnten die Ausbeute auf teilweise 80 % erhöhen. Der Sieber Amid-Linker erwies sich als geeignet, da er neben der guten Ausbeute direkt nach der Abspaltung einen amidierten C-Terminus hinterlässt [132]. Der Chlortrityl-Linker konnte nicht verwendet werden. Dieser sehr labile Linker reagiert bereits mit Luftsauerstoff [141] und bedarf daher spezieller Apparaturen, die eine

Synthese unter Schutzgasatmosphäre erlauben. Solche Apparaturen werden jedoch in einem biologischen Labor herkömmlicherweise nicht verwendet. Bei einigen Synthesen wurden dennoch Chlortrityl-Verbindungen als Seitenketten-Schutzgruppe eingesetzt, wobei hier keine negativen Erfahrungen in Bezug auf die Stabilität gemacht wurden. So konnte im Rahmen dieser Arbeit eine auf das biologische Labor passende Methode entwickelt werden, die die Synthese von Peptiden mit sulfatierten Aminosäuren ermöglicht, ohne aufwendige chemische Apparaturen oder komplexe Schutzgruppenmoleküle zu verwenden.

4.2 Die Verwendung von Wang-Resin als Trägermatrix von Affinitätsäulen in biologischen Assays

Die Peptide, die dieser Arbeit synthetisiert worden sind (3.1.1), wurden im direkten Anschluss an die Festphasensynthese als Säulenmaterial verwendet. Da die Peptide am Syntheseharz blieben, um als Substrat für biologisch aktive Proteine in einer Affinitätschromatographie zu dienen, konnten keine Seitenkettenschutzgruppen verwendet werden, die normalerweise beim Abspalten des Peptids vom Harz mit entfernt werden. Bei zu langen Kopplungszeiten wurde in der anschließenden massenspektrometrischen Analyse beobachtet, dass die Peptide mit der Sequenz INYYTSA, ein zu geringes Molekulargewicht zeigten. Die Differenz der gemessenen zu der theoretischen Masse betrug 113 g/mol. Diese Massendifferenz entspricht der monoisotopischen relativen Masse von Isoleucin. Es wurde vermutet, dass ein Fehler in der chemischen Struktur des Isoleucins dazu geführt haben könnte, nicht zu binden. Da keine Schutzgruppen verwendet wurden und andere Aminosäuren aufgrund ihrer spezifischen Masse ausgeschlossen werden konnten. Die MS-Untersuchung des Fmoc-Aminosäurebausteins zeigte die vom Hersteller (Novabiochem) angegebene Masse, sodass ein struktureller Fehler des Isoleucins auch nicht die Ursache sein konnte. Als nächstes wurde anhand der Struktur des Peptids NYYTSA überlegt, welche Nebenreaktionen eintreten könnten. Eine hypothetische Begründung wäre eine intramolekulare Cyclisierung, die theoretisch auf der Bildung eines Aminoxids beruhen würde (55) und zumindest erklären könnte, warum der N-Terminus für weitere Synthesen nicht mehr zugänglich ist.

Die Bildung von Aminoxiden wird in der Regel durch den Angriff von Oxidationsmitteln auf Amine eingeleitet, wobei bei primären Aminen meist komplexe Produktgemische entstehen [142]. Ein ähnlicher Effekt könnte durch die dirigierenden Kupplungsreagenzien auf die OH-Gruppe gewirkt haben, die durch das benachbarte Ringsystem eine elektronisch begünstigte Reaktion zum nahen Amin hätte haben können.

Alternativ wäre auch ein Übergangszustand denkbar, der ähnlich wie bei der Cope-Eliminierung [143] einen quasicyclischen Zustand zwischen dem Amin und der phenolischen OH-Gruppe bilden würde.

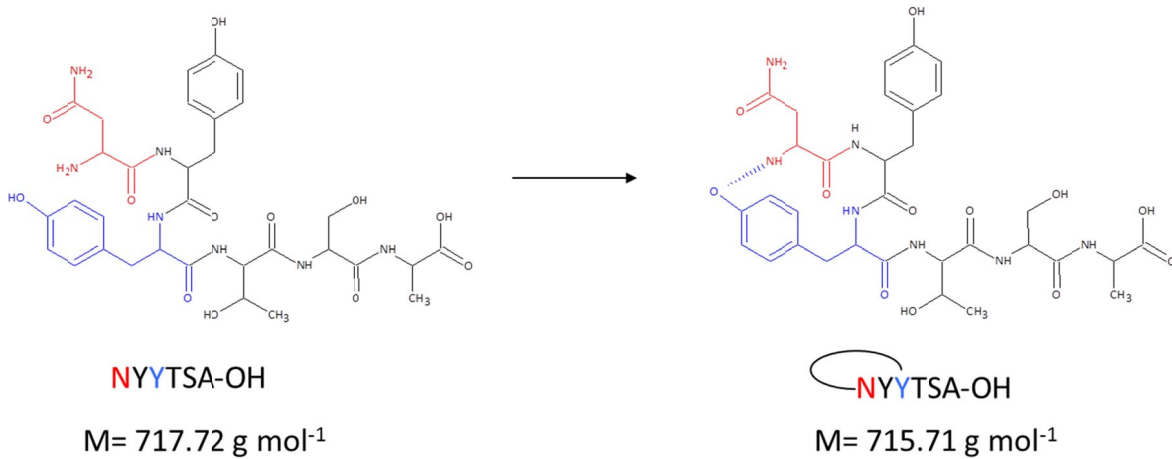


Abb.55: Die hypothetische Bildung eines Ringschlusses in dem Peptid NYTSA durch zu lange Kopplungszeit könnte die Ursache für die Verhinderung einer weiteren Aminosäurekopplung sein.

Die Problematik, trat nicht mehr auf, sobald mit kürzeren Kopplungszeiten der Aminosäure Asparagin und längeren Kopplungszeiten für Isoleucin gearbeitet wurde.

Der Wang-Linker, ist für die Festphasensynthese sehr gut geeignet, da er chemisch sehr strapazierfähig und inert ist [122], daher wurde als Trägermaterial für die Säulenmatrix gewählt. Er hat in seiner unsubstituierten Form hydrophoben Charakter und ist somit prinzipiell ungeeignet für biologische Experimente auf Wasserbasis. Jedoch wurde, bedingt durch einen hohen Anteil an hydrophilen Seitenketten in der Peptidsequenz, eine gute Verträglichkeit mit wässrigen Substanzen angenommen, die in den Experimenten bestätigt wurden.

Der biologische Ansatz der Experimente beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob eine Peptidsequenz mit einem sulfatierten Tyrosin in der Lage ist, Proteine an sich zu binden, die eine Affinität zu phosphatierten Tyrosinen besitzen, da sich die Strukturen chemisch sehr ähneln. Falls nicht, soll untersucht werden, ob sich die Affinität des Proteins durch Mutation so verändern lässt, dass ein Sulfat höhere Affinität aufweist als ein Phosphat.

Dieser Fragestellung wird aktuell in der Dissertation von Jennifer Michevec aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Bayer (ZMB, Strukturelle und medizinische Biochemie, Essen) nachgegangen. Als Versuchsobjekt wurde die IRS-PTB-Domäne herangezogen, ein Proteinabschnitt, dessen natürliches Substrat ein Phosphotyrosin ist, das aus der Sequenz des IL-4-Rezeptors stammt (Abb. 56) [128].

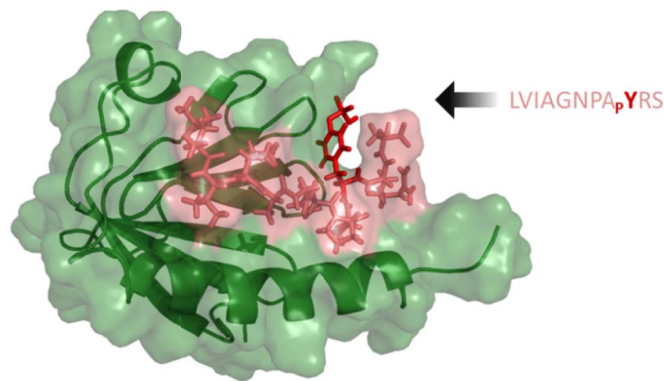


Abb.56: IRS-PTB (grün) im Komplex mit einem Phosphotyrosin enthaltenem Peptid (rot).

Es wurde eine Bibliothek mit speziellen Primern erstellt, die dafür sorgen, dass bei der Translation an bestimmten Stellen Mutationen in das IRS-PTB-Protein eingebaut werden und somit verschiedene Proteinkombinationen ergeben. Diese wurden mittels Ribosomendisplay an den hier synthetisierten Peptidsäulen IN_xYYTSA -Wang affinitätschromatografisch untersucht. Über die affine Bindung des Ribosomenkomplexes, bestehend aus Ribosom, mRNA und Protein, konnten die besten Binder isoliert, revers transkribiert und anschließend kloniert werden. Mit den fluoreszenzmarkiertem Peptiden Mant- $IN_xYYTSA-NH_2$, analog zu den Peptiden auf der Säule, konnten die Proteine mittels Fluoreszenzanisotropie auf ihre Bindungsaffinität hin untersucht werden. Erste Bindungsstudien sind in Abb. 57 dargestellt.

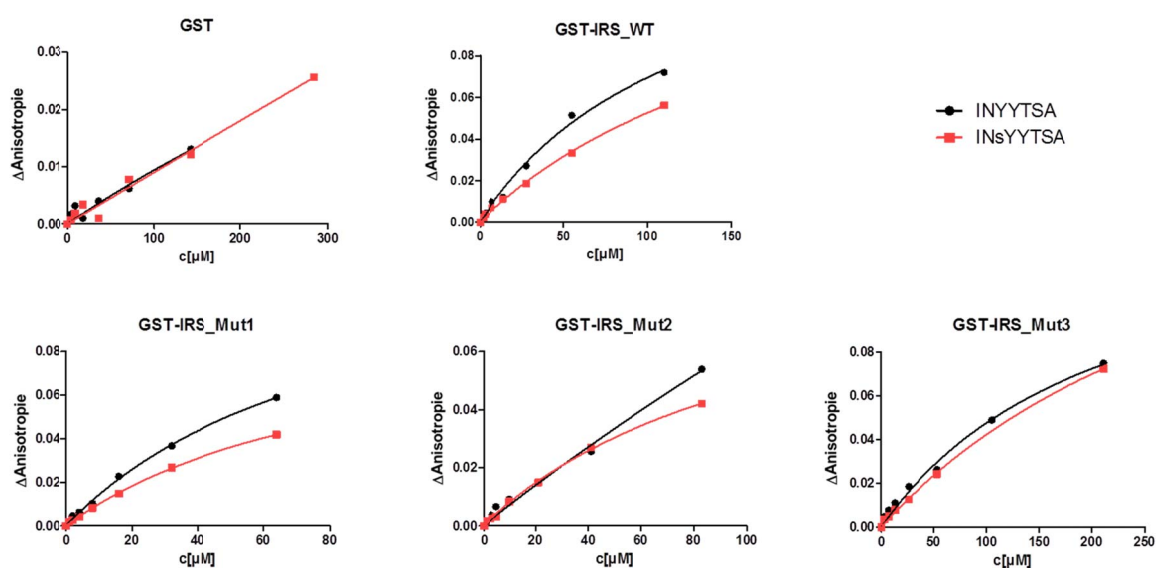


Abb.57: Fluoreszenzanisotropie-Studien aus der Arbeit von Jennifer Michevec. Dargestellt sind die Bindungskurven zwischen den Peptiden Mant-INYYTSA (schwarz), Mant-IN₅YYTSA (rot) und den IRS-PTB-Proteinen, sowie einer Kontrolle mit GST.

Die Messungen wurden in einem 50 mM TRIS-HCl-Puffer durchgeführt. Die Peptide wurden mit je 1 μM vorgelegt und die zu untersuchenden Proteine (GST, GST-IRS_WT, GST-IRS_Mut1, GST-IRS_Mut2 und GST-IRS_Mut3) mit steigender Konzentration dazu titriert. Die Datenpunkte wurden anschließend mit dem Programm GraphPadPrism ausgewertet und über die Funktion ‚one site specific binding‘ eine Regressionsanalyse vorgenommen, wodurch die in Tab. 26 gezeigten K_D -Werte zustande kamen.

Tab. 26: K_D -Werte für die Bindung zwischen CCR5-Peptiden und IRS-Proteinen

CCR5-Peptid	Protein	K_D -Wert [μM]
■ INYYTSA-NH ₂	GST-IRS_WT	123,8
	GST-IRS_Mut1	87,64
	GST-IRS_Mut2	719,3
	GST-IRS_Mut3	215,5
	GST (Kontrolle)	1039
■ IN ₅ YYTSA-NH ₂	GST-IRS_WT	197,5
	GST-IRS_Mut1	90,74
	GST-IRS_Mut2	117,2
	GST-IRS_Mut3	372,7
	GST (Kontrolle)	>10000

Die Experimente zeigen, dass Wang-Resin-Peptidsäulen für affinitätschromatographische Untersuchungen geeignet sind, bestätigt durch die anschließende Analyse der Daten aus den Fluoreszenzanisotropie-Messungen konnten spezifische Affinitätsunterschiede an den Mutanten gegenüber dem Wildtyp gemessen werden. So ist hier exemplarisch die Analyse für die Mutante GST-IRS_Mut2 gegen INYYTSA-NH₂ und IN₅YYTSA-NH₂ zu nennen. Zeigt die Messung des unsulfatierten Peptids einen K_D -Wert von 719,3 μM , so ist ein bei dem sulfatierten Peptid ein wesentlich affinerer K_D -Wert von 117,2 μM zu sehen. Kontrollen zum phosphorylierten Peptide IN_pYYTSA-NH₂ wurden noch nicht durchgeführt. Die Fähigkeit der Wang-Resin-Peptidsäulen aus einem nativen Milieu heraus Proteine zu binden, lässt diese Methode zumindest immer dann als Alternative zu gängigen Verfahren wie der Affiniätsreinigung über Agarosesäulen zu [144] [145], wenn chemisch synthetisierte Peptide als Zielstrukturen verwendet werden.

4.3 Vorzüge und Nachteile der Fluorophore Mant, ATTO 488 und Rhodamin B für die Verwendung in der Festphasenpeptidsynthese

4.3.1 Mant

Der Fluoreszenzfarbstoff Mant ist dank seiner geringen molekularen Größe ($M=151,16 \text{ g mol}^{-1}$) sehr gut geeignet, um biologische Sachverhalte zu untersuchen, zudem da er aufgrund seiner molekularen Struktur einen wesentlich kleineren Einfluss auf

die Umgebung des zu untersuchenden Proteins ausübt als andere Fluoreszenzfarbstoffe. Einen weiteren Vorteil bietet die vorhandene Carboxyl-Gruppe, die eine einfache chemische Handhabung für das Labeln des Farbstoffs an Aminogruppen ermöglicht. In der Festphasenpeptidsynthese könnte er analog zu Aminosäurebausteinen behandelt werden. Ebenfalls zeigte sich in der Praxis, dass Mant eine geringere Photosensibilität aufweist als vergleichbare Produkte, sodass auf besondere Vorkehrungen bei der Synthese, wie Lichtausschluss, verzichtet werden konnte.

Allerdings gibt es auch einige nachteilige Eigenschaften, von Mant in der Fluoreszenzanalytik. Mant liegt mit seinem Anregungsmaximum von 335 nm knapp außerhalb des Wellenspektrums, in dem einige konfokale Laser-Raster-Mikroskope Proben erfassen können. Der Dioden-Laser des hier verwendeten Leica TCS SP5 kann ab einer Wellenlänge von 405 nm anregen. Somit ist Mant zwar als Fluorophor für Fluoreszenzspektroskopie noch ausreichend gut geeignet, für die Fluoreszenzmikroskopie ist es jedoch ratsam, einen anderen Farbstoff zu wählen, der in effizienteren Wellenlängenbereichen arbeitet, wie z. B. ATTO 488.

4.3.2 ATTO 488

Für die Fluoreszenzmikroskopie mussten die Peptide mit effektiven fluoreszierenden Linkern versehen werden. Da bei zu starker Lichteinstrahlung die molekulare Struktur von aromatisch konjugierten Systemen zerstört werden kann (photochemische Stabilität) [146], wurde ein Linker verwendet, der eine hohe Stabilität gegenüber den verwendeten Lasern (Tab. 18) aufweist. Außerdem sollte er in einem spektralen Bereich anregbar sein, der mit anderen, für die Mikroskopie verwendeten Fluorophoren keine Überlappung zeigt. Hierfür wurde der Fluorophor ATTO 488 [147] ausgewählt, der bei einer Wellenlänge von 501 nm sein Absorptionsmaximum hat (Abb. 58). Die chemische Handhabung des Farbstoffs war wegen seiner guten Wasserlöslichkeit für die hier durchgeführte Semisyntese einfach. Durch die strukturell etwas außerhalb des photoaktiven Zentrums gelegenen Carboxylgruppe konnte der Fluorophor durch eine herkömmliche Kupplungsreaktion N-terminal an das Peptid synthetisiert werden. Der aliphatische Linker sorgte für ausreichenden Abstand, ohne dass der Farbstoff einem Quenching-Effekt durch das eigene Peptid ausgesetzt war [148].

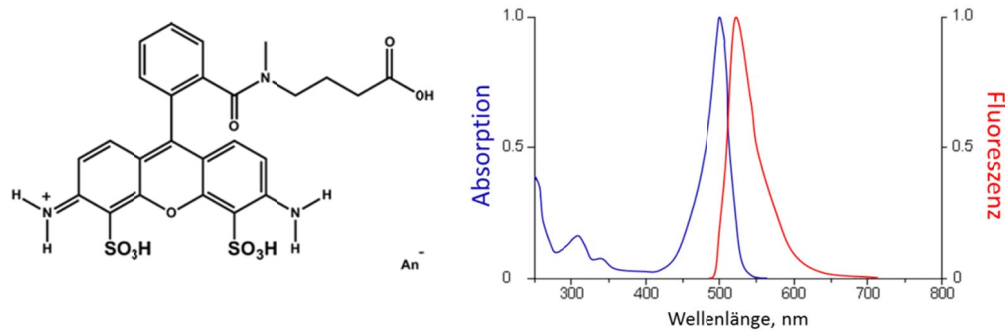


Abb.58: Der Fluoreszenzfarbstoff ATTO 488, der aufgrund seiner charakteristischen Eigenschaften wie hohe Fluoreszenzquantenausbeute, hohe photochemische Stabilität und gute Wasserlöslichkeit für die Semisynthese dieser Arbeit verwendet wurde.

Die manuelle chemische Kopplung wurde unter Lichtausschluss durchgeführt, damit keine unerwünschten Lichtreaktionen den Fluorophor beschädigen konnten. In den folgenden Arbeitsschritten wurde ebenfalls darauf geachtet, die markierten Proteine keiner intensiven Lichteinstrahlung auszusetzen. Nach der nativen chemischen Ligation konnten die Proteine im gewünschten Wellenlängenbereich über den Farbstoff nachgewiesen werden. Eine Kontrollinjektion des reinen Farbstoffs in das Zytosol der U-2 OS Zellen zeigte keine spezifische Anlagerung an zelluläre Strukturen oder Substanzen (Abb. 3.31).

4.3.3 Rhodamin B

Rhodamin B ist ein verhältnismäßig preiswerter Farbstoff, der eine hohe Quantenausbeute von nahezu 100 % aufweist. Daher wurde Rhodamin B für die Fluoreszenzanisotropie verwendet.

Nachteilig ist, dass Rhodamin B als karzinogen und stark ökotoxisch eingestuft wird [149]. Des Weiteren hat der Farbstoff eine sehr nah am photoaktiven Zentrum liegende COOH-Gruppe, die bei komplexen chemischen Strukturen des Zielmoleküls zu sterischen Hindernissen führen kann. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Synthesen sind dadurch keine Nachteile entstanden, da Aminosäuren mit kurzen Seitenketten in der unmittelbaren Umgebung des Fluorophors verwendet wurden. Jedoch könnte sich die elektronenreiche, Anthracen-ähnliche Gruppe bei der Synthese in anderen Sequenzen, in welche aromatische Aminosäuren eingebaut werden, als problematisch erweisen, da es zu Nebenreaktionen kommen könnte [150].

4.4 Peptidfragmente als Bausteine für die Semisyntese von hPar14-Mutanten

Die in dieser Arbeit synthetisierten Fragmente stellen eine Basis für funktionelle Studien posttranslationaler Modifikationen dar. Neben dem Aufspüren von Bindungspartnern, wie es in Abschnitt 3.4 bei den Bromodomänen durchgeführt wurde, können diese kurzen Teilschnitte umfangreich eingesetzt werden. So könnten unterschiedliche posttranslationale Modifikationen miteinander kombiniert bzw. ausgetauscht und die Bindungsaffinitäten unter Berücksichtigung der neuen PTMs an bereits gefundenen Interaktionspartnern erneut getestet werden. Über diese Dokumentation der Bindungsstärken könnte eine Art „roadmapping“ für den Stoffwechselweg von Parvulin 14 erstellt werden. Mit „roadmapping“ ist eine vergleichende Versuchsreihe gemeint, so könnte hier beispielsweise das in vitro Verhalten von unterschiedlich modifizierten hPar14-Varianten gegenüber dem BRDT1-Protein (oder entsprechend anderer) getestet und effektorische PTM weiter in Zellversuchen charakterisiert werden. Auch ein Einsatz der Peptidfragmente in Protein-Micro-Array-Analysen wäre möglich. Kombinierte Experimente mit synchronisierten Zellen wären in der Lage, eine on/off-Strategie für gezielte posttranslationale Modifikationen zu verfolgen. So könnte zum Beispiel geklärt werden, ob eine Acetylierung an K11 in allen Phasen des Zellzyklus eine Bindung an die Bromodomäne von BRDT1 hervorruft oder ob diese Acetylierung nur in bestimmten Zyklusphasen relevant ist. Hierfür könnte man in einem Experiment bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) [151] mit Durchflusszytometrie [152] kombinieren, wobei die acetylierte hPar14-Variante semisynthetisch herstellen wäre. Anhand der FACS-Analyse würde man über die Fluoreszenzintensität eine Bindung beider Proteine aneinander in den entsprechenden Zyklusphasen erkennen. Die kurzen Peptidfragmente wurden alle an Wang-Resin synthetisiert und haben somit, anders als die in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Peptide, keinen C-terminalen Thioester. Der freie C-Terminus von herkömmlichen Peptiden kann allerdings durch weitere chemische Reaktionen [7] in Thioester überführt werden, sodass eine Kopplung an rekombinante Produkte auch hier durchaus möglich ist. Für den Fall einer Cystein-freien Ligation können ebenfalls alternative Strategien angewendet werden, wie sie in der Veröffentlichung von Pentelute und Kent beschrieben werden. Die Fragmente können auch als Säulenmatrix genutzt werden. Dadurch ist es möglich, Bindungspartner aus Zelllysaten zu fischen, die eine bestimmte PTM benötigen oder evtl. sogar eine Kombination aus verschiedenen PTMs. Eine weitere Einsatzmöglichkeit für kurze Peptidsequenzen mit posttranslationalen Modifikationen bieten Microarray-Technologien. Durch die Verwendung sogenannter Biochips können parallel mehrere tausend Analysen gestartet werden und somit einen ganzen Substanzklassenbereich abdecken [153].

4.5 Veränderung der räumlichen Struktur durch Seitenketten-Phosphorylierung

Die Modifikation von Proteinen durch posttranslational eingeführte Gruppen wie Phosphat hat oft strukturelle Auswirkungen [154]. In der Veröffentlichung wird anhand molekulardynamischer Simulationen gezeigt, dass Mehrfachphosphorylierungen, die durch verschiedene Kinasen vorgenommen werden, β -Faltblattstrukturen aufbrechen und in verschiedene andere, teilweise sogar zu α -helikalen Strukturen umwandeln. Um zu sehen, ob eine Einfachphosphorylierung an Ser19 des hPar14 bereits eine ähnliche Tendenz zeigt, wurden die aufgenommenen CD-Spektren miteinander verglichen. Im Vergleich der CD-Spektren von den semisynthetischen Proteinen (p Ser19, Ala19) zum rekombinanten Wildtyp zeigte sich in der phosphorylierten Variante eine strukturelle Veränderung (Abb. 36). Eine Sekundärstrukturanalyse dieser Spektren, mit der CDSSTR-Methode [155], ergab beim Wildtyp ein Verhältnis von 51 % α -Helix zu 23 % β -Faltblatt und bei der Ala19-Variante ein ähnliches Verhältnis von 53 % α -Helix zu 24 % β -Faltblatt. Hingegen zeigte sich in der p Ser19-Variante eine Abnahme der α -helikalen Struktur auf 42 % α -Helix-Anteil und eine geringe Zunahme in der β -Faltblattstruktur mit 29 %. Die Phosphorylierung an Ser19 in hPar14 verändert demnach die Struktur tendenziell zu einem höheren Anteil an β -Faltblatt. Um herauszufinden, ob zusätzliche Phosphorylierungen in der direkten Nachbarschaft zu einem höheren α -helikalen Strukturanteil führen, können weitere semisynthetische Proteine mit den dementsprechenden Phosphorylierungen an Ser21 und Ser23 synthetisiert werden. Zusätzlich können weitere Methoden zur Sekundärstrukturanalyse, wie beispielsweise CONTIN/LL genutzt werden, um sie mit dem Ergebnis der CDSSTR-Methode zu vergleichen.

4.6 Einfluss der Phosphorylierung von hPar14 auf seine Lokalisation in der Zelle

In dieser Arbeit wurde erstmals eine posttranslationale Modifikation (PTM) durch Semisynthese in das Protein hPar14 eingebaut. Diese Art der Modifikation kann mit den, der Arbeitsgruppe zur Verfügung stehenden, rekombinanten Techniken nicht erzeugt werden, da bei der Kultivierung von humanen Proteinen in Bakterien keine eukaryotische PTM vorgenommen werden kann [156]. Ein Vorteil der semisynthetischen Methode ist, dass man mit ihr den Einfluss auf die Lokalisation von Par14 in der Zelle studieren kann. In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Substitution der Aminosäure Ser19 durch Glu19 eine Veränderung auf intrazellulär Lokalisation auslöst [134], jedoch ist diese Beobachtung auf eine sequenzunspezifische Aminosäure zurückzuführen. Die Simulation einer posttranslationalen Modifikation wie Phosphat durch Glutamat als Träger einer negativen Ladung kann eine gewisse biologische Relevanz zwar bestätigen, jedoch wird eine posttranslationale Modifikation nur begrenzt simuliert.

Eine chemisch korrekt eingefügte PTM entspricht eher der biologischen Situation als die Glutamatmutante.

Einen weiteren, Einfluss auf das Protein könnte die Wahl des Fluorophors haben. So ist ein mit EYFP markiertes Parvulin 14 mit Sicherheit weit von einem nativen Zustand entfernt. Umso erstaunlicher ist die Tatsache, dass die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der EYFP-Mutanten sehr ähnliche Ergebnisse im Vergleich mit den semisynthetischen Proteinen zeigen. Um den Einfluss von EYFP auf hPar14 bewerten zu können, wurden auch Fluoreszenzaufnahmen von einem transient transfizierten EYFP-Protein gemacht. Wie in Abb. 42 gezeigt wird, ist EYFP als einzelnes Protein ebenfalls zu einem geringen Teil im Kern lokalisiert. Ein Effekt der mit EGFP in anderen Zelllinien ebenfalls beobachtet wurde [157]. Die statistische Auswertung der Fluoreszenzintensität des EYFP-Proteins in U-2 OS Zellen zeigt einen Intensitätsunterschied zwischen Zellkern und Cytosol von 100 % zu 79,3 %. Sieht man die Differenz von 20,7 % als einen dirigierenden Effekt, der auch in Fusionsproteinen zum Tragen kommt, so kann man diesen Wert als Blindprobe auf die Messungen des hPar14_{WT}-EYFP und des hPar14_{ALA19}-EYFP übertragen. Demnach hätten die Proteine ohne EYFP eine 20,7 % höherliegende Aufenthaltswahrscheinlichkeit im Cytosol. Addiert man die 20,7 % auf den ermittelten Wert für cytosolisches hPar14_{WT}-EYFP (39,8 %), so erhält man ein Verhältnis von 100 % hPar14_{WT}-EYFP im Kern, zu 60,5 % hPar14_{WT}-EYFP im Cytosol. Damit liegt das Kern/Cytosol-Verhältnis dieser Messung in der gleichen Größenordnung wie bei der ATTO 488-_pSer19-hPar14-Variante, wo der prozentuale Unterschied 100 % zu 58,6 % beträgt. Ein leicht abweichendes Verhalten zeigt sich bei dem Vergleich der Ala19-Varianten. Dort beträgt das prozentuale Verhältnis der hPar14_{Ala19}-EYFP-Mutante 100 % zu 58,6 % nach Addition der 20,7 %. Bei der ATTO 488-Ala19-hPar14-Variante 100% zu 72,8 %. Abb.59 zeigt eine grafische Gegenüberstellung.

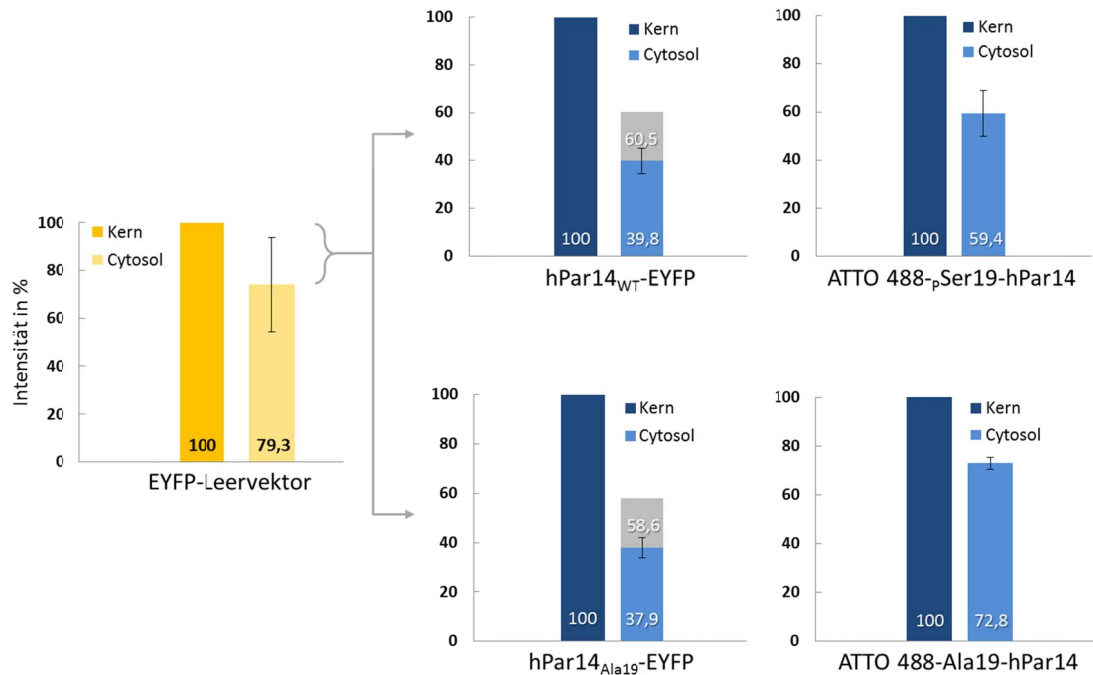


Abb.59: Darstellung der statistisch gemittelten Fluoreszenzsignalintensitäten von EYFP mit hPar14_{WT}-EYFP und ATTO 488-ρSer19-hPar14 im Vergleich (oben) und der beiden Proteine hPar14_{Ala19}-EYFP und ATTO 488-Ala19-hPar14 (unten). Ausgehend von der Annahme eines dirigierenden Effekts von EYFP auf die Kernlokalisierung seiner Fusionsproteine hPar14_{WT}-EYFP und hPar14_{Ala19}-EYFP, ist der effektbedingte Intensitätsunterschied auf die cytosolischen Werte übertragen worden (grauer Balken). Die Leuchtintensität des Zellkerns wurde auf 100 % gesetzt. In gelb dargestellt sind die Mittelwerte +/- Standardfehler von 15 Zellen.

Jans gibt in seiner Veröffentlichung viele verschiedene Faktoren an, die für einen Kern-Import verantwortlich sein können [158]. Bei der ATTO-88-Ala19-hPar14-Variante kann unter anderem alleine schon seine Größe (14 kDa) dafür verantwortlich sein in den Kern zu gelangen. Proteine mit einer Größe von bis zu 40 kDa können die Kernmembran passieren ohne aktiv transportiert zu werden. Wohingegen Proteine ab >40 kD nicht selbstständig in den Kern gelangen können. Außerdem besitzt Parvulin14 ein nukleares Lokalisations-Signal (NLS), über das ein aktiver Transport ins Innere ermöglicht wird [134]. Der Import von NLS-tragenden Proteinen wird durch andere Proteine, den Importinen, vermittelt [159]. Diese Adapterproteine setzen sich aus einer α - und β -Untereinheit [160] zusammen wobei die α -Untereinheit für die Erkennung des NLS-Signals verantwortlich ist [65], während die β -Untereinheit [161] die Verbindung zum Kernporenkomplex herstellt [162]. Die α -Untereinheiten des Heterodimers können je nach Zelltyp verschiedenartige NLS-Sequenzen rekrutieren. Durch diese Kombination ist es den Importinen möglich, viele NLS auf Proteinen zu erkennen, die in manchen Fällen sequenziell verschoben sind [163]. In dem Review von Alvisi *et al.* wird ein Mechanismus vorgestellt, der den Kernimport eines Herpesvirus zeigt [163]. Dort wird gezeigt, dass eine dreifache Phosphorylierung die

Bindung an Importin α und somit den Kernimport begünstigt. Analogien zu Parvulin 14 sind auf Grund der benachbarten Aminosäuren Ser21 und Ser23 neben Ser19 möglich und würden eine logische Erklärung für den Transport der Ala19-Variante in den Kern liefern. Demnach würde der Import von Par14 nicht unbedingt nur über eine Phosphorylierung gesteuert. Vielmehr deutet die Aminosäuresequenz darauf hin, dass eine dreifache Phosphorylierung wahrscheinlicher ist. So beschreibt Alvisi *et al.*, dass eine Phosphorylierung an dem zu importierenden Protein durch die Casein-Kinase1 (CK1) und die Casein-Kinase2 (CK2) (genau wie bei Reimer auch [97]) stattfindet. In der folgenden Abb.(Abb. 60) wird ein möglicher Transportmechanismus vorgestellt, der aus der Veröffentlichung von Alvisi *et al.* [163] abgeleitet wurde und den aktiven Transport von hPar14 untermauert. Zusätzliche Phosphorylierungen in direkter Nachbarschaft, so wie in dem Mechanismus von Alvisi *et al.* [163], könnten den Effekt verstärken. Auch hPar14 hat mit Ser21 und Ser23 Aminosäuren, die potentiell phosphoryliert werden können. Im folgenden Mechanismus wird das Kernlokalisierungssignal von hPar14, auf die weiter vorne liegende Sequenz PPKGKGSGS verschoben, die einem klassischen Importsignal entspräche und sich mit den Aussagen in der Veröffentlichung von Jans *et al.*[158] besser in Einklang bringen ließe.

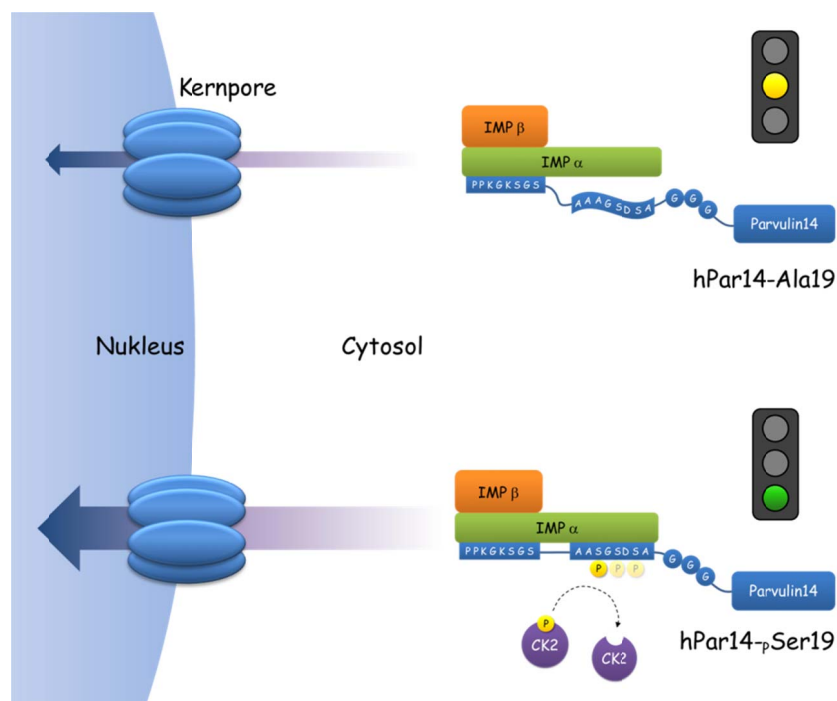


Abb.60: Darstellung eines möglichen Transportmechanismus von hPar14 in den Nucleus. Die NLS (PPKGKGSGS) des hPar14 würde in beiden Fällen erkannt und durch das Importin-Heterodimer (IMP α und IMP β) in den Kern geschleust. Bei einer Phosphorylierung an S19 wäre die Bindung an den Komplex noch stärker und würde einen schnelleren Transport begünstigen, ähnlich wie im Transportmechanismus von Gualtiero beschrieben [163]. Zusätzliche Phosphorylierungen an S21 und S23 könnten den Effekt noch einmal verstärken.

Die Wahrscheinlichkeit, eines dirigierenden Effektes durch EYFP auf den Kernimport von hPar14, lässt sich durch eine weitere, theoretische Überlegung erklären. So wurde mittels der Phosphorylierungsvorhersage-Software PHOSIDA [164] ermittelt, dass EYFP in einem menschlichen Organismus an den Aminosäuren S27, S29, S172, S202 und S205 phosphoryliert werden kann. Um zu überprüfen, wo sich diese Aminosäuren in der dreidimensionalen Struktur des EYFP-Proteins befinden, wurde das Strukturmodell 3V3D aus der PDB Datenbank mit der Software Pymol (DeLano), die Oberfläche dargestellt und die potentiellen Phosphorylierungsmotive in rot (für geeignete Motive) und gelb (für weniger zugängliche Motive) gekennzeichnet. Diese Darstellung zeigt (Abb. 61), dass es Epitope gibt, die von Phosphokinasen, wie beispielsweise der CK2, erkannt werden können und demzufolge sehr wahrscheinlich auch phosphoryliert werden.

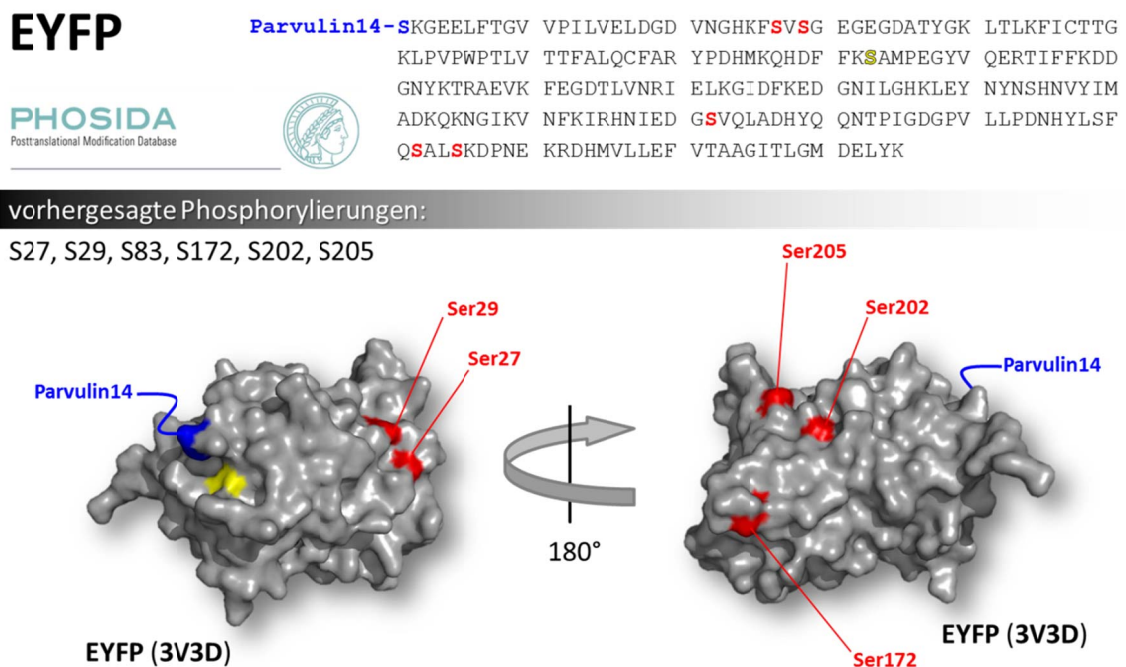


Abb.61: Oben ist die Aminosäuresequenz von EYFP mit vorangestelltem hPar14 und rot markierten Serinen gezeigt, darunter die durch PHOSIDA vorhergesagten Phosphorylierungsmöglichkeiten für die in der Sequenz rot gekennzeichneten Serine. Der untere Teilbereich zeigt die von Pymol ermittelte Oberflächendarstellung des EYFP (3V3D) aus der PDB-Datenbank mit in rot markierten Serinen, die Phosphorylierungsmotive für Kinasen darstellen und einem unzugänglichen Motiv in gelb. Blau ist der Übergang zu hPar14 in einem Fusionsprotein dargestellt.

EYFP ist über seinen C-Terminus mit hPar14 verknüpft, daher ist es sehr gut möglich, dass die Phosphorylierungsmotive beider Proteine in unmittelbarer Nähe zueinander liegen. Denn die Tatsache, dass C- und N-Terminus der strukturell charakterisierten Form von hPar14 in die gleiche Richtung zeigen, würde die Lage des flexible N-Terminus bezüglich der EYFP-Phosphorylierungsmotive begünstigen. Ausgehend von einer möglichen Trippelphosphorylierung würde diese Hypothese nicht nur erklären, warum hPar14_{WT}-EYFP besser in den Kern transportiert wird, sondern auch seine Ala19-Mutante.

4.7 hPar14 und seine Lokalisation in subnuklearen Strukturen von U-2 OS Zellen

Diese Arbeit zeigt erstmals klar definierte Aufnahmen von subnuklearen Strukturen in U-2 OS Zellen die durch Anwesenheit von fluoreszierendem hPar14 sichtbar gemacht werden konnten (Abb. 62). Bei den Aufnahmen handelt es sich um die ersten Versuche einer transienten Transformation mit dem auch später verwendeten hPar14_{WT}-EYFP. Bei der Darstellung der oberen drei Bilder, die in Abb. 62 zu sehen sind, ist keine Gegenfärbung mit DAPI vorgenommen worden. Weitere Aufnahmen, die in der Abb. 62 unten links dargestellt sind, sind die vergrößerten Darstellungen anderer Zellen, derselben mikroskopischen Messung gezeigt. Es wurde mit DAPI gegengefärbt, was in der Abb. jedoch nicht gezeigt wird. Eine stark verminderte Kernmigration durch das Substituieren der Aminosäure Ser19 durch Ala19, wie es durch die Interpretation der Ergebnisse von Tatiana Reimer [134] angenommen wurde, konnte hingegen nicht bestätigt werden und unterstützen die oben vorgestellte Hypothese einer mehrfach Phosphorylierung. So wären neben Ala19 noch Ser21 und Ser23 als Phosphorylierungsstellen möglich und könnten hPar14 immer noch einen Kernimport ermöglichen.

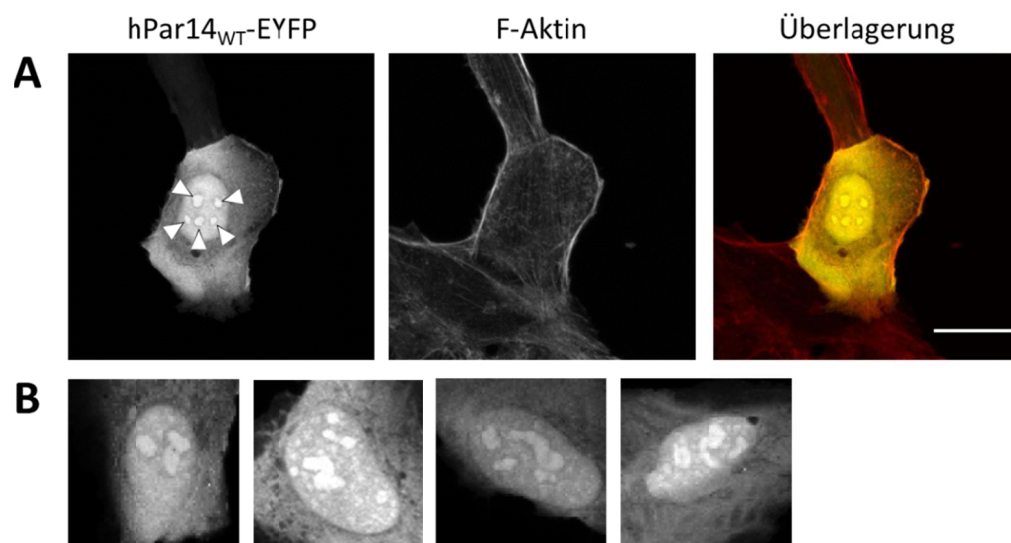


Abb.62: (A) Aufnahmen von fixierten U-2 OS Zellen mit 100 ng zuvor transient transfiziertem Plasmid-DNA des Proteins hPar14_{WT}-EYFP. Das Aktin-Cytoskelett (F-Aktin) mit Alexa Fluor® 633 Phalloidin angefärbt. Links oben deuten Pfeile auf die Anreicherung von hPar14_{WT}-EYFP in subnuklearen Bereichen, bei denen es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um Nukleoli handelt. Der Maßstabsbalken wurde auf 25 µm skaliert. Unter (B) sind weitere Aufnahmen von Kernen mit transientem hPar14_{WT}-EYFP zu sehen.

Auch die darauf folgenden Versuche konnten eine vermehrte Lokalisation von Par14 in diesen Kompartimenten bestätigen. Durch eine umfassende Studie zur strukturellen Charakterisierung von Kernbestandteilen [165], lassen sich die subnuklearen Strukturen in denen hPar14 zu sehen ist am ehesten mit den dort veröffentlichten Strukturen für Nukleoli vergleichen. So wurden in der Veröffentlichung von Matera *et al.* aus dem Jahre

2009 [165] eine Reihe von sogenannten „*nuclear bodies*“ gezeigt, deren Abb.hier zum Vergleich in abgeänderter Form ebenfalls illustriert werden (Abb. 63).

Da hPar14 an DNA bindet [98], acetylierte Varianten von hPar14 mit Bromodomänen interagieren und hPar14 in den Acetylierungssequenzen Übereinstimmungen mit Sequenzen des Histon 4 zeigt, ist es wahrscheinlich, dass hPar14 in diesen Strukturen zu finden ist.

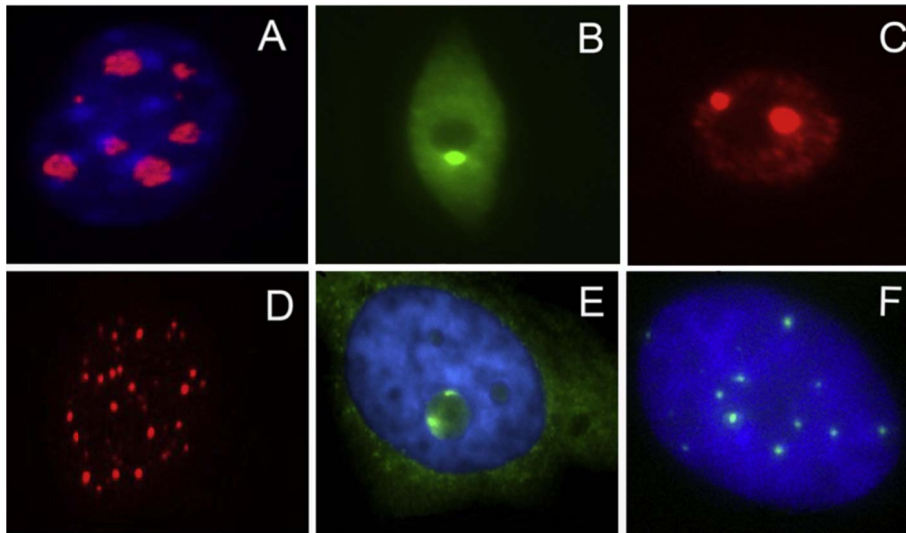


Abb.63: Aufnahmen subnuklearer Strukturen verändert nach Matera *et al.* (A) zeigt die Nukleoli von embryonalen Mausfibroblasten gefärbt mit Anti-Fibrillarin (rot) und gegengefärbte DNA mit DAPI (blau). (B) zeigt einen Cajal-Körper im Kern von *Arabidopsis* gefärbt durch Antikörper gegen das Protein U2B (heller grüner Punkt). (C) zeigt zwei Histon *locus* Körper in *Drosophila* S2 Zellen, gefärbt mit Anti-FLASH Antikörpern. (D) PML-Körperchen aus Maus NIH 3T3 Zellen, gefärbt mit Anti-PML. (E) Perinukleolare Kammer (PNC) in HeLa Zellen, hybridisiert mit Oligonukleotiden für hy1 RNA (grün), gegengefärbt mit DAPI. Das Zytoplasma wurde RNA bedingt mit angefärbt. (F) zeigt humane U-2 OS Zellen mit YFP-getagtem Bmi1-Protein, einem Marker für PcG-Körper (grün), Gegenfärbung mit Hoechst (blau).

Ebenso wurde in einer Veröffentlichung von Fujiyama-Nakamura *et al.* gezeigt, dass Parvulin14 in Nukleoli von MSF-7 und HeLa-Zelllinien zu finden ist. Als Beweis wurden dort die Nukleoli über B23 gegengefärbt [99]. Es gibt widersprüchliche Fakten zwischen den Ergebnissen von Tatiana Reimer und den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit bezüglich einer subnuklearen Lokalisation von hPar14. Hier wurden Fusionsproteine bzw. markierte Proteine mikroskopiert, die sich in subnuklearen Strukturen wiederfanden. In den Mikroskopie-Aufnahmen von T. Reimer wurden überwiegend Antikörperfärbungen genutzt [134], um die Lokalisation von Par14 zu visualisieren. Die Wahrscheinlichkeit, dass die hPar14-spezifischen Antikörper keinen Zugang zum bindenden Epitop hatten, könnte vermutlich darin begründet liegen, dass sich Par14 in einem Komplex mit anderen Molekülen (Protein/DNA) befindet, der eine Detektion per Antikörper unmöglich macht.

4.8 Bromodomänen als mögliche Bindungspartner für acetyliertes hPar14

Wie bereits bekannt ist, bindet hPar14 über seinen N-terminalen Sequenzbereich an DNA [98]. Begründet ist dies durch die überwiegend positiv geladenen Seitenketten der Aminosäuren in diesem Bereich. Da hPar14 wegen seiner strukturellen und sequentiellen Ähnlichkeit zu Proteinen der HMGB/HMGN-Gruppe an Gentranskriptionsvorgängen und der Regulation des Zellzyklus beteiligt sein könnte [98], wurden erstmals Versuche zu Bindungsaffinitäten an Bromodomänen vorgenommen. Die groß angelegte Studie von Filippakopoulos *et al.* [102] bildete die Grundlage zur Annahme, hPar14 könne durch acetylierte Lysine an Bromodomänen binden. Diese Vermutung kam durch den Vergleich zwischen den Substratsequenzen aus der Filippakopoulos-Veröffentlichung und Sequenzabschnitten des hPar14 zustande. Während in älteren Studien aufgrund der Sequenzhomologie von hPar14 zu HMGN2 meist eine Affinität zu H3 angenommen wurde [166], zeigte die Arbeit von Filippakopoulos *et al.* [103], dass eine Übereinstimmung in den Acetylierungsmotiven von H4 und hPar14 gegeben ist (Abb. 64).

H4	MSGRGKGGKGLKGGAKRHRKVL
hPar14	MPPKGKSGSGKAGKGAASGSDS

Abb.64: Sequenzvergleich zwischen den N-Termini von H4 und hPar14. Rot hervorgehoben sind die Acetylierungsmotive, die gehäuft in der Substratanalyse von Bromodomänen (Filippakopoulos und Knapp 2012) und auch in hPar14 zu finden sind.

In einer Arbeit von Choundhary 2009 [27] aus der Arbeitsgruppe von Mathias Mann wurde eine Acetylierung an Position K32 bestätigt. Die Aminosäuresequenz, in der K32 liegt, lautet: H₂N-AQGPK_{ac}GGGNA-COOH. Diese Region befindet sich kurz vor der strukturell charakterisierten Form des Proteins. 2010 konnte erstmals eine Beziehung zwischen Parvulin und Bromodomänensubstraten hergestellt werden (André Knitsch 2010). Mit Hilfe des Programms *EpitopeMatch*[®] [167] wurde eine räumliche Übereinstimmung zwischen einer Teilsequenz aus hPar14 (H₂N-GPKGG-COOH) und dem Substrat der Bromodomäne PCAF (H₂N-ARK_{ac}ST-COOH) gefunden (Abb. 65). Diese bioinformatische Vorhersage konnte in Fluoreszenz-Versuchen nicht bestätigt werden. Jedoch war die hier zu sehende, kurze Aminosäuresequenz von hPar14 ausschlaggebend für die Suche nach Sequenzhomologien in der Veröffentlichung von Filippakopoulos. Dort wurde über den Vergleich der Aminosäureabfolge KGG aus hPar14 eine Übereinstimmung zu Sequenzen der Bromodomän-Substrate gefunden. Die Anzahl der strukturell charakterisierten Proteine hat sich seit dem Zeitpunkt der Analyse 2010 mehr als verdoppelt, daher ist eine neue Durchsuchung der Datenbank mit einer ebenfalls neuen Version des Programms (*EpitopeMatch 2.5*[®]) in Erwägung zu ziehen.

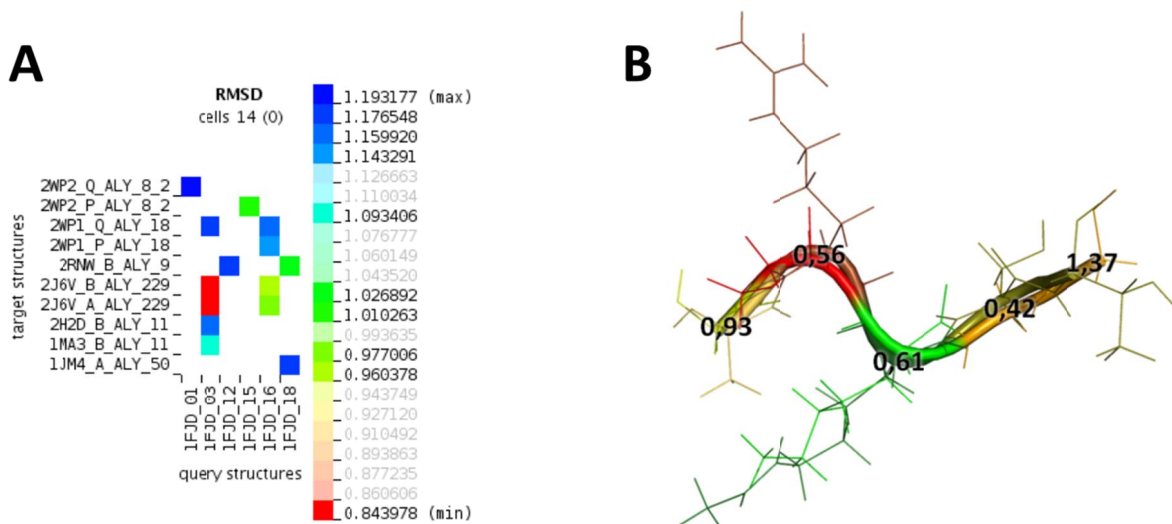


Abb.65: Aus der Diplomarbeit von André Knitsch 2010: (A) RMSD der Protein-Fragmente aus hPar14 und geometrischen Strukturanaloga im Bereich von 2 Å und 50 % Übereinstimmung. Aus den Berechnungen von Epitope Match. (B) Dargestellt ist die Überlagerung der beiden Teilsequenzen aus hPar14 (GPKGG) und einem an Lysin acetylierten Bindungspartner der Histonacetyltransferase PCAF [ARK_{Ac}ST]. Beziffert sind die einzelnen RMSD-Werte in Ångström. Dargestellt mit Pymol.

Mittels des Vorhersagewerkzeugs PHOSIDA [164], konnten sowohl Phosphorylierungswahrscheinlichkeiten, wie auch eine weitere Acetylierung an Position K11 prognostiziert werden. Auf ein persönliches Gespräch mit Prof. Dr. Stefan Knapp hin, der die Studien zur strukturellen Charakterisierung von Bromodomänen [102] und deren Affinität zu überwiegend Histon-Substraten [103] veröffentlicht hat, ergab sich der Schluss, dass hPar14 aufgrund einer Sequenzhomologie ebenfalls eine Doppelacetylierung besitzen könnte. Daraufhin wurden hPar14 Peptide mit einer Doppelacetylierung an K11 und K14 zur Prüfung der Bindungsaffinität zu Bromodomänen hergestellt. Diese Doppelacetylierung zeigte im Versuch mit den vier Bromodomänen GCN5, PCAF, BRDT(1) und BRD4(2) Bindungsaffinitäten in der gleichen Größenordnung wie Histon4-Peptide mit Acetylierungen an den Positionen K8 und K12 bzw. K12 und K16, aus der Veröffentlichung der Substratstudie von Filippakopoulos *et al.* [103] (Tab. 26). Die Fluoreszenzanisotropiemessung zwischen der Bromodomäne BRDT1 und dem acetylierte hPar14-Peptid an K11 zeigte mit einem KD-Wert von 36 µM die höchste Affinität (Abschnitt 3.4.2), womit von einer Bindung der beiden Proteine ausgegangen werden kann. Die Bromodomäne BRDT1 ist an der Reorganisation von hyperacetylierten Chromatin beteiligt [168]. Auch konnte gezeigt werden, dass BET-Proteine, zu denen auch BRDT1 gehört, in Proteinkomplexen zusammen mit der Casein-Kinase II (CK2) und verschiedenen Vertretern der TAF-Gruppe an Regulationsprozessen von Condensin, beteiligt sind [105]. Condensine sind Proteinkomplexe, die für die Chromosomenkondensation während der Mitose verantwortlich sind [106]. Die Experimente von Fujiama-Nakamura *et al.* zeigen die Anwesenheit von hPar14 in Strukturen des Spindelapparats, ebenfalls während der

Mitose [99]. hPar14 scheint somit in seiner Funktion als Faltungshelfer an einem strukturgebenden Prozess der Organisation und/oder Reorganisation von Chromosomen beteiligt zu sein. Dies gilt es jedoch noch konkret zu beweisen.

4.9 Ausblick

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sulfatierte Peptide mit der Sequenz IN_xYYTSA aus dem N-Terminus des CCR5 Rezeptors darstellbar sind. Damit wurde eine Methode etabliert, die es ermöglicht, säurelabile Peptidsequenzen für Proteinbindungsstudien herzustellen.

Mit der Synthese der Peptide sollte ein hochaffiner Binder zur Maskierung des CCR5-Rezeptors gefunden werden. Ein vorläufiges Ergebnis konnte in Abschnitt 4.2 vorgestellt werden, in dem Peptide mit der Sequenz IN₅YYTSA gegen Mutanten der IRS-PTB-Domäne auf Affinität getestet wurden. Dabei kam heraus, dass die Mutante GST-IRS_Mut2 mit einem K_D -Wert von 117,2 μ M eine höhere Affinität zum sulfatierten Peptid zeigt, als der Wildtyp mit einem K_D -Wert von 197,5 μ M. Die Kontrolle mit unsulfatiertem Peptid INYYTSA zeigte zudem, dass die Mutante GST-IRS_Mut2 mit 719,3 μ M einen wesentlich schlechteren K_D -Wert gegenüber dem Wildtyp mit 123,8 μ M besitzt. Um nun herauszufinden, ob der K_D -Wert von 117,2 μ M eine verhältnismäßig gute Bindungsaffinität repräsentiert, müssen weitere Versuche mit dem phosphorylierten Peptid gemacht werden, die eine höhere Affinität zum IRS-PTB Wildtyp aufweisen sollten. Vor diesem Hintergrund können weitere Experimente durchgeführt werden, die einen *in vivo*-Test der Mutante in einem HIV-System auf ihre Wirksamkeit hin prüfen. Ein solches Projekt könnte mit der Abteilung für Molekulare und Medizinische Virologie, an der Ruhr-Universität Bochum in Kooperation mit Prof. Dr. Überla geplant werden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass sich handelsübliche Wang-Resine als Trägermaterial für Affinitätsäulen eignen. Daher ist es generell möglich diese Methodik für peptidbasierte Proteinbindungsstudien einzusetzen. Sequenzen mit säurelabilen Aminosäuremodifikationen sind dadurch für Bindungsassays zugänglich und können zum Fischen von Proteinen aus Zelllysaten eingesetzt werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass hPar14 semisynthetisch hergestellt werden kann. Dadurch wurde eine Methode für die Arbeitsgruppe etabliert, die es ermöglicht posttranslational modifizierte Proteine semisynthetisch herzustellen. Eine CD-spektroskopische Untersuchung der semisynthetischen Proteine (p Ser19, Ala19) und dem rekombinanten Wildtyp von hPar14 zeigte eine strukturelle Veränderung in der phosphorylierten Variante. Während eine Sekundärstrukturanalyse des Wildtyps ein Verhältnis von 51 % α -Helix zu 23 % β -Faltblatt und die Ala19-Variante ein ähnliches Verhältnis von 53 % α -Helix zu 24 % β -Faltblatt zeigte, konnte in der p Ser19-Variante eine

Abnahme der α -helikalen Struktur auf 42 % α -Helix-Anteil und eine geringe Zunahme in der β -Faltblattstruktur mit 29 % gemessen werden. Um herauszufinden, wie sich zusätzliche Phosphorylierungen an den Aminosäuren Ser21 und Ser23 auf die Struktur des Proteins auswirken, können weitere semisynthetische Proteine mit den dementsprechenden Phosphorylierungen synthetisiert werden. Als Kontrolle müssen in diesem Zusammenhang auch eine Sequenz mit unphosphoryliertem Ser19 und mehrere Alanin-Varianten getestet werden, um einen strukturellen Vergleich anstellen zu können. Außerdem kann hier durch einen N-terminalen Fluoreszenzmarker der Einfluss zusätzlicher Phosphorylierungen von hPar14 auf die Kernlokalisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie in Zellen untersucht werden.

Im letzten Teil dieser Arbeit haben Bindungsstudien zwischen unterschiedlich acetylierten hPar14-Peptiden GSGK_xAGK_xGGAA und den Bromodomänen GCN5, PCAF, BRD4(2) und BRDT1 gezeigt, dass eine Acetylierung an K11 zu einer affinen Bindung an die Bromodomäne BRDT1 mit einem KD-Wert von 36 μ M führt. Ebenfalls zeigt die doppelt acetylierte Variante (K11 und K14) mit einem KD-Wert von 57,2 μ M eine gute Affinität zu BRDT1. Über weitere Bindungsstudien des acetylierten N-Terminus von hPar14 mit Bromodomänproteinen könnten potentielle Bindungspartner für hPar14 gesucht werden. Hierzu könnte man kleine, per Peptidfestphasensynthese hergestellte Peptidfragmente für Protein-Microarrays nutzen. Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Mike Schutkowski an der Martin-Luther-Universität (Halle-Wittenberg) wendet diese Technologie für Screening-Verfahren an [153]. Hier wurde bereits eine Kooperationsmöglichkeit angeboten.

5 Zusammenfassung

Das durch HIV ausgelöste erworbene Immundefizienzsyndrom (AIDS) ist bis heute nicht heilbar, nahezu 28 Millionen Menschen starben bislang an den Folgen von AIDS. Daher ist die Entwicklung eines Impfstoffes oder eines wirksamen Medikamentes von großem Interesse. Der Infektionsmechanismus ist gut verstanden und ermöglicht viele pharmakologische Ansätze. Der Virus dringt über Chemokinrezeptoren (CCR5) in menschliche T-Zellen ein, dabei spielt der V3-Loop des viruseigenen Glykoproteins gp120 eine entscheidende Rolle. Dieser bindet mit seiner Stammregion an den sulfatierten N-Terminus und mit der Kopfregion an die ECL2-Schleife des CCR5-Rezeptors. Hier soll ein Entry-Inhibitor entwickelt werden, der einem natürlichen Protein entspricht. Dieser Inhibitor soll hochaffin an den sulfatierten N-Terminus des CCR5-Rezeptors binden und diesen maskieren. Um geeignete Binder finden zu können, muss der N-Terminus des CCR5-Rezeptors in sulfatierter Form vorliegen. Daher bestand die erste Aufgabe darin, diesen N-Terminus auf Basis sulfatierter Peptide herzustellen. Die einen Peptide wurden so konzipiert, dass sie nach der Synthese an einer festen Phase gebunden bleiben. Dadurch können sie als Trägermaterial für die Affinitätschromatographie eingesetzt werden und einen geeigneten Binder aus einer Substanzbibliothek fischen. Die anderen Peptide besitzen einen Fluorophor, mit denen eine Fluoreszenzanisotropie-Analyse der Bindungsaffinität in physiologischer Lösung möglich ist. Hierbei wurde die Säurelabilität der sulfatierten Peptide berücksichtigt und durch die Verwendung eines speziellen Harzes eine geeignete Synthesestrategie entwickelt.

Das zweite Projekt beschäftigt sich mit hPar14 einer PPlase aus der Familie der Parvuline. Die genaue Funktion dieses Proteins ist bis heute nicht geklärt. Der N-Terminus ist hoch flexibel, positiv geladen und besitzt neben einem Kernlokalisierungssignal mehrere posttranslationale Modifikationen (PTM). Eine genauere Untersuchung dieser PTM könnte Hinweise auf die Funktion des Proteins geben. Da PTM in *E. coli* rekombinant nicht herstellbar sind, wurde die Semisyntese etabliert. Hierzu wurden in erster Linie zwei semisynthetische Protein-Varianten (ATTO 488- pSer19 -hPar14 und ATTO 488-Ala19-hPar14) hergestellt, um eine Phosphorylierung an Ser19 zu untersuchen. Dabei wurde in einer CD-Spektroskopie-Analyse eine strukturelle Veränderung mit erhöhten β -Faltblattanteilen der Phosphoserin-Variante festgestellt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der semisynthetischen Proteine konnten eine erhöhte Kernlokalisierung der phosphorylierten Variante gegenüber der Kontrolle zeigen. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass sich beide semisynthetischen Proteine in subnuklearen Strukturen von U-2 OS-Zellen anlagern. Eine Kontrollgruppe transient transfizierter hPar14-EYFP-Fusionsproteine zeigte vergleichbare Ergebnisse mit einer erhöhten Kern- und subnuklearen Lokalisation.

Abschließend wurde das Bindungsverhalten des hPar14-Proteins anhand vier unterschiedlich acetylierter hPar14-Peptide untersucht. Dabei wurde die N-terminale Sequenz ${}_{8}\text{GSGKAGKGGAA}_{18}$ mit Acetylierungen an K11, K14, K11 und K14 versehen. Diese drei Peptide und ein zusätzliches Kontrollpeptid wurden gegenüber den vier unterschiedlichen Bromodomänen PCAF, GCN5, BRDT1 und BRD4(2) mittels Fluoreszenzanisotropie auf ihre Bindung hin charakterisiert. Hierbei ergab die Acetylierung an K11 von hPar14 eine adäquate Bindungsaffinität zu BRDT1, womit das Protein als potentieller Bindungspartner für hPar14 in Frage kommt.

Abstract

The acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) induced by HIV is still incurable today, nearly 28 million people have died so far from the effects of AIDS. Therefore, the development of a vaccine or of an active medicament are of great interest. The Infection mechanism is well understood and allows many pharmacological approaches. The virus enters through the chemokine receptors (CCR5) in human T cells, therefor the V3 loop of the glycoprotein gp120 plays an important role. This binds with its stem region to the sulfated N-terminus and with the head region to the ECL2 loop of the CCR5 receptor. The goal is the development of an entry inhibitor that corresponds to a natural protein. This inhibitor should bind with high affinity to the sulfated N-terminus of the CCR5 receptor and mask it. In order to find suitable binder, the N-terminus of the CCR5 receptor must be present in sulfated form.

Therefore, the first task was to produce a part of this N-terminus on the basis of sulfated peptides. Some peptides were designed for remain bound after synthesis on a solid phase. This allows them to be used as support material for affinity chromatography and fish a suitable binder from a compound library. Other peptides having a fluorophore, with which a fluorescence anisotropy analysis of binding affinity in physiological solution is possible. Here, the acid lability of the sulfated peptides were taken into consideration and a suitable synthetic strategy was developed by the use of a specific resin.

The second project deals with hPar14 a PPIase from the family of parvulins. The exact function of this protein is still unknown. The N-terminus is highly flexible, positively charged and has a nuclear localization signal in addition to several post-translational modifications (PTM). A precise examination of these PTM could give clues to the function of the protein. Since PTM cannot be produced in *E. coli* recombinantly, semi-synthesis has been established. For this purpose, two semisynthetic protein variants (ATTO 488-PSer19-hPar14 and ATTO 488-Ala19-hPar14) were prepared to investigate phosphorylation at Ser19 in the first step. A structural change with increased β -sheet proportions of the phosphoserine variant was discovered with CD spectroscopic analysis. Fluorescence microscopy of the semisynthetic proteins were able to show an increased nuclear localization of the phosphorylated variant compared with its control. It has also been shown that both semisynthetic proteins accumulate in subnuclear structures of U-2 OS cells. A control group transiently transfected hPar14-EYFP fusion proteins showed similar results with increased nuclear and subnuclear localization.

Finally, the binding behavior of the hPar14 protein was studied using four different acetylated hPar14 peptides. The N-terminal sequence ${}_{8}\text{GSGKAGKGGAA}_{18}$ was provided with acetylation of K11, K14, K11 and K14. These three peptides, and an additional control peptide were characterized by fluorescence anisotropy to their binding with the

four different bromodomains PCAF, GCN5, BRDT1 and BRD4 (2). The adequate binding affinity of the K11 acetylated peptide to BRDT1, makes the protein come a potential binding partner for hPar14.

6 Literaturverzeichnis

1. Hojo H, Matsumoto Y, Nakahara Y, Ito E, Suzuki Y et al. (2005) Chemical Synthesis of 23 kDa Glycoprotein by Repetitive Segment Condensation: A Synthesis of MUC2 Basal Motif Carrying Multiple O-GalNAc Moieties. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (39): 13720–13725.
2. Kimmerlin T, Seebach D (2005) '100 years of peptide synthesis': ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to β -peptide assemblies*. *The Journal of Peptide Research* 65 (2): 229–260.
3. Muir TW (2003) SEMISYNTHESIS OF PROTEINS BY EXPRESSED PROTEIN LIGATION. *Annu. Rev. Biochem.* 72 (1): 249–289.
4. PELLOIS J, MUIR T (2006) Semisynthetic proteins in mechanistic studies: using chemistry to go where nature can't. *Current Opinion in Chemical Biology* 10 (5): 487–491.
5. Rauh D, Waldmann H (2007) Symbiose aus Chemie und Biologie zum Studium von Proteinfunktionen. *Angew. Chem.* 119 (6): 840–844.
6. Wieland T, Bokelmann E, Bauer L, Lang HU, Lau H (1953) Über Peptidsynthesen. 8. Mitteilung Bildung von S-haltigen Peptiden durch intramolekulare Wanderung von Aminoacylresten. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 583 (1): 129–149.
7. Hackenberger CPR, Schwarzer D (2008) Chemoselektive Ligations- und Modifikationsstrategien für Peptide und Proteine. *Angew. Chem.* 120 (52): 10182–10228.
8. Dawson P, MUIR T, Clark-Lewis I, Kent S (1994) Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* 266 (5186): 776–779.
9. Nagaike F, Onuma Y, Kanazawa C, Hojo H, Ueki A et al. (2006) Efficient Microwave-Assisted Tandem N- to S-Acyl Transfer and Thioester Exchange for the Preparation of a Glycosylated Peptide Thioester. *Org. Lett.* 8 (20): 4465–4468.
10. Erlanson DA, Chytil M, Verdine GL (1996) The leucine zipper domain controls the orientation of AP-1 in the NFAT-AP-1-DNA complex. *Chemistry & Biology* 3 (12): 981–991.
11. Romanelli A, Shekhtman A, Cowburn D, Muir TW (2004) Semisynthesis of a segmental isotopically labeled protein splicing precursor: NMR evidence for an unusual peptide bond at the N-extein-intein junction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (17): 6397–6402.
12. Zheng W, Zhang Z, Ganguly S, Weller JL, Klein DC et al. (2003) Cellular stabilization of the melatonin rhythm enzyme induced by nonhydrolyzable phosphonate incorporation. *Nat Struct Biol* 10 (12): 1054–1057.
13. van Kasteren SI, Kramer HB, Jensen HH, Campbell SJ, Kirkpatrick J et al. (2007) Expanding the diversity of chemical protein modification allows post-translational mimicry. *Nature* 446 (7139): 1105–1109.
14. Liggett SB (2011) Phosphorylation barcoding as a mechanism of directing GPCR signaling. *Sci Signal* 4 (185): pe36.
15. Watari K, Nakaya M, Kurose H (2014) Multiple functions of G protein-coupled receptor kinases. *J Mol Signal* 9 (1): 1.
16. Prescott LM, Harley JP, Klein DA (2002) *Microbiology*. Boston: McGraw-Hill. 1 v. (various p.
17. Gareau JR, Lima CD (2010) The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11 (12): 861–871.
18. Ciechanover A (1994) The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mechanisms of action and cellular physiology. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 375 (9): 565–581.

19. Walsh C (2006) Posttranslational modification of proteins. Expanding nature's inventory. Englewood, Colo: Roberts and Co. Publishers. xxi, 490 p.
20. Peng M, Scholten A, Heck AJR, van Breukelen B (2014) Identification of Enriched PTM Crosstalk Motifs from Large-Scale Experimental Data Sets. *J. Proteome Res.* 13 (1): 249–259.
21. van Damme P, Hole K, Pimenta-Marques A, Helsens K, Vandekerckhove J et al. (2011) NatF Contributes to an Evolutionary Shift in Protein N-Terminal Acetylation and Is Important for Normal Chromosome Segregation. *PLoS Genet* 7 (7): e1002169.
22. Starheim KK, Gromyko D, Evjenth R, Rynningen A, Varhaug JE et al. (2009) Knockdown of human N alpha-terminal acetyltransferase complex C leads to p53-dependent apoptosis and aberrant human Arl8b localization. *Mol. Cell. Biol.* 29 (13): 3569–3581.
23. Gromyko D, Arnesen T, Rynningen A, Varhaug JE, Lillehaug JR (2010) Depletion of the human N α -terminal acetyltransferase A induces p53-dependent apoptosis and p53-independent growth inhibition. *Int. J. Cancer* 127 (12): 2777–2789.
24. Yi CH, Pan H, Seebacher J, Jang I, Hyberts SG et al. (2011) Metabolic Regulation of Protein N-Alpha-Acetylation by Bcl-xL Promotes Cell Survival. *Cell* 146 (4): 607–620.
25. Tan (2009) Immunohistochemical analysis of human arrest-defective-1 expressed in cancers in vivo. *Oncol Rep* 21 (4).
26. Marushige K (1976) Activation of chromatin by acetylation of histone side chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73 (11): 3937–3941.
27. Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M et al. (2009) Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 325 (5942): 834–840.
28. Sadoul K, Boyault C, Pabion M, Khochbin S (2008) Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases. *Biochimie* 90 (2): 306–312.
29. Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E (2005) Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 363: 15–23.
30. Yang X, Seto E (2008) Lysine Acetylation: Codified Crosstalk with Other Posttranslational Modifications. *Molecular Cell* 31 (4): 449–461.
31. Alberts B (2008) *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science. 1 v. (various p.
32. Mittag T, Kay LE, Forman-Kay JD (2009) Protein dynamics and conformational disorder in molecular recognition. *J. Mol. Recognit.*: n/a.
33. Olsen JV, Blagoev B, Gnad F, Macek B, Kumar C et al. (2006) Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. *Cell* 127 (3): 635–648.
34. Lennarz WJ, Lane MD *Encyclopedia of biological chemistry*. 1 online resource (4 volumes in 1) p.
35. Manning G (2005) Genomic overview of protein kinases. *WormBook*: 1–19.
36. Kiesel B (2000) *Encyclopedia of molecular biology*. (Four-volume set; first edition). New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: John Wiley & Sons, Inc., 1999, 2878 pages with over 2,000 entries and 900 figures; 925.00, ISBN 0-471-15302-8. *Acta Biotechnol.* 20 (1): 16.
37. Barford D (1996) Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends in Biochemical Sciences* 21 (11): 407–412.
38. Zhang Z (2002) P ROTEIN T YROSINE P HOSPHTASES. Structure and Function, Substrate Specificity, and Inhibitor Development. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42 (1): 209–234.
39. Cieřła J, Frączyk T, Rode W (2011) Phosphorylation of basic amino acid residues in proteins: important but easily missed. *Acta Biochim. Pol.* 58 (2): 137–148.

40. Mumby MC, Walter G (1993) Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiol. Rev.* 73 (4): 673–699.
41. Hemmerich S, Verdugo D, Rath VL (2004) Strategies for drug discovery by targeting sulfation pathways. *Drug Discov. Today* 9 (22): 967–975.
42. Lee RW, Huttner WB (1983) Tyrosine-O-sulfated proteins of PC12 pheochromocytoma cells and their sulfation by a tyrosylprotein sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* 258 (18): 11326–11334.
43. Stone MJ, Chuang S, Hou X, Shoham M, Zhu JZ (2009) Tyrosine sulfation: an increasingly recognised post-translational modification of secreted proteins. *N Biotechnol* 25 (5): 299–317.
44. Varin L, DeLuca V, Ibrahim RK, Brisson N (1992) Molecular characterization of two plant flavonol sulfotransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (4): 1286–1290.
45. Rouleau M, Marsolais F, Richard M, Nicolle L, Voigt B et al. (1999) Inactivation of brassinosteroid biological activity by a salicylate-inducible steroid sulfotransferase from *Brassica napus*. *J. Biol. Chem.* 274 (30): 20925–20930.
46. Weinshilboum RM, Otterness DM, Aksoy IA, Wood TC, Her C et al. (1997) Sulfation and sulfotransferases 1: Sulfotransferase molecular biology: cDNAs and genes. *FASEB J.* 11 (1): 3–14.
47. Chapman E, Best MD, Hanson SR, Wong C (2004) Sulfotransferasen: Struktur, Mechanismus, biologische Aktivität, Inhibierung, Anwendung in Synthesen. *Angew. Chem.* 116 (27): 3610–3632.
48. Varin L, Ibrahim RK (1989) Partial Purification and Characterization of Three Flavonol-Specific Sulfotransferases from *Flaveria chloraefolia*. *Plant Physiol.* 90 (3): 977–981.
49. Niehrs C, Beisswanger R, Huttner WB (1994) Protein tyrosine sulfation, 1993--an update. *Chem. Biol. Interact.* 92 (1-3): 257–271.
50. Negishi M, Pedersen LG, Petrotchenko E, Shevtsov S, Gorokhov A et al. (2001) Structure and function of sulfotransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* 390 (2): 149–157.
51. Teramoto T, Fujikawa Y, Kawaguchi Y, Kurogi K, Soejima M et al. (2013) Crystal structure of human tyrosylprotein sulfotransferase-2 reveals the mechanism of protein tyrosine sulfation reaction. *Nat Commun* 4: 1572.
52. Seibert C, Cadene M, Sanfiz A, Chait BT, Sakmar TP (2002) Tyrosine sulfation of CCR5 N-terminal peptide by tyrosylprotein sulfotransferases 1 and 2 follows a discrete pattern and temporal sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (17): 11031–11036.
53. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S et al. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220 (4599): 868–871.
54. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E et al. (1983) Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220 (4599): 865–867.
55. Katzourakis A, Tristem M, Pybus OG, Gifford RJ (2007) Discovery and analysis of the first endogenous lentivirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (15): 6261–6265.
56. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR (1998) Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393 (6685): 595–599.
57. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y et al. (1996) HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381 (6584): 667–673.

58. Zlotnik A, Yoshie O (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12 (2): 121–127.
59. Fernandez EJ, Lolis E (2002) Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42: 469–499.
60. Naif HM (2013) Pathogenesis of HIV Infection. *Infect Dis Rep* 5 (Suppl 1): e6.
61. Haqqani AA, Tilton JC (2013) Entry inhibitors and their use in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral Res.* 98 (2): 158–170.
62. Melby T, Sista P, DeMasi R, Kirkland T, Roberts N et al. (2006) Characterization of envelope glycoprotein gp41 genotype and phenotypic susceptibility to enfuvirtide at baseline and on treatment in the phase III clinical trials TORO-1 and TORO-2. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 22 (5): 375–385.
63. Poveda E, Soriano V (2010) Optimizing management of treatment-naïve and treatment-experienced HIV+ patients: the role of maraviroc. *HIV AIDS (Auckl)* 2: 51–58.
64. Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Robbins SL (2013) Robbins basic pathology. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders. xii, 910 p.
65. Marfori M, Mynott A, Ellis JJ, Mehdi AM, Saunders NF et al. (2011) Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813 (9): 1562–1577.
66. Rodriguez MS, Dargemont C, Stutz F (2004) Nuclear export of RNA. *Biol. Cell* 96 (8): 639–655.
67. Goldfarb DS, Corbett AH, Mason DA, Harreman MT, Adam SA (2004) Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol.* 14 (9): 505–514.
68. Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39 (3 Pt 2): 499–509.
69. Dingwall C, Robbins J, Dilworth SM, Roberts B, Richardson WD (1988) The nucleoplasmic nuclear location sequence is larger and more complex than that of SV-40 large T antigen. *J. Cell Biol.* 107 (3): 841–849.
70. Makkerh JP, Dingwall C, Laskey RA (1996) Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids. *Curr. Biol.* 6 (8): 1025–1027.
71. Pemberton LF, Paschal BM (2005) Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic* 6 (3): 187–198.
72. Goodsell D (2007) Importins. RCSB PDB.
73. Göthel SF, Marahiel MA (1999) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell. Mol. Life Sci.* 55 (3): 423–436.
74. Fischer G, Bang H, Mech C (1984) Nachweis einer Enzymkatalyse für die cis-trans-Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden. *Biomed. Biochim. Acta* 43 (10): 1101–1111.
75. Greenberg A, Breneman CM, Liebman JF (2003) The amide linkage. Structural significance in chemistry, biochemistry, and materials science. Hoboken, NJ: Wiley-Interscience. xii, 653 p.
76. Nagradova N (2007) Enzymes catalyzing protein folding and their cellular functions. *Curr. Protein Pept. Sci.* 8 (3): 273–282.
77. Mueller JW, Bayer P (2008) Small family with key contacts: par14 and par17 parvulin proteins, relatives of pin1, now emerge in biomedical research. *Perspect Medicin Chem* 2: 11–20.
78. Huai Q, Kim H, Liu Y, Zhao Y, Mondragon A et al. (2002) Crystal structure of calcineurin-cyclophilin-cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin-drug complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (19): 12037–12042.

79. Kim BJ, Min SU, Park KY, Choi JW, Park SW et al. (2008) Combination therapy of cyclosporine and methylprednisolone on severe alopecia areata. *J Dermatolog Treat* 19 (4): 216–220.
80. Fegan A, White B, Carlson, Jonathan C T, Wagner CR (2010) Chemically controlled protein assembly: techniques and applications. *Chem. Rev.* 110 (6): 3315–3336.
81. Rahfeld JU, Schierhorn A, Mann K, Fischer G (1994) A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 343 (1): 65–69.
82. Lazar SW, Kolter R (1996) SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins. *J. Bacteriol.* 178 (6): 1770–1773.
83. Lederer C, Heider D, van den Boom, Johannes, Hoffmann D, Mueller JW et al. (2011) Single-domain parvulins constitute a specific marker for recently proposed deep-branching archaeal subgroups. *Evol. Bioinform. Online* 7: 135–148.
84. Jaremko Ł, Jaremko M, Elfaki I, Mueller JW, Ejchart A et al. (2011) Structure and dynamics of the first archaeal parvulin reveal a new functionally important loop in parvulin-type prolyl isomerases. *J. Biol. Chem.* 286 (8): 6554–6565.
85. Schmid FX (2001) Prolyl isomerases. *Adv. Protein Chem.* 59: 243–282.
86. Metzner M, Stoller G, Rücknagel KP, Lu KP, Fischer G et al. (2001) Functional replacement of the essential ESS1 in yeast by the plant parvulin DPar13. *J. Biol. Chem.* 276 (17): 13524–13529.
87. Sudol M, Sliwa K, Russo T (2001) Functions of WW domains in the nucleus. *FEBS Lett.* 490 (3): 190–195.
88. Lu PJ, Zhou XZ, Shen M, Lu KP (1999) Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science* 283 (5406): 1325–1328.
89. Jäger M, Zhang Y, Bieschke J, Nguyen H, Dendle M et al. (2006) Structure-function-folding relationship in a WW domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (28): 10648–10653.
90. Jager M, Deechongkit S, Koepf EK, Nguyen H, Gao J et al. (2008) Understanding the mechanism of beta-sheet folding from a chemical and biological perspective. *Biopolymers* 90 (6): 751–758.
91. Fuller AA, Du D, Liu F, Davoren JE, Bhabha G et al. (2009) Evaluating beta-turn mimics as beta-sheet folding nucleators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (27): 11067–11072.
92. Shaw DE, Maragakis P, Lindorff-Larsen K, Piana S, Dror RO et al. (2010) Atomic-level characterization of the structural dynamics of proteins. *Science* 330 (6002): 341–346.
93. Zhou XZ, Lu PJ, Wulf G, Lu KP (1999) Phosphorylation-dependent prolyl isomerization: a novel signaling regulatory mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 56 (9-10): 788–806.
94. Hanes SD (2014) The Ess1 prolyl isomerase: Traffic cop of the RNA polymerase II transcription cycle. *Biochim. Biophys. Acta.*
95. Mueller JW, Kessler D, Neumann D, Stratmann T, Papatheodorou P et al. (2006) Characterization of novel elongated Parvulin isoforms that are ubiquitously expressed in human tissues and originate from alternative transcription initiation. *BMC Mol. Biol.* 7: 9.
96. Sekerina E, Rahfeld JU, Müller J, Fanghänel J, Rascher C et al. (2000) NMR solution structure of hPar14 reveals similarity to the peptidyl prolyl cis/trans isomerase domain of the mitotic regulator hPin1 but indicates a different functionality of the protein. *J. Mol. Biol.* 301 (4): 1003–1017.
97. Tatiana Reimer (2003) Cellular localisation and function of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase hPar14. Dissertation. Available: <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/03/03H115/>. Accessed 9 March 2014.

98. Surmacz TA, Bayer E, Rahfeld JU, Fischer G, Bayer P (2002) The N-terminal basic domain of human parvulin hPar14 is responsible for the entry to the nucleus and high-affinity DNA-binding. *J. Mol. Biol.* 321 (2): 235–247.
99. Fujiyama-Nakamura S, Yoshikawa H, Homma K, Hayano T, Tsujimura-Takahashi T et al. (2009) Parvulin (Par14), a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, is a novel rRNA processing factor that evolved in the metazoan lineage. *Mol. Cell Proteomics* 8 (7): 1552–1565.
100. Kessler D, Papatheodorou P, Stratmann T, Dian EA, Hartmann-Fatu C et al. (2007) The DNA binding parvulin Par17 is targeted to the mitochondrial matrix by a recently evolved prepeptide uniquely present in Hominidae. *BMC Biol.* 5: 37.
101. Tamkun JW, Deuring R, Scott MP, Kissinger M, Pattatucci AM et al. (1992) brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* 68 (3): 561–572.
102. Filippakopoulos P, Picaud S, Mangos M, Keates T, Lambert J et al. (2012) Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family. *Cell* 149 (1): 214–231.
103. Filippakopoulos P, Knapp S (2012) The bromodomain interaction module. *FEBS Lett.* 586 (17): 2692–2704.
104. Swygert SG, Peterson CL (2014) Chromatin dynamics: Interplay between remodeling enzymes and histone modifications. *Biochim. Biophys. Acta.*
105. Kim H, Mukhopadhyay R, Rothbart SB, Silva AC, Vanoosthuyse V et al. (2014) Identification of a BET Family Bromodomain/Casein Kinase II/TAF-Containing Complex as a Regulator of Mitotic Condensin Function. *Cell Reports* 6 (5): 892–905.
106. Alberts B (2011) *Molekularbiologie der Zelle*. Weinheim: Wiley-VCH. LXII, 1801 S. p.
107. Nils Postel HIV-Medikamente im Überblick. Available: <http://www.hivandmore.de/medikamente/>.
108. Balsved D, Bundgaard JR, Sen JW (2007) Stability of tyrosine sulfate in acidic solutions. *Analytical Biochemistry* 363 (1): 70–76.
109. GraphPad Prism V5.04. Graphpad Software Inc.
110. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9 (7): 671–675.
111. Kibbe WA (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* 35 (Web Server issue): W43-6.
112. DeLano The PyMOL Molecular Graphics System. Version 1.2r1. PyMOL. LLC 2009.
113. Walker JM (2005) *The Proteomics Protocols Handbook*. Dordrecht: Springer. 1 online resource (1003 p.
114. Cooloy.com (2014) Solution Calculator Lite: Cooloy.
115. Johnson WC (1999) Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. *Proteins* 35 (3): 307–312.
116. Sreerama N, Woody RW (1993) A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.* 209 (1): 32–44.
117. Sreerama N, Woody RW (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* 287 (2): 252–260.
118. Briz V, Poveda E, Soriano V (2006) HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways. *Briz - 2006 HIV entry inhibitors. Briz - HIV entryinhibitors. Retrovirology* 3 (1): 67.
119. Hanes J, Plückthun A (1997) In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (10): 4937–4942.

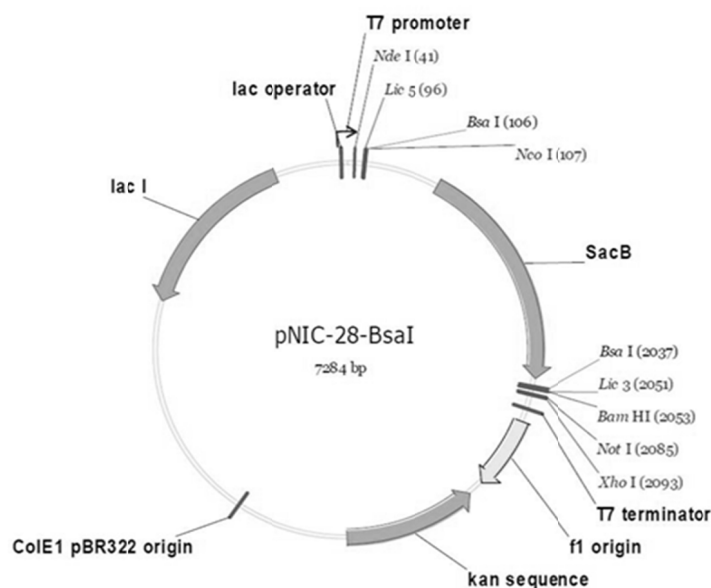
120. Lipovsek D, Plückthun A (2004) In-vitro protein evolution by ribosome display and mRNA display. *Journal of Immunological Methods* 290 (1-2): 51–67.
121. Bende H (1974) Affinitäts-Chromatographie. *Chem. Unserer Zeit* 8 (1): 17–25.
122. Wang SS (1973) p-alkoxybenzyl alcohol resin and p-alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments. *J. Am. Chem. Soc.* 95 (4): 1328–1333.
123. Axén R, Porath J (1966) Chemical coupling of enzymes to cross-linked dextran ('Sephadex'). *Nature* 210 (5034): 367–369.
124. Axén R, Porath J, Ernback S (1967) Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature* 214 (5095): 1302–1304.
125. Waters ML (2002) Aromatic interactions in model systems. *Current Opinion in Chemical Biology* 6 (6): 736–741.
126. McGaughey GB, Gagné M, Rappé AK (1998) pi-Stacking interactions. Alive and well in proteins. *J. Biol. Chem.* 273 (25): 15458–15463.
127. Liptrott NJ, Penny M, Bray PG, Sathish J, Khoo SH et al. (2009) The impact of cytokines on the expression of drug transporters, cytochrome P450 enzymes and chemokine receptors in human PBMC. *Br. J. Pharmacol.* 156 (3): 497–508.
128. Zhou MM, Huang B, Olejniczak ET, Meadows RP, Shuker SB et al. (1996) Structural basis for IL-4 receptor phosphopeptide recognition by the IRS-1 PTB domain. *Nat. Struct. Biol.* 3 (4): 388–393.
129. Dhe-Paganon S, Ottinger EA, Nolte RT, Eck MJ, Shoelson SE (1999) Crystal structure of the pleckstrin homology-phosphotyrosine binding (PH-PTB) targeting region of insulin receptor substrate 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (15): 8378–8383.
130. Thomas Kühnemund (2005) Synthese von Peptiden aus dem N-terminalen Bereich des humanen CCR5 unter Verwendung von Sulfotyrosinen und deren Bindung an das HIV-1 Glycoprotein gp120. Hamburg.
131. Takahashi S, Kim EH, Hibino T, Ooi T (1989) Comparison of alpha-helix stability in peptides having a negatively or positively charged residue block attached either to the N- or C-terminus of an alpha-helix: the electrostatic contribution and anisotropic stability of the alpha-helix. *Biopolymers* 28 (5): 995–1009.
132. Sieber P (1987) A new acid-labile anchor group for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides by the Fmoc method. *Tetrahedron Letters* 28 (19): 2107–2110.
133. Rihs HP, Jans DA, Fan H, Peters R (1991) The rate of nuclear cytoplasmic protein transport is determined by the casein kinase II site flanking the nuclear localization sequence of the SV40 T-antigen. *EMBO J.* 10 (3): 633–639.
134. Reimer T, Weiwad M, Schierhorn A, Ruecknagel P, Rahfeld J et al. (2003) Phosphorylation of the N-terminal domain regulates subcellular localization and DNA binding properties of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase hPar14. *J. Mol. Biol.* 330 (5): 955–966.
135. Arndt H, Hackenberger C, Schwarzer D (2010) Werkzeug für die Chemische Biologie. Semisynthese. *Chemie in unserer Zeit* 44 (3): 198–206.
136. Arndt H, Hackenberger C, Schwarzer D (2010) Semisynthese. Chemie mit den Molekülen der Natur. *Chem. Unserer Zeit* 44 (2): 130–137.
137. White P, Keyte JW, Bailey K, Bloomberg G (2004) Expediting the Fmoc solid phase synthesis of long peptides through the application of dimethylloxazolidine dipeptides. *J. Peptide Sci.* 10 (1): 18–26.

138. AppliedPhotophysics (2014) CD Units & Conversions. All relationships explained. Available: <http://www.photophysics.com/tutorials/circular-dichroism-cd-spectroscopy/7-cd-units-conversions>. Accessed 29 March 2014.
139. Lottspeich F, Engels JW (2006) Bioanalytik. München, Heidelberg: Elsevier, Spektrum, Akad. Verl. XXIV, 1119 s. p.
140. Rapp C, Klerman H, Levine E, McClendon CL, Verma C (2013) Hydrogen Bond Strengths in Phosphorylated and Sulfated Amino Acid Residues. *PLoS ONE* 8 (3): e57804.
141. Hoekstra WJ (2001) The 2-chlorotrityl resin: a worthy addition to the medicinal chemist's toolbox. *Curr. Med. Chem.* 8 (6): 715–719.
142. Kosswig K (2000) Surfactants. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
143. Auterhoff H (1967) Reaktionen der organischen Chemie. VonH. KrauchundW. Kunz, 3., völlig neu bearbeitete Auflage der „Namenreaktionen der organischen Chemie“. XXIV, 764 Seiten. A. Hüthig Verlag, Heidelberg 1966. Preis: Ganzleinen DM 56,-. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 300 (5): 478.
144. Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258 (5536): 598–599.
145. Letzel T, Rehm H (2010) Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. S. p.
146. Elson EL, Qian H (1989) Interpretation of fluorescence correlation spectroscopy and photobleaching recovery in terms of molecular interactions. *Methods Cell Biol.* 30: 307–332.
147. Roth CM, Heinlein PI, Heilemann M, Hertel D (2007) Imaging diffusion in living cells using time-correlated single-photon counting. *Anal. Chem.* 79 (19): 7340–7345.
148. Petryayeva E, Algar WR, Medintz IL (2013) Quantum dots in bioanalysis: a review of applications across various platforms for fluorescence spectroscopy and imaging. *Appl Spectrosc* 67 (3): 215–252.
149. Kranjc A (1997) Tracer hydrology 97. Proceedings of the 7th International Symposium on Water Tracing, Portorož, Slovenia, 26 - 31 May 1997. Rotterdam [u.a.]: Balkema. XIV, 450 S p.
150. Breton GW, Vang X (1998) Photodimerization of Anthracene. *J. Chem. Educ.* 75 (1): 81.
151. Hu C, Chinenov Y, Kerppola TK (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol. Cell* 9 (4): 789–798.
152. Fulwyler MJ (1965) Electronic separation of biological cells by volume. *Science* 150 (3698): 910–911.
153. Zerweck J, Masch A, Schutkowski M (2009) Peptide microarrays for profiling of modification state-specific antibodies. *Methods Mol. Biol.* 524: 169–180.
154. Lyons AJ, Gandhi NS, Mancera RL (2014) Molecular dynamics simulation of the phosphorylation-induced conformational changes of a tau peptide fragment. *Proteins*: n/a.
155. Whitmore L, Wallace BA (2008) Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers* 89 (5): 392–400.
156. Cain JA, Solis N, Cordwell SJ (2014) Beyond gene expression: The impact of protein post-translational modifications in bacteria. *Journal of Proteomics* 97: 265–286.
157. Seibel NM, Eljouni J, Nalaskowski MM, Hampe W (2007) Nuclear localization of enhanced green fluorescent protein homomultimers. *Anal. Biochem.* 368 (1): 95–99.
158. Jans DA (1995) The regulation of protein transport to the nucleus by phosphorylation. *Biochem. J.* 311 (Pt 3): 705–716.

159. Lange A, Mills RE, Lange CJ, Stewart M, Devine SE et al. (2007) Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J. Biol. Chem.* 282 (8): 5101–5105.
160. Stewart M (2006) Structural basis for the nuclear protein import cycle. *Biochem. Soc. Trans.* 34 (Pt 5): 701–704.
161. Lott K, Cingolani G (2011) The importin β binding domain as a master regulator of nucleocytoplasmic transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1813 (9): 1578–1592.
162. Jennifer McDowall (2007) Importins. Importins, Controlling Movement into the Nucleus. Available: www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2007_1/Page1.htm.
163. Gualtierio A, Jans D, Camozzi D, Avanzi S, Loregian A et al. (2013) Regulated Transport into the Nucleus of Herpesviridae DNA Replication Core Proteins. *Viruses* 5 (9): 2210–2234.
164. Gnad F, Ren S, Cox J, Olsen JV, Macek B et al. (2007) PHOSIDA (phosphorylation site database): management, structural and evolutionary investigation, and prediction of phosphosites. *Genome Biol.* 8 (11): R250.
165. Matera AG, Izaguire-Sierra M, Praveen K, Rajendra T (2009) Nuclear Bodies: Random Aggregates of Sticky Proteins or Crucibles of Macromolecular Assembly. *Developmental Cell* 17 (5): 639–647.
166. Herrera JE, Sakaguchi K, Bergel M, Trieschmann L, Nakatani Y et al. (1999) Specific acetylation of chromosomal protein HMG-17 by PCAF alters its interaction with nucleosomes. *Mol. Cell. Biol.* 19 (5): 3466–3473.
167. Jakushev S, Hoffmann D (2009) A Novel Algorithm for Macromolecular Epitope Matching. *Algorithms* 2 (1): 498–517.
168. Dhar S, Thota A, Rao, Manchanahalli Rangaswamy Satyanarayana (2012) Insights into role of bromodomain, testis-specific (Brdt) in acetylated histone H4-dependent chromatin remodeling in mammalian spermiogenesis. *J. Biol. Chem.* 287 (9): 6387–6405.

7 Anhang

Vektorkarten der beiden übrigen in dieser Arbeit verwendeten und nicht im Methodenteil gezeigten Vektoren pEYFP-N1 und pNIC28-Bsa4. Zusätzliche Informationen über den pNIC28-Vektor, der aus Oxford erhalten wurde und in dem sich sämtliche hier verwendeten Bromodomänen befunden haben, sind als Kopie des originalen Informationsblatts hinzugefügt.



Vector Name	pNIC28-Bsa4
Source	Opher Gileadi
Sequence accession/link	(SGC)
Description	pET expression vector with His ₆ tag in 22-aa N-terminal fusion peptide, with TEV protease cleavage site. Includes sites for LIC cloning, and a “stuffer” fragment that includes the SacB gene, allowing negative selection on 5% sucrose
Antibiotic resistance	Kanamycin, 50 µg/ml
Promoter	T7 - lacO
Cloning	LIC. (vector treated with BsaI, then with T4 DNA polymerase in presence of dGTP)
Initiation codon	Supplied in PCR primer
N-terminal fusion – seq.	MHHHHHSSGVDLGTENLYFQ*SM (* - TEV cleavage site)
N-terminal fusion – MW	2684.1 Da including Met (2465.8 Da removed by TEV cleavage)
Termination codons	supplied in PCR primer
Protease cleavage	TEV
Additional features	
Preferred host	DE3 hosts: BL21, Rosetta, etc. MUST express T7 RNA polymerase.
5' sequencing primer	pLIC-for: TGTGAGCGGATAACAATTCC
3' sequencing primer	pLIC-rev: AGCAGCCAACCTCAGCTTCC

Polylinker region

```

                                T7-forward          pLIC-forward
                                ----->          ----->
                                lac operator
                                ~~~~~
7222 CTCGATCCCG CGAAATTAAT ACGACTCACT ATAGGGGAAT TGTGAGCGGA TAACAATTCC
     GAGCTAGGGC GCTTTAATTA TGCTGAGTGA TATCCCCTTA AACTCGCCT ATTGTTAAGG

                                NdeI
                                ~~~~~
                                M H H H H H
7282 CCTCTAGAAA TAATTTTGT TAACTTTAAG AAGGAGATAT ACATATGCAC CATCATCATC
     GGAGATCTTT ATTAACAACA ATTGAAATTC TTCCTCTATA TGTATACGTG GTAGTAGTAG

                                Upper-LIC          BsaI
                                ~~~~~
     H S S G V D L G T E N L Y F Q S
58   ATCATTCTTC TGGTGTAGAT CTGGGTACCG AGAACCTGTA CTTCCAATCC ATGGAGACCG
     TAGTAAGAAG ACCACATCTA GACCCATGGC TCTTGGACAT GAAGGTTAGG TACCTCTGGC

118  ACGTCCACAT ..... (SacB fragment) .....
     TGCAGGTGTA

                                BsaI          Lower-LIC          BamHI          EcoRI          SacI
                                ~~~~~          ~~~~~          ~~~~~          ~~~~~          ~~~~~
2010 GATATCCTAT TGGCATTGAC GGTCTCCAGT AAAGGTGGAT ACGGATCCGA ATTCGAGCTC
     CTATAGGATA ACCGTAAC TG CAGAGGTCA TTTCCACCTA TGCCTAGGCT TAAGCTCGAG

     SalI
     HindIII
     *****
2070 CGTCGACAAG CTTGCGGCCG CACTCGAGCA CCACCACCAC CACCACTGAG ATCCGGCTGC
     GCAGCTGTTT GAACCGCGGC GTGAGCTCGT GGTGGTGGTG GTGGTGACTC TAGGCCGACG

                                T7-reverse
                                -----<
2130 TAACAAAGCC CGAAAGGAAG CTGAGTTGGC TGCTGCCACC GCTGAGCAAT AACTAGCATA
     ATTGTTTCGG GCTTTCCTTC GACTCAACCG ACGACGGTGG CGACTCGTTA TTGATCGTAT

                                pLIC-rev
                                -----<

```

Primers for LIC cloning:

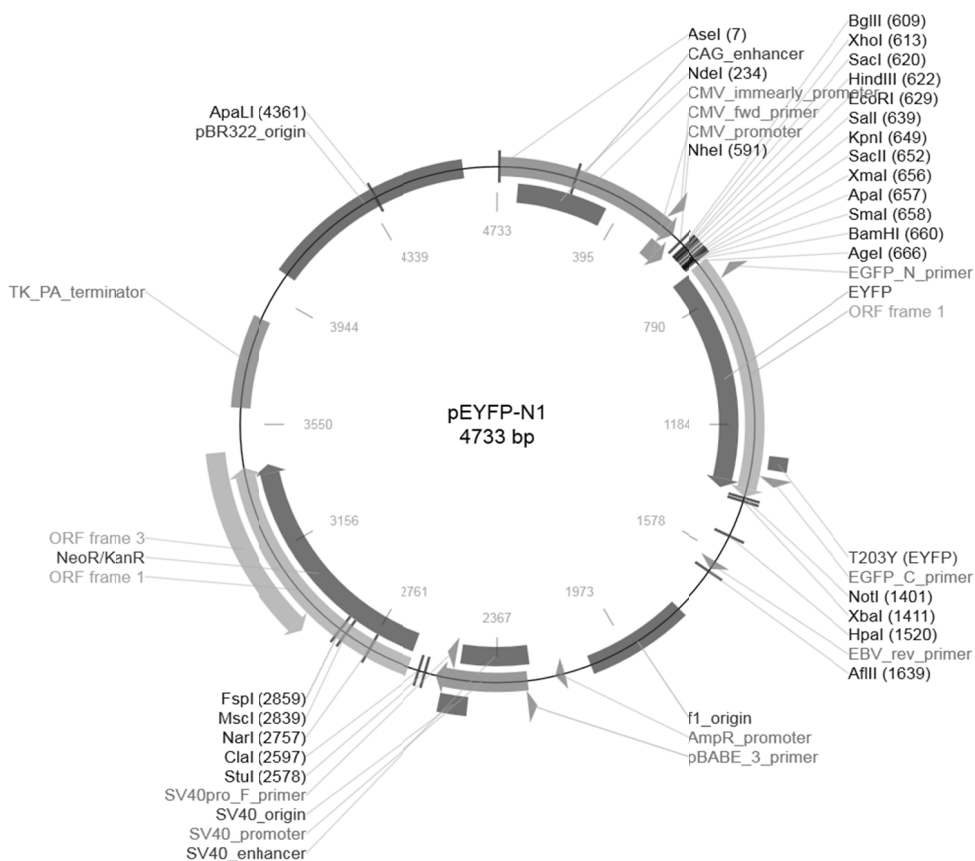
Upstream: add TACTTCCAATCCATG to the 5' end (ATG in-frame with the desired coding sequence).

Downstream: add TATCCACCTTTACTG to 5' end of downstream primer; add termination codon, if necessary.

Quelle:

Opher Gileadi, Structural Genomics Consortium

opher.gileadi@sgc.ox.ac.uk



Quelle:

www.addgene.org/vector-database/2689/

2. PCR-Produkt

TGTGAAAAACATGGCAAAATCATGGAAGCCATGGAAAAGTTAAAGTCTGGGATGAGATTCAATGAAGTGGCCGCACAGTATAGTGAAGATA
AAGCCAGGAAGGGGTGACTTGGGTGGATGACCAGAGGTCATGGTGGGACCATTTCAAGAAGCAGCATTTGCCCTTGCCTGTAAGTGG
GATGGATAAGCCTGTGTTTACAGACCCACCGGTTAAGACAAAATTTGGATATCATATTTATATGGTCTGAAGGAAAGAA

3. Restriktion des Vektors BC 903.1

BsaI ggtctc
BamHI ggatcc

CAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCGGCCACGGGGCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCGAAGTGGCGAGCC
CGATCTTCCCACATCGGTGATGTCCGGCATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGTGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGA
GGATCGAGATCTCGATCCCAGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAAATGTTGAGCGGATAACAATTTCCCTCTAGAAAATAATTTTGT
AACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACGGCAGCGGCTGGTCCGGCGCCGAGCGCTAGCATGTC
GGACTCAGAAGTCAATCAAGAAGCTAAGCCAGAGGTCAAGCCAGAAGTCAAGCCTGAGACTCACATCAATTTAAAGGTGTCCGATGGATCT
TCAGAGATCTTCTCAAGATCAAAAAGACCACTCCTTTAAGAAGGCTGATGGAAGCGTTCGCTAAAAGACAGGGTAAAGAAATGGACTCCT
TAAGATCTTGTACAGCGGTATTAGAATTAAGCTGATCAGACCCCTGAAGATTTGGACATGGAGATAACGATATATTAGGCTCACAG
AGAACAGATTGGTGGTAGAGACCTCA

GGATCC

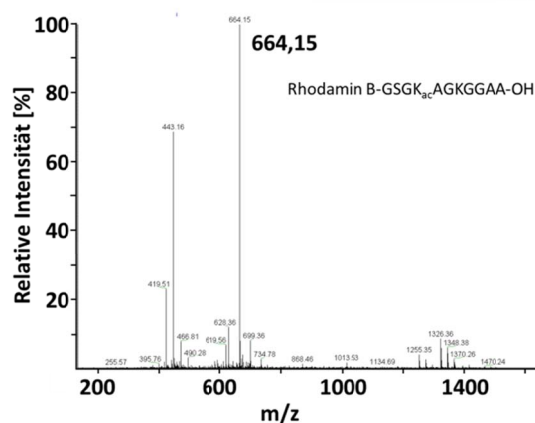
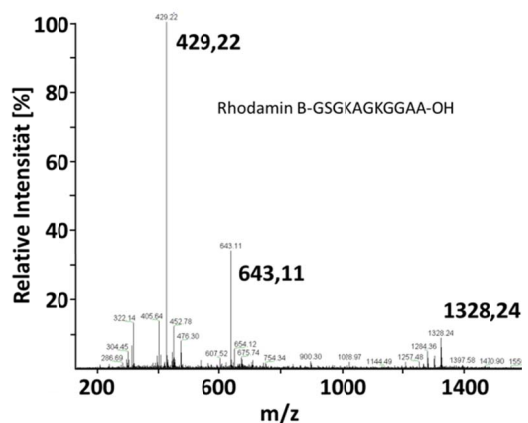
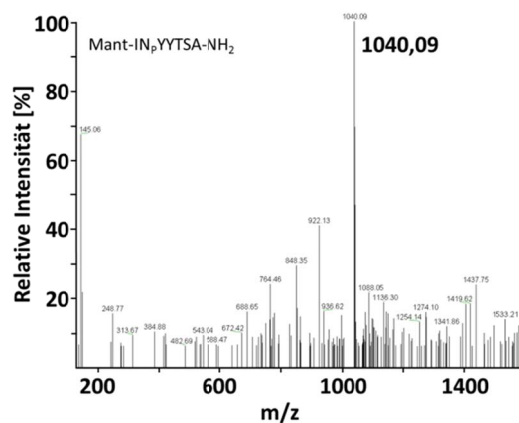
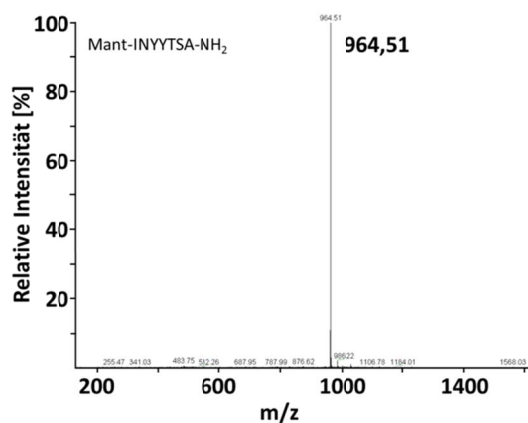
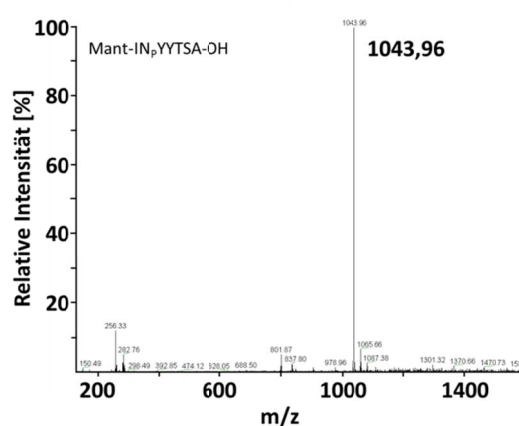
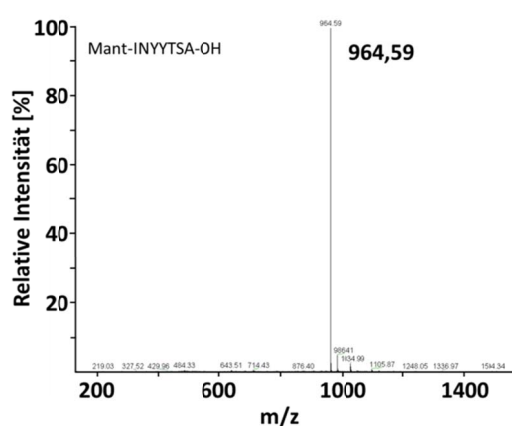
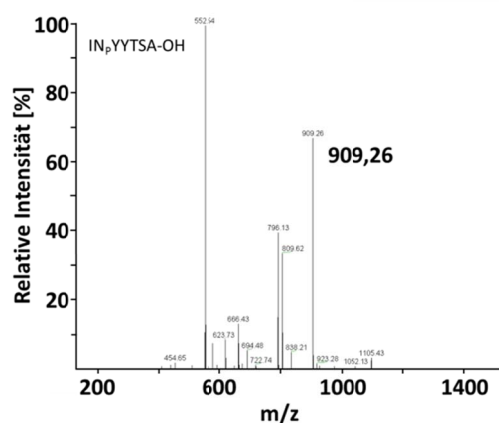
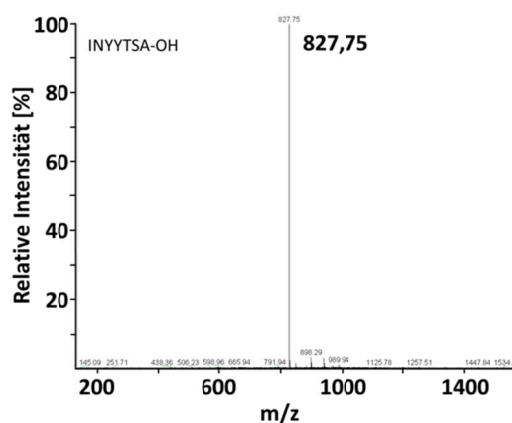
GGTCTC

CAACGACAGGAGCAGCATCATGCGCACCCGTGGGGCCGCATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCA
GTGACGAAGGCTTGTAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAGCCGATCATCGTCCGCTCCAGCGAAAGCGGTCTCCG
CGAAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGCAGTCATAAGTGGCGCAGCATAGTCATGCCCCG
CGCCACCGGAAGGACTGACTGGGTGAAGGCTCTCAAGGCATCGGTGAGATCCCGGTGCCTAATGAGTGAAGTAACTTACATTAAT
GCGTTGGCGTCACTGCCGCTTCCAGTCCGGAAACCTGTGTCGACAGTGCATTAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGGGGTTTGC
GTATGGGGCCAGGGTGGTCTTTCTTTTACCAGTGTAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTCCAGCGCTGGCCCTGAGAGAGTTGAGCA
AGCGGTCCACGCTGGTTTGGCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTGATGGTGGTAAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTCCGATCGTC
GTATCCCACTACCGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCACGCGCATCTGATCGTTGGCAACC
AGCATCGCAGTGGAAACGATGCCCTCATTACGATTTGTCATGGTTTGGTAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCCGCTTCCGTTCCGCTA
TCGGCTGAATTTGATTTGCGAGTGTAGATATTATGCGAGCCAGCCAGACGCAGACGCGCCGAGACAGAACTTAAATGGCCCGCTAACAGCGC
GATTTGCTGGTGACCAATGCGACAGATGCTCCACGCCAGTCCGGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTGATGGGTGTCTGG
TCAGAGACATCAAGAAATAACGCGGAAACATTAGTGCAGGCGACTTCCACAGCAATGGCATCCTGCTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCA
GCCACTGACGCGTGTGCGGAGAAAGATTGTGCACCCGCGCTTTACAGGCTTTCGACGCGCTTCGTTTACCATCGACACCACCAGCTGGC
ACCCAGTTGATCGGCGGAGATTTAATCGCGCGACAATTTGCGAGCGCGGTGCAAGGGCAGACTGGAGTGGCAACGCCAATCAGCAAC
GACTGTTTGGCCCGCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCTTTTTCGCA
AAAGTGGCTGGCTGGTTACCCAGCGGAAACCGTCTGATAAGAGACACCGGCATACTGTGCAGATCGTATAACGTTACTGTTGTTTAC
ATTACCACCTGAATGACTCTCTTCCGGCGCTATCATGCCATACCAGGAAAGGTTTTCGCCATTCGATGGTGTCCGGGATCTCGAGC
CTCTCCCTTATGCGACTCTGCATTAGGAAGCAGCCAGTAGTAGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCGCAAGGAATGGTGCATG

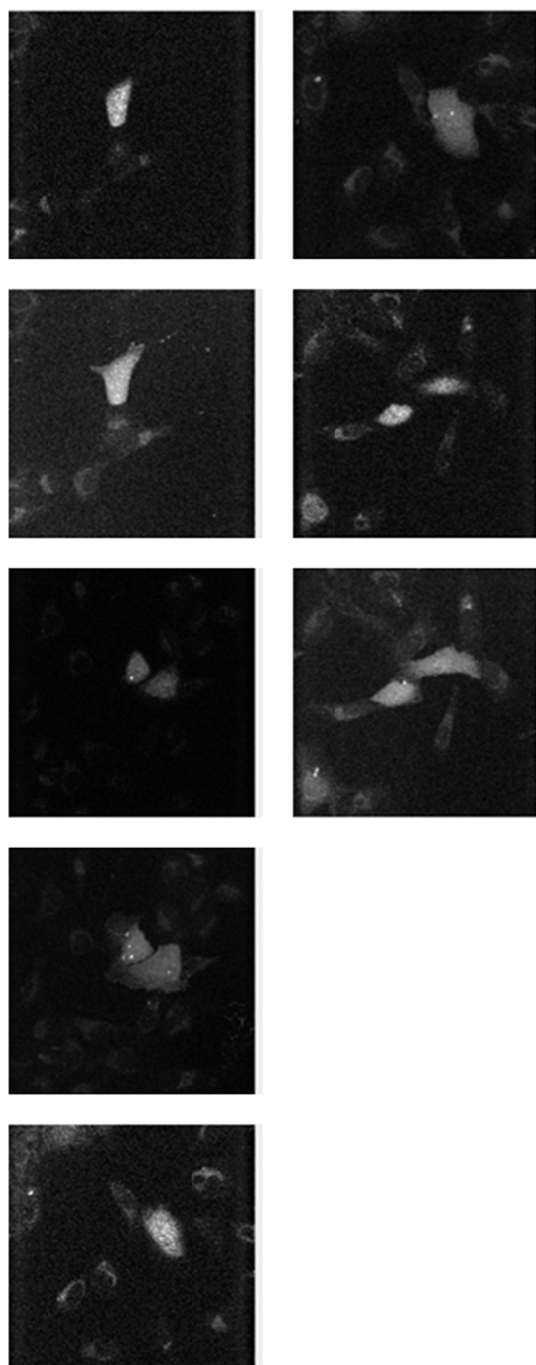
4. Ligation

CAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCGGCCACGGGGCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCGAAGTGGCGAGCC
CGATCTTCCCACATCGGTGATGTCCGGCATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGTGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGA
GGATCGAGATCTCGATCCCAGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAAATGTTGAGCGGATAACAATTTCCCTCTAGAAAATAATTTTGT
AACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACGGCAGCGGCTGGTCCGGCGCCGAGCGCTAGCATGTC
GGACTCAGAAGTCAATCAAGAAGCTAAGCCAGAGGTCAAGCCAGAAGTCAAGCCTGAGACTCACATCAATTTAAAGGTGTCCGATGGATCT
TCAGAGATCTTCTCAAGATCAAAAAGACCACTCCTTTAAGAAGGCTGATGGAAGCGTTCGCTAAAAGACAGGGTAAAGAAATGGACTCCT
TAAGATCTTGTACAGCGGTATTAGAATTAAGCTGATCAGACCCCTGAAGATTTGGACATGGAGGATAACGATATATTAGGCTCACAG
AGAACAGATTGGTGGTAGAGACTCAAGATTTGATGATGAAAGATAAAGCCAGGCAAGGGGTGACTTGGGTGGATGACAGAGGGTCCATGGTGGGACCATTT
CAAGAAGCAGCATTTGCCCTTGCCTGTAAGTGGGATGGATAAGCCTGTGTTTACAGACCCACCGGTTAAGACAAAATTTGGATATCATATTA
TTATGGTCTGAAGGAAAGAAAGGGTCTCAACGACAGGAGCAGCATCATGCGCACCCGTGGGGCCGCATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTCT
CGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCACTGACGAAGCTTGTAGCAGGGCGTGAAGATTTCCGAATACCGCAAGCAGCGCGATCATCTG
CGCCTCCAGCGAAAGCGGTCTCTCGCCGAAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCTTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATA
AGTGGCGCAGCATAGTCATGCCCCGCGCCACCGGAAGGAGTACTGAGGTTGAAGGCTCTCAAGGCATCGGTGAGATCCCGGTGCCT
AATGAGTGTGACTAATTAATTAATTTGCGTTCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCCGGAAACCTGTGTCGACGCTGCATTAATGAATCGG
CCAACGCGCGGGGAGAGCGGTTTTCGCTATTGGCGCCAGGGTGGTCTTTCTTTTACCAGTGTAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTAC
CGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGACAGCAAGCGTCCACGCTGGTTTGGCCACGAGCGGAAATCCTGTTTATGGTGGTTAACCGCGGGATA
TAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCTGATCCCACTACCGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGATTGCCG
CCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTAGCATTTGCATGGTTTGGTAAAACCGGACATGGC
ACTCCAGTCCGCTTCCGCTATCCGCTGAATTTGATTCGAGTGTGATATTTATGCCAGCCAGCCAGCAGCAGCGCGCCGAGCA
GCACTTAATGGGCCCTAACAGCGCGATTGCTGGTGAAGCCTTGTGTCGACAGATTTATCCAGCCAGCCAGCAGCAGCGCGCCGAGCA
AAATAATACTGTTGATGGTGTCTGGTTCAGAGACATCAAGAAATAACCGCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCTG
GTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCACTGACGCGTTCGCGGAGAAAGATTGTCACCGCGCTTTACAGGCTTCGACCGCGCTTCGT
TCTACCATGCACACCACCGTGGCACCAGTTGATCGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGCGCGTGCAGGGCCAGAG
TGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGGCCCGAGTTTGTGTCGACAGGATTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCTTCCGCGC
TTCCACTTTTTCCCGCTTTTTCGAGAAACGTTGGTGGCTGGTTTACCACGCGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCATACTCTGCG
ACATCGTATAACGTTACTGGTTTACATTCACCACCTGAATGACTCTCTTCCGGCGCTATCATGCCATACCAGGAAAGGTTTTGCGCC
ATTCGATGGTGTCCGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCTGCATTAGGAAGCAGCCAGTAGTAGTTGAGGCCGTTGAGCACCG
CCGCGCAAGGAATGGTGCATG

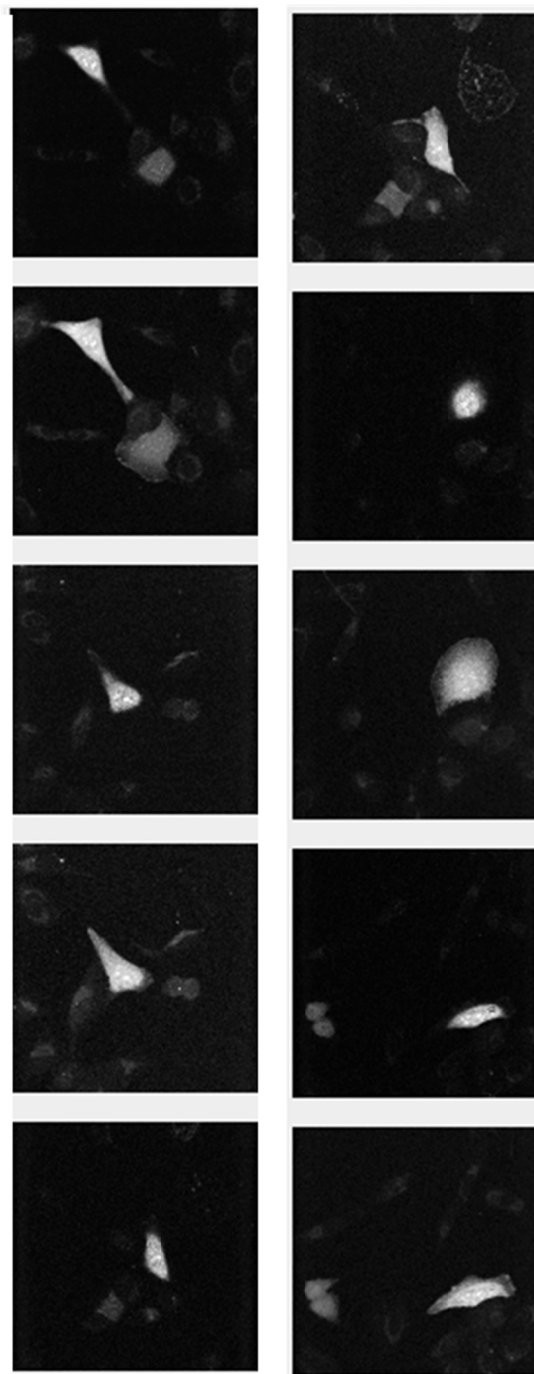
Massenspektren aus den Ergebnisteilen 3.1 und 3.4



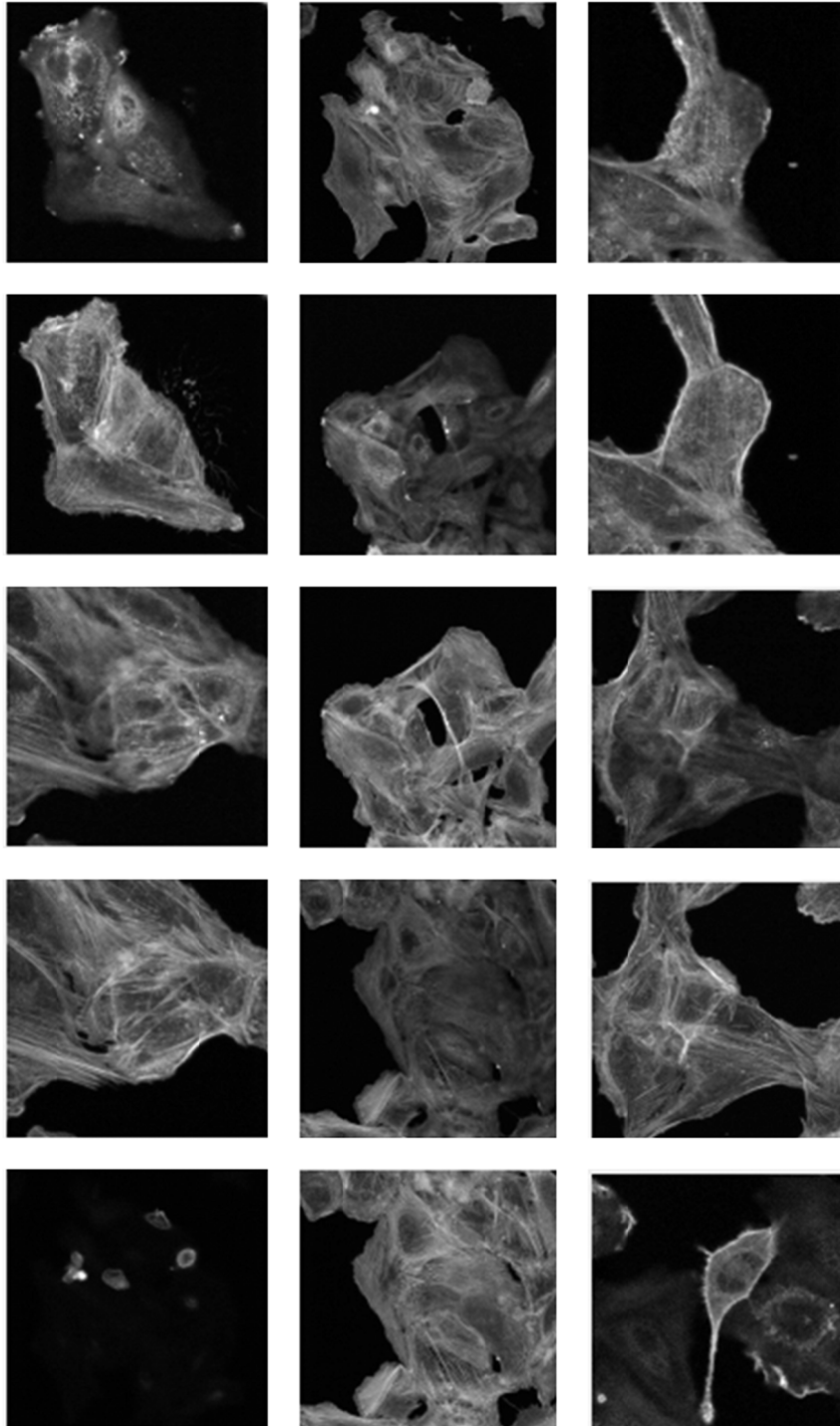
Abbildungen der Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von ATTO 488- ρ Ser19-hPar14, ATTO 488-Ala19-hPar14 und WT-hPar14-EYFP

ATTO 488- ρ Ser19-hPar14

ATTO 488-Ala19-hPar14



WT-hPar14-EYFP



Verdünnungsreihe der Bromodomänen für die Titration mit acetylierten Peptiden. Gemessen wurden jeweils 55 μl pro Probe. Zu jedem Titrationsschritt sind jeweils 11 μM Peptid (5 μl) hinzugefügt worden, sodass sich eine finale Peptidkonzentration von 1 μM ergab. Alle 128 Messungen sind unter den selben Bedingungen durchgeführt worden:

Protein	Stock[μM]	1	2	4	8	16	32	64	128
BRD4(2)	694	694	347	173,5	86,8	43,4	21,7	10,8	5,4
BRDT1	140	140	70	35	17,5	8,8	4,4	2,2	1,1
GCN5	236	236	118	59	29,5	14,8	7,4	3,7	1,8
PCAF	194	194	97	48,5	24,3	12,1	6,1	3	1,5

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Peter Bayer für die Vergabe dieser Arbeit, seine Geduld und sein Vertrauen in meine Person sowie seinen jederzeit zur Verfügung gestellten fachlichen Rat. Ebenfalls danke ich ihm für den wissenschaftlich kreativen Freiraum, den er mir gegeben hat und ganz besonders für sein menschliches und freundschaftliches Wesen, dem ich es überhaupt erst zu verdanken habe, da zu stehen, wo ich heute bin.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Perihan Nalbant und Manuela Kowalczyk für die aufopferungsvolle Unterstützung bei den Fluoreszenzmikroskopie-Experimenten bedanken.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Shirley Knauer für die schnelle und spontane Übernahme des Koreferats und den fachlichen Rat.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Stefan Knapp und Sarah Picaud für die Bereitstellung der untersuchten Bromodomänen-Plasmide.

Vielen Dank an alle Mitglieder, Alumni und Neulinge der AG Bayer, die mir viele schöne, witzige, emotionale und koffeinreiche Momente beschert haben.

Besonders möchte ich mich da bei Franzi bedanken, die mich in die „Geheimnisse“ der Proteinexpression und -reinigung eingeweiht hat.

Johannes für seine schnelle analytische Auffassungsgabe und stets fundierten fachlichen Konversationen.

Tina für ihren laboratorischen „Ordnungswahn“, ohne den ich wahrscheinlich längst im Chemikalienmüll erstickt wäre.

Lukas für seine herzliche und stets fröhliche Art, seinen Humor und die Begeisterung für die Natur. Wenn es so etwas wie Seelenverwandtschaft gibt, dann sind wir mindestens Cousins.

Vielen Dank an Julia, die sich während meiner Abwesenheit um meine Pflanzen gekümmert hat.

Entschuldigen möchte ich mich bei Irina, der ich noch ein sauberes Fenster schulde!

Dann wären da noch Carina Moll und Manuela Wülling, die sich gemeinsam mit mir auf die Suche nach Bindungspartnern für hPar14 begeben haben. Besonders Carina möchte ich danken, die haufenweise Immunpräzipitationen durchgeführt hat und dafür zumindest jetzt hier in der Arbeit erwähnt wird – vielen Dank!

Meinem Freund Helmut, für viele gesellige Stunden und seine stete Bereitschaft auf diversen Festivitäten anwesend zu sein. Ich freue mich schon auf den Harz!

Der AG Kaiser danke ich für den regen wissenschaftlichen Austausch, der Bereitstellung chemischer Räumlichkeiten (natürlich nur mit Kittel und Schutzbrille!) und Analysegeräte sowie dem sportlichen Ausgleich auf dem Fußballplatz.

Ich bedanke mich bei Delilah saba Shila, Wulf Steckenknecht, Chmul, Samska Donnerzunge und Bumms, Sohn des Mokel für zahlreiche Ausflüge in eine Welt voller Magie und Abenteuer.

Meinem Bruder und dem Inter Schloßpark für schöne Vorlagen und viele Tore, jetzt kann ich mich auch für Sonntag wieder eintragen Olli!

Mein abschließender Dank gilt natürlich meiner Frau: Ich bedanke mich für ihre ellenlange Geduld, ihre kritischen Korrekturen und ihre Unterstützung in allen Lebenslagen. Ganz besonders aber danke ich ihr dafür, dass sie einfach nur da ist und wir noch viele schöne gemeinsame Stunden verbringen werden.

Ich bedanke mich bei allen Freunden, Bekannten, Verwandten und all denen, die ich hier noch vergessen haben sollte, die aber stets an mich geglaubt und mich unterstützt haben!

DANKE!

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

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 „Synthese sulfatierter Substratpeptide zur Validierung eines CCR5-Inhibitors und Charakterisierung posttranslationaler Modifikationen des N-Terminus von hPar14 anhand semisynthetisch hergestellter Proteine und modifizierter Peptide“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von André Matena befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den

Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

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

Unterschrift des/r Doktoranden/in

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 kein er anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den

Unterschrift des/r Doktoranden/in