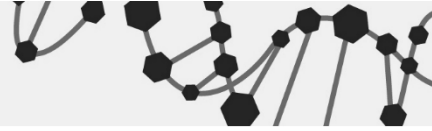


ZMB



ZENTRUM FÜR MEDIZINISCHE BIOTECHNOLOGIE
UNIVERSITÄT DUISBURG-ESSEN

Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des Parvulins 42 aus *Trypanosoma brucei*

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

der Fakultät für Biologie
an der
Universität Duisburg–Essen

vorgelegt von
Edisa Rehic

aus Tuzla
Oktober 2016

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Zentrum für Medizinische Biotechnologie in der Abteilung für Strukturelle und Medizinische Biochemie der Universität Duisburg-Essen unter der Leitung von Prof. Dr. Peter Bayer durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Bayer

2. Gutachter: Prof. Dr. Raphael Stoll

3. Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Daniel Hoffmann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2016

„Die Endlosigkeit des wissenschaftlichen Ringens sorgt unablässig dafür, dass dem forschenden Menschegeist seine beiden edelsten Antriebe erhalten bleiben und immer wieder von neuem angefacht werden: Die Begeisterung und die Ehrfurcht.“

Max Planck

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	14
1.1	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerasen (PPlasen)	14
1.2	Prokaryotische Parvuline	17
1.3	Eukaryotische Parvuline.....	18
1.4	Parvuline in <i>Trypanosoma brucei</i>	20
1.5	FHA Domänen	22
1.6	Zielsetzung	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Chemikalien	25
2.1.2	DNA- und Proteinmarker	27
2.1.3	Puffer und Lösungen	27
2.1.4	Nährmedien	30
2.1.5	Bakterienstämme	32
2.1.6	Plasmide	32
2.1.7	Oligonukleotide (<i>Primer</i>).....	33
2.1.8	Enzyme	34
2.1.9	Peptide.....	34
2.1.10	Verbrauchsmaterial und Kits	35
2.1.11	Geräte und Software	36
2.2	Mikro- und Molekularbiologische Methoden	38
2.2.1	Klonierung.....	38
2.2.2	DNA-Transformation	40
2.2.3	Ermittlung richtiger Klone	41
2.2.4	Plasmid-DNA Isolierung	42
2.2.5	Expressionstest.....	42
2.2.6	Proteinexpression	43
2.3	Biochemische Methoden.....	44
2.3.1	Gelelektrophorese.....	44
2.3.2	Zellaufschluss	45
2.3.3	Proteinreinigung.....	46
2.3.4	Analytische Gelfiltration (SEC)	47
2.3.5	Limitierte Proteolyse mit Chymotrypsin.....	47
2.4	Spektroskopische Methoden	48
2.4.1	NMR-Spektroskopie	48

2.4.2	Fluoreszenz-Spektroskopie	52
2.4.3	UV-Vis-Spektroskopie	53
2.5	Strukturrechnung und -Analyse	55
2.5.1	Zuordnung der Rückgrat- und Seitenketten-Resonanzen.....	55
2.5.2	Sekundärstrukturanalyse nach Wishart	55
2.5.3	Analyse der Sekundärstruktur nach Wüthrich.....	56
2.5.4	Erstellen der Winkeldatei mit Hilfe von TALOS.....	57
2.5.5	Strukturrechnung mit CYANA.....	57
2.5.6	CS-Rosetta Strukturmodell.....	59
3	Ergebnisse	60
3.1	Untersuchung des vollständigen <i>TbPar42</i>	60
3.1.1	Klonierung von <i>TbPar42</i> -VL	60
3.1.2	Expression und Reinigung von <i>TbPar42</i> -VL.....	60
3.1.3	Analytische Gelfiltration von <i>TbPar42</i> -VL	62
3.1.4	NMR-spektroskopische Untersuchung von <i>TbPar42</i> -VL.....	63
3.1.5	Generierung einzelner Konstrukte aus <i>TbPar42</i> -VL	65
3.2	Klonierung der einzelnen Konstrukte.....	67
3.3	Untersuchung der PPlase-Domäne.....	68
3.3.1	Vorarbeiten zur strukturellen Analyse der PPlase-Domäne	68
3.3.2	Untersuchung einer möglichen Multimerisierung der PPlase-Domäne	68
3.4	Strukturelle Analyse der PPlase-Domäne	69
3.4.1	Sequentielle Zuordnung des Proteinerückgrats und der aliphatischen Seitenketten der PPlase-Domäne von <i>TbPar42</i>	69
3.4.2	Zuordnung der Prolin-Resonanzen am Beispiel des Prolin 369.....	75
3.4.3	Zuordnung der Seitenketten-Protonen aromatischer Aminosäuren	77
3.4.4	Zuordnung der Aminoprotonen von Glutamin/Asparagin	78
3.4.5	Bestimmung der Wasserstoffbrücken-Donoren für die Strukturberechnung.....	79
3.4.6	Sekundärstrukturanalyse der PPlase-Domäne von <i>TbPar42</i>	80
3.4.7	Strukturrechnung der PPlase-Domäne.....	83
3.4.8	Dynamik der PPlase-Domäne von <i>TbPar42</i>	86
3.5	Untersuchung der NterFHA-Domäne	89
3.5.1	Vorarbeiten zur strukturellen Analyse der NterFHA-Domäne.....	89
3.5.2	Untersuchung einer möglichen Multimerisierung der NterFHA- Domäne	90
3.5.3	Strukturelle Charakterisierung der NterFHA-Domäne.....	91
3.5.4	Sekundärstrukturanalyse der NterFHA-Domäne	94

3.5.5	Strukturrechnung der NterFHA-Domäne	96
3.5.6	Dynamik der <i>TbPar42</i> -NterFHA-Domäne	99
3.6	Untersuchung des Linkers von <i>TbPar42</i>	101
3.6.1	Expression und Reinigung des Linkers.....	101
3.6.2	Strukturelle Charakterisierung des Linkers	102
3.6.3	Sekundärstrukturanalyse des Linkers.....	104
3.6.4	Strukturmodel des Linkes mit CS-Rosetta.....	105
3.7	Vergleich der isolierten Domänen mit dem vollständigem <i>TbPar42</i> -Protein	106
3.8	Funktionelle Charakterisierung der PPIase-Domäne.....	108
3.8.1	Untersuchung der Phosphospezifität der PPIase-Domäne	108
3.8.2	Untersuchung der katalytischen Aktivität der PPIase-Domäne	109
3.8.3	Bindungsstudien zwischen der PPIase und dem Suc-Ala-pThr-Pro- Ala-NH ₂ -Peptid.....	111
3.8.4	Untersuchung der Chaperonaktivität der <i>TbPar42</i> -PPIase-Domäne.....	113
3.9	Funktionelle Untersuchung der FHA-Domäne von <i>TbPar42</i>	114
3.9.1	Titrationen mit Ala-Glu-Ala-pThr-Ala-Glu-Xaa-Peptiden	115
3.9.2	Fluoreszenz-Anisotropie-Studien.....	116
4	Diskussion	119
4.1	Das <i>Trypanosoma brucei</i> Parvulin 42 ist ein Monomer mit unabhängig voneinander agierenden Domänen	119
4.2	Vergleich der PPIase-Domäne aus <i>TbPar42</i> mit weiteren PPIasen	120
4.3	Vergleich der FHA-Domäne aus <i>TbPar42</i> mit weiteren FHA-Domänen.....	125
5	Ausblick	131
6	Zusammenfassung	132
7	Anhang	134
7.1	pEX-K-Vektor mit der DNA-Sequenz (in Blau) von <i>tbp42</i>	134
7.2	Auflistung der einzelnen Konstrukte mit zugehörigem Extinktionskoeffizienten.....	135
7.3	α -Chymotrypsin-Verdau der <i>TbPar42</i> -PPIase-Domäne.....	135
7.4	Aufgenommene NMR-Spektren für die Zuordnung, Strukturrechnung und Dynamik-Analyse der <i>TbPar42</i> -Konstrukte	136
8	Literaturverzeichnis	138
9	Danksagung	157
10	Lebenslauf	159
11	Eidesstattliche Erklärungen	160

auf der beigefügten CD enthalten:

- Zugeordnete Resonanzen der NterFHA-Domäne
- Wasserstoffbrücken-Datei der NterFHA-Domäne
- Zugeordnete Resonanzen des Linkers
- Zugeordnete Resonanzen der PPIase-Domäne
- Wasserstoffbrücken-Datei der PPIase-Domäne
- pdf-Datei dieser Arbeit

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Peptidyl-Prolyl-Isomerisierung.....	15
Abbildung 1.2 Proteinstrukturen der humanen Vertreter der vier Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> - Isomerase-Klassen in <i>catroon</i> -Darstellung (erstellt mit Pymol)	16
Abbildung 1.3 Aufteilung der Parvuline in Subfamilien und der Lebenszyklus von <i>Trypanosoma</i> <i>brucei</i>	21
Abbildung 2.1 Verwendete DNA- und Proteinmarker	27
Abbildung 2.2 Vektorkarte des pET41b(+)-Vektors.....	33
Abbildung 3.1 Klonierung von <i>TbPar42-VL</i>	60
Abbildung 3.2 Reinigung des <i>TbPar42-VL</i> -Proteins.....	61
Abbildung 3.3 MALDI-TOF-Massenspektrum von <i>TbPar42-VL</i>	62
Abbildung 3.4 Analytische Gelfiltration von <i>TbPar42-VL</i> in An- und Abwesenheit von Reduktionsmittel.....	63
Abbildung 3.5 $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC- und TROSY-HSQC-Spektrum des <i>TbPar42-VL</i>	65
Abbildung 3.6 Sekundärstrukturvorhersage des <i>TbPar42</i> -Proteins	66
Abbildung 3.7 Klonierung der einzelnen Konstrukte	67
Abbildung 3.8 Gelfiltrationslauf und MALDI-TOF-Massenspektrum der PPIase-Domäne.....	68
Abbildung 3.9 Analytische Gelfiltration der PPIase-Domäne	69
Abbildung 3.10 Sequentielle Zuordnung des Sequenzabschnittes (364G-371E)	70
Abbildung 3.11 Sequentielle Zuordnung mit dem Spektrenpaar HNCA/HNCOCA und HNCO/HNCACO.....	72
Abbildung 3.12 Vollständig zugeordnetes $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum der PPIase-Domäne.....	73
Abbildung 3.13 $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TOCSY-HSQC, H, H-COSY und HBHACONH.....	74
Abbildung 3.14 Zuordnung der Seitenkettenresonanzen des Prolins 369	76
Abbildung 3.15 Zuordnung eines Ringsystems am Beispiel des Phenylalanins.....	77
Abbildung 3.16 Zuordnung der Seitenketten- $\text{N}_\text{H}\text{H}_\text{N}$ -Signale am Beispiel von Asparagin 303.....	79
Abbildung 3.17 H-Brücken-Donoren.....	80
Abbildung 3.18 Definition der Sekundärstrukturelemente der PPIase-Domäne	82
Abbildung 3.19 Struktur-Ensemble der <i>TbPar42</i> -PPIase-Domäne.....	84
Abbildung 3.20 Ramachandran-Plot für die 10 besten PPIase-Domäne-Strukturen	85
Abbildung 3.21 Anzahl und Art der NOEs pro Aminosäure.....	86
Abbildung 3.22 Relaxationsraten und $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -hetNOE der PPIase-Domäne.....	88
Abbildung 3.23 τ_c der PPIase-Domäne im Vergleich zu den bekannten Rotationskorrelations- Zeiten anderer Proteine [197]	89
Abbildung 3.24 Gelfiltrationslauf und MALDI-TOF-Massenspektrum der NterFHA-Domäne	90
Abbildung 3.25 Analytische Gelfiltration der NterFHA-Domäne.....	90
Abbildung 3.26 Zuordnung des Tyrosins 57 der NterFHA-Domäne mit weiteren 3D-Spektren.....	92
Abbildung 3.27 Vollständig zugeordnetes $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum der NterFHA-Domäne	93
Abbildung 3.28 Definition der Sekundärstrukturelemente der NterFHA-Domäne.....	95
Abbildung 3.29 <i>Ribbon</i> -Darstellung der 10 besten NterFHA-Strukturen.....	97
Abbildung 3.30 Ramachandran-Plot für die 10 besten NterFHA-Domäne-Strukturen.....	98

Abbildung 3.31 Cartoon-Darstellung der NterFHA ₁₋₁₇₇ und NterFHA ₃₃₋₁₇₇	98
Abbildung 3.32 Anzahl und Art der NOEs pro Aminosäure.....	99
Abbildung 3.33 Relaxationsraten R_1 und R_2 und der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -hetNOE der NterFHA-Domäne	100
Abbildung 3.34 Gelfiltrationslauf und MALDI-TOF-Massenspektrum des <i>TbPar42</i> -Linkers	101
Abbildung 3.35 $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum des Linkers.....	102
Abbildung 3.36 Zugeordnetes $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum des Linkers	103
Abbildung 3.37 Chemischer Verschiebungsindex (CSI) für den Linker	104
Abbildung 3.38 CS-Rosetta-Modell des Linkers.....	106
Abbildung 3.39 Übertragung der Zuordnung der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren auf das TROSY-Spektrum	107
Abbildung 3.40 EXSY-Experiment mit einem Phosphopeptid, der <i>TbPar42</i> - und <i>hPin1</i> -PPIase	109
Abbildung 3.41 Protease-gekoppelter <i>cis/trans</i> -Isomeraseassay	110
Abbildung 3.42 Bindung des Suc-Ala-pThr-Pro-Ala-NH ₂ -Peptids an die <i>TbPar42</i> -PPIase	111
Abbildung 3.43 Markierung der Aminosäuren mit der H_N -Gesamtverschiebung $>0,015$ ppm in der Struktur der PPIase-Domäne.....	112
Abbildung 3.44 Chaperonassay der <i>TbPar42</i> -PPIase-Domäne.....	113
Abbildung 3.45 Bindung des Suc-Ala-pThr-Pro-Ala-NH ₂ -Peptids an die <i>TbPar42</i> NterFHA-Domäne.....	114
Abbildung 3.46 Bindung der Ala-Glu-Ala-pThr-Ala-Glu-Xaa-Peptide an die <i>TbPar42</i> NterFHA-Domäne.....	116
Abbildung 3.47 Affinität der konservierten NIPP1-Bindemotive zur <i>TbPar42</i> -NterFHA-Domäne	118
Abbildung 4.1 Vergleich der <i>TbPar42</i> -PPIase Domäne mit den phosphoabhängigen PPIasen aus <i>TbPin1</i> und <i>hPin1</i> , sowie mit der phosphounabhängigen humanen PPIase Par14	120
Abbildung 4.2 Sequenzvergleich der <i>TbPar42</i> -PPIase Domäne mit verschiedenen aktiven phosphoselektiven PPIase-Domänen.....	122
Abbildung 4.3 Ursprünglich beschriebener Isomerisierungsmechanismus der <i>hPin1</i> -PPIase	122
Abbildung 4.4 Katalytische Tetrade in den PPIasen von <i>hPin1</i> , <i>hPar14</i> und <i>TbPar42</i>	123
Abbildung 4.5 Prolin-Bindetaste der <i>hPin1</i> - und <i>TbPar42</i> -PPIase.....	125
Abbildung 4.6 Sequenzvergleich verschiedener FHA-Domänen	126
Abbildung 4.7 FHA-Strukturen mit gebundenen Phosphopeptiden	129

Formelverzeichnis

Formel 2.1 Formel zur Berechnung der Insertmenge für den Ligationsansatz	39
Formel 2.2 Berechnung der chemischen Gesamtverschiebung	50
Formel 2.3 Berechnung der mikroskopischen Dissoziationskonstante	50
Formel 2.4 Signal-Intensitäten in Abhängigkeit von den <i>delay</i> -Zeiten (t)	51
Formel 2.5 Rotationskorrelationszeit τ_c	51
Formel 2.6 Berechnung des heteronuklearen NOEs (η)	52
Formel 2.7 Lambert-Beer'sches-Gesetz.....	53
Formel 2.8 CYANA-Zielfunktion	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Liste der verwendeten Chemikalien.....	25
Tabelle 2.2 Liste der verwendeten Puffer und Lösungen.....	28
Tabelle 2.3 Liste der verwendeten Nährmedien.....	30
Tabelle 2.4 Verwendete Bakterienstämme.....	32
Tabelle 2.5 Liste der verwendeten Primer.....	33
Tabelle 2.6 Liste der generierten Konstrukte.....	34
Tabelle 2.7 Liste der verwendeten Enzyme.....	34
Tabelle 2.8 Liste der verwendeten Peptide.....	34
Tabelle 2.9 Liste des verwendeten Verbrauchsmaterials.....	35
Tabelle 2.10 Liste der verwendeten Kits.....	35
Tabelle 2.11 Liste der verwendeten Geräte.....	36
Tabelle 2.12 Liste der verwendeten Software.....	37
Tabelle 2.13 PCR-Ansatz für die DNA-Amplifizierung.....	38
Tabelle 2.14 PCR-Programm für die DNA-Amplifizierung.....	38
Tabelle 2.15 Restriktionsverdau-Ansatz mit Apal und XhoI.....	39
Tabelle 2.16 Zusammensetzung des Ligationsansatzes.....	40
Tabelle 2.17 Kolonie-PCR-Ansatz zur Überprüfung richtiger Klone.....	41
Tabelle 2.18 Expressionsparameter der einzelnen Konstrukte.....	43
Tabelle 2.19 Zusammensetzung der 12,5 %igen und 15 %igen SDS-Gele.....	45
Tabelle 2.20 FPLC-Programm zur Durchführung einer GST-Affinitätschromatographie.....	46
Tabelle 2.21 Zusammensetzung des <i>gel filtration</i> -Standards von Biorad.....	47
Tabelle 2.22 Verdau-ansatz mit α -Chymotrypsin.....	48
Tabelle 2.23 Verwendete <i>delay</i> -Zeiten (t) für die T ₁ - und T ₂ -Relaxation.....	51
Tabelle 2.24 Eingesetzte Dateien und Parameter für die Strukturberechnung.....	58
Tabelle 3.1 Statistik des mit Cyana 2.1 berechneten Ensembles aus 10 <i>TbPar42</i> -PPIase-Strukturen.....	84
Tabelle 3.2 Statistik des mit Cyana 2.1 berechneten Ensembles aus 10 <i>TbPar42</i> -NterFHA-Strukturen.....	96
Tabelle 3.3 Durchschnittliche K _d -Werte nach Titrationen mit Ala-Glu-Ala-pThr-Ala-Glu-Xaa-Peptiden.....	116
Tabelle 3.4 Treffer der DALI-Suche mit der <i>TbPar42</i> -NterFHA als Vorlage.....	117

Abkürzungsverzeichnis

(m/v)	<i>mass per volume</i>
(v/v)	<i>volume per volume</i>
[¹³ C]	Isotopen-markierter Kohlenstoff
[¹⁵ N]	Isotopen-markierter Stickstoff
¹ H	Wasserstoff
<i>ad</i>	adjustiert
<i>Aqua bidest.</i>	Zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Da	Dalton
DTT	1,4-Dithioerythritol
EXSY	<i>EXchange SpectroscopY</i>
FHA	<i>forkhead-associated domain</i>
FID	<i>free induction decay</i>
FKBP	FK506-bindendes Protein
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
GST	Glutathion-S-transferase
HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
K _D	Dissoziationskonstante
KP _i	Kaliumphosphat
M	mol/l
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MS	Massenspektrometrie
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PDB ID	Identifikationsnummer der Proteindatenbank
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
TROSY	<i>Transverse relaxation-optimized spectroscopy</i>
UV	Ultraviolettes Licht
VL	vollständiges Protein
Vis	Sichtbares Licht
Xaa	Beliebige Aminosäure im Dreibuchstaben-Code

Aminosäuren

Ala (A)	Alanin	Leu (L)	Leucin
Arg (R)	Arginin	Lys (K)	Lysin
Asn (N)	Asparagin	Met (M)	Methionin
Asp (D)	Aspartat	Phe (F)	Phenylalanin
Cys (C)	Cystein	Pro (P)	Prolin
Gln (Q)	Glutamin	Ser (S)	Serin
Glu (E)	Glutamat	Thr (T)	Threonin
Gly (G)	Glycin	Trp (W)	Tryptophan
His (H)	Histidin	Tyr (Y)	Tyrosin
Ile (I)	Isoleucin	Val (V)	Valin
pThr (pT)	Phosphothreonin		
pSer (pS)	Phosphoserin		

1 Einleitung

Grundlegende sowie komplexe biologische Prozesse werden in der Zelle über Protein-Protein Interaktionen vermittelt und reguliert [77, 149]. Basierend auf der zeitlichen Beständigkeit wird zwischen permanenten und transienten Interaktionen unterschieden [37]. Die ersten sind hauptsächlich in makromolekularen Komplexen vertreten [75, 124] und zeichnen sich durch starke Bindungsaffinitäten aus [185], da der Kontakt zwischen Domänen und somit größeren Proteinbereichen erfolgt [37]. Transiente Protein-Protein Interaktionen sind reversibel und zeigen kleinere Kontaktflächen [1, 185]. Die Bindungsaffinität beruht meistens auf Kontakten zwischen Protein-Domänen und Epitopen, welche eine bestimmte Erkennungssequenz aufweisen und meist an den Termini oder in unstrukturierten Regionen des Zielproteins vorkommen [37]. Proteine mit speziellen Bindemodulen, darunter SH2-, FHA- und WW-Domänen [232] nutzen den zuletzt genannten Interaktionsmechanismus für die Signaltransduktion und/oder eine Aktivitätsregulation [1, 88]. Transiente Interaktionen werden von posttranslationalen Modifikationen [174], der Proteinfaltung sowie von Konformationsänderungen gesteuert [27, 185]. Neben den Hitzeschockproteinen (HSPs), Lectin-Chaperonen und Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI) haben Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) einen Einfluss auf die Proteinfaltung und konformationelle Änderungen im Protein [87].

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

Mitte der 1930er Jahre wurde mittels röntgenkristallographischer Untersuchungen gezeigt, dass sich die an der Peptidbindung beteiligten Atome (C, O, N) in einer Ebene befinden und die Peptidbindung planar ist [183]. Zudem beträgt die Distanz der C-N Bindung in Peptiden ca. 0,132 nm, was zwischen der Bindungslänge für C-N Einfachbindungen (0,149 nm) und C=N Doppelbindungen (0,127 nm) liegt [22]. Der Grund dafür ist die Ladungsdelokalisation freier Elektronenpaare über die Peptidbindung, wodurch sie einen partiellen Doppelbindungscharakter erhält [183]. Wegen der starren Anordnung und der eingeschränkten Drehbarkeit kann die Peptidbindung in nativen Proteinen in *cis*- oder *trans*-Konformation vorkommen (dihedraler Winkel $\omega=0^\circ$ oder 180°). Da bei der *trans*-Form die Seitenketten der flankierenden $\text{C}\alpha$ -Atome in gegenüberliegender Stellung liegen, ist sie aus sterischen Gründen energetisch günstiger und somit bei prolinlosen Peptidbindungen stark bevorzugt [108]. NMR-spektroskopische Messungen von *cis/trans*-Gleichgewichten in Peptiden mit nicht-Prolylbindungen ergaben einen *cis*-Isoform-Anteil von ca. 1 % [207].

Anders ist diese Verteilung jedoch bei Xaa-Prolin Bindungen (Xaa: beliebige Aminosäure). Die Aminogruppe des Prolins ist zugleich ein Bestandteil der Seitenkette sowie der Peptidbindung

mit der N-terminal gelegenen Aminosäure, so dass die spezifischen sterischen Verhältnisse des Prolinrings das Auftreten beider Konformationen ermöglichen (Abbildung 1.1).

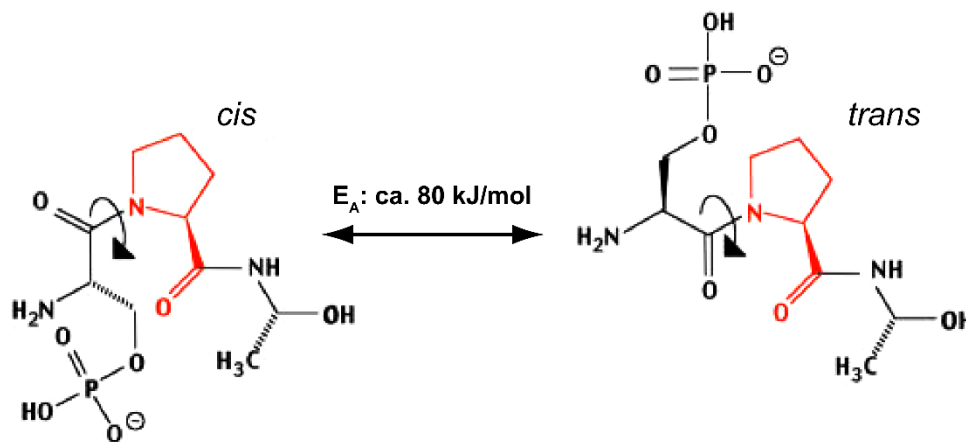


Abbildung 1.1 Peptidyl-Prolyl-Isomerisierung

cis/trans-Isomerisierung einer (Phospho)-Peptidyl-Prolyl-Peptidbindung (mit Pfeilen gekennzeichneten) in einem pSer-Pro-Ala Tripeptid. Prolin ist in Rot dargestellt. Verändert nach [217].

Aufgrund der geringen Energiedifferenz zwischen der *cis*- und *trans*-Form kommen etwa 10-30 % der Peptidyl-Prolyl-Bindungen als *cis*-Isomere vor [5, 168]. Da für die Konvertierung eine Aktivierungsenergie von ca. 80 kJ/mol aufgebracht werden muss, würde dieser Vorgang ohne eine Katalyse den Faltungsprozess zum nativen Protein erheblich verlangsamen [5, 40]. Daher stellt die *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen einen geschwindigkeits-limitierenden Schritt bei der Proteinfaltung dar [78]. Die Rolle des Katalysators übernehmen dabei die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen). Sie beschleunigen reversibel den Isomerisierungsschritt und sind somit sowohl bei der Protein-*de novo*-Synthese als auch bei der Funktionsregulation anderer Proteine, indem sie als Konformationsschalter fungieren, wichtig [3].

Die erste PPIase wurde 1984 von der Arbeitsgruppe Fischer aus Schweinenieren isoliert [64]. 1989 stellte sich heraus [65, 238], dass die beschriebene Isomerase mit dem zur gleichen Zeit entdeckten Rezeptorprotein für das Immunsuppressivum Cyclosporin A [89] identisch ist. Somit wurden die Vertreter dieser Proteinfamilie unter dem Namen der Cyclophiline, der ersten PPIase-Klasse, zusammengefasst. Die hochkonservierte Proteinfamilie umfasst 18 Isoformen kodiert von 17 Genen [186]. In Säugetieren bindet und inhibiert der Cyclophilin A/Cyclosporin A Komplex die Serin/Threonin Proteinphosphatase Calcineurin und verhindert dadurch die Transkription Zytokin-kodierender Gene [148] und die T-Zellen Aktivierung [110]. Cyclophiline werden als Antwort auf oxidativen Stress, Hypoxie, und Infektionen sekretiert [105, 215, 222] und sind in vielzähligen Krankheiten, wie Virusinfektionen, neurodegenerativen Krankheiten, Krebs, rheumatoider Arthritis, Sepsis,

Asthma, Parodontitis und Alterung involviert [186, 254]. Neuen Studien zur Folge wird Cyclophilinen eine wichtige Rolle bei kardiovaskulären Krankheiten zugesprochen [175, 186].

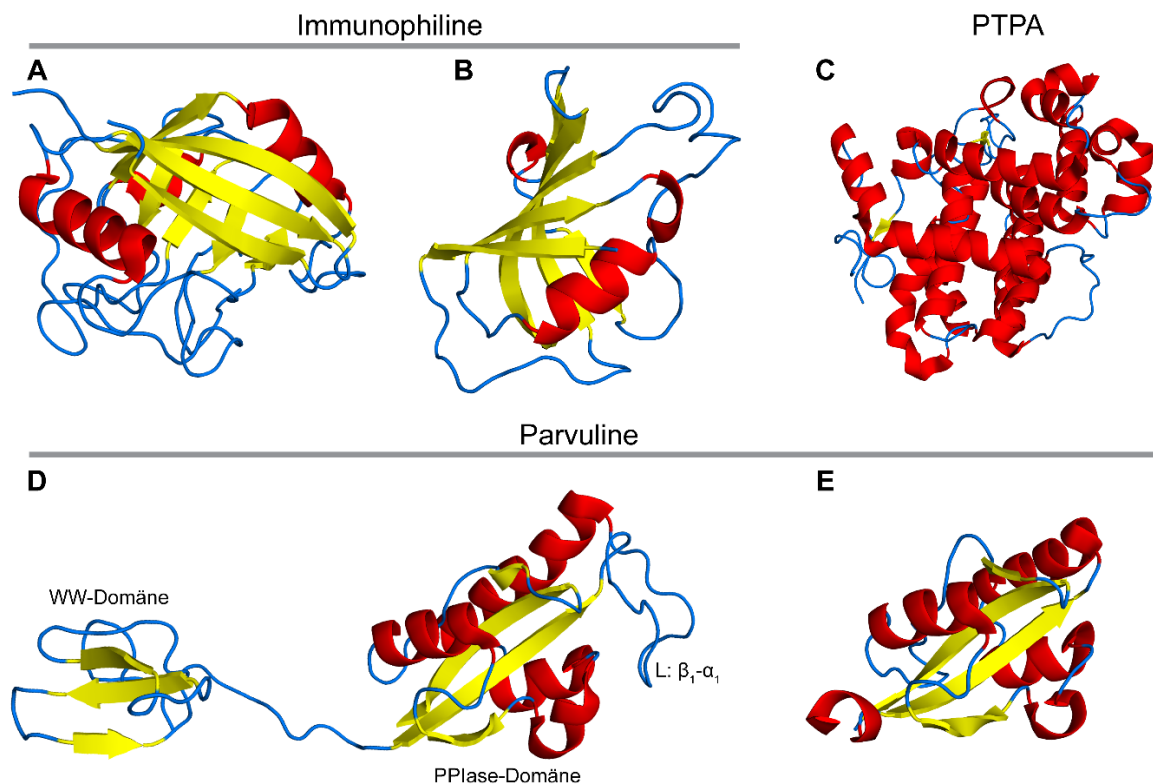


Abbildung 1.2 Proteinstrukturen der humanen Vertreter der vier Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Klassen in cartoon-Darstellung (erstellt mit Pymol)

A: Cyclophilin A (PDB ID: 1CWA), **B:** FKBP12 (PDB ID: 1FKL), **C:** PTPA (PDB ID: 2IXM), **D:** *hPin1* (PDB ID: 1NMV), **E:** *hPar14* (PDB ID: 3UI4).

Die zweite Klasse der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen wurde ebenfalls 1989 identifiziert [60]. Als Bindeproteine des Immunsuppressivums FK506 (Tacrolimus) wurden sie als FK506-bindende Proteine bezeichnet (FKBPs) [93, 224]. Über 20 Vertreter dieser Proteinfamilie wurden bisher isoliert und auf Grundlage des Molekulargewichts bekannt [186]. Wie bei den Cyclophilinen binden sie an Calcineurin und übernehmen somit die gleiche Funktion bei der Immunantwort wie die erste PPIase-Familie [110]. Eine zusätzliche immunsuppressive Rolle übernehmen FKBPs, indem sie an mTOR binden [216]. Zudem besitzen sie unabhängig von der Bindung an ein Immunsuppressivum neurotrophe und neuroprotektive Eigenschaften [56]. Aufgrund ihrer Bindungsaffinität zu Immunsuppressiva wurden die FKBPs zusammen mit den Cyclophilinen 1991 in die Gruppe der Immunophilinen eingeordnet [211].

Mit einer vergleichbaren Isomeraseaktivität wie das Cyclophilin A (Abbildung 1.2 A) und das FKBP12 (Abbildung 1.2 B), jedoch strukturell komplett abweichend wurde 2006 der humane Protein-Serin/Threonin-Phosphatase 2A-Aktivator (PTPA) (Abbildung 1.2 C) als neues Mitglied der PPIase-Familie beschrieben [107]. Die Substratbindung eines Prolin-Peptids

induziert eine Dimerbildung des in zwei Domänen organisierten α -helikalen Proteins [136]. Zu der humanen PTPA wurden bisher nur Orthologe in *S.cerevisiae* und *S.pombe* identifiziert [107].

Eine weitere Klasse der PPlasen trägt den Namen Parvuline (Abbildung 1.2 D, E). Ihren Namen verdanken sie dem ersten isolierten Vertreter aus *E. coli*, welcher aufgrund der geringen Masse von ca. 10 kDa Parvulin 10 genannt wurde (lat.: *parvus* = klein, winzig) [192, 193]. Anders als die Immunophiline binden sie keine Immunosuppressiva [94]. Parvuline weisen keine Sequenzähnlichkeit zu den restlichen PPlase-Vertretern auf. Sie besitzen eine typische Parvulinfaltung (β - α 3- β - α - β 2) aus einem vier-strängigen β -Faltblatt, welches von vier α -Helices umschlossen wird [62] und kommen als Ein- oder Mehrdomänenproteine sowohl in Prokaryoten, Eukaryoten und Archaeen vor [95, 100].

1.2 Prokaryotische Parvuline

Das *E.coli* Par10 ist ein zytosolisches Protein, welches nur aus der katalytischen PPlase-Domäne [122] besteht und eine hohe Isomeraseaktivität ($\sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) gegenüber Tetrapeptiden mit einem Leucin oder Phenylalanin vor dem Prolin zeigt [245]. Eine deutlich geringere Isomeraseaktivität ($\sim 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) besitzt das periplasmatische *E.coli* Parvulin SurA [200]. Der Name kommt von engl. *survival*, da das Protein für das Überleben der Bakterien in der stationären Wachstumsphase notwendig ist [242]. SurA ist ein Mehrdomänenprotein mit zwei nacheinander angeordneten Parvulin Domänen. Dabei besitzt nur die zweite Domäne eine Isomerasefunktion und die erste bildet zusammen mit den SurA-Termini einen Kernkomplex, welcher an der Faltung und Reifung der Proteine der äußeren Membran (OMPs) involviert ist [18, 200]. Obwohl die erste Parvulin-Domäne katalytisch inaktiv ist, regulieren beide Parvulin-Domänen die Chaperonaktivität von SurA [227]. Wie SurA ist auch das Parvulin PpiD im periplasmatischen Raum des gram-negativen Bakteriums zu finden. PpiD besteht aus einer katalytisch inaktiven Parvulin- und einer Chaperondomäne [39, 255] und ist ebenfalls an der Faltung der OMPs beteiligt. PpiD kompensiert den SurA-Verlust in *E.coli*-Deletionsmutanten [39], wodurch eine überlappende Chaperonfunktion und Substratspezifität zwischen den Parvulin-Vertretern angenommen wird [231].

Das membrangebundene PrsA-Parvulin [243, 248] ist nur in gram-positiven Bakterien vertreten. In *B. subtilis* und *S. aureus* spielt es eine Rolle bei der Faltung sekretierter Proteine, darunter bakterieller Toxine [109, 205, 253], sowie von Enzymen, die notwendig für den Aufbau der Zellwand sind [86, 95]. PrsA ist zwischen Plasmamembran und Zellwand lokalisiert [95], indem es über ein Cystein im Protein-N-terminus kovalent an ein Diacyl-Glycerol in der Membran gebunden ist [230]. Ähnlich den periplasmatischen *E.coli* Parvulinen, besteht PrsA aus einer Chaperondomäne, die von einer Parvulin-Domäne unterbrochen wird [95, 103]. Im Unterschied zu PpiD verfügt die PrsA-Parvulin-Domäne über eine Isomeraseaktivität, jedoch

mit unterschiedlicher Substratspezifität zwischen *B. subtilis* (Lys-Pro) und *S. aureus* (Glu-Pro) [95, 243].

Weitere prokaryotische Parvuline, wie PmpA aus *Lactococcus lactis* [49] und NifM aus *Klebsiella pneumoniaei* [73] sind auch an der Proteinfaltung beteiligt. PmpA reguliert die Faltung der sekretierten Lipase [49] und über NifM wird die korrekte Faltung und Reifung der Nitrogenase-Komponente NifH gewährleistet [73].

1.3 Eukaryotische Parvuline

Der erste entdeckte eukaryotische Vertreter der Parvuline war Ess1 aus *S. cerevisiae* [91]. Vorerst als ein essentielles Protein für das Wachstum der Hefezellen entdeckt, wurde einige Zeit später die Isomeraseaktivität von Ess1 beschrieben [92]. Das Ess1-Homolog in Menschen ist Pin1. Humanes Pin1 ist bis heute eine der bestcharakterisierten PPlasen aus der Familie der Parvuline. Nachdem es 1996 bei einem Yeast-Two-Hybrid-Screen als Interaktionspartner der NIMA (Never In Mitosis gene A)-Kinase aus *Aspergillus nidulans* identifiziert wurde, bekam es den Namen „Protein Never in Mitosis Gene A Interacting-1“, kurz Pin1 [151]. Da die NIMA-Kinase essentiell für die Mitose-Einleitung ist [178], wurde auch für Pin1 eine Funktion bei der Zellteilung angenommen. Diese bestätigte sich, nachdem Deletionen von Pin1 oder des Hefehomologs Ess1 zur Unterbrechung der M-Phase der Mitose mit anschließender Apoptose führten [13, 151], sowie eine Überexpression von Pin1 in HeLa Zellen einen G2-Arrest verursachte [151]. Somit wurde Pin1 kurz nach seiner Entdeckung als Mitoseregulator bekannt [218, 269]. 1997 konnten Yaffe *et al.* zeigen, dass Pin1 bevorzugt die Isomerisierung von phosphoryliertem Threonin oder phosphoryliertem Serin vor dem Prolin, im Vergleich zu unphosphorylierten Substraten katalysiert [270], wodurch die Annahme, dass Pin1 phosphorylierungs- und zellzyklus-abhängig mit Interaktionspartnern interagiert, erwiesen wurde [106, 218].

96 % aller Phosphoproteine in der Zelle sind an einem Serin-oder Threoninrest phosphoryliert [177]. Die Phosphorylierung von Serin/Threonin-Prolin Motiven von Seiten Prolin-abhängiger Kinasen ist bei der Regulation der Zellproliferation und –Transformation, sowie der Signaltransduktion in vielen zellulären Prozessen von entscheidender Bedeutung [155]. Das koordinierte Zusammenwirken zwischen den Kinasen und *cis/trans*-Isomerasen stellt einen erweiterten Kontrollmechanismus zellulärer Abläufe dar. Eine Dysregulation von Pin1 wird mit Alterung [133], motorischen und Verhaltensstörungen, Neuron-Degeneration und Keimzellabbau [146], der Immunantwort [61], Antwort auf zellulären Stress [152] und dem programmierten Zelltod [34, 229] in Verbindung gebracht. Auf diese Weise ist Pin1 an Krankheiten wie Hoden- und Retinaatrophien [145], Morbus Alzheimer [48, 132, 194] und Krebs beteiligt [155, 202, 203, 263, 276]. Pin1 ist in 38 von 60 verschiedenen Tumorgeweben überexprimiert [7, 264], so dass man ihn als potentiellen prognostischen Tumormarker

bezeichnen kann [132]. Pin1 ist aus zwei Domänen aufgebaut (Abbildung 1.2 D) [195]. Die N-terminal gelegene WW-Domäne umfasst 39 Aminosäuren und enthält zwei konservierte Tryptophane, welche für die Namensgebung der Domäne verantwortlich sind [195, 232]. Die WW-Domäne ist ein Interaktionsmodul, welches der Erkennung von phosphorylierten Serin/Threonin-Prolin Motiven und Protein-Protein Wechselwirkung dient und einen Einfluss auf die Pin1-Lokalisation im Kern hat [152, 154, 195]. Lufei und Cao zeigten, dass endogenes Pin1 sowohl im Kern als auch im Zytoplasma lokalisiert ist und dass auch in der katalytischen Einheit ein Kern-Lokalisationssignal (NLS) vorhanden ist [156]. Obwohl die *in vitro*-Aktivität von *hPin1*-Mutanten ohne WW-Domäne erhalten bleibt [198, 278], ist das Interaktionsmodul für die *in vivo* Funktion von *hPin1* essentiell [153]. Die katalytische PPlase-Domäne befindet sich am C-Terminus [151, 195]. In der Kristallstruktur, komplexiert mit einem Ala-Pro Dipeptid, PEG und Sulfat gibt es ein gemeinsames Interface zwischen den Pin1-Domänen [195]. 2003 stellte sich bei einer Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie heraus, dass für die Interaktion der Domänen ein flexibler Glycin- und Serin-reicher linker verantwortlich ist [12]. Kristall- sowie NMR-Strukturen zeigten zudem, dass das Sulfat, welches als Mimikry der Phosphatgruppe in phosphorylierten Substraten fungiert, mit einer basischen Triade im β_1 - α_1 -Loop interagiert [12, 195]. Der lange β_1 - α_1 -Loop (Abbildung 1.2 D) ist charakteristisch für Pin1/Ess1 Homologe [169]. Auch die WW-Domäne wurde bis zur Identifizierung der pflanzen Ess1/Pin1 Homologe in *A. thaliana* (AtPin1) [127, 128], *D. lanata* (DIPar13) [165] und *M. domestica* (MdPIN1) [271] für ein gemeinsames Merkmal Pin1-typischer Parvuline gehalten [128]. Bei den Pflanzen-Homologen handelt es sich jedoch um Eindomänen-Parvuline ohne N- oder C-terminale Erweiterungen mit katalytischer Isomeraseaktivität für Phosphoserin/Threonin-Prolin-Motive [128]. Ein eindeutiges Kriterium, welches die Zuordnung der PPlasen in Pin1-Typ Parvuline erlaubt, ist die Fähigkeit, Ess1 in temperatursensitiven oder Deletionsmutanten zu komplementieren [90, 165]. Somit gehören auch Dodo in *D. melanogaster* [160], Ess1 in *S. pombe* [101], Ess1 in *C. albicans* [45], MmPin1 in *M. musculus* [68] und xPin1 in *X. laevis* [256] zu Pin1-Typ Parvulinen. Anders als die Deletion von *hPin1*, Ess1 und xPin1 führt der Verlust der erwähnten Pin1-Homologe in der Maus und der Fruchtfliege jedoch zu keiner Phänotypveränderung [198].

Neben den phosphospezifischen Pin1-Typ-Vertretern existieren in Eukaryoten auch nicht-phosphospezifische Parvuline. Im Menschen zählen zu dieser Gruppe das Par14 und Par17 [169]. Par14 besitzt neben der PPlase-Domäne keine WW-Domäne, sondern einen 35 Aminosäuren langen, basischen und unstrukturierten N-Terminus [171, 214, 245]. Bei Par17 handelt es sich um eine durch alternative Transkriptionsinitiation N-terminal verlängerte Variation von Par14 [170, 240]. Während Par14 abhängig von der Phosphorylierung des Ser 19 entweder im Zytoplasma oder Nukleus zu finden ist, ist das Par17 in den Mitochondrien lokalisiert [116, 169, 197]. Die PPlase-Domäne von Par14 hat eine 34 %ige Sequenzidentität

mit *E.coli* Par10 und eine 39 %ige Sequenzidentität mit der PPlase des *hPin1* [169]. Wie Par10 hat Par14 (Abbildung 1.2 E) keinen verlängerten, phosphospezifischen β_1 - α_1 -Loop und die höchste Isomeraseaktivität für Arg-Pro Motive [245], jedoch mit einer um Faktor 1000 geringeren Aktivität ($\sim 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) als Par10 und *hPin1* zu deren Substraten [169, 245]. Sowohl Par14 als auch Par17 beschleunigen die Mikrotubulibildung [240]. Par14 bindet an AT-reiche DNA-Segmente [236] sowie an Chromatin und ist während der S und G2/M Phase hochreguliert [204]. Zudem interagiert Par14 mit dem Pre-ribosomalen-Nukleproteinkomplex, wodurch eine Rolle bei der Ribosom-Biogenese vermutet wird [69, 70]. Während Par14-Homologe in weiteren Eukaryoten identifiziert wurden, ist Par17 nur in *Hominidae* vertreten [170, 204, 240]. Im Vergleich zum Immunophilin-Bestand, fällt das Parvulin-Repertoire mit nur zwei Parvulin-Vertretern (Pin1- und Par14-Homologe) in den meisten mehrzelligen Organismen gering aus [169]. In einigen Einzellern wurde jedoch ein weiteres Parvulin-codierendes Gen identifiziert. Dabei handelt es sich um ein Parvulin, welches größer ist als die bekannten Vertreter. Es besteht aus der charakteristischen PPlase-Domäne mit dem verlängerten phosphospezifischen β_1 - α_1 -Loop und einer Parvulin-untypischen N-terminalen Erweiterung in Form einer FHA-Domäne. Vorerst wurde es in den Protozoen *Dictyostelium discoideum* [57] und *Chlamydomonas reinhardtii* [247] und erst später in den Trypanosomatiden *Leishmania* und *Trypanosoma* entdeckt [60] (Abbildung 1.3 A).

1.4 Parvuline in *Trypanosoma brucei*

Trypanosomen sind einzellige Parasiten, die den Flagellaten angehören [129]. Die zwei Arten, die für den Menschen lebensbedrohlich sind, sind *Trypanosoma brucei* und *Trypanosoma cruzi*, Erreger der Tropenkrankheiten Afrikanische Trypanosomiasis (Schlafkrankheit) und Amerikanische Trypanosomiasis (Chagas-Krankheit) [161, 196]. Während *T. cruzi* durch Raubwanzen übertragen wird, ist der Vektor von *T. brucei* die Tsetsefliege. Die Parasiten haben eine längliche Form und bewegen sich spiralförmig, woher sich auch der Name *Trypanosoma* von griechisch *trypano* (Bohrer) und *soma* (Körper) ableitet. Obwohl beide Erreger die Blut-Hirn-Schranke durchqueren können, ist *T. cruzi* selten im Gehirn zu finden [66]. Anders ist es bei dem extrazellulären Parasiten *T. brucei* [244]. Direkt nach der Infektion gelangt der Erreger ins zentrale Nervensystem [67]. Durch den Insektenstich ins Blut injiziert, können sich Trypanosomen frei bewegen, da sie durch die variablen Oberflächen-Glykoproteine (VSG) [163, 241] dem Immunsystem des Menschen ausweichen [162]. Im Blutkreislauf nehmen die Trypanosomen eine schlanke Form ein und vermehren sich über Längsteilung [179]. Nachdem eine gewisse Parasitendichte erreicht wurde, gehen die Trypanosomen in eine kurze und dicke Form über und die Zellteilung stoppt [162]. Wird die kurze Form bei einem Stich von der Tsetsefliege aufgenommen, entstehen aus den kurzen Formen prozyklische proliferierende Trypanosomen im Mitteldarm der Fliege. Dabei wird die

VSG-Beschichtung durch einen Mantel aus Prozyklinen ersetzt. Mit den morphologischen Änderungen durchlaufen auch der Kinetoplast (mitochondriales Genom des Parasiten) sowie die Geißel (Flagellum) einen Positionswechsel innerhalb der Zelle. Das korrekte Positionieren der Organelle ist für den Zellzyklus des Parasiten von entscheidender Bedeutung, vor allem wenn der Energiestoffwechsel der Trypanosomen im Mitteldarm der Fliege von der Glykolyse auf die Atmungskette wechselt [162]. Nachdem sich der Parasit im Mitteldarm vermehrt hat, wandern die Trypanosomen in die Speicheldrüse der Fliege. Dort haften sie über das Flagellum an der Drüsenwand, vermehren sich und werden in dieser Form als Epimastigote bezeichnet. Aus den Epimastigoten werden metazyklische Formen, die sich nicht weiter vermehren, VSGs ausbilden und im Lumen der Drüse auf die Übertragung auf einen neuen Säugetierwirt warten [162] (Abbildung 1.3 B).

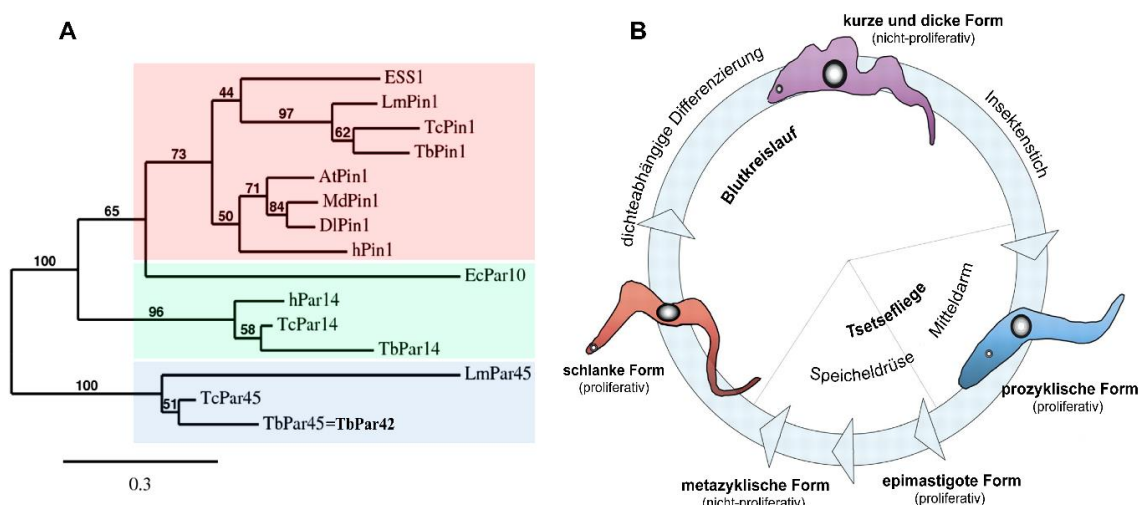


Abbildung 1.3 Aufteilung der Parvuline in Subfamilien und der Lebenszyklus von *Trypanosoma brucei*

A: Phylogenetischer Baum der Parvuline [60]. In dem roten Kasten sind phosphoabhängige Parvuline, in dem grünen die Parvuline mit unterschiedlicher Substratspezifität und im blauen Par45(42)-ähnliche Parvuline dargestellt. **B:** Morphologische Veränderung von *T. brucei* während des Wirtswechsels zwischen Säugetier und Tsetsefliege. Verändert nach [162].

Da das erste Stadium des Krankheitsverlaufes symptomlos abläuft, wird die Krankheit meist Wochen später diagnostiziert, nachdem Enzephalitis und systemisches Organversagen auftreten (zweites Stadium) und der Betroffene in einen schläfrigen komatösen Zustand fällt (drittes Stadium) [67, 114]. Unbehandelt endet die Infektion schließlich tödlich. Die Therapiemöglichkeiten sind stark begrenzt, da die wenigen verfügbaren Präparate starke Nebenwirkungen mit sich bringen und mutagen oder zusätzlich neurotoxisch sind [115]. Die Suche nach neuen Targets und Medikamenten ist somit Gegenstand aktueller Forschung. 2010 wurden in *T. brucei* das *TbPin1* und das *TbPar42* Parvulin entdeckt [76]. Auch *TbPar14* ist in *T. brucei* vertreten [60]. Während *TbPin1* zu den Pin1-typ Parvulinen gehört, phosphospezifisch ist und Ess1 in Hefezellen substituieren kann, ist es anders als *hPin1* nicht

im Zellkern zu finden, sondern gleichmäßig im Zytoplasma verteilt [60, 76]. Zudem hat *TbPin1* keinen Einfluss auf die Mitose in *T.brucei* [59]. *TbPar42* (Abbildung 1.3 A) ist dagegen im Zellkern lokalisiert [60]. Ein Knockdown des Proteins führt in prozyklischen *T. brucei* Zellen zur Wachstumsinhibition [60]. Außer der Tatsache, dass es Ess1 nicht ersetzen kann und dass das Protein N-terminal eine FHA- und C-terminal eine PPIase-Domäne aufweist [60], sind Interaktionspartner oder Funktion bisher nicht bekannt.

1.5 FHA Domänen

FHA-Domänen sind Phosphothreonin-Bindemodule, die sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten vertreten sind [54, 158]. Sie wurden 1995 in *Forkhead*-Transkriptionsfaktoren entdeckt und danach benannt [98]. Seitdem folgte die Identifizierung der FHA-Domänen in vielen unterschiedlichen Regulatorproteinen, unter anderem in Kinasen, Phosphatasen, Kinesinen, DNA- oder RNA- bindenden Proteinen, metabolischen Enzymen, weiteren Transkriptionsfaktoren [141, 158] und erst seit kurzem in Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen. [57, 60, 247]. In Bakterien spielen sie eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellform, der Sporenbildung, der Sekretion, der pathogenen sowie symbiotischen Bakterium-Wirt-Interaktion, beim Kohlenhydrat-Speicher und -Transport, bei Resistenzen sowie der Signaltransduktion [181]. Auch in Eukaryoten sind die Funktionen der FHA-Domänen sehr vielseitig. Sie sind an Prozessen wie Zellteilung, Zellwachstum, Proteintransport und -Abbau, DNA-Transkription, Reparaturmechanismen bei DNA-Schäden und Apoptose beteiligt [52, 141, 158], wodurch sie an der Entstehung von Krebs und anderen Krankheiten mitwirken [16, 55, 219, 246]. Obwohl alle bisher aufgeklärten FHA-Strukturen eine charakteristische Faltung in Form eines β -Faltblatt-Sandwiches aufweisen, erkennen und binden sie sequenzspezifisch unterschiedliche Zielproteine [53, 130, 137, 141]. Zudem kann die gleiche FHA-Domäne diverse Interaktionspartner haben und mehrere Mechanismen regulieren [88]. So bindet die humane Zellzyklus-Checkpoint-Kinase Chk2 über ihre FHA-Domäne an Mus81, BRCA1 und an EDD [88, 158]. Mus81 ist eine Endonuklease, die Holliday-Strukturen, entstanden durch DNA-Schäden, auflöst [33]. BRCA1 (*breast cancer associated gene 1*) ist ein Tumorsupressor-Gen [261], welches bei Reparaturen von Einzel- und Doppelstrangbrüchen eine Rolle spielt indem es mit Proteinen der DNA-Reparatur-Maschinerie interagiert [43]. Bei DNA-Schäden wird Chk2 für die vollständige Aktivierung vorerst FHA-unabhängig an einem N-terminal gelegenen Threoninrest phosphoryliert. Danach bindet die FHA-Domäne an das Phosphothreonin eines weiteren Chk2 Proteins, wodurch das Protein oligomerisiert, was zu einer Autophosphorylierung und kompletten Aktivierung der Kinase führt [267], wodurch sie über nachgeschaltete Signalwege das Arretieren des Zellzyklus in der G1/S, S und G2/M Phase, verschiedene Reparaturmechanismen oder die Apoptose einleitet [8, 277]. Ein Knockdown der E3-Ubiquitinligase EDD [96] inhibiert die Aktivierung der Effektor kinase und

verhindert somit die Antwort auf DNA-Schäden. Während Chk2 neben der Kinase-Domäne nur eine FHA-Domäne aufweist, hat Rad53, das Homolog in *S. cerevisiae* zwei FHA-Domänen, welche die Kinase-Domäne flankieren [53, 54]. Die FHA-Domänen der Serin/Threonin Kinase favorisieren die Bindung von unterschiedlichen Aminosäuren in der Nähe des phosphorylierten Threonins [54], was sie für Struktur- abgeleitete Funktionsuntersuchungen sehr begehrt machte [158]. Obwohl die Interaktion von Rad53 mit der phosphorylierten Rad9-Kinase bei beschädigter DNA oder unvollständiger Replikation über die C-terminale FHA2 stattfindet [235], sind beide FHA-Domänen für die Regulation und Aktivierung von Rad53 wichtig [51, 189]. Zudem interagiert Rad53-FHA1 phosphorylierungsabhängig mit den PP2C-Phosphatasen Ptc2 und Ptc3, welche für die Checkpoint-Inaktivierung nach DNA-Doppelstrangbrüchen notwendig sind [81, 134]. Die Hefekinese Dun1 enthält ebenfalls eine FHA-Domäne, mit welcher sie Rad53 bindet [9, 32]. So werden bei DNA-Schädigung mehrere Signalkaskaden über FHA-enthaltende Proteine aktiviert.

Proteine, die über FHA-Domänen verfügen, wie KAPP, NtFHA1 und DAWDLE spielen eine wichtige Rolle bei der Pflanzenentwicklung [47, 117]. Mutationen in einiger dieser Proteine zeigen bei Pflanzen beschädigte Wurzeln, Sprossen und Blüten [167], da die Proteine Einfluss auf den Rezeptor-ähnlichen Proteinkinase (RLK) Signalweg, die rRNA-Prozessierung, sowie die Biogenese und Reifung der miRNA haben [138, 167, 223, 272].

In den letzten Jahren wurden viele Proteine identifiziert, die mit dem RNA-Metabolismus in Verbindung stehen [27, 123, 137]. Zu diesen zählen im Menschen auch der Proliferationsmarker Ki67 und der nukleare Inhibitor der Proteinphosphatase 1 (NIPP1) [52, 88]. Beide Proteine interagieren phosphorylierungs- und zellzyklus-abhängig über die FHA Domäne mit ihren Zielproteinen [20, 27]. Über Pulldown-Experimente wurden das humane Kinesin-ähnliche-Protein-2 (Hk1p2) und das nukleare-RNA-Bindeprotein (NIFK1) als Interaktionspartner von Ki67 isoliert [233, 237]. Ein gemeinsamer Interaktionspartner von Ki67 und NiPP1 ist CDC5L (Cell division cycle 5-like protein) [19, 191]. Der pre-mRNA Splicing-Faktor und Regulator der G2/M Phase der Mitose ist mit NIPP1 an nuklearen *speckles* (subnukleare Strukturen in Regionen des Interchromatins, angereichert mit pre-mRNA Splicing-Faktoren [126]) colokalisiert [19]. Über die FHA-Domäne interagiert NIPP1 auch mit der Serin/Threonin Kinase MELK (*maternal embryonic leucine zipper kinase*) sowie dem Splicing-Faktor SAP155 (Komponente des *U2 small nuclear ribonucleoprotein particle*), wodurch es am mRNA-Splicing und der Spliceosom-Anordnung mitwirkt [20, 250]

Das in Trypanosoma entdeckte Parvulin42 enthält N-terminal eine FHA-Domäne, die eine sequentielle Ähnlichkeit zur NIPP1-FHA hat [60]. Ob die *TbFHA* die gleichen Interaktionspartner wie NIPP1 und eine Rolle beim Splicing-Prozess hat, ist noch unbekannt.

Da nur wenige Einzeller-Parvuline über die modulare Domäne verfügen, sind die Funktion und mögliche Interaktionspartner des Phosphothreonin-Bindemoduls in Parvulinen unerforscht.

1.6 Zielsetzung

Das 42 kDa große Parvulin aus dem humanen Pathogen *T. brucei* wurde 2010 als neues Parvulinmitglied identifiziert [6]. Es besteht aus 383 Aminosäuren und ist anders als das zur gleichen Zeit entdeckte *TbPin1* [14] ein Mehrdomänen-Protein. *TbPar42* verfügt am C-Terminus über eine konservierte PPlase-Domäne, aufgrund welcher das Protein der Parvulinfamilie zugeordnet wurde. N-terminal gelegen befindet sich eine FHA Domäne, die über einen langen Linker mit der PPlase Domäne verbunden ist. Obwohl bereits Mehrdomänenparvuline charakterisiert wurden [11], ist die FHA Domäne als Parvulinkomponente bisher nur in einigen wenigen Einzellern wie in den Parasiten *Trypanosoma* [3] und *Leishmania*, [5], der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* [12] und dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* [2] vorzufinden.

Ein Knock-down des *Trypanosoma* Parvulins 42 über RNA-Interferenz führte zum verlangsamten Wachstum der prozyklischen Trypanosomazellen [3], wodurch eine wichtige Rolle des Proteins bei der normalen Zellproliferation vermutet wird. Da die genaue Funktion jedoch nicht bekannt ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit das *TbPar42*-Protein NMR-spektroskopisch charakterisiert werden, um Hinweise über mögliche Interaktionspartner zu erlangen und daraus auf die Funktion des Proteins zu schließen. Aufgrund seiner wenig NMR-praktikablen Größe (42kDa) sollte das *TbPar42* zu diesem Zweck in seine einzelnen Domänen zerlegt werden, welche separat strukturell charakterisiert werden sollten. Dafür soll zunächst für alle Proteinkonstrukte die Expression in *E. coli*, sowie die Proteinreinigung etabliert werden. Anschließend soll die Aufklärung der Proteinstruktur auf atomarer Ebene einen Einblick in die Anordnung der einzelnen Domänen im Protein geben sowie einen Vergleich zu bisher entdeckten Parvulinen und FHA-Domänen ermöglichen. Die strukturelle Charakterisierung könnte bei der Entwicklung neuer therapeutischer Mittel hilfreich sein, da das Protein im Menschen nicht vorkommt. Des Weiteren soll die Funktion der einzelnen Domänen näher untersucht werden. Mit NMR-Titrationen soll die Affinität zu möglichen Substraten analysiert werden und über UV/VIS-Spektroskopie die enzymatische Aktivität des Enzyms untersucht werden. Mit Fluoreszenz-Anisotropie-Experimenten soll überprüft werden, ob eine Bindung zu Motiven bisher isolierter FHA-enthaltender Proteine besteht, um darüber die mögliche Funktion des Parvulins einzugrenzen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1 Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Abkürzung	Hersteller
(-)-Riboflavin		Sigma Aldrich, Steinheim
¹³ C-D-Glukose, 99-Atom% ¹³ C	¹³ C ₆ H ₁₂ O ₆	Cortecnet, Voisins le Bretonneux
¹⁵ N-Ammoniumchlorid, 99-Atom% ¹⁵ N	¹⁵ NH ₄ Cl	Cortecnet, Voisins le Bretonneux
1,4-Dithiothreitol	DTT	Roth, Karlsruhe
2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol	Tris	AppliChem, Darmstadt
2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat	DSS	Sigma-Aldrich, Steinheim
2,2,2-Trifluorethanol	2,2,2-TFE	Fluka, Buchs
5-[(3a <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,6a <i>R</i>)-2-Oxohexahydro-1 <i>H</i> -thieno[3,4- <i>d</i>]imidazol-4-yl]pentansäure	D-Biotin	AppliChem, Darmstadt
Acetonitril	ACN	Fluka, Buchs
Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese Gel 30	AA/Bis	Roth, Karlsruhe
Agar, Kobe I	Agar	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	NH ₄ Cl	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	(NH ₄) ₂ SO ₄	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	APS	Roth, Karlsruhe
Borsäure	H ₃ BO ₃	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau		Roth, Karlsruhe
Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan	Bis-Tris	AppliChem, Darmstadt
Calciumchlorid Dihydrat	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Cobaltchlorid Hexahydrat	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	Fluka, Buchs
Coomassie Brilliant Blue G250		Sigma, Steinheim
D-Glukose	C ₆ H ₁₂ O ₆	Roth, Karlsruhe
D-Pantothensäure		Sigma-Aldrich, Steinheim
Desoxynukleosidtriphosphate, 10 mM	dNTP	Metabion, Martinsried
Deuteriumoxid, 99,96 %	99,96 % D ₂ O	Eurisotop, Saint-Aubin
Deuteriumoxid, 99,9 %	99,9 % D ₂ O	Aldrich, Steinheim
Deuteriumoxid, 99,8 %	99,8 % D ₂ O	Cortecnet, Voisins le Bretonneux
Diammoniumhydrogencitrat		Fluka, Buchs
Dihydroxyacetophenon	DHAP	Sigma-Aldrich, Steinheim

Dikaliumhydrogenphosphat	K_2HPO_4	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4	AppliChem, Darmstadt
DreamTaq Green Buffer® (10x)		Thermo Scientific, Darmstadt
Eisen(III)chlorid-Hexahydrat	$FeCl_3 \cdot 6 H_2O$	
Sigma Aldrich		
Eisen(III)citrat	Fe(III)citrat	Sigma, Steinheim
Essigsäure, 100 %		VWR, Pennsylvania
Ethanol		Fisher Chemical, Leics
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA	Roth, Karlsruhe
EDTA Dinatriumsalzdihydrat	Na_2EDTA	Roth, Karlsruhe
FastDigest Green Buffer® 10x		Fermentas, St. Leon-Rot
Guanidinhydrochlorid	GuCl	Roth, Karlsruhe
Glycerol, 99 %		AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt		AppliChem, Darmstadt
Isopropanol		Fisher Chemical, Leics
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	IPTG	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid	KCl	AppliChem, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Roth, Karlsruhe
Kanamycinsulfat	Kann	Roth, Karlsruhe
Kupferchlorid Dihydrat	$CuCl_2 \cdot 2 H_2O$	Sigma, Steinheim
Kupfersulfat Pentahydrat	$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glycin		AppliChem, Darmstadt
Lithiumchlorid	LiCl	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat Heptahydrat	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Manganchlorid Tetrahydrat	$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	Fluka, Buchs
Mangansulfat Hydrat	$Mn_2SO_4 \cdot H_2O$	Sigma-Aldrich, Steinheim
Midori Green Advance		Nippon Genetics Europe, Düren
Natriumchlorid	NaCl	AppliChem, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	NaH_2PO_4	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	SDS	AppliChem, Darmstadt
Natriummolybdat Dihydrat	$NaMoO_4 \cdot 2 H_2O$	Roth, Karlsruhe
Natriumselenit Pentahydrat	$Na_2SeO_3 \cdot 5 H_2O$	Fluka, Buchs
Natriumhydroxid	NaOH	Bernd Kraft, Duisburg
Natriumthiosulfat	$Na_2S_2O_3$	Roth, Karlsruhe
Nickelchlorid Hexahydrat	$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	Roth, Karlsruhe
Nicotinamid		AppliChem, Darmstadt
Orthophosphorsäure, 85 %	H_3PO_4	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid	PMSF	AppliChem, Darmstadt
Salzsäure, 37 %	HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
T4-Puffer 10x		Metabion, Martinsried

Tetramethylethylendiamin	TEMED	Roth, Karlsruhe
Thiamin Hydrochlorid	Vitamin B1	Roth, Karlsruhe
Trifluoressigsäure	TFA	Fluka, Buchs
Trypton		AppliChem, Darmstadt
Vitamin B12		Sigma Aldrich
Zinksulfat Heptahydrat	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol		Serva, Heidelberg
γ-L-Glutamyl-L-cysteinyl-glycin	Glutathion, GSH	AppliChem, Darmstadt

2.1.2 DNA- und Proteinmarker

Für die Gelelektrophorese wurden die DNA-Marker mi-100bp+ (Abbildung 2.1 A) und mi-1kb(-) (Abbildung 2.1 B) von Metabion verwendet. Bei der SDS-Page wurde der PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Abbildung 2.1 C) oder der PageRuler Unstained BroadRange Protein Ladder (Abbildung 2.1 D) von Thermo Scientific eingesetzt.

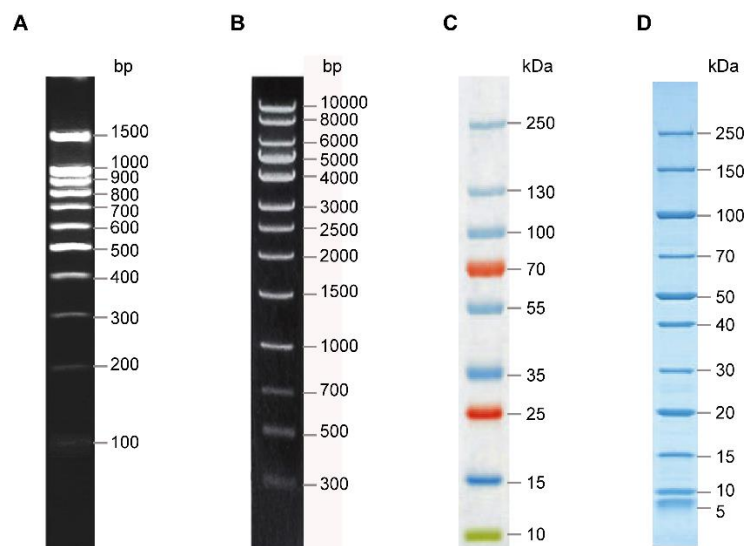


Abbildung 2.1 Verwendete DNA- und Proteinmarker

A: DNA-Marker mi-100bp+ **B:** DNA-Marker mi-1kb(-) **C:** PageRuler Plus Prestained Protein Ladder **D:** PageRuler Unstained BroadRange Protein Ladder

2.1.3 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 2.2 aufgelistet. Wenn nichts anderes angegeben, wurde der pH bei Raumtemperatur eingestellt und die Lösungen sterilfiltriert (0,22 µm Sterilfilter, Millipore).

Tabelle 2.2 Liste der verwendeten Puffer und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung	pH
10xPBS	323,8 ml 0,5 M Na ₂ HPO ₄ 76,2 ml 0,5 M NaH ₂ PO ₄ 87,66 g NaCl ad 1 l <i>Aqua bidest.</i>	7,4
Basispuffer (GSH-Affinitätschromatographie)	200 mM NaCl 50 mM BisTris GST- <i>TbPar42-VL</i>	6,8
	PBS-Puffer 150 mM NaCl 50 mM BisTris GST- <i>TbPar42-NterFHA</i>	7,4
	150 mM NaCl 50 mM BisTris GST- <i>TbPar42-Linker</i>	6,8
	150 mM NaCl 50 mM BisTris GST- <i>TbPar42-PPIase</i>	6,8
Bradford-Reagenz	100 mg Coomassie Brillant Blue G250 50 ml Ethanol 100 ml 85 % Orthophosphorsäure ad 1 l <i>Aqua bidest.</i>	
Coomassielösung	1,25 g Coomassie Brillant Blue G250 227 ml Ethanol 46 ml Essigsäure ad 500 ml <i>Aqua bidest.</i>	
DSS-Standard	50 mM KPi 30 mM DSS	6,5
Entfaltung-Puffer	30 mM Tris 1 mM EDTA 3 M GuCl	8,0
Entfärbelösung	50 ml Essigsäure 75 ml Ethanol ad 1 l ddH ₂ O	
Gelfiltrationspuffer	150 mM KCl 50 mM KPi-Puffer	6,26

Laemmlipuffer	25 mM Tris 0,1 % (m/v) SDS 250 mM Glycin	
NMR-Puffer (KPi-Puffer)	50 mM KH_2PO_4 50 mM K_2HPO_4	6,26
PBS	1:9 Verdünnung von 10xPBS mit <i>Aqua bidest.</i>	7,4 oder 6,8
Peptidpuffer	0,106 g in 5 ml 2,2,2-TFE	
PMSF	100 mM PMSF Isopropanol	
Rückfaltung-Puffer	30 mM Tris 1 mM EDTA	8,0
Sammelgellösung	500 mM Tris	6,8
SDS-Probenpuffer	12,5 ml Sammelgellösung 12,5 ml Glycerol 2,5 g SDS 1 mg Bromphenolblau 80 μl β -Mercaptoethanol	
Spuremetalllösung	2 g Na_2EDTA 1,67 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 500 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 18 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 16 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 12 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 18 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ad 100 ml <i>Aqua bidest.</i> (Lagerung bei 4 °C)	
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA	

Trenngellösung	1,5 M Tris	8,8
TS2 (50x)	700 mg ZnSO ₄ · 7 H ₂ O 30 mg MnCl ₂ · 4 H ₂ O 300 mg Borsäure 200 mg CoCl ₂ · 6 H ₂ O 200 mg NiCl ₂ · 6 H ₂ O 10 mg CuCl ₂ · 2 H ₂ O 900 mg Na ₂ MoO ₄ 20 mg Na ₂ SeO ₃ · 5 H ₂ O ad 1 l <i>Aqua bidest.</i>	
Vitaminlösung	2 mg Biotin 2 mg Folsäure 5 mg Thiamin 5 mg Pantothersäure 0,1 mg Vitamin B12 5 mg Nicotinamid 5 mg Riboflavin ad 100 ml <i>Aqua bidest.</i> (Lagerung bei 4 °C)	
α-Chymotrypsin-Stocklösung (350 μM)	0,0175 g in 2 ml PBS-Puffer	

2.1.4 Nährmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien sind in Tabelle 2.3 aufgelistet. Der pH-Wert der Nährmedien wurde mit pH-Teststreifen (pH-Fix 0-14, Macherey & Nagel) bei Raumtemperatur bestimmt.

Tabelle 2.3 Liste der verwendeten Nährmedien

Medium	Zusammensetzung	pH
LB-Platten	500 ml LB 7,5 g Agar 500 μl Kanamycin-Stammlösung	7,0 autoklavieren

LB+Kan	10 g Trypton	7,0	autoklavieren
	5 g Hefeextrakt		
	10 g NaCl		
	ad 1 l <i>Aqua bidest.</i>		
	40 mg Kanamycinsulfat		
M9	6,84 g Na ₂ HPO ₄	autoklavieren	
	3 g KH ₂ PO ₄		
	0,5 g NaCl		
	ad 1 l <i>Aqua bidest.</i>		
	1 g NH ₄ Cl oder ¹⁵ NH ₄ Cl		
	2 ml MgSO ₄ (1 M)		
	2 ml TS2 (50x)		
	100 µl CaCl ₂ (1 M)		
	100 µl Vitamin B1 (0,5 % (m/v))		
	1 ml Fe(III)Citrat (10 mM)		
	4 g D-Glukose oder ¹³ C-D-Glukose		
	40 mg Kanamycinsulfat		
	M9-D ₂ O		6,84 g Na ₂ HPO ₄
3 g KH ₂ PO ₄			
0,5 g NaCl			
ad 1 l 99,8 % D ₂ O			
1,5 mL Spurenmetalllösung			
1 mL Vitaminlösung			
100 µL 1M CaCl ₂			
2 mL 1M MgSO ₄			
4 g ¹³ C-D-Glukose			
0,6 g ¹⁵ NH ₄ Cl			
40 mg Kanamycinsulfat			
SOC	20 g Trypton	7,0	
	5 g Hefeextrakt		
	10 mM NaCl		
	2,5 mM KCl		
	10 mM MgCl ₂ Hexahydrat		
	10 mM MgSO ₄ Heptahydrat		
	20 mM Glukose		
	ad 1 l <i>Aqua bidest.</i>		

2.1.5 Bakterienstämme

Verwendete Bakterienstämme sind in Tabelle 2.4 aufgelistet. Die Transformation des Ligationsansatzes sowie die DNA-Isolierung erfolgten aus elektrokompetenten *E. coli* Shox-Zellen. Die Proteinexpression erfolgte in den chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen BL21(DE3)T1r.

Tabelle 2.4 Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
Shox	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr</i> <i>hsdRMS</i> <i>mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>ara</i> Δ139 Δ(<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (<i>StrR</i>) <i>nupG</i> λ ⁻	Bioline, London
BL21(DE3)T1r	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (rB·mB ⁻) <i>gal</i> <i>dcm</i> λ(DE3) <i>tonA</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.6 Plasmide

Für die Klonierung wurde der pET41b(+)-Vektor (Abbildung 2.2) verwendet. Dabei handelt es sich um einen institutsintern modifizierten pET41-Vektor (Merckbioscience), bei welchem die bereits vorhandene Apal-Schnittstelle bei 2135 bp durch eine PreScission-Schnittstelle mit zusätzlicher Apal-Schnittstelle substituiert wurde. So kann bei der Proteinreinigung mit der PreScission-Protease der GST-Tag vom zu untersuchenden Protein getrennt werden.

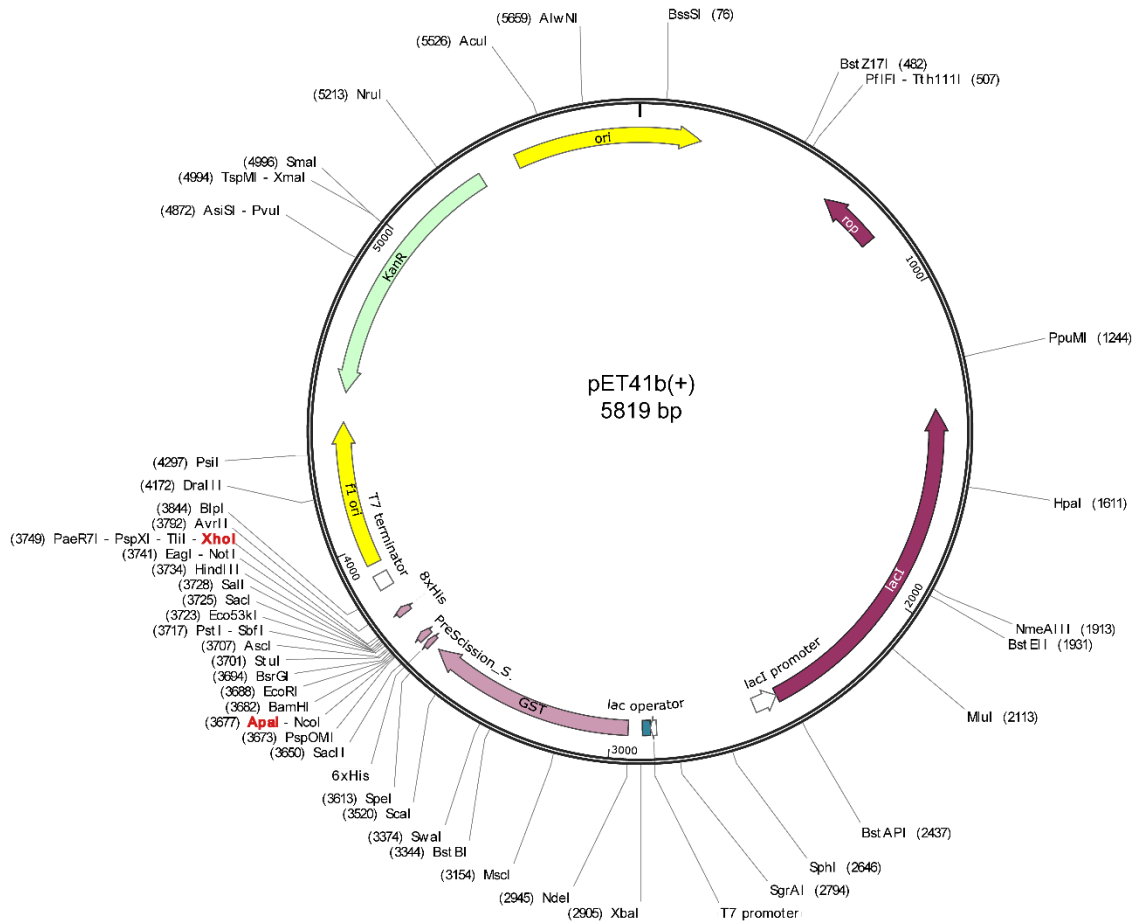


Abbildung 2.2 Vektorkarte des pET41b(+)-Vektors

Der Vektor wird bei der Klonierung mit den Enzymen Apal und XhoI linearisiert, so dass eine Ligation mit dem mit gleichen Restriktionsenzymen behandelten Insert erfolgen kann.

2.1.7 Oligonukleotide (Primer)

Im Folgenden sind die für die Klonierung verwendeten Primer (Tabelle 2.5) sowie die generierten Konstrukte (Tabelle 2.6) aufgeführt.

Tabelle 2.5 Liste der verwendeten Primer

Primerbezeichnung	Sequenz in 5'-3'-Richtung	T _m [C °]
2010-FW	CACACA GGGCC ATGGTGACAAGC	60,8
2011-RV	GGTTGG CTCGAG CTTA TTCCACGCGA	60,5
2015-RV	GGTTGG CTCGAG CTTA AG AAG AAG ACG GTG GCC CC	61,4
2016-FW	CACACA GGGCC GGG CCA CCG TCT TCT TCT AA	60,5
2017-RV	GGTTGG CTCGAG CTTA TTC GGT CGG CGG CGG C	60,9
2018-FW	CACACA GGGCC CCG ACC GAA CGC CAT TTT TAT	59,5

Tabelle 2.6 Liste der generierten Konstrukte

Generiertes Konstrukt	Interne BC-Nummer	Genutzte Primerpaare
<i>TbPar42-VL</i>	1078	2010-FW/2011-RV
<i>TbPar42-NterFHA-Domäne</i>	1123	2010-FW/2015-RV
<i>TbPar42-Linker</i>	1083	2016-FW/2017-RV
<i>TbPar42-PPIase-Domäne</i>	1084	2018-FW/2011-RV

2.1.8 Enzyme

Die verwendeten Enzyme sind in Tabelle 2.7 aufgelistet.

Tabelle 2.7 Liste der verwendeten Enzyme

Enzym	Verwendung	Hersteller
α -Chymotrypsin	Isomeraseassay	Sigma-Aldrich, Steinheim
Apal	Restriktionsverdau	Fast Digest, Fermentas
<i>hPin1</i> -PPIase	EXSY, Isomeraseassay	eigene Herstellung
Muskel-Kreatinkinase	Chaperonassay	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lysozym	Zellyse	Fluka, Buchs
PreScission	Proteolyse des Fusionsproteins	eigene Herstellung
T4-Ligase	Ligation	Metabion, Martinsried
XhoI	Restriktionsverdau	Fast Digest, Fermentas

2.1.9 Peptide

Tabelle 2.8 Liste der verwendeten Peptide

Peptid	Verwendung	Hersteller
Ala-Glu-Ala-pThr-Ala-Glu-Asp	NMR-Titrationen	CASLO
Ala-Glu-Ala-pThr-Ala-Glu-Gln	NMR-Titrationen	CASLO
Ala-Glu-Ala-pThr-Ala-Glu-Ile	NMR-Titrationen	CASLO
Ala-Glu-Ala-pThr-Ala-Glu-Ser	NMR-Titrationen	CASLO
Ala-Glu-Ala-pThr-Ala-Glu-Val	NMR-Titrationen	CASLO
(Rhodamin B)-DDpTPMFVMG	Fluoreszenz-Anisotropie	CASLO
(Rhodamin B)-GSGpTPMFTGA	Fluoreszenz-Anisotropie	CASLO
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa	Isomeraseassay	ChinaPeptides
Suc-Ala-Asp-Pro-Phe-pNa	Isomeraseassay	CASLO
Suc-Ala-Glu-Pro-Phe-pNa	Isomeraseassay	CASLO
Suc-Ala-Gln-Pro-Phe-pNa	Isomeraseassay	CASLO
Suc-Ala-Lys-Pro-Phe-pNa	Isomeraseassay	ChinaPeptides
Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNa	Isomeraseassay	ChinaPeptides

Suc-Ala-Ser-Pro-Phe-pNa	Isomeraseassay	CASLO
Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNa	Isomeraseassay	CASLO
Suc-Ala-pThr-Pro-Ala-NH ₂	EXSY, NMR-Titrationen	CASLO

2.1.10 Verbrauchsmaterial und Kits

Die verwendeten Gebrauchsmaterialien (Tabelle 2.9) und Kits (Tabelle 2.10) sind im Folgenden aufgeführt.

Tabelle 2.9 Liste des verwendeten Verbrauchsmaterials

Material	Hersteller
C18-Pipettenspitzen Supel-Tips	Supelco, Bellefonte
Einmalküvette	Roth, Karlsruhe
Gelfiltrationssäule Superdex 75 pg, 16/600, 26/600	GE Healthcare, Little Chalfont
Gelfiltrationssäule Superdex 200 pg, 16/600, 26/600	GE Healthcare, Little Chalfont
Superdex 200 Increase 10/300 GL	GE Healthcare, Little Chalfont
Glutathion Agarose Protino 4B	Macherey & Nagel, Düren
Handschuhe,	Diagonal, Münster
NMR-Probenröhrchen 5 mm	Bruker, Fällanden
Papiertücher, Kimberly-Clark® Kimwipes	Kimberly-Clark, Koblenz-Rheinhafen
Petrischalen	Waldeck, Münster
pH-Fix Indikator pH 4,5 - 10 Teststäbchen	Macherey & Nagel, Düren
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
ProteinA Sepharose CL-4B	GE Healthcare, Little Chalfont
Reaktionsgefäß 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Greiner bio-one, Essen
Sterilfilter 0,22 µm	Millipore, Tullagreen
Ultrazentrifugationsgefäß 1,5 ml	Beckmann Coulter, Palo Alto
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugationsfilter Vivaspin Turbo 15 5000 MWCO	Sartorius, Göttingen
Zentrifugationsfilter Vivaspin Turbo 15 10000 MWCO	Sartorius, Göttingen

Tabelle 2.10 Liste der verwendeten Kits

Kit	Hersteller
Plasmidpräparation NucleoSpin Plasmid	Macherey & Nagel, Düren
<i>NucleoSpin® Extract II Kit</i>	Macherey & Nagel, Düren

2.1.11 Geräte und Software

Die verwendeten Geräte und die benötigte Software sind in Tabelle 2.11 und Tabelle 2.12 aufgelistet.

Tabelle 2.11 Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Agarosegel-Analyzer	Biodoc Analyze	Biometra, Göppingen
Autoklav	H+P Varioklav 2T	Oberschleißheim
Brutschränke	BD53	Binder, Tuttlingen
DNA-Gelapparatur	Mini Subcell GT	BioRad, Berkeley
Elektroporationsgerät	MicroPulser Electroporator	BioRad, Berkeley
Elektroporationsküvetten	Gene Pulser/Micro Pulser 0,2 cm	BioRad, Berkeley
Feinwaagen	ABJ	KERN, Balingen-Frommern
	XS105 DualRange	Mettler Toledo, Gießen
FPLC-Anlagen	BioLogic DuoFlow F10	BioRad, Berkeley
Fluoreszenz-Küvetten	Suprasil 105.250 QS	Hellma Analytics, Müllheim
Fluoreszenz-Spektrometer	Cary Eclipse	Agilent Technologies, Waldbronn
Großraumzentrifuge	Avanti JE, JLA 9.100	Beckmann, Palo Alto
Laborkarussell	Rotator SB2	Stuart, Staffordshire
Laborwaage	EG	KERN, Balingen-Frommern
Laborwippe	Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Magnetrührer	MR 3000	Heidolph, Schwabach
Magnetständer	MagnaRack	Invitrogen, Carlsbad
MALDI-TOF	Autoflex speed	Bruker, Fällanden
Massenspektrometer		
Mikrowelle		Sharp, Osaka
NanoDrop	ND 1000	Peqlab, Erlangen
NMR-Spektrometer	Ultrashield-700	Bruker, Fällanden
PCR-Gerät	T3000 Thermocycler	Biometra, Göttingen
pH-Meter	SevenEasy	Mettler Toledo, Gießen
	766 Calimatic mit N6003	Knick, Berlin
	Elektrode	
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Scanner	Scanjet 8200	Hewlett Packard, Palo Alto
SDS-Gelapparatur	XCell Mini Protean 3	BioRad, Berkeley
Spannungsgeber	PowerPac basic	BioRad, Berkeley
	PowerPack P25T	Biometra, Göttingen
Sterilbank	HERA safe	Thermo, Langenselbold

Thermoschüttler	Thermoschüttler HAT	Infors, Bottmingen
Tisch-Thermoschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifugen	Centrifuge 5415R Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät	Sonoplus	Bandelin, Hamburg
Ultrazentrifugen	Optima LE-80K, Ti-45 Optima Max-XP, SS-34	Beckmann, Palo Alto
UV/Vis-Küvetten	Suprasil 104-QS 10 mm Suprasil 108.002 10 mm	Hellma Analytics, Müllheim
UV/Vis-Spektroskop	Cary 100Bio	Varian/Agilent, Santa Clara
Vakuumzentrifuge	Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Wasseraufbereitung (<i>Aqua bidest.</i>)	Milli-Q Biocel	Millipore, Schwalbach

Tabelle 2.12 Liste der verwendeten Software

Software	Verwendung	Hersteller	Quelle
BioLogic	BioRad FPLC Programmierung	BioRad, Berkeley	-
BLAST	Online Suchwerkzeug über Sequenzhomologie	NCBI, Bethesda	-
Cary WinUV	UV/Vis-Spektrenaufnahme	Varian, Santa Clara	-
CcpNmr Analysis (CCPN)	Auswertung von NMR-Spektren, hetNOE-Analyse	Cambridge, UK	[249]
Clustal Omega	Sequenzalignment	EMBL-EBI	[225]
CS-Rosetta	Strukturmodellberechnung	Yang Shen	[220, 221]
CYANA 2.1	Strukturrechnung, RMSD	Güntert's Lab, Frankfurt	[23, 83–85, 97, 210]
DALI Server	Suchwerkzeug über Strukturhomologie		[99]
flexcontrol & flexanalysis 3.3	Aufnahme und Auswertung der Massenspektren	Bruker, Fällanden	-
GOR4	Sekundärstrukturvorhersage		[71, 72]
GraphPad Prism	Statistik, Kurvenauswertung	GraphPad Software, La Jolla	-
Jpred	Sekundärstrukturvorhersage	Drozdetskiy A	[50]
PyMol 1.3	Strukturdarstellung-alignment, RMSD	Schrödinger, LLC	[42]
SOPMA	Sekundärstrukturvorhersage		[74]
TALOS	Winkelvorhersage-Programm	NMRPipe package	[38]
Topspin 3.0	NMR Spektrenaufnahme, Prozessierung, Phasenkorrektur	Bruker, Fällanden	-
WHAT IF/Yasara	Elektrostatik von Proteinen		[120]

2.2 Mikro- und Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Klonierung

Das für *TbPar42* kodierende Gen wurde von der Firma Eurofins synthetisiert und im pEX-K-Vektor geliefert (Kap. 7.1). Für die strukturelle und funktionelle Charakterisierung des *TbPar42* wurden sowohl das vollständige Gen als auch bestimmte Genabschnitte, welche für die einzelnen Domänen und den Linker des *TbPar42* kodieren mittels PCR amplifiziert, mit Restriktionsenzymen verdaut und in den pET41b(+)-Expressionsvektor ligiert.

Amplifizierung mittels PCR

Alle PCR-Ansätze wurden unter der Cleanbench (HERA safe, Thermo Scientific) auf Eis angesetzt. Als *Template*-DNA diente das *tbp42*-Gen im pEX-K-Vektor (Kap. 7.1). Die einzelnen Komponenten des PCR-Ansatzes sind in Tabelle 2.13 aufgeführt. Die verwendeten Primer sind der Tabelle 2.5 zu entnehmen.

Tabelle 2.13 PCR-Ansatz für die DNA-Amplifizierung

Komponente	Menge
DreamTaq Green Buffer® (10x)	4 µl
FW-Primer (10 pmol/µl)	2 µl
RV-Primer (10 pmol/µl)	2 µl
dNTPs (10 mM)	2,5 µl
<i>Template</i> -DNA (50 ng/µl)	1 µl
DreamTaq DNA-Polymerase (5 units/µl)	1 µl
Nuklease-freies Wasser	ad 40 µl

Da unterschiedlich lange DNA-Konstrukte mit den zugehörigen Primer-Paaren amplifiziert wurden, wurden *Annealing*-Temperatur und Elongationszeit entsprechend angepasst. Die PCR erfolgte in dem Thermocycler (T 3000 Thermocycler, Biometra) und das PCR-Programm ist in der Tabelle 2.14 aufgeführt.

Tabelle 2.14 PCR-Programm für die DNA-Amplifizierung

Zyklen	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [sec]
2 x	Anfangsdenaturierung	95	120
	Denaturierung	95	30
	<i>Annealing</i>	$T_m - 9\text{ °C}$	30
	Elongation	72	30/500 bp
31 x	Denaturierung	95	30
	<i>Annealing</i>	$T_m - 6\text{ °C}$	30
	Elongation	72	30/500 bp
	Endelongation	72	600
	Pause	8	∞

Das PCR-Gemisch wurde auf ein 1,2 %iges Agarosegel in TAE-Puffer aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 100 V durchgeführt und so lange laufen gelassen, bis die (50 bp) gelbe Bande des DreamTaq Green Buffer® am unteren Rand des Agarosegels angekommen war. Da das Agarosegel mit Midori Green Advance versehen war, war die DNA unter UV-Licht sichtbar (BioDoc Analyze, Biometra). Somit konnte die Bande des PCR-Produktes aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem *NucleoSpin® Extract II Kit* von Macherey & Nagel gereinigt werden.

Restriktion

Nachdem die DNA aus dem Gel extrahiert wurde, erfolgte in zwei separaten Ansätzen ein parallel ablaufender Verdau des PCR-Produktes (*Inserts*) und des pET41b(+)-Vektors mit den Restriktionsenzymen Apal und XhoI (Fast Digest, Fermentas) bei 37 °C (Thermomixer comfort, Eppendorf) für 40 Minuten. Der verwendete Restriktionsansatz ist in Tabelle 2.15 aufgeführt. Anschließend fand für 20 Minuten bei 65 °C eine Hitzeinaktivierung statt.

Tabelle 2.15 Restriktionsverdau-Ansatz mit Apal und XhoI

Komponente	Menge
FastDigest Green Buffer® 10x	3 µl
Apal	1 µl
XhoI	1 µl
DNA	Vektor 1 µg/ Insert 200 ng
Nuklease-freies Wasser	ad 30 µl

Im Anschluss an die Restriktion erfolgte ein weiterer Reinigungsvorgang des Vektors und Inserts mit dem *NucleoSpin® Extract II Kit* (Macherey & Nagel).

Ligation

Nach abgeschlossener Restriktion wurden Vektor und *Insert* im Verhältnis 1:3 bei 16 °C für 1 h mit der T4-Ligase ligiert. Pro Ligationsansatz wurden 50 ng Vektor eingesetzt, wobei die Menge an *Insert* mit Formel 2.1 berechnet wurde.

Formel 2.1 Formel zur Berechnung der Insertmenge für den Ligationsansatz

$$\frac{\text{Vektor [ng]} \cdot \text{Insert [bp]}}{\text{Vektor [bp]}} \cdot 3 = \text{Insert [ng]}$$

Der linearisierte pET41b(+)-Vektor hat eine Größe von 5819 bp. Die kodierende DNA für das vollständige *TbPar42* ist 1149 bp, die NterFHA-Domäne 531 bp, den Linker 285 bp und die PPlase-Domäne 360 bp groß. Die Zusammensetzung des Ligationsansatzes ist in Tabelle 2.16 zu sehen.

Tabelle 2.16 Zusammensetzung des Ligationsansatzes

Komponente	Menge
Vektor	50 ng
Insert	berechnet mit Formel 2.1
T4-Ligase	1 µl
T4-Puffer 10x	2 µl
Nuklease-freies Wasser	ad 20 µl

1 µl des Ligationsansatzes wurde in elektrokompetente *E. coli* Shox-Zellen transformiert, auf mit Kanamycin versehene LB-Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht im Brutschrank (BD53, Binder) inkubiert.

2.2.2 DNA-Transformation

Transformation in elektrokompetente *E. coli* Shox-Zellen

Ein 20 µl Aliquot der bei -80 °C gelagerten Shox-Zellen wurde auf Eis aufgetaut. 1 µl des Ligationsansatzes (ca. 3 ng) wurden zum Zellaliquot gegeben, sanft gemischt und für 1 Minute auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine sterile vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und elektroporiert (EC2-Programm, *MicroPulser Electroporator*, BioRad). Direkt nach der Elektroporation wurden 200 µl vorgewärmtes (37 °C) SOC-Medium zu den Zellen gegeben, die Suspension in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 37 °C und 300 rpm für 1 h inkubiert (Thermomixer comfort, Eppendorf). Alle Schritte der Transformation erfolgten bei offener Flamme. 50 µl des Transformationsansatzes wurden auf eine LB+Kan-Agarplatte ausplattiert und bei 37 °C über Nacht im Brutschrank (BD53, Binder) inkubiert.

Transformation in chemisch kompetente *E. coli* -Zellen

Die Transformation der DNA in den chemisch-kompetenten *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3)T1r erfolgte mittels Hitzeschock. Dafür wurden 50 ng DNA zu einem eisgekühlten Aliquot chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen gegeben, vorsichtig gemischt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Darauf wurden die Zellen für 45 sec einem Hitzeschock bei 42 °C unterzogen (Thermomixer comfort, Eppendorf) und erneut für zwei weitere Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 200 µl vorgewärmtes LB-Medium zu den Zellen gegeben, sanft resuspendiert und für 1 h bei 37 °C und 400 rpm inkubiert (Thermomixer comfort, Eppendorf). Zuletzt wurde die gesamte Zellsuspension auf einer LB+Kan-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert (BD53, Binder).

2.2.3 Ermittlung richtiger Klone

Kolonie-PCR

Um Plasmid-tragende Kolonien mit integriertem Insert von denen mit einem religierten Vektor zu unterscheiden, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dafür wurden Kolonien von der Agarplatte in 20 µl Nuklease-freies Wasser überführt und resuspendiert. 10 µl der Suspension dienten als *Template*-DNA in der PCR-Reaktion (Tabelle 2.17).

Tabelle 2.17 Kolonie-PCR-Ansatz zur Überprüfung richtiger Klone

Komponente	Menge
Kolonie-Suspension	10 µl
DreamTaq Green Buffer® (10x)	4 µl
<i>forward</i> -Primer (10 pmol/µl)	2 µl
<i>reverse</i> -Primer (10 pmol/µl)	2 µl
dNTPs (10 mM)	2,5 µl
DreamTaq DNA-Polymerase (5 units/µl)	1 µl
Nuklease-freies Wasser	<i>ad</i> 40 µl

Das PCR-Programm (Tabelle 2.14) sowie die eingesetzten Primer (Tabelle 2.5) waren analog zu der Amplifizierung des Inserts aus dem Ursprungs-pEX-K-Vektor. Nach der PCR wurden die Ansätze auf ein 1,2 %iges Agarosegel aufgetragen und in TEA-Puffer laufen gelassen. Durch das hinzugefügte Midori Green Advance war die DNA unter UV-Licht (BioDoc Analyze, Biometra) sichtbar. Von Kolonie-Ansätzen, die eine Bande auf der gleichen Höhe wie das PCR-Produkt nach Amplifizierung des Inserts aus dem Original-pEX-K-Vektor (Positivkontrolle) aufwiesen, wurden die restlichen 10 µl der Kolonie-Suspension für das Animpfen von 7 ml LB+Kan-Medium genutzt. Die Flüssigkultur wurde bei 37 °C und 180 rpm (Thermoschüttler HT, Infors) über Nacht inkubiert. Nach der Isolierung der Plasmid-DNA (Kap. 2.2.4) wurde die DNA zur Sequenzierung geschickt (GATC GmbH, Köln).

Kontrollrestriktion

Neben der Kolonie-PCR wurden richtige Klone auch mittels Kontrollrestriktion ermittelt. Dafür wurden einzelne Kolonien direkt von der Agarplatte in jeweils 7 ml LB+Kan-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von der isolierten Plasmid-DNA (Kap 2.2.4) wurde ein Teil einer Restriktion mit Apal und XhoI (Tabelle 2.15) unterzogen. Von Verdau-Ansätzen, die nach der Gelelektrophorese, zusätzlich zu der Bande des geschnittenen Vektors, eine Bande auf der Höhe der Positivkontrolle (PCR-Produkt nach Amplifizierung des Inserts) zeigten, wurde die übrige, ungeschnittene DNA zur Sequenzierung (GATC GmbH, Köln) geschickt. Erwies sich die Sequenz als korrekt, folgte eine Transformation der Plasmid-DNA in den Expressionsstamm BL21(DE3)T1r.

2.2.4 Plasmid-DNA Isolierung

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte aus 7 ml (Mini-Prep) oder 200 ml (Midi-Prep) angezogener *E. coli*-Kulturen (37 °C, 180 rpm, über Nacht) in LB+Kan-Medium. Die Zellen wurden bei 4 °C, 4000 x g, für 20 min pelletiert und die enthaltene Plasmid-DNA nach Herstelleranleitung mit dem *NucleoSpin® Plasmid Kit* (Macherey & Nagel) isoliert. Abweichend vom Protokoll wurde die DNA in *Aqua bidest* eluiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels NanoDrop (Peqlab).

2.2.5 Expressionstest

Nach erfolgreicher Klonierung wurde vor der Proteinexpression im großen Maßstab eine Testexpression durchgeführt. Diese sollte Aufschlüsse über die optimalen Bedingungen geben, unter welchen das Protein überwiegend im Überstand zu finden ist und die beste Proteinausbeute liefert. Analysiert wurden drei Temperaturen (25 °C, 30 °C und 37 °C) und vier Expressionszeiten (2 h, 4 h, 6 h und über Nacht) in LB+Kan-Medium. Zuerst wurde eine 30 ml Übernachtskultur (37 °C, 160 rpm) des jeweiligen Konstrukts in *E. coli* BL21(DE3)T1r-Zellen angezogen (Thermoschüttler HT, Infors) und mit dieser 400 ml LB+Kan-Medium auf eine Anfangs-optische Dichte (OD) bei 600 nm von 0,1 angeimpft. Unter kontinuierlichem Schütteln bei 37 °C und 160 rpm wurde die Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 inkubiert (Thermoschüttler HT, Infors). Dann wurde die 400 ml-Kultur auf vier Kolben mit je 100 ml Zellsuspension aufgeteilt. Zu den Kulturen in drei der Kolben wurden 200 µM IPTG für die Expressionsinduktion zugegeben. Die Kolben wurden auf die Temperaturen 25 °C, 30 °C und 37 °C aufgeteilt und schüttelnd inkubiert. Der vierte Kolben wurde ebenfalls bei 37 °C und 160 rpm inkubiert, jedoch wurde zur Kultur kein IPTG zugegeben, so dass sie als Kontrolle für *E. coli*-eigene Proteine ohne Induktion diente. 2 h, 4 h, 6 h und über Nacht nach Induktionsstart wurden von jeder Bakterienkultur je 10 ml Proben entnommen. Diese wurden bei 4000 xg für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf), der Überstand verworfen und das Bakterienpellet bei -20 °C eingefroren. Für die Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen wurde das Pellet aufgetaut und in 1 ml mit PMSF (1 mM) versehenem PBS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschall (Sonoplus, Bandelin) (3 x 30 sec, 30 % Intensität) aufgeschlossen. Daraufhin wurden die lysierten Zellen für 60 Minuten bei 4 °C und 16.000 xg zentrifugiert (Centrifuge 5415R, Eppendorf). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Zellpellet in 500 µl PBS (+ 1mM PMSF) gelöst. 20 µl von jedem Überstand sowie 20 µl von jeder Pelletsuspension wurden mit 20 µl SDS-Probenpuffer vermischt und für die SDS-Page vorbereitet 2.3.12.3.1.

2.2.6 Proteinexpression

Expression in Vollmedium

Für die Expression von unmarkiertem Protein in LB-Medium wurde entweder eine einzelne Kolonie von der Agarplatte (nach erfolgreicher Transformation in die chemisch-kompetenten *E. coli*-BL21(DE3)T1r-Zellen) oder etwas Zellmaterial der entsprechenden Glycerin-Dauerkultur zu 50 ml LB Medium (mit 50 µg/ml Kanamycin) gegeben und eine Übernachtskultur bei 37 °C und 160 rpm angezogen. Mit 2 % [v/v] der Übernachtskultur wurden 1-4 l LB+Kan-Medium (je 1 l LB-Medium pro 5 l-Kolben) beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bei 37 °C schüttelnd inkubiert (160 rpm) (Thermoschüttler HT, Infors). Nachdem die Proteinexpression mit 200 µM IPTG induziert wurde, wurden die Zellen unter Expressionstest-ermittelten Parametern (Tabelle 2.18) weiter inkubiert.

Tabelle 2.18 Expressionsparameter der einzelnen Konstrukte

Protein	Expressions-temperatur [°C]	Expressions-dauer
<i>TbPar42</i> -VL	30	
<i>TbPar42</i> -NterFHA-Domäne	25	über Nacht
<i>TbPar42</i> -Linker	25	
<i>TbPar42</i> -PPlase-Domäne	37	

Im Anschluss an die Expression wurden die Bakterien für 20 min bei 6000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Avanti JE, JLA 9.100, Beckmann). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet aus 1 l-Medium in 25 ml Basispuffer (Tabelle 2.2) gelöst und bei -20 °C gelagert.

Expression in M9-Minimalmedium

Für die Expression isotopenmarkierter (¹³C und/oder ¹⁵N) Proteine in M9-Minimalmedium wurde vorerst wie bei der Expression in Vollmedium eine Übernachtskultur (LB+Kan-Medium) des gewünschten Konstrukts angelegt. Mit der Übernachtskultur wurde eine Vorkultur in LB+Kan-Medium (250 ml LB-Medium pro 1 l M9-Medium) auf eine Anfangs-OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert. Die Bakterien wurden bei 37 °C und 160 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 kultiviert und danach 15 min bei 20 °C und 4000 rpm Raumtemperatur zentrifugiert (Avanti JE, JLA 9.100, Beckmann). Das Pellet wurde in 20 ml M9-Medium aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in das restliche M9-Medium (Hauptkultur) überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 angezogen. Nach der Induktion mit 200 µM IPTG wurden die Zellen wie bei der Expression in Vollmedium weiterbehandelt.

Expression in M9-D₂O-Medium

Die Produktion von dreifach markiertem (²H, ¹³C, ¹⁵N) *TbPar42*-VL Protein erfolgte im NMR-Medium, in welchem anstelle von herkömmlichem Wasser 99,8 %iges D₂O als Lösungsmittel eingesetzt wurde. Dafür wurde nach der DNA-Transformation eine einzelne *E. coli*-BL21(DE3)T1r-Kolonie von der LB-Agarplatte in 50 ml M9-D₂O-Medium gegeben und über Nacht bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Mit der Übernachtskultur wurde 1 l M9-D₂O-Medium auf eine Anfangs-OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft. Die Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 wachsen gelassen und mit 200 µM IPTG induziert. Die optimalen Bedingungen für die Expression in D₂O wurden zuvor mit einem Expressionstest (wie in Kap 2.2.5 beschrieben) im M9-D₂O-Medium ermittelt. In deuteriertem Medium benötigten die Zellen 40 h bei 30 °C für die Produktion des GST-*TbPa42*-VL-Fusionsproteins. Nach dem Zentrifugieren (Avanti JE, JLA 9.100, Beckmann) der Zellen (20 min bei 6000 rpm und 4 °C), wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet aus 1 l-Medium in 25 ml *TbPar42*-VL-Basispuffer (Tabelle 2.2) gelöst und bei -20 °C gelagert.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente nach ihrer Größe getrennt. Durch das Anlegen einer Spannung wandert die negativ geladene DNA von der Kathode zur Anode durch das Agarosegel, wobei die Porengröße des Gels von der Agarosekonzentration abhängig ist. Für alle DNA-Konstrukte wurden in dieser Arbeit 1,2 %ige [w/v] Gele genutzt. Dafür wurden 1,2 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer gelöst und aufgeköcht. Nachdem die Agarose vollständig gelöst war, wurden 3 µl Midori Green Advance zur noch flüssigen Gelmasse zugefügt, wodurch die DNA nach der Separierung unter UV-Licht sichtbar wird. Das ausgehärtete Gel wurde in eine mit TAE-Puffer befüllte Gelelektrophoresekammer überführt und mit DNA-Proben beladen. Die Elektrophorese wurde mit 100 V durchgeführt (Mini Subcell GT und PowerPac basic, BioRad) und als Größenreferenz dienten die in Abbildung 2.1 abgebildeten DNA-Marker.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) werden Proteine nach ihrer Größe getrennt. Durch das Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) werden Proteine denaturiert und erhalten eine einheitliche negative Ladung. Wenn anschließend ein elektrisches Feld angelegt wird, wandern die Proteine größenabhängig von der Kathode zur Anode durch das Gel. Die dabei zurückgelegte Strecke im Gel ist annähernd proportional zum Logarithmus des

Molekulargewichts. In dieser Arbeit wurden selbst hergestellte diskontinuierliche 12,5 %ige oder 15 %ige SDS-Gele (Tabelle 2.19) verwendet [125].

Tabelle 2.19 Zusammensetzung der 12,5 %igen und 15 %igen SDS-Gele

Komponente	Trenngel (4x)		Sammelgel (4x)
	12,5 %	15 %	15%
<i>AA/Bis.</i>	8,3 ml	10 ml	850 µl
<i>Aqua bidest</i>	6,9 ml	5,2 ml	3,5 ml
Trenngelpuffer	4,4 ml	4,4 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	400 ml
SDS (10 %)	200 µl	200 µl	40 µl
APS (10 %)	200 µl	200 µl	40 µl
TEMED	8 µl	8 µl	4µl

Dabei wurde zunächst das Trenngel gegossen (XCell Mini Protean System, BioRad) und mit Isopropanol beschichtet. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel geschichtet und ein 10- oder 15-Taschen-Kamm aufgesetzt. Nach dem Aushärten des Sammelgels wurde der Kamm vorsichtig entnommen und das Gel bis zur weiteren Verwendung in feuchte Papiertücher (Kimberly-Clark®) eingewickelt und bei 4 °C gelagert. Vor dem Beladen des Gels wurden die Proben mit 2x oder 5x SDS-Probenpuffer vermischt und 10 min auf 95 °C erhitzt. Die Elektrophorese wurde bei RT und einer konstanten Spannung von 140 V durchgeführt (XCell Mini Protean 3 und PowerPac basic, BioRad). Als Größenreferenz wurden die in Abbildung 2.1 aufgeführten Proteinmarker verwendet. Nach der Elektrophorese wurde das Gel aus den Glasscheiben gelöst, in eine mit Coomassie-Färbelösung befüllte Plastikschaale gelegt und für 1 Minute in der Mikrowelle erhitzt. Das gefärbte Gel wurde nach 20 minütigem Schütteln in Entfärberlösung (Duomax 1030, Heidolph) mit VE-Wasser gewaschen und in eine Plastikschaale mit Entfärber-Lösung gegeben, erneut erhitzt und bis einzelne Proteinbanden sichtbar waren entfärbt.

2.3.2 Zellaufschluss

Das nach der Proteinexpression bei -20 °C gelagerte Zellpellet wurde im lauwarmen Wasserbad aufgetaut, mit Lysozym (1 mg/ml) und PMSF (1 mM) versehen und für 1 h bei 4 °C gerührt (MR 3000, Heidolph). Der Zellaufschluss erfolgte am Sonifikator (Sonoplus, Bandelin) mittels Ultraschall. Das Pellet wurde auf Eis in Zyklen von 5 x 50 sec und 60 % Schallintensität behandelt. Zwischen den einzelnen Zyklen wurde das Pellet für 1 min ruhen gelassen. Die lysierten Zellen wurden anschließend für 70 min, 35.000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Ultrazentrifuge, Beckmann). Der steril filtrierte (0,22 µm, Millipore) Überstand wurde mit Basispuffer (Tabelle 2.2) auf 250 ml Endvolumen verdünnt und in der nachfolgenden Affinitätschromatographie genutzt.

2.3.3 Proteinreinigung

GSH-Affinitätschromatographie

Die Reinigung der GST-Fusionsproteine wurde mittels Affinitätschromatographie an einer FPLC-Anlage (BioLogic DuoFlow F10, BioRad), unter Verwendung einer GSH-Säule (Protino® Glutathione Agarose 4B, Macherey & Nagel) durchgeführt. Die GSH-Säule wurde vorerst mit Basispuffer (Tabelle 2.2) äquilibriert und anschließend mit dem filtrierten, proteinhaltigen Überstand (nach dem Zellaufschluss) beladen. Die einzelnen Schritte der GSH-Affinitätschromatographie sind in Tabelle 2.20 zusammengefasst. Während des kompletten Reinigungsverlaufes wurde die Absorption bei 280 nm gemessen.

Tabelle 2.20 FPLC-Programm zur Durchführung einer GSH-Affinitätschromatographie

Die Zusammensetzung der Puffer ist abhängig vom zu reinigenden Konstrukt der Tabelle 2.2 zu entnehmen.

Schritt	Puffer	Volumen [ml]	Flussrate [ml/min]
Äquilibration	Basispuffer	100	1
Probenauftrag	Überstand nach Zellaufschluss	250	0,5
1. Waschen	Basispuffer	30	1
2. Waschen	Hochsalzpuffer	80	0,5
3. Waschen	Basispuffer	50	1
Elution	Elutionspuffer	250	0,5

Fusionsproteinhaltige Fraktionen wurden mittels SDS-Page überprüft, zusammengeführt und mit einem Konzentratoren (Vivaspin Turbo 15, 10000 MWCO, Sartorius) auf ein Endvolumen von 2 ml konzentriert (4 °C, 4000 x g). Nach der Protein-Konzentrationsbestimmung (NanoDrop, Peqlab) wurden pro 6 mg Fusionsprotein 1 µg PreScission-Protease zugegeben, 10 Minuten bei 4 °C und 16,000 xg zentrifugiert (Centrifuge 5415R, Eppendorf) und in einen 2 ml Probenloop gespritzt. Während die Gelfiltrationssäule mit Gelfiltrationspuffer äquilibriert wurde (7 h), wurde durch die PreScission-Protease der GST-Tag vom Zielprotein abgespalten.

Größenausschluss-Chromatographie (Gelfiltration)

Für die Größenausschluss-Chromatographie (Gelfiltration) wurde abhängig von exprimierter Proteinmenge und vom Konstrukt entweder die HiLoad 16/600 (26/600) Superdex 75 pg (für Linker, NterFHA- und PPIase-Domäne) oder die HiLoad 16/600 (26/600) Superdex 200 pg (für *TbPar42-VL*) von GE Healthcare verwendet. Die Gelfiltration wurde wie die Affinitätschromatographie an einer FPLC-Anlage (BioLogic DuoFlow F10, BioRad) durchgeführt. Das Proteingemisch (geschnittenes Fusionsprotein) aus dem zuvor beladenen Probenloop wurde mit konstanter Flussrate (1 ml/min) über die äquilibrierte Gelfiltrationssäule gegeben, mit Gelfiltrationspuffer eluiert (1 ml/min) und fraktioniert. Die abgespaltene GST wurde von einer, an die Gelfiltrationssäule nachgeschaltete GSH-Affinitätssäule gebunden. Während des Reinigungsverlaufes wurde die Absorption bei 280 nm und 214 nm detektiert.

Proteinhaltige Fraktionen wurden mittels SDS-Page analysiert und jene mit reinem Zielprotein zusammengeführt sowie konzentriert (Vivaspin Turbo 15, 5000 MWCO, Sartorius). Experimentabhängig wurde das reine Protein in einen anderen Puffer überführt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

2.3.4 Analytische Gelfiltration (SEC)

Eine mögliche Multimerisierung des Proteins wurde mit einer analytischen Gelfiltration untersucht. Dafür wurde im ersten Schritt die Superdex 200 Increase 10/300 GL-Säule (GE Healthcare) an der FPLC-Anlage (BioLogic DuoFlow F10, BioRad) bei 4 °C mit Gelfiltrationspuffer äquilibriert. Daraufhin wurde ein Kalibrationslauf mit Proteinen bekannter Größe (*Gel Filtration Standard*, BioRad) (Tabelle 2.21) durchgeführt. 125 µl des Proteinstandards wurden mit 25 µl reduktionsfreiem Gelfiltrationspuffer vermischt und damit ein 140 µl Probenloop befüllt. Die Proteine wurden unter konstanter Flussrate von 0,7 ml/min mit 35 ml von der Säule eluiert. Anschließend wurde unter denselben Bedingungen anstelle des Proteinstandards ein Lauf mit reinem zu untersuchenden Protein (100-300 µM) wiederholt.

Tabelle 2.21 Zusammensetzung des *gel filtration*-Standards von Biorad

Protein	Molekulargewicht [kDa]	Konzentration [mg/ml]
Thyroglobulin (Rind)	670	10
γ-globulin (Rind)	158	10
Ovalbumin (Huhn)	44	10
Myoglobin (Pferd)	17	5
Vitamin B₁₂	1,35	0,5

Nachdem die Elutions-Signalmaxima der Proteine des Proteinstandards gegen den dekadischen Logarithmus (\log_{10}) derer Molekulargewichte aufgetragen wurden, konnte über lineare Regression und die Elutionszeit des zu untersuchenden Proteins auf dessen Molekulargewicht, unter den vorliegenden Bedingungen, geschlossen werden. In der Sequenz von *TbPar42* sind mehrere Cysteine zu finden, die unter Ausbildung von Disulfidbrücken zur Entstehung von artifiziellen Multimeren führen könnten. Aus diesem Grund wurde die analytische Gelfiltration im Gelfiltrationspuffer, welcher zusätzlich 2 mM DTT enthielt, wiederholt.

2.3.5 Limitierte Proteolyse mit Chymotrypsin

Um zu überprüfen, ob die *TbPar42*-PPLase-Domäne während des PPLase-Assays von α -Chymotrypsin geschnitten wird, wurde eine limitierte Proteolyse mit α -Chymotrypsin bei 10 °C durchgeführt. Der Protease-Ansatz ist in Tabelle 2.22 aufgeführt.

Tabelle 2.22 Verdauungsansatz mit α -Chymotrypsin

Komponente	Volumen [μ l]	Endkonzentration
<i>TbPar42</i> -PPIase -Domäne	30	1 mg/ml
α -Chymotrypsin	20	10 μ g/ml
PBS-Puffer pH6,8	ad 200	

Als Kontrolle wurde vor Chymotrypsin-Zugabe eine SDS-Probe mit reiner *TbPar42*-PPIase-Domäne vorbereitet. Aus dem mit Chymotrypsin versehenen Ansatz wurden nach 2, 5, 10, 15, 20, 30 und 60 min je 20 μ l entnommen, mit 20 μ l 2x SDS-Probenpuffer vermischt und für 10 min bei 95 °C erhitzt. 10 μ l der SDS-Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und nach abgeschlossener Elektrophorese analysiert.

2.4 Spektroskopische Methoden

MALDI-Massenspektrometrie

Für die massenspektrometrische Analyse der Proteine wurden diese mittels Supel-Tips C18 (Supelco) Pipettenspitzen nach Herstellerprotokoll entsalzt. Die Matrixlösung, in die das Protein nach der Entsalzung eingebettet wurde, bestand aus Dihydroxyacetophenon und Ammoniumhydrogencitrat und wurde nach Bruker-Protokoll zur Probenvorbereitung hergestellt. 0,5 μ l der vorbereiteten Probe wurden auf eine Probenplatte (MTP 384 target plate ground steel T F, Bruker) pipettiert und bei Raumtemperatur bis zum Verdampfen des Lösungsmittels stehen gelassen. Die Spektren wurden am MALDI-TOF Massenspektrometer (autoflex speed, Bruker) unter Verwendung der Standardmethoden: LP_20-50kDa oder RP_5-20kDa aus der Bruker-Bibliothek aufgenommen und über Variation der Detektorspannung oder Laserintensität optimiert.

2.4.1 NMR-Spektroskopie

Probenvorbereitung

Nachdem das zu untersuchende Protein (unmarkiert, einfach-, doppel- oder dreifachmarkiert) exprimiert wurde und nach der Reinigung in reiner und konzentrierter Form vorlag, wurde es für NMR-spektroskopische Untersuchungen in NMR-Puffer umgepuffert, bei -20 °C gelagert oder direkt für NMR-Messungen genutzt. Zur 540 μ l-Proteinprobe (Proteinkonzentration: 200-600 μ M in NMR-Puffer) wurden 60 μ l 99,9 %iges D₂O und 1 μ l DSS-Standard zugegeben. Dabei dient das D₂O als interner Feldfrequenz-Lock und das DSS als externer Standard. Die fertige NMR-Probe wurde in ein 5 mm NMR-Röhrchen (Bruker) pipettiert, kurz mit der Handzentrifuge zentrifugiert und gemessen.

Bei den Proben, die in D₂O gemessen wurden, wurde das gereinigte Protein nach dem Überführen in NMR-Puffer (540 μ l) in einer Lyophylle (Christ) über Nacht gefriergetrocknet.

Gefriergetrocknetes Protein wurde in D₂O gelöst, mit 1 µl DSS versetzt und im 5 mm NMR-Röhrchen (Bruker) gemessen.

Aufnahme und Prozessierung der NMR-Spektren

Die NMR-Spektren wurden am Bruker Ultrashield 700-NMR (Bruker BioSpin, Fällanden) unter Verwendung eines Tripleresonanz-Cryo-Probenkopfes (700 MHz), mit aktiv abgeschirmten Gradientenspulen in allen drei Raumrichtungen, bei 27 °C (BVT3000-Kontrolleinheit (Bruker BioSpin, Fällanden) aufgenommen. Bis auf wenige Ausnahmen entstammen die Pulsprogramme der Bruker Standardbibliothek und sind zusammen mit weiteren Aufnahme- und Prozessierparametern in Kap. 7.4 aufgelistet. Mit dem Programm Topspin 3.0 (Bruker BioSpin, Rheinstetten) wurden sowohl alle Aufnahmeeinstellungen als auch die Prozessierung der aufgenommenen Spektren vorgenommen. Die Prozessierung (Fourier-Transformation) der 2D-Spektren erfolgte mit dem Befehl *xfb* (F1- und F2-Dimension) und der 3D-Spektren mit den Befehlen *tf3*, *tf2*, *tf1* (F3-, F2- und F1-Dimension). Die Basislinien- und Wasserkorrektur wurde automatisiert über die Befehle *abs2.water*, *abs1* für 2D-Spektren und *tabs3*, *tabs2*, *tabs1* für 3D-Spektren durchgeführt. Die Fourier-Transformation der 1D-Spektren erfolgte über den Befehl *ft*. Die Phasenkorrektur der Spektren wurde bei Bedarf manuell mit Topspin 3.0 vorgenommen. Bei den 3D-Spektren musste der Datensatz über die Hilbert-Transformation (Befehl: *xht2*, *xht1*) um die imaginären Anteile ergänzt werden. Als Filterfunktionen wurden 45 ° bis 90 ° verschobene (SSB: 4 bzw. SSB: 2) Sinus- oder Sinusquadratfunktionen (WDW: SINE bzw. QSINE) verwendet [29]. Das hetNOE-Spektrum wurde über die Eingabe *split 2* in das jeweilige Spektrum mit und ohne Vorsättigung aufgeteilt und anschließend prozessiert.

Titrationsexperimente

Nachdem vom Protein die Rückgrat-Resonanzen zugeordnet wurden, wurden mit Titrationsexperimenten Bindungsstudien mit potentiellen Liganden (Peptiden) durchgeführt. Dafür wurde das Protein ¹⁵N-markiert exprimiert und gereinigt. Die Peptide (Tabelle 2.8) wurden unmarkiert in lyophilisierter Form von der Firma CASLO geliefert. Es wurde eine 6 mM Peptid-Stocklösung hergestellt, indem lyophilisiertes Peptid in 5 mM KPi-Puffer gelöst und der pH mit 5 mM KH₂PO₄ und 5 mM K₂HPO₄ auf 6,26 eingestellt wurde. Nach der Gefrierdrying wurde das Peptid in ddH₂O (10x geringerem Volumen) aufgenommen, so dass eine Peptid-Stocklösung von 60 mM in 50 mM KPi-Puffer, pH 6,26 (NMR-Puffer) vorlag. Von der Stocklösung wurde schrittweise Peptid (bis zur Endkonzentration von 8 mM oder 13 mM) zu 250 µM oder 440 µM Protein in 500 µl NMR-Puffer gegeben. Nach jedem Titrationsschritt wurde ein ¹⁵N-HSQC- oder ein SOFAST-HMQC-Spektrum (Kap. 7.4) aufgenommen. Eine Bindung des Peptids verändert die chemische Umgebung der an der Bindung beteiligten Aminosäuren, was in der Verschiebung der Signale (*shifts*) im Spektrum resultiert. Die Berechnung der Gesamtverschiebung erfolgte mit der Formel 2.2 [4]:

Formel 2.2 Berechnung der chemischen Gesamtverschiebung

$$\Delta\delta_{gesamt} = \sqrt{(\Delta\delta_N \cdot 0,154)^2 + (\Delta\delta_H)^2}$$

Die ermittelten $\Delta\delta_{gesamt}$ -Werte der Signal-Shits für einzelne Aminosäuren wurden mit dem Programm GraphPadPrism zu Titrationskurven verarbeitet, indem die beobachtete Resonanzverschiebung gegen die steigende Peptid-Konzentration aufgetragen wurde. Durch das Fitten der Datenpunkte des Kurvenverlaufs mit der Formel 2.3 konnte somit für jede Aminosäure der Wert der mikroskopischen Dissoziationskonstante mit dem entsprechen Standardfehler berechnet werden.

Formel 2.3 Berechnung der mikroskopischen Dissoziationskonstante

Dargestellt ist die Beziehung zwischen der Protein (P)-, Ligand (L)-Konzentration, der Gesamtveränderung der chemischen Verschiebung ($F = \delta_{gesamt}$) und dem K_D -Wert. F_{max} ist die hypothetische maximale Verschiebung bei Sättigung.

$$F = F_{max} \cdot \frac{P + L + K_D}{2} - \frac{\sqrt{\left(\frac{P + L + K_D^2}{2}\right) - (L \cdot P)}}{P}$$

Die mikroskopische Dissoziationskonstante beschreibt dabei die Bindungsaffinität des Liganden zu der einzelnen Aminosäure. Diese muss nicht direkt mit der Bindung des Liganden an das Protein übereinstimmen. Dafür wurde ein durchschnittlicher K_D -Wert aus einer Vielzahl einzelner Aminosäuren ermittelt.

EXSY-Experiment

Dynamische, jedoch langsam ablaufende Prozesse (wie die Einstellung des *cis/trans*-Gleichgewichts) in einem Zeitfenster von 10 ms bis 5 s lassen sich im NMR im EXSY (**EX**change **S**pectroscop**Y**)-Spektrum beobachten [118]. Das EXSY ist eine Version des NOESY-Spektrums mit kurzer Mischzeit und langem Relaxationsintervall. 0,645 mg lyophilisiertes Suc-Ala-pThr-Pro-Ala-NH₂-Peptid (Tabelle 2.8) wurden in 500 µl 25 mM KPi-Puffer gelöst und auf pH 6,26 eingestellt (766 Calimatic mit N6003 Elektrode). Das Peptid wurde gefriergetrocknet und in D₂O aufgenommen. Von der konzentrierten Peptidprobe (2,4 mM Peptid in 25 mM KPi-D₂O-Puffer) wurde am NMR ein EXSY-Spektrum aufgenommen (Pulsprogram: noesygp19, Mischzeit: 400 ms, Relaxationsintervall:1 s, Scanzahl:16). Im Spektrum sind sowohl *cis*- als auch *trans*-Signale detektierbar. Nach Zugabe der hPin1-PPIase oder der TbPar42-PPIase in NMR-Puffer (50 µM Endkonzentration) wurde das EXSY-

Spektrum erneut aufgenommen. Im Falle der *cis/trans*-Isomerisierung durch die zugegebene PPlase sind zu den Signale des *cis*- und *trans*-Isomers, Austauschsignale zwischen den Zuständen in Form von Kreuzsignalen zu sehen.

Relaxations- und Dynamikmessungen

Die longitudinale Relaxationsrate ($R_1=1/T_1$), die transversale Relaxationsrate ($R_2=1/T_2$) sowie der heteronukleare $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -NOE stellen Parameter dar, über die es möglich ist, Aussagen über die Dynamik bzw. Flexibilität einzelnen Strukturregionen zu treffen. Die Rückkehr der Kernspin-Magnetisierung in den Gleichgewichtszustand nach einer Anregung bezeichnet man als Relaxation. Die longitudinale Relaxationszeit (Spin-Gitter-Relaxation) (T_1) beschreibt die in Richtung des Hauptmagnetfeldes auftretende Relaxation. Die transversale Relaxationszeit (Spin-Spin-Relaxation) T_2 ist die Relaxation senkrecht zum äußeren Magnetfeld. Sowohl die longitudinale T_1 - als auch die transversale T_2 -Relaxation wurden über Intensitätsmessungen der Signale aus einer Serie an $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren (bei 27 °C) mit unterschiedlichen *delay*-Zeiten (t) ermittelt. Relaxationsabhängig wurden unterschiedliche *delay*-Zeiten gesetzt (Tabelle 2.23).

Tabelle 2.23 Verwendete *delay*-Zeiten (t) für die T_1 - und T_2 -Relaxation

	t [ms]
T_1	20, 100, 140, 180, 200, 300, 500, 750, 1000, 1400
T_2	10, 30, 50, 70, 90, 110, 130, 170, 190

T_1 bzw. T_2 wurden durch Fitten der Intensitätsverläufe nach Formel 2.4 bestimmt.

Formel 2.4 Signal-Intensitäten in Abhängigkeit von den *delay*-Zeiten (t)

I = Intensität; I_0 = Intensität im Grundzustand; t = Relaxationszeit in ms; T = T_1 bzw. T_2

$$I = I_0 \cdot e^{-\frac{t}{T}}$$

T_1 und T_2 können als eine Funktion der Rotationskorrelationszeit τ_c (Formel 2.2) angegeben werden. Diese ist abhängig von der Partikelgröße und beschreibt die Dauer, die ein Molekül braucht, um einen Radian zu rotieren (60 °) [29].

Formel 2.5 Rotationskorrelationszeit τ_c

ν_N = Resonanzfrequenz von ^{15}N [Hz], die bei 700 MHz $70,971 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ beträgt

$$\tau_c = \frac{1}{4 \times \pi \times \nu_N} \times \sqrt{6 \times \frac{T_1}{T_2} - 7}$$

Die Dynamikmessungen erfolgten bei 27 °C im NMR Puffer, 10 % (v/v) D₂O und 50 µM DSS. Von der Berechnung der Rotationskorrelationszeit mit den gemittelten T₁- und T₂-Zeiten wurden T₁- und T₂-Werte mit einer Standardabweichung >16 %, die flexiblen Termini sowie die Aminosäuren mit einem negativen hetNOE-Wert ausgeschlossen.

Durch das Auftragen der Rotationskorrelationszeiten anderer Proteine, aufgenommen unter vergleichbaren Bedingungen, gegen das entsprechende Molekulargewicht [199], ist es über lineare Regression und die Rotationskorrelationszeit des zu untersuchenden Proteins möglich, auf dessen Molekulargewicht zu schließen.

Über den ¹H¹⁵N-hetNOE wird die Bewegung des ¹H¹⁵N-Bindungsvektors gemessen. Um den hetNOE zu bestimmen, werden zwei simultan aufgenommene Spektren verwendet. In einem davon sind die Protonen gesättigt (I_{sat}), während das andere Spektrum (I_{ref}) ohne Vorsaturierung ist und als Referenzspektrum dient. Das Verhältnis zwischen den Signalintensitäten aus dem Spektrum mit Vorsättigung I_{sat} und dem Referenzspektrum I_{ref} ergibt schließlich den hetNOE (Formel 2.6).

Formel 2.6 Berechnung des heteronuklearen NOEs (η)

$$\eta = I_{\text{sat}}/I_{\text{ref}}$$

D₂O-Austauschexperiment

Eine 500 µM ¹⁵N-markierte Probe der *TbPar42*-PPIase- oder *TbPar42*-NterFHA-Domäne in 540 µl NMR-Puffer, 10 % (v/v) D₂O und 50 µM DSS wurde über Nacht gefriergetrocknet (Lyophylle, Christ). Anschließend wurde das lyophilisierte Protein in 600 µl 99,96 %igem D₂O (Eurisotop) aufgenommen und umgehend die Aufnahme einer Reihe hintereinander geschalteter ¹H¹⁵N-HSQC- (NterFHA-Domäne) oder SOFAST-HMQC-Spektren (PPIase-Domäne) gestartet.

2.4.2 Fluoreszenz-Spektroskopie

Fluoreszenz-Anisotropie

Über die Fluoreszenz-Anisotropie sollte die Affinität der NterFHA-Domäne zu den Peptiden GSGpTPMFTGA und DDpTPMFVMG untersucht werden. Dafür wurden die Peptide (Tabelle 2.8) von der Firma CASLO mit einem N-terminal konjugierten Rhodamin B synthetisiert. Die lyophilisierten Peptide wurden in 5 mM KPi-Puffer aufgenommen und mit 5 mM KH₂PO₄ und 5 mM K₂HPO₄ auf pH 6,26 eingestellt. Anschließend wurden die Peptide gefriergetrocknet und in 10x geringerem Volumen ddH₂O aufgenommen. Die Konzentration der Peptide wurde am Nanodrop (Peglab) über die Absorption bei 563 nm und den Extinktionskoeffizienten ε=106000 M⁻¹cm⁻¹ bestimmt. Die Anisotropie-Messungen erfolgten am

Cary Eclipse Fluoreszenz-Spektrometer (Agilent Technologies, Waldbronn), einer Anregung bei 563 nm und einer Emission bei 583 nm. Der G-Faktor wurde mit 400 nM (Rhodamin B)-GSGpTPMFTGA-Peptid in 50 mM KPi-Puffer, pH 6,26 bestimmt. Bei dem (Rhodamin B)-DDpTPMFVMG-Peptid wurden 1 µM Peptid in 50 mM KPi-Puffer, pH 6,26 für die G-Faktor Bestimmung genutzt. Mit einer Verdünnungsreihe der *TbPar42*-NterFHA-Domäne im gleichen Puffer wurde in separaten Ansätzen die Anisotropie bei den unterschiedlichen NterFHA-Konzentrationen gemessen. Die Küvetten wurden zwischen den Messungen mit Hellmanex II und *A. bidest.* gespült. Die Datenpunkte wurden mit GraphPadPrism ausgewertet. Der Anisotropie-Wert jedes Titrationsschrittes wurde um den Nullwert (Anisotropie-Wert mit alleinigem Peptid ohne Protein) korrigiert. Anschließend wurden die Datenpunkte gefittet (Modell "one site specific binding") und der K_D -Wert ermittelt.

2.4.3 UV-Vis-Spektroskopie

Bestimmung der DNA- und Proteinkonzentration

Mit dem NanoDrop® (Peqlab) Spektrophotometer wurde sowohl die DNA- als auch die Proteinkonzentration bestimmt. Die DNA-Konzentration wurde über die Absorption bei 260 nm und die der Proteine über das Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren bei 280 nm bestimmt. Der ermittelte Absorptionswert kann durch Umstellung der Lambert Beer'schen Gleichung (Formel 2.7) für die Berechnung der Konzentration genutzt werden.

Formel 2.7 Lambert-Beer'sches-Gesetz

ϵ –molarer Extinktionskoeffizient; c-Konzentration (M); d-Schichtdicke.

$$A = \epsilon cd \leftrightarrow c = \frac{A}{\epsilon d}$$

Der Extinktionskoeffizient des jeweiligen Proteins wurde mit Hilfe des Online-Tools ProtParam: <http://web.expasy.org/protparam/> (ExpASy, Swiss Institute of Bioinformatics) durch Eingabe der Proteinsequenz ermittelt und ist dem Kap. 7.2 zu entnehmen.

Die Konzentration des *TbPar42*-Linkers wurde mittels Bradford-Reaktion gemessen [21]. In einer Küvette mit 999 µl Bradford-Reagenz wurde am Photometer (BioPhotometer, Eppendorf) der Leerwert bestimmt. Das Photometer wurde zuvor mit einer BSA-Verdünnungsreihe auf das Bradfordreagenz geeicht. Durch die Zugabe von 1 µl Proteinprobe zu den 999 µl Bradford-Reagenz, kurzem Resuspendieren und 5 minütiger Inkubation, wurde über die Absorption bei 595 nm die Proteinkonzentration in mg/ml gemessen.

Protease-gekoppelter Isomeraseassay

Ob die *TbPar42*-PPIase über eine Isomeraseaktivität verfügt, wurde mit einem Protease-gekoppelten Isomeraseassay untersucht [63, 119]. Modellpeptide (Caslo oder ChinaPeptides) mit dem Grundgerüst Succinyl-Ala-Xaa-Pro-Phe-paraNitroanilin wurden in einer Konzentration von 15 mM einen Tag vor Versuchsdurchführung in Peptidpuffer gelöst. In den Peptiden wurde Xaa, die Position N-terminal von Prolin, mit unterschiedlichen Aminosäuren besetzt. Der Peptidpuffer bewirkt eine Verschiebung des *cis/trans*-Gleichgewichtes auf ca. 40 % *cis*- und ca. 60 % *trans*-Isomer von ca. 10 % *cis*- und 90 % *trans*-Isomer in lithiumfreien Puffer. Ohne eine Isomerase ist die Isomerisierung ausschließlich thermischer Natur. Um den thermischen Faktor zu minimieren, wurde die Temperatur in der Messzelle während der gesamten Messung bei 10 °C gehalten. Bei der im Assay verwendeten Protease handelt es sich um α -Chymotrypsin. α -Chymotrypsin schneidet nur die *trans*-Form des Peptids, C-terminal vom Phenylalanin, wodurch für das abgespaltene para-Nitroanilin (pNA) ein Signal bei 390 nm detektierbar ist. Als Negativkontrolle (unkatalysierte Reaktion) wurden aus einer 350 μ M α -Chymotrypsin-Stocklösung in PBS (pH 6,8), 100 μ l in eine 10 mm Quarzküvette (Suprasil 104-QS, Hellma) pipettiert und auf ein Volumen von 995 μ l mit PBS pH 6,8 aufgefüllt. Die Messung erfolgte am Cary 100Bio Spektroskop von Varian, bei einer Wellenlänge von 390 nm, einer Spektralbandbreite von 1,0 nm und einem zeitlichen Mittelwert von 0,5 sec für jeden Datenpunkt. Nachdem 5 min die Basislinie aufgenommen wurde, wurden 5 μ l Peptid zum Ansatz hinzugefügt. Die Küvette wurde mit Parafilm beschichtet, mehrmals invertiert und die Messung der Absorption bei 390 nm für weitere 15 min weitergeführt. Das Überführen des Peptids aus dem lithiumhaltigen Puffer in PBS-Puffer resultiert in einer Änderung des *cis/trans*-Gleichgewichtes zu Gunsten der *trans*-Isoform. Eine zusätzliche Verlagerung des Gleichgewichtes zur gleichen Seite bewirkt die *trans*-spezifische Proteolyse durch α -Chymotrypsin [143, 144]. Da in der Negativkontrolle keine Isomerase vorhanden ist, erfolgt die Isomerisierung rein thermisch. Für den eigentlichen Isomerase-Assay wurde zum α -Chymotrypsin *TbPar42*-PPIase hinzugefügt (außer für das Phosphomotiv-enthaltende-Peptid betrug die Endkonzentration an *TbPar42*-PPIase im Ansatz 10 μ M). Die Messung erfolgte wie bei der Negativkontrolle, indem zum Chymotrypsin+PPIase-Ansatz nach 5 minütiger Äquilibration (Basislinie-Messung) das Peptid hinzugegeben wurde und für weitere 15 min die Absorption bei 390 nm detektiert wurde. Für den Isomeraseassay mit dem Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNa-Peptid wurden 200 nM *TbPar42*-PPIase eingesetzt. Da die *hPin1*-PPIase die Isomerisierung von Phosphomotiven katalysiert, wurde sie als Positivkontrolle (20 nM *hPin1*-PPIase) mit dem Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNa-Peptid verwendet. Durch Zugabe einer aktiven PPIase wird die Isomerisierung beschleunigt. Die Verdaureaktion durch α -Chymotrypsin ist durch die Verfügbarkeit an *trans*-Peptid begrenzt. Diese ist wiederum von der Geschwindigkeit der *cis*- zu *trans*-Isomerisierung abhängig. Über die Auswertung der Messkurven wäre es

möglich, die Geschwindigkeitskonstante für die katalysierte Reaktion sowie die katalytische Effizienz der PPlase für das jeweilige Modelpeptid (Substrat) zu bestimmen. In dieser Arbeit wurden jedoch nur die Kurvenverläufe der katalysierten und unkatalysierten Reaktionen miteinander verglichen, um Aussagen über das Vorhandensein einer Isomeraseaktivität zu treffen.

Chaperonassay

In dem Chaperonassay wurde die Muskel-Kreatinkinase aus Kaninchen als Modellprotein genutzt. Vorerst wird eine 150 μM Stocklösung der Kreatinkinase in Entfaltungspuffer (3 M Guanidiniumhydrochlorid, 30 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) angesetzt. In diesem Puffer wurde die Kreatinkinase für 1 h bei RT entfaltet. Eine Überführung des Proteins in den gleichen Puffer ohne Denaturierungsmittel resultiert in einer vollständigen Aggregation der Kreatinkinase. Dabei kann die Aggregation über die Trübung bzw. ein Absorptionssignal bei 400 nm gemessen werden. Fungiert ein Protein als Chaperon, so kann die Aggregation der Kreatinkinase unterbunden werden. Um zu testen, ob die *TbPar42*-PPlase bzw. das vollständige *TbPar42* die Funktion eines Faltungshelfers übernimmt, wurde die Trübung in Anwesenheit der PPlase oder des *TbPar42*-VL gemessen. Die Messungen erfolgten bei 37 °C am Cary 100Bio Spektroskop von Varian in einer Suprasil 108.002 10 mm Küvette. 1, 5 und 20 μM PPlase (*TbPar42*-VL) wurden im Entfaltungspuffer bei 37 °C für 2 min inkubiert. Zu dem 482,5 μl Ansatz wurden 7,5 μl der Kreatinkinase (aus der 150 μM Stocklösung im Entfaltungspuffer) gegeben (entspricht einer 1:66 Verdünnung), mit der Pipettenspitze durchmischt und umgehend für 20 min die Absorption bei 400 nm detektiert. Als Negativkontrolle wurde die Kreatinkinase in den Rückfaltungspuffer ohne *TbPar42*-PPlase oder *TbPar42*-VL überführt und die Trübung gemessen.

2.5 Strukturrechnung und -Analyse

2.5.1 Zuordnung der Rückgrat- und Seitenketten-Resonanzen

Unter „Zuordnung“ versteht man die Zuweisung der Signale der NMR-Spektren den einzelnen Atomen einer Polypeptidkette. In dieser Arbeit wurden dafür eine Reihe an 2D- und 3D-Spektren (Kap. 7.4) mit dem Programm CCPN (CcpNmr Analysis) ausgewertet. Auf die sequentielle Verknüpfung (*chain tracing*) sowie die Zuordnung der koppelnden Atome wird im Ergebnisteil (Kap. 3.4.1-3.4.4, 3.5.3) ausführlich eingegangen. Die zugeordneten Resonanzen der einzelnen Konstrukte können auf der beigefügten CD eingesehen werden.

2.5.2 Sekundärstrukturanalyse nach Wishart

Die Sekundärstrukturanalyse nach Wishart *et al.* [258] erfolgt über den chemischen Verschiebungsindex (CSI). Dabei werden die ermittelten chemischen Verschiebungen der

Rückgratresonanzen im Protein (dafür notwendige Spektren wurden nach IUPAC geeicht) mit Frequenzen der jeweiligen Aminosäure verglichen, welche in einem kurzen Peptid (GG-X-Ala(Pro)GG) ermittelt wurden und somit der chemischen Verschiebung in unstrukturierten (*random coil*) Bereichen entsprechen [257, 259]. Beträgt die Abweichung des gemessenen Wertes für die H α -Resonanz im Protein mehr als +/- 0,1 ppm gegenüber dem Referenzwert, so bekommt die entsprechende Rückgratresonanz den Wert +/- 1. Ist die Differenz kleiner 0,1 ppm, so wird der Wert 0 vergeben. Im Falle von C α und C β beträgt die Differenz 0,7 ppm und bei dem CO ist der Unterschied von 0,5 ppm zu beachten. Trägt man den chemischen Verschiebungsindex gegen die Aminosäuresequenz auf, so lassen sich Sekundärstrukturelemente vorhersagen, da bei α -Helices die C α - und CO-Resonanzen eine positive Abweichung zu den *random coil*-Verschiebungen besitzen, wohingegen die C β - und H α -Resonanzen eine negative Abweichung zeigen. In β -Faltblättern verhält sich diese Verteilung genau entgegengesetzt. In der Arbeit wird der CSI in Form der genauen Abweichungen gegenüber dem Referenzwert anstelle der -1/0/+1-Darstellung gezeigt. Der Konsensus des chemischen Verschiebungsindex CSI_{CONS} wurde für der Linker aus der Darstellung des chemischen Verschiebungsindex für C α , C β und CO manuell ermittelt. Für die NterFHA- und die PPlase-Domäne wurde der CSI_{CONS} Software-unterstützt über den Webserver: <http://randomcoilindex.com/cgi-bin/rci CGI current.py> bestimmt. Dafür wurden die chemischen Verschiebungen der H α -, C α -, C β - und CO-Resonanzen mit CCPN in SHIFTY-Format exportiert. Bis auf die Einstellung *Random coil values: Wishart* wurden die Standardvoreinstellungen genutzt.

2.5.3 Analyse der Sekundärstruktur nach Wüthrich

Das Auftreten bestimmter NOEs zwischen den Aminosäuren einer α -Helix oder eines β -Faltblattes erlaubt das Definieren der Sekundärstrukturelemente innerhalb einer NMR-Struktur [252]. Charakteristisch für α -Helices ist das NOE-Muster, in dem aufeinanderfolgende H_N-Protonen der Aminosäure i und $i+1$ (dNN(i , $i+1$)) zu starken Signalen führen, ebenso wenn NOEs zwischen dem H α _{i} - und dem H_N von Aminosäure $i+3$ (d α N(i , $i+3$)) und $i+4$ (d α N(i , $i+4$)) zu sehen sind und der NOE-Kontakt zwischen H α _{i} und H β $i+3$ (d α β (i , $i+3$)) erscheint. β -Faltblätter lassen sich durch starke NOEs zwischen dem H α der Aminosäure i und dem sequentiell benachbarten Amidproton der Aminosäure $i+1$ (d α N(i , $i+1$)) identifizieren [265]. Mit dem Befehl `seqplot seqplot.ps` in CYANA wird die Postscript-Datei `seqplot.ps` erstellt, welche die sequentiellen NOEs aufgetragen gegen die Aminosäuresequenz enthält. Die Datei, in der die Informationen über die Anzahl der NOEs pro Aminosäure zusammengefasst sind, wurde in CYANA mit dem Befehl `dcostat dco.ps` erstellt.

2.5.4 Erstellen der Winkeldatei mit Hilfe von TALOS

Die Proteinsequenz wurde zusammen mit den zugeordneten Rückgrat- sowie Seitenketten-Resonanzen mit dem Programm CCPN als *project file* exportiert. Aus dieser Datei wurde mit dem Programm TALOS die *winkel.aco*-Datei erstellt. TALOS kombiniert die Informationen aus den zugeordneten chemischen Verschiebungen der H α -, C α -, C β -, CO- und N-Resonanzen mit der Sequenzinformation, um über das Zugreifen auf eine Datenbank mit gelösten Proteinstrukturen eine empirische Vorhersage von phi- und psi-Winkeln für das zu untersuchende Protein zu erstellen. TALOS verfolgt die Idee, dass die chemischen Verschiebungen mit der Sekundärstruktur eines Proteins verknüpft sind. Das Programm teilt die Proteinsequenz in Triplet-Abschnitte auf und vergleicht dabei die chemische Verschiebung (relativ zu Verschiebungen in *random coil*-Regionen) der vorhergehenden und nachfolgenden Aminosäure des Triplets mit chemischen Verschiebungen und Sequenzinformationen von Triplets bekannter Proteinstrukturen, um Vorhersagen der Torsionswinkel für die zentrale Aminosäure des Triplets des zu untersuchenden Proteins zu treffen [38]. TALOS sucht nach den 10 besten Triplet-Treffern. Sind die Vorhersagen einheitlich, teilt TALOS den Φ - oder Ψ -Winkel automatisiert als „gut“ ein. Sind die Vorhersagen nicht einstimmig in allen 10 Strukturen, so können die als „uneindeutig“ deklarierten Winkel manuell als gut klassifiziert werden. Für das Schreiben der *winkel.aco*-Datei werden nur die als „gut“ deklarierten Winkel benutzt [38].

2.5.5 Strukturrechnung mit CYANA

CYANA ist ein Skript-basiertes Programm für eine 3D-Strukturberechnung auf der Grundlage von NMR-Daten. Dabei kombiniert es eine automatisierte Zuordnung der NOESY-Signale mit einem Strukturberechnungs-Algorithmus, welches zu der simulierten Abkühlung des Systems die Torsionswinkel-Dynamik einbezieht. Bei der Torsionswinkel-Dynamik werden anstelle der kartesischen Koordinaten die Torsionswinkel als Freiheitsgrade bei der Molekulardynamik (MD)-Simulation einbezogen [84, 97]. Da Cyana das Protein als eine Reihe von Festkörpern darstellt, werden die Strukturparameter wie Bindungslänge, Bindungswinkel, Chiralität und Planarität während der Rechnung bei deren optimalen Werten festgehalten und somit die Anzahl an Freiheitsgraden 10-fach reduziert. Über die Zielfunktion (Formel 2.8) werden die Strukturen nach der Rechnung evaluiert. Je kleiner der Zielfunktions-Wert, desto besser ist die berechnete Struktur [82].

Formel 2.8 CYANA-Zielfunktion

Beachtet werden obere und untere Grenzen, $b_{\alpha\beta}$, für die Distanzen $d_{\alpha\beta}$ zwischen zwei Atomen α und β und Beschränkungen θ_i in Form erlaubter Intervalle $[\theta_i^{\min}, \theta_i^{\max}]$. l_u , l_l , and l_v stellt ein Atompaar-Set (α, β) mit oberen, unteren oder von der Waals-Distanzbegrenzungen dar. l_a ist das Set an Torsionswinkel-Beschränkungen. w_u , w_l , w_v , und w_a sind die Gewichtungsfaktoren für die verschiedenen constraints. $\Gamma_i = \pi - (\theta_i^{\max} - \theta_i^{\min})/2$ bezeichnet die halbe verbotene Spannweite der Torsionswinkel-Beschränkungen und Δ_i ist die Größe der Verletzung der Torsionswinkel-Beschränkungen [82].

$$V = \sum_{c=u,l,v} w_c \sum_{(\alpha,\beta) \in l_c} (d_{\alpha\beta} - b_{\alpha\beta})^2 + w_a \sum_{i \in l_a} \left[1 - \frac{1}{2} \left(\frac{\Delta_i}{\Gamma_i} \right)^2 \right] \Delta_i^2$$

Mit dem Programm CCPN wurden alle zugeordneten chemischen Verschiebungen in Form einer Liste zusammengefasst. Die Datei verfügte über die Endung *.prot* und diente als Eingangsdatei für die Strukturrechnung. Abstandsinformationen aus einem 2D- oder 3D-NOESY wurden in eine Datei mit der Endung *.peaks* exportiert und ebenfalls als Eingangsdatei benutzt. Zuletzt wurde die Winkeldatei mit der Endung *.aco* zusammen mit den Wasserstoffbrücken-Informationen (*.upl*, *.lol*) mit in die Rechnung einbezogen. Über die *init*-Datei wurden die Sequenz des Proteins, für welches die 3D-Struktur berechnet werden sollte, sowie die *residue library*-Eingangsdatei eingelesen. Da die NMR-Messungen bei pH 6,26 aufgenommen wurden und der Imidazolring des Histidins bei diesem pH deprotoniert vorliegt, wurde die Aminosäuretyp-charakterisierende Datei *speciallib.append* verwendet. Zuletzt wurden in der Datei *CALC.cya* die Struktur-Eingangsdateien sowie Berechnungsparameter zusammengefasst. Die Eingangsdateien sowie die Parameter für die Berechnung der 3D-Struktur der NterFHA-Domäne und der PPlase-Domäne sind in Tabelle 2.24 zu sehen. Für beide Domänen wurden aus 60 berechneten Strukturen, 10 Strukturen mit dem kleinsten Zielfunktionswert in einem Ensemble zusammengefasst.

Tabelle 2.24 Eingesetzte Dateien und Parameter für die Strukturberechnung

	NterFHA-Domäne	PPlase-Domäne
<i>shifts.prot</i>	1844	1265
<i>2D-(3D)-NOESY.peaks</i>	358 (¹⁵ N-2D-NOESY) 3485 (¹⁵ N-3D-NOESY)	3668 (¹⁵ N-2D-NOESY)
<i>winkel.aco</i>	262	206
<i>H-brücke(.upl, .lol)</i>	42	46
<i>Schritte der Torsionswinkel-Dynamik</i>	15000	10000
<i>randomseed</i>	434882	434726

Bei der Strukturrechnung generiert CYANA für jeden der durchlaufenen Zyklen (*7+final*) die Ausgangsdateien mit den Endungen *.pdb*, *.upl*, *.noa* und *.ovw*, in denen die 10 Strukturen (in

pdb-Format) sowie Informationen über eingesetzte NOEs, der Zielfunktion-Wert und Beschränkungs-Verletzungen aufgeführt sind.

2.5.6 CS-Rosetta Strukturmodell

Das Programm CS-Rosetta nutzt die experimentell ermittelten chemischen Verschiebungen, um ein empirisches dreidimensionales Strukturmodell zu generieren. Im ersten Schritt werden basierend auf den chemischen Verschiebungen der H_N , H_α , C_α , C_β , CO und N des zu untersuchenden Proteins Fragmente aus einer Fragmentbibliothek (PDB-Datenbank), von denen die chemischen Verschiebungen und Torsionswinkel (dadurch auch die Sekundärelement-Zugehörigkeit) bekannt sind, selektiert. Anschließend wird das Protein über das ROSETTA Monte Carlo Prinzip mit anschließender Energieminimierung über die selektierten Fragmente modelliert. CS-ROSETTA erstellt dabei 3000-40000 Modellstrukturen. Neben der Berechnung der Energie über alle Atome, stellt CS-Rosetta eine Vorhersage der chemischen Verschiebungen für die berechneten Strukturen auf und vergleicht diese mit den experimentell ermittelten Daten. Der berechnete Rosetta-Wert für die Energie über alle Atome wird dann gegen den C_α -RMSD-Wert der Struktur mit dem geringsten Energiewert aufgetragen [220, 221]. Ausgegeben werden 10 Strukturen, die am wenigsten von der Struktur mit der geringsten Energie über alle Atome abweichen.

Das Strukturmodell des *TbPar42*-Linkers (in NMR-Puffer mit 2 mM DTT) wurde über den CS-Rosetta Webserver (<https://csrosetta.bmr.b.wisc.edu/csrosetta>) generiert. Die zugeordneten H_N , C_α , C_β , CO und N chemischen Verschiebungen des *TbPar42*-Linkers wurden über CCPN in TALOS-Format exportiert. Es wurden 3000 mögliche Strukturen generiert, in denen die flexiblen Regionen außer bei der Energieminimierung beibehalten wurden (Yang Shen Methode).

3 Ergebnisse

Das 42 kDa große Parvulin aus *T. brucei* ist ein Mehrdomänenprotein, bestehend aus einer N-terminalen FHA-Domäne, einem ca. 100 Aminosäuren langen Linker, sowie der C-terminal gelegenen PPLase-Domäne. Für die strukturelle Charakterisierung von *TbPar42* mittels NMR-Spektroskopie war es erforderlich, das Protein ^{13}C - und ^{15}N -isotopenmarkiert in *E. coli* rekombinant herzustellen. Im ersten Schritt wurde das codierende Gen für *TbPar42* in einen Expressionsvektor kloniert. Darauf folgte die Reinigung des Proteins über eine Affinitätschromatographie mit anschließender Gelfiltration.

3.1 Untersuchung des vollständigen *TbPar42*

3.1.1 Klonierung von *TbPar42*-VL

Das synthetisch hergestellte Gen (Kap. 7.1), welches für das vollständige, 383 Aminosäuren lange *TbPar42*-Protein (*TbPar42*-VL) codiert, wurde mittels PCR amplifiziert (siehe Abb. 3.1 A) und über *Apal*/*XhoI* in den laborintern modifizierten Vektor pET41b(+) kloniert. Abbildung 3.1 B zeigt das Ergebnis der Kontrollrestriktion nach erfolgreicher Ligation (Banden 1 und 7).

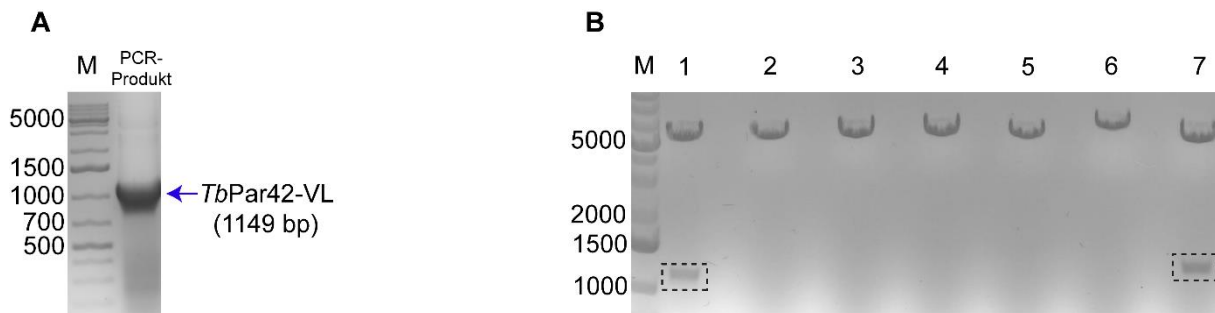


Abbildung 3.1 Klonierung von *TbPar42*-VL

A: Agarosegel nach Amplifizierung des *TbPar42*-VL mittels PCR. Spur M entspricht dem Marker. Die Bande auf der Höhe von 1000 bp passt zu der zu erwartenden Größe des *TbPar42*-VL-Inserts von 1149 bp. **B:** 7 Klone wurden einer Kontrollrestriktion mit *Apal*/*XhoI* unterzogen. Klon 1 und Klon 7 weisen eine Bande auf der Höhe des *TbPar42*-Inserts auf (gestrichelter Kasten). Klon 7 erwies sich nach der Sequenzierung als richtig.

Nach Bestätigung der korrekten Klonierung durch Sequenzierung, wurde die Plasmid-DNA in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3)T1r transformiert.

3.1.2 Expression und Reinigung von *TbPar42*-VL

Um für die nachfolgenden strukturellen und funktionellen Untersuchungen *TbPar42*-VL vorliegen zu haben, wurde das Protein zunächst als GST-Protein in *E. coli* exprimiert und anschließend über GST-Affinitätschromatographie gereinigt.

Das Chromatogramm zeigt ein klares Elutionssignal und im SDS-Gel ist eine Bande, die der Größe von GST-*TbPar42-VL* (70 kDa) entspricht, zu sehen (Abbildung 3.2 A).

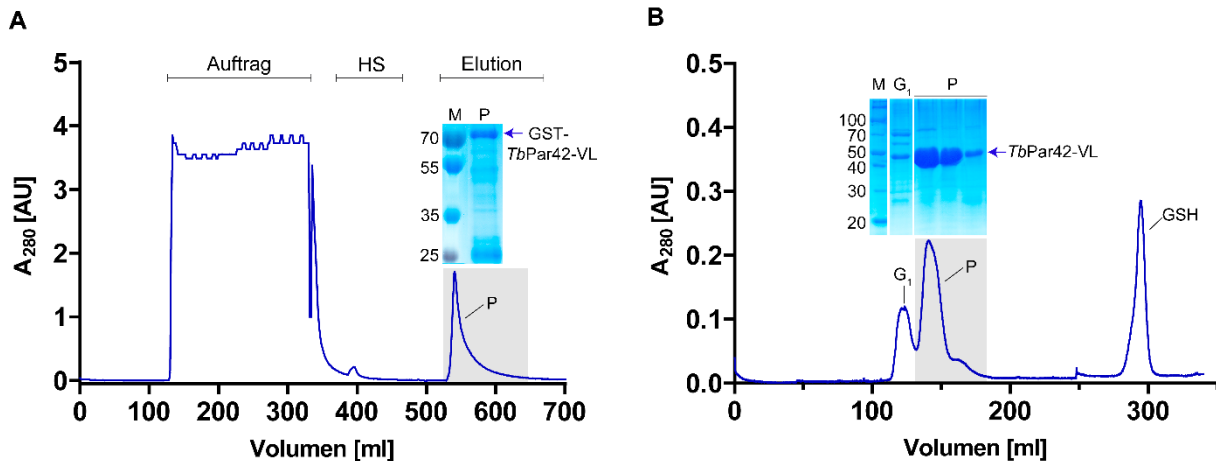


Abbildung 3.2 Reinigung des *TbPar42-VL*-Proteins

A: Chromatogramm der GST-Affinitätschromatographie mit dem Fusionsprotein. Nachdem der Überstand auf die Säule aufgetragen wurde, wurde Hochsalz-Puffer (HS) über die Säule gegeben, um unspezifische Bindungen zu lösen. Das Signal von 525 ml bis 650 ml zeigt die Elution des Fusionsproteins. Im SDS-Gel ist bei 70 kDa eine Bande zu sehen, die der erwartenden Größe des Fusionsproteins entspricht. **B:** Gelfiltrationschromatogramm mit dazugehöriger SDS-Page Analyse. Die Fraktion G_1 vom ersten Signal zeigt zwar eine Bande, die der Größe des 42 kDa großen *TbPar42-VL*-Proteins entspricht, jedoch treten Verunreinigungen bei 60 und 70 kDa im auf. Die Fraktionen des zweiten Peaks (P) zeigen deutliche Banden bei 42 kDa und bestätigen die Reinheit des Proteins. Das letzte Signal im Chromatogramm entspricht Glutathion (307 Da), welches im Gel nicht zu sehen ist.

Das GST-Fusionsprotein wurde mit der PreScission-Protease geschnitten. Anschließend erfolgte eine Gelfiltration mit nachgeschalteter GSH-Säule (Abbildung 3.3 B). Das erste Signal im Chromatogramm lässt sich, zusammen mit Verunreinigungen bei 60 und 70 kDa, *TbPar42-VL* zuordnen. Die Verunreinigungen lassen sich durch das nicht ausreichend geschnittene GST-Fusionsprotein oder ein *E. coli*-eigenes Chaperon erklären. Das zweite Chromatogramm-Signal zeigt im SDS-Gel eine starke Bande bei 42 kDa. Die Fraktionen dieses Signals wurden konzentriert, in salzarmen Puffer überführt und aliquotiert. Dass es sich bei der Proteinprobe um reines *TbPar42-VL* handelt, wurde mit einer MALDI-TOF-Analyse bestätigt (Abbildung 3.3). Das letzte Signal gehört zu Glutathion (GSH), welches aufgrund der Größe von 307 Da im SDS Gel nicht zu sehen ist.

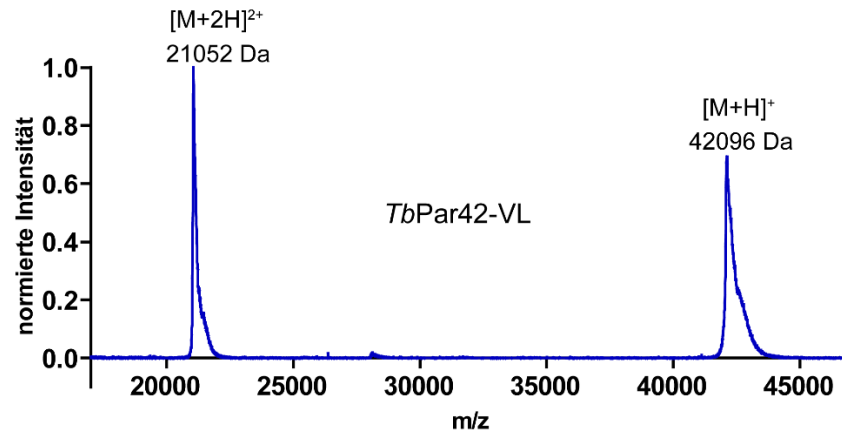


Abbildung 3.3 MALDI-TOF-Massenspektrum von *TbPar42-VL*

Das rechte Signal entspricht der erwarteten Masse des *TbPar42-VL* und das linke Signal entspricht 2-fach geladenem *TbPar42-VL*.

Nachdem die Expression und Reinigung von *TbPar42* in Vollmedium etabliert wurden, sollte isotopenangereichertes *TbPar42* im Minimalmedium (M9-Medium) hergestellt werden. Für die Produktion von $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -*TbPar42-VL*-Proben wurden die Expressionsparameter aus dem zuvor beschriebenen Reinigungsprotokoll übernommen. Das markierte Protein sollte für NMR-spektroskopische Untersuchungen verwendet werden (Kap. 3.1.4).

3.1.3 Analytische Gelfiltration von *TbPar42-VL*

Um eine mögliche Multimerisierung des Proteins zu untersuchen, wurde eine analytische Gelfiltration durchgeführt. In der Sequenz von *TbPar42* sind mehrere Cysteine zu finden, die unter Ausbildung von Disulfidbrücken zur Entstehung von artifiziellen Multimeren führen könnten. Aus diesem Grund wurde die analytische Gelfiltration erst im reduktionsmittelfreien Gelfiltrationspuffer (50 mM Kaliumphosphat, 150 mM Kaliumchlorid, pH 6,26) durchgeführt. Später wurde das Experiment in einem Gelfiltrationspuffer, welcher zusätzlich 2 mM DTT enthielt, wiederholt. Die beiden Auswertungen wurden anschließend miteinander verglichen. Um auf das Molekulargewicht des Proteins schließen zu können, wurde die analytische Gelfiltrationssäule zunächst kalibriert (Abbildung 3.4 A, B).

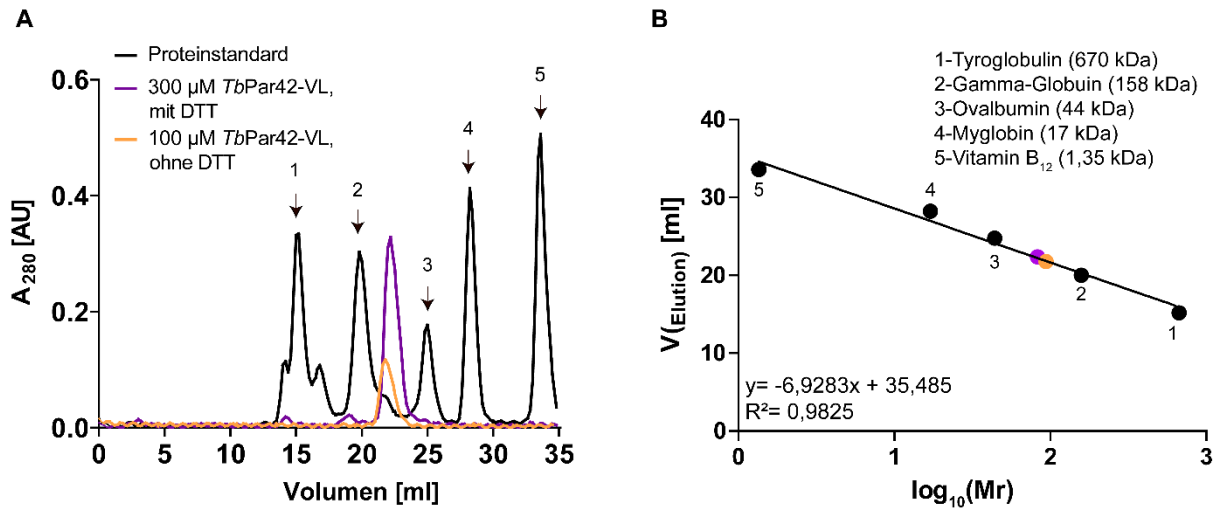


Abbildung 3.4 Analytische Gelfiltration von *TbPar42-VL* in An- und Abwesenheit von Reduktionsmittel

A: Chromatogramm mit dem Kalibrierungslauf (schwarz), in Lila der Lauf mit 300 µM *TbPar42-VL* im NMR-Puffer mit DTT und in Orange der Lauf mit 100 µM *TbPar42-VL* im reduktionsmittelfreien Puffer. Bei beiden Läufen wird das *TbPar42-VL*-Protein zwischen 22 und 24 ml eluiert. Signale 1-5 entsprechen den Proteinen des Standards, welche in B aufgeführt sind. **B:** Das Auftragen der Elutionsvolumina $V_{(elution)}$ gegen den dekadischen Logarithmus des jeweiligen Molekulargewichts ($\log_{10}(Mr)$) der Standardproteine erlaubt das Erstellen der Regressionsgeraden. Der lila- und der orange-farbene Punkt gehören zum *TbPar42-VL*. Für die Läufe wurde die *Superdex 200 Increase*-Säule verwendet.

TbPar42 zeigt in beiden Puffern das gleiche Elutionsprofil. Konzentrationsunabhängig ist im Chromatogramm bei einem Elutionsvolumen von ca. 22 ml das Signalmaximum vom *TbPar42-VL*-Protein zu sehen (Abbildung 3.4 A), was für *TbPar42* mit Reduktionsmittel im Puffer einem Molekulargewicht von 82,7 kDa und ohne DTT einer Molekülmasse von 93,83 kDa entspricht. In beiden Fällen ist das kalkulierte Molekulargewicht etwas höher, als für ein Monomer zu erwarten wäre. Dennoch sprechen die Daten eindeutig eher für ein *TbPar42*-Monomer als für ein Dimer.

3.1.4 NMR-spektroskopische Untersuchung von *TbPar42-VL*

Eines der grundlegenden Spektren, notwendig für eine Protein-Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie, ist das $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum. Dieses zweidimensionale Spektrum zeigt die direkte Bindung der ^1H - und ^{15}N -Kerne. Die x-Achse im $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum stellt die ^1H -chemische Verschiebung dar und auf der y-Achse ist die ^{15}N -Verschiebung zu sehen. Da Aminosäuren im Protein über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind, ist für jede Aminosäure bis auf Prolin (kein Amidproton vorhanden) und die N-terminale Aminosäure ein Signal im HSQC-Spektrum zu sehen. Für die Seitenketten Glutamin und Asparagin sind zudem weitere Signale zu sehen. Das ϵ -NH von Tryptophan ist charakteristischerweise bei etwa 10 ppm/130 ppm im Spektrum als zusätzliches Signal zu erkennen. Das HSQC-Spektrum liefert nicht nur Informationen über das Proteinrückrat, sondern auch über die Sekundärstrukturverteilung im Protein. Eine weite Dispersion der Signale deutet auf ein

strukturiertes Protein hin, wohingegen eine starke Akkumulation im mittleren Spektrenbereich (7-8 ppm; *random-coil* Bereich) auf unstrukturierte Bereiche hinweist. Abbildung 3.5 zeigt das $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von *TbPar42*-VL. Die schwarzen Signale im HSQC-Spektrum stammen vom vollständigen *TbPar42*. Es sind nur ein Drittel aller zu erwartenden Signale zu sehen. Die sichtbaren Signale sind zudem überlagert und treten vorwiegend im *random coil*-Bereich auf.

Der Signalverlust kann mit den Relaxationseigenschaften der Kerne erklärt werden. In Lösung bewegen sich große Proteine langsam. Dieses hat zur Folge, dass die Rotationskorrelationszeit des Proteins steigt. Darüber hinaus sorgen bei großem Molekulargewicht die hohe Anzahl an H-Kernen im Protein für eine schnellere Relaxation. Beides bewirkt, dass die sogenannte transversale Relaxationszeit (T_2) kürzer wird. Letztere ist ein Parameter, der sich indirekt proportional auf die Linienbreite von Signalen auswirkt. Ein kurzer T_2 -Wert geht daher mit einem breiter werdenden Signal einher. Bei großen Molekulargewichten über 25 kDa werden die Resonanzlinien so breit, dass immer mehr Signale nicht mehr im Spektrum sichtbar sind [187]. Um die transversale Relaxationszeit zu erhöhen, werden bei großen Proteinen kovalent gebundene H-Atome der Seitenketten gegen Deuteronen ausgetauscht (Deuterierung). Durch das Ersetzen des Protons mit einem Deuteron, welches ein 6,5-fach kleineres gyromagnetisches Verhältnis als ^1H aufweist, wird die Mitwirkung der dipolaren Relaxation der direkt gebundenen $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Kerne und der umliegenden ^1H -Kerne unterbrochen [17, 29]. Da das Protein zusätzlich ^{13}C und ^{15}N markiert ist, wird von einer Dreifachmarkierung gesprochen. Bei diesem Verfahren bleiben austauschbare Protonen, wie die Amidprotonen in wässriger Lösung sichtbar. Mit Hilfe der *transverse relaxation-optimized spectroscopy* (TROSY) [188], kann man nun bei hohen Feldstärken HSQC-ähnliche Spektren aufnehmen, die für große Proteine möglichst schmale Linienbreiten ergeben und so die Signalauflösung erheblich verbessern.

Für die Aufnahme eines TROSY-Spektrums wurde das vollständige *TbPar42* im isotoopenmarkierten M9- D_2O -Medium mit deuteriertem Wasser (D_2O) exprimiert. Die Zellen benötigten 40 h bei 30 °C für die Produktion des GST-*TbPa42*-VL-Fusionsproteins. Die Proteinreinigung erfolgte nach gleichem Prinzip (Puffer mit H_2O) wie die Reinigung des Proteins aus LB-Vollmedium. Das TROSY-Spektrum vom *TbPar42*-VL ist in Abbildung 3.5 in Grau dargestellt.

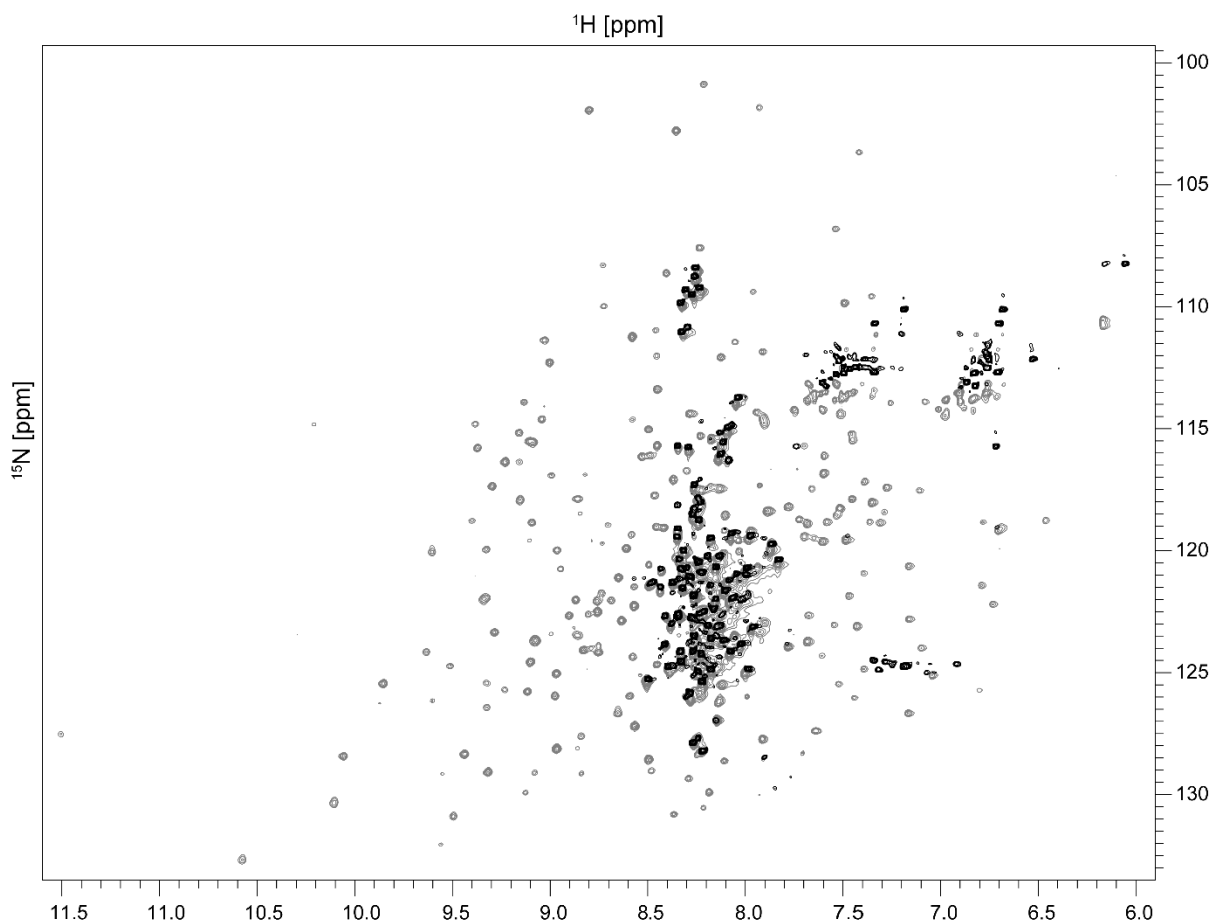


Abbildung 3.5 $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC- und TROSY-HSQC-Spektrum des *TbPar42*-VL

Überlagerung des ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrums (schwarz) mit dem TROSY-HSQC-Spektrum des *TbPar42*-VL in grau. Im HSQC-Spektrum sind nur Signale des *random coil*-Bereiches des Proteins zu sehen, wohingegen das TROSY-HSQC eine weite Dispersion und eine bessere Auflösung der einzelnen Signale zeigt.

Im Vergleich zum $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum (schwarz) sind im TROSY-Spektrum die Signale besser aufgelöst so, dass fast alle zu erwartenden Signale sichtbar waren. Zudem zeigt die Signalverteilung, dass das vollständige Protein gefaltet ist. Trotzdem ist das vollständige *TbPar42* wegen der Größe, der Signalüberlagerungen im mittleren Spektrenbereich und der geringen Stabilität des deuterierten Proteins für längere NMR-Untersuchungen nur bedingt geeignet. Da sich im *TbPar42* mindestens zwei strukturierte Domänen befinden (PPlase- und FHA-Domäne), sollten diese im Folgenden einzeln untersucht werden.

3.1.5 Generierung einzelner Konstrukte aus *TbPar42*-VL

Da das vollständige *TbPar42* aufgrund seiner Größe (42 kDa) wenig NMR-praktikabel ist, wurde das Protein in seine einzelnen Domänen unterteilt, welche separat strukturell charakterisiert werden sollten. Um über die Länge der Konstrukte sowie über den Sequenz-Start- bzw. Sequenz-Endpunkt entscheiden zu können, wurde vom kompletten Protein eine Sekundärstrukturvorhersage durchgeführt. (Abbildung 3.6).

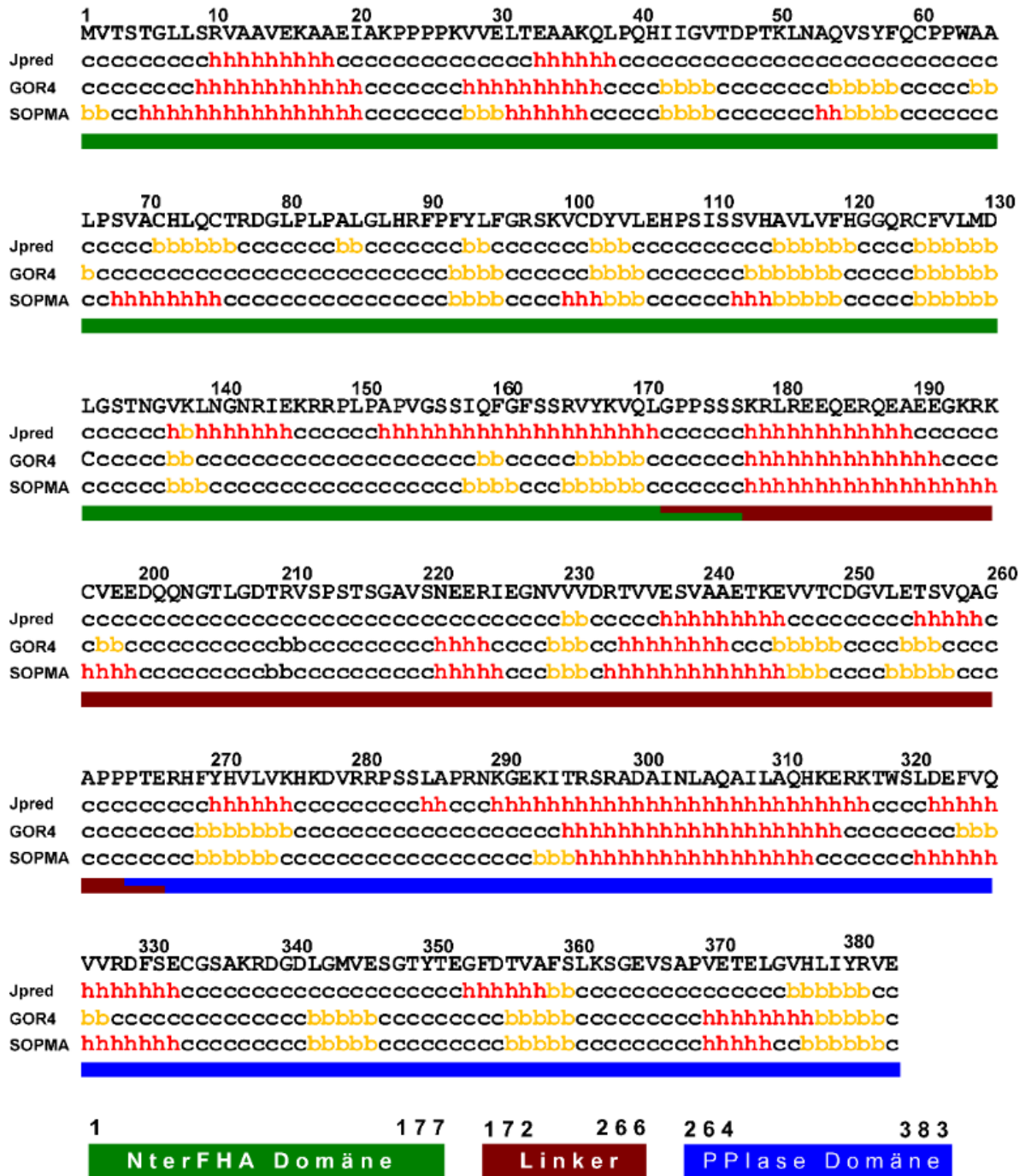


Abbildung 3.6 Sekundärstrukturvorhersage des *TbPar42*-Proteins

In der ersten Zeile ist die Sequenz des *TbPar42* zu sehen. Darunter folgt die Sekundärstrukturvorhersage der Programme Jpred, GOR4 und SOPMA. h steht für Helix, b für Faltblatt und c für *coil* (unstrukturiert). Der grüne Balken unter den Vorhersagen kennzeichnet die klonierte NterFHA-Domäne, der dunkelrote Balken das klonierte Linker-Konstrukt und der blaue Balken den Abschnitt der klonierten PPIase-Domäne.

Alle Vorhersage-Algorithmen (Jpred [50], GOR4 [71, 72] und SOPMA [74]) zeigen eine ähnliche Verteilung der Sekundärstrukturelemente. Für das Design der Fragmente wurde darauf geachtet, dass diese nicht innerhalb einer Helix- oder Faltblatt-Struktur anfangen oder abbrechen. Dieses könnte eine strukturelle und/oder funktionelle Einheit zerstören und zudem

bei der Proteinreinigung von entscheidender Bedeutung sein. Demzufolge wurden drei Konstrukte generiert. Das Erste hat eine Länge von 120 Aminosäuren und entspricht der PPlase-Domäne. Der 95 Aminosäuren lange Sequenzabschnitt zwischen der FHA- und PPlase-Domäne stellt den Linker dar, welcher ebenfalls als eigenständiges Konstrukt untersucht werden sollte. Da FHA-Domänen von 100-180 Aminosäuren lang sind [88] und über terminale Anhänge verfügen [53, 54], bestand das letztes 177 Aminosäuren lange Konstrukt aus der FHA-Domäne mit fusionierten N-Terminus (NterFHA-Domäne).

3.2 Klonierung der einzelnen Konstrukte

Die einzelnen Konstrukte wurden, wie auch das vollständige Protein, in den pET41b(+)-Vektor mit PreScission-Schnittstelle und GST-Tag kloniert. Als Template für die PCR wurde *TbPar42-VL* im Originalvektor genutzt. Die PCR-Produkte sind in Abbildung 3.7 A zu sehen.

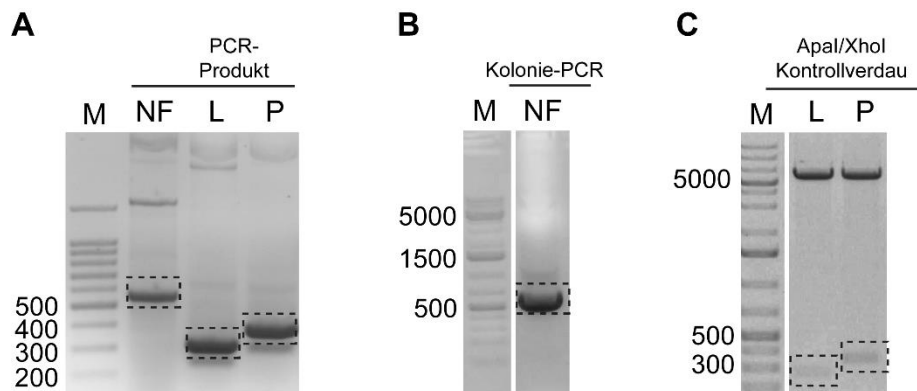


Abbildung 3.7 Klonierung der einzelnen Konstrukte

A: Agarosegel links zeigt die PCR-Produkte (gestrichelte Kästen) der NterFHA-Domäne (NF:531 bp), des Linkers (L:285 bp) und der PPlase-Domäne (P:360 bp). **B:** Der Erfolg der Klonierung der NterFHA-Domäne wurde mit einer Kolonie-PCR überprüft. Zu sehen ist das PCR-Produkt (NF) bei 531 bp. **C:** Für den Linker und die PPlase-Domäne wurden positive Klone über eine Kontrollrestriktion mit Apal/XhoI ermittelt. Bei 6000 bp ist der geschnittene Vektor zu sehen. Beim Linker zeigte die Restriktion eine Bande bei 285 bp (L), welche zu der erwarteten Insertgröße passt. Bei 360 bp ist das Insert der PPlase-Domäne zu sehen (P).

Für alle Konstrukte war eine Bande auf der zu erwartenden Höhe zu sehen (NterFHA-Domäne: 531 bp, Linker: 285 bp und PPlase-Domäne: 360 bp). Die Richtigkeit der Klone wurde für die NterFHA Domäne mit einer Kolonie-PCR überprüft (Abbildung 3.7 B), wohingegen für den Linker und die PPlase-Domäne ein Kontrollverdau mit Apal/XhoI durchgeführt wurde (Abbildung 3.7 C). Alle drei Konstrukte wurden abschließend mittels einer Sequenzierung überprüft.

3.3 Untersuchung der PPlase-Domäne

3.3.1 Vorarbeiten zur strukturellen Analyse der PPlase-Domäne

Ein Expressionstest in LB-Medium zeigte, dass die optimalen Bedingungen für die Expression der PPlase-Domäne als GST-Fusionsprotein in *E. coli* über Nacht bei 25 °C liegen.

Nachdem die Zellen sonifiziert, anschließend zentrifugiert und der Überstand mit darin enthaltendem GST-Fusionsprotein abgenommen und steril filtriert wurde, konnte mit der GST-Affinitätschromatographie fortgefahren werden. Das Abtrennen des GST-Tags erfolgte durch Zugabe der PreScission Protease und anschließender Gelfiltration. Wie Abbildung 3.8 A zeigt, konnte die *TbPar42*-PPlase-Domäne erfolgreich gereinigt werden.

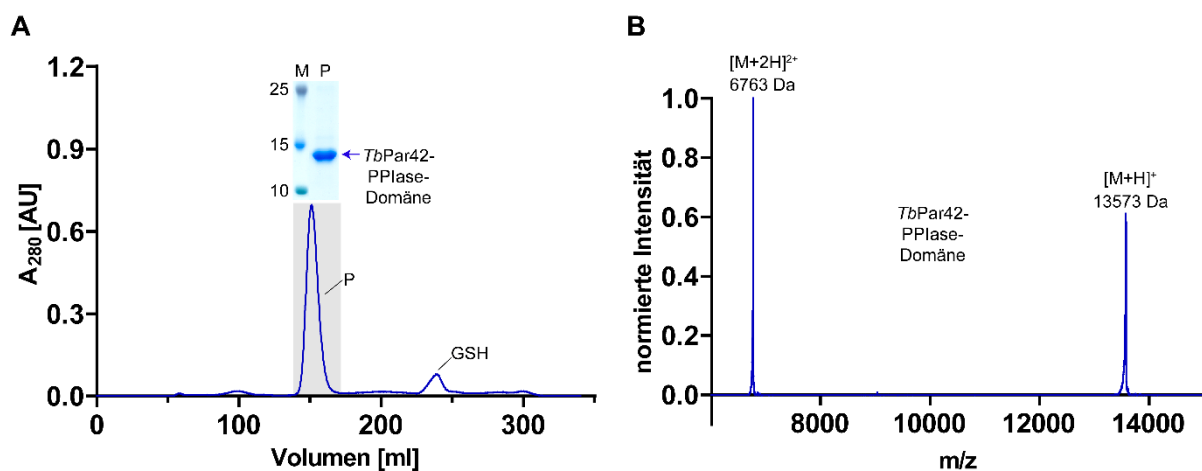


Abbildung 3.8 Gelfiltrationslauf und MALDI-TOF-Massenspektrum der PPlase-Domäne

A: Chromatogramm der Gelfiltration der PPlase-Domäne. Es ist ein Signal bei dem Elutionsvolumen zwischen 145 und 170 ml zu erkennen. Im SDS Gel war für die Fraktionen (P) eine Bande bei 14 kDa zu sehen, die der erwartenden Größe der PPlase-Domäne entspricht. **B:** Das Massenspektrum zeigt im untersuchten Bereich zwei Signale. Das rechte Signal entspricht der erwarteten Masse der *TbPar42*-PPlase-Domäne und das linke Signal entspricht der 2-fach geladenen *TbPar42*-PPlase-Domäne.

Zudem bestätigte ein anschließendes MALDI-TOF Spektrum (Abbildung 3.8 B) die Reinheit der Proteinprobe sowie die richtige Größe der *TbPar42*-PPlase-Domäne.

3.3.2 Untersuchung einer möglichen Multimerisierung der PPlase-Domäne

Wie das vollständige *TbPar42*-Protein, wurde auch die PPlase-Domäne über eine analytische Gelfiltration auf eine mögliche Multimerisierung untersucht. Die PPlase-Domäne zeigte das Signalmaximum bei einem Elutionsvolumen von 20,4 ml (rotes Signal in Abbildung 3.9 A). Das damit berechnete Molekulargewicht beträgt 8,9 kDa. Dieses weicht nur um 4 kDa von dem massenspektroskopisch ermittelten Wert ab. Daher kann geschlussfolgert werden, dass die PPlase-Domäne in 50 mM Kaliumphosphat, 150 mM Kaliumchlorid, pH 6,26 als Monomer vorliegt.

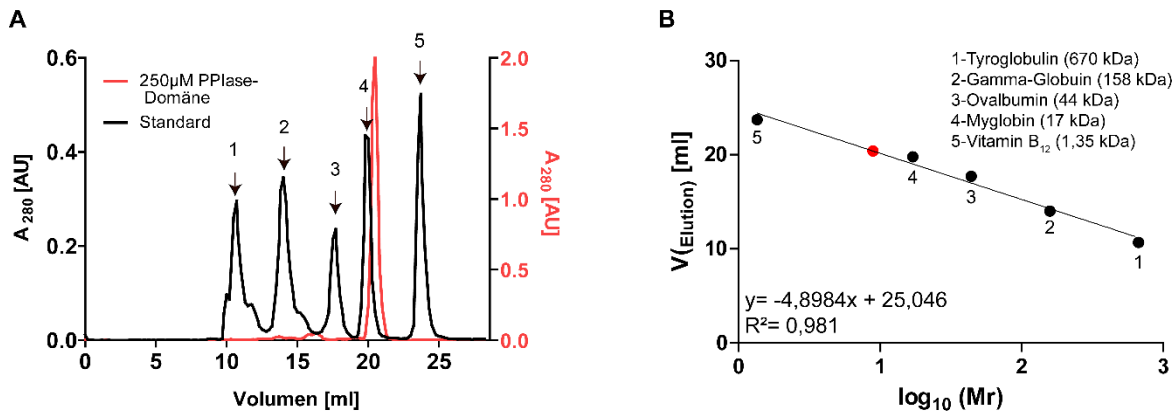


Abbildung 3.9 Analytische Gelfiltration der PPlase-Domäne

A: Kalibrierungslauf (schwarz) und der Lauf mit 250 µM PPlase-Domäne (rot). Das Signalmaximum liegt bei 20,4 ml. **B:** Die Regressionsgerade, erstellt mit den Elutionsvolumina der Standardproteine 1-5 und der zugehörigen dekadischen Logarithmen der Molekulargewichte ($\log_{10}(\text{Mr})$), ist rechts zu sehen. Das berechnete Molekulargewicht der PPlase-Domäne betrug 8,9 kDa, was auf eine monomere Form der PPlase hindeutet. Für die Läufe wurde die *Superdex 200 Increase*-Säule verwendet.

3.4 Strukturelle Analyse der PPlase-Domäne

Nachdem Expression und Reinigung der *TbPar42*-PPlase Domäne etabliert wurden, wurden für NMR-spektroskopische Analysen, analog zur Expression und Reinigung aus LB-Medium, isotopenmarkierte Proben vorbereitet. In einem ersten Schritt sollte die 3D-Struktur der PPlase-Domäne ermittelt werden, anschließend erfolgt eine dynamische Charakterisierung.

3.4.1 Sequentielle Zuordnung des Proteinerückgrats und der aliphatischen Seitenketten der PPlase-Domäne von *TbPar42*

Der erste Schritt einer Strukturaufklärung mittels NMR ist die Zuordnung der Rückgrat-Resonanzen (*backbone assignment*). Da sich diese größtenteils im $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum widerspiegeln, dient das zweidimensionale Spektrum als Grundlage zur Strukturermittlung. Ziel ist es, jedem Signal im $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC eine Aminosäure in der Primärsequenz des Proteins zuzuweisen.

Die sequentielle Verknüpfung, auch *chain tracing* genannt, erfolgte mit den dreidimensionalen Spektren HNCACB und CBCACONH. Zu Beginn wird jedem Signal im $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum eine ^1H - und eine ^{15}N -Koordinate zugeschrieben. Da die 3D-Spektren das $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum als Grundgerüst haben, aber in der dritten Dimension durch die ^{13}C -Resonanzen der Kohlenstoffatome erweitert sind, ist es über die $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Koordinaten möglich, sich durch die Spektren zu navigieren und Informationen über die ^{13}C -chemischen Verschiebungen zu erlangen. Zur besseren Veranschaulichung werden 3D-Spektren in Streifen dargestellt. Im HNCACB-Spektrum sind pro Streifen vier Signale zu sehen (Abbildung 3.10). Die zwei stärkeren gehören zu der $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ -Resonanz der eigenen Aminosäure (i) und die zwei schwächeren zu den $\text{C}\alpha$ und $\text{C}\beta$ chemischen Verschiebungen der vorangehenden

Aminosäure (i-1). Die $C\alpha$ -Signale sind im HNCACB-Spektrum nach der Datenprozessierung durch die entgegengesetzte Phase von den $C\beta$ -Signalen zu unterscheiden. Durch die Überlagerung beider Spektren sind die Signale der Aminosäure i als alleinstehende Signale zu erkennen. Die sequentielle Zuordnung kann Richtung C- oder N-Terminus erfolgen. Geht man von den schwächer sichtbaren i-1-Signalen an der Position der Aminosäure i aus und sucht in dem HNCACB-Spektrum in der ^{13}C -Ebene nach Signalen auf gleicher ^{13}C -Frequenz, so gelangt man zur benachbarten Aminosäure i-1 und deren $H_N N_H$ -Verschiebung.

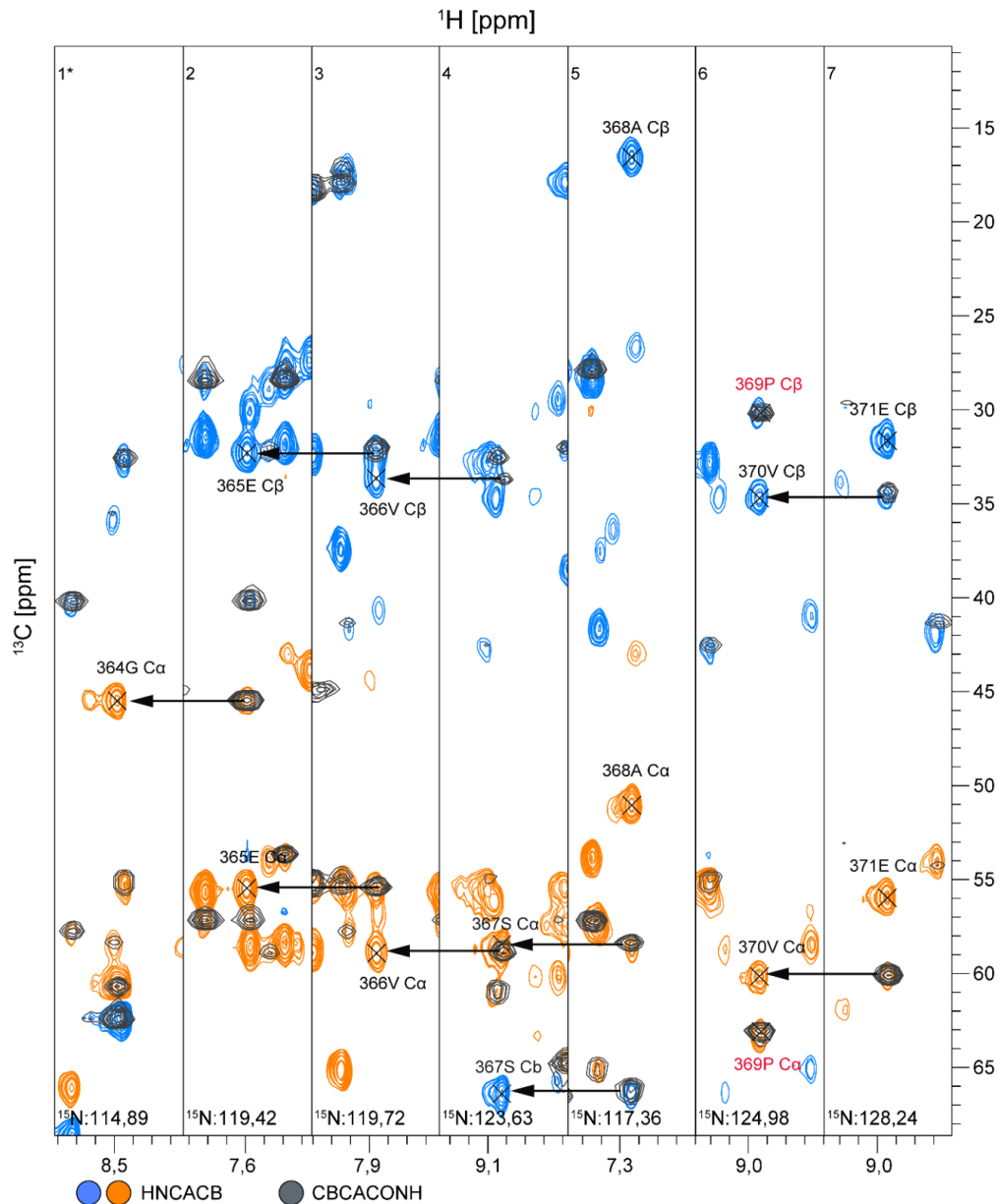


Abbildung 3.10 Sequentielle Zuordnung des Sequenzabschnittes (364G-371E)

Im HNCACB-Spektrum sind pro $H_N N_H$ -Steifen die Signale der Aminosäure i und i-1 zu sehen. Die $C\alpha$ -Resonanzen sind in Orange und die $C\beta$ -Resonanzen in Blau dargestellt. Im CBCACONH sind nur die Signale der Aminosäure i-1 (grau) im $H_N N_H$ -Streifen zu sehen. Eine Überlagerung der Spektren ermöglicht die sequentielle Verknüpfung. Die Prolin-Resonanzen sind rot beschriftet, da das Prolin keinen eigenen $H_N N_H$ -Streifen hat und indirekt über das CBCACONH zugeordnet wird.

Auf diese Weise ist es möglich, Aminosäuren sequentiell miteinander zu verknüpfen. Exemplarisch dargestellt ist dieses in Abbildung 3.10 für 8 Reste der PPlase-Domäne (371E-364G). Auf der $H_N N_H$ -chemischen Verschiebung von Glutamat 371 (128,24 ppm) sind das eigene C_α (56 ppm)- und C_β (31,5 ppm)-Signal klar zu erkennen (rechter Streifen in Abbildung 3.10). Die überlagerten Signale stellen Signale der Aminosäure $i-1$ (in Grau) dar. Ausgehend von den $i-1$ -Signalen von 371E wurde im HNCACB-Spektrum nach Signalen gesucht, die exakt auf dieser Höhe die eigenen C_α/C_β -Signale aufwiesen. Als einzige Übereinstimmung kam das Valin 370 in Frage. Nachdem zu 370V die eigenen C_α/C_β -Signale zugeordnet wurden, wurde von den schwächeren Signalen erneut eine Suche ausgeführt. In dem $H_N N_H$ -Streifen von 370V sind das C_α und C_β von Prolin 369 zu sehen (rot beschriftet in Abbildung 3.10). Prolin hat aufgrund des fehlenden Amidprotons keinen eigenen $H_N N_H$ -Streifen und wird indirekt über das CBCACONH zugeordnet. Bei einem Prolin bricht somit die sequentielle Zuordnung ab und es muss ein neuer Startpunkt gesucht werden. Aufgrund des charakteristischen C_β von Alanin konnte Alanin 368 identifiziert werden. Von dieser Aminosäure wurde die sequentielle Zuordnung Richtung N-Terminus erneut begonnen.

Für Aminosäuren, deren Signale wegen zu schwacher Intensität oder Signalüberlagerungen nicht eindeutig zuordenbar waren (z. B. C_α von Serin 367 in Abbildung 3.10) wurde die sequentielle Zuordnung mit den komplementären Spektren HNCA und HNCOCA vervollständigt. Beruhend auf demselben Prinzip wie bei dem zuvor erwähnten Spektrenpaar sind Signale für die eigene und die benachbarte Aminosäure zu sehen. In den Spektren stehen nur die Informationen für die C_α -Resonanzen der Aminosäuren i und $i-1$ zu Verfügung. Die Signale sind oft stärker und definierter als in dem HNCACB-Spektrum, was eine Unterscheidung des Signals möglich macht. Abbildung 3.11 A zeigt erneut eine sequentielle Zuordnung des 8 Aminosäuren langen Fragments aus der PPlase-Domäne, jedoch nur mit den C_α -Resonanzen. Im Unterschied zum HNCACB ist bei Serin 367 das eigene C_α klar vom $i-1$ - C_α zu erkennen (Streifen 4 in Abbildung 3.11 A).

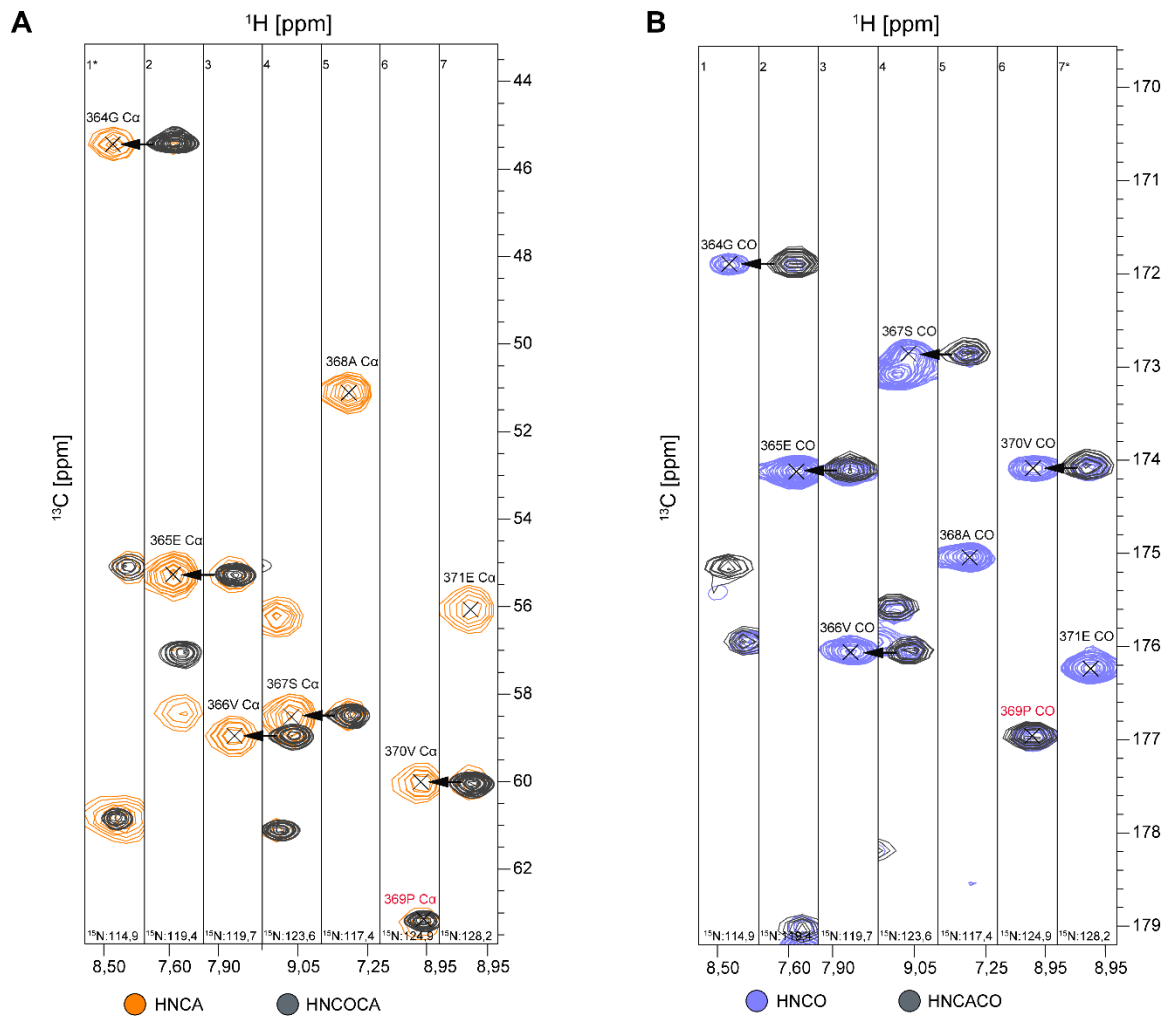


Abbildung 3.11 Sequentielle Zuordnung mit dem Spektrypaar HNCA/HNCOCA und HNCO/HNCACO

A: Überlagerung der Spektren HNCA und HNCOCA. Im HNCA (orange) sind die $\text{C}\alpha$ -Resonanzen der Aminosäuren i und $i-1$ zu sehen. Im HNCOCA (grau) sind nur die $\text{C}\alpha$ -Signale der Aminosäure $i-1$ zu sehen. In Rot beschriftet ist das Prolin $\text{C}\alpha$, da Prolin kein Amidproton besitzt und indirekt nur über das HNCACO zugeordnet wird. **B:** Überlagertes HNCO (lila) mit dem HNCACO Spektrum (grau). Im HNCO sind das CO der Aminosäuren i und $i-1$ zu sehen, wohingegen im HNCACO nur die Signale der vorhergehenden Aminosäure erscheinen. Eine Überlagerung der komplementären Spektren ermöglicht die sequentielle Zuordnung. Das Prolin-CO ist rot gekennzeichnet, da Prolin nur im HNCACO zu sehen ist.

Um die sequentielle Zuordnung zu überprüfen sowie eventuell fehlende Signale zu ergänzen, wurde das *chain tracing* mit den HNCO/HNCACO-Spektren wiederholt. Bei den hier zu verknüpfenden chemischen Verschiebungen handelt es sich um die Resonanzen der COs von Aminosäure i und $i-1$ (Abbildung 3.11 B).

Die Vollständigkeit der Rückgratzuordnung der PPlase-Domäne betrug 100%. In Abbildung 3.12 ist das zugeordnete $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum der PPlase-Domäne zu sehen.

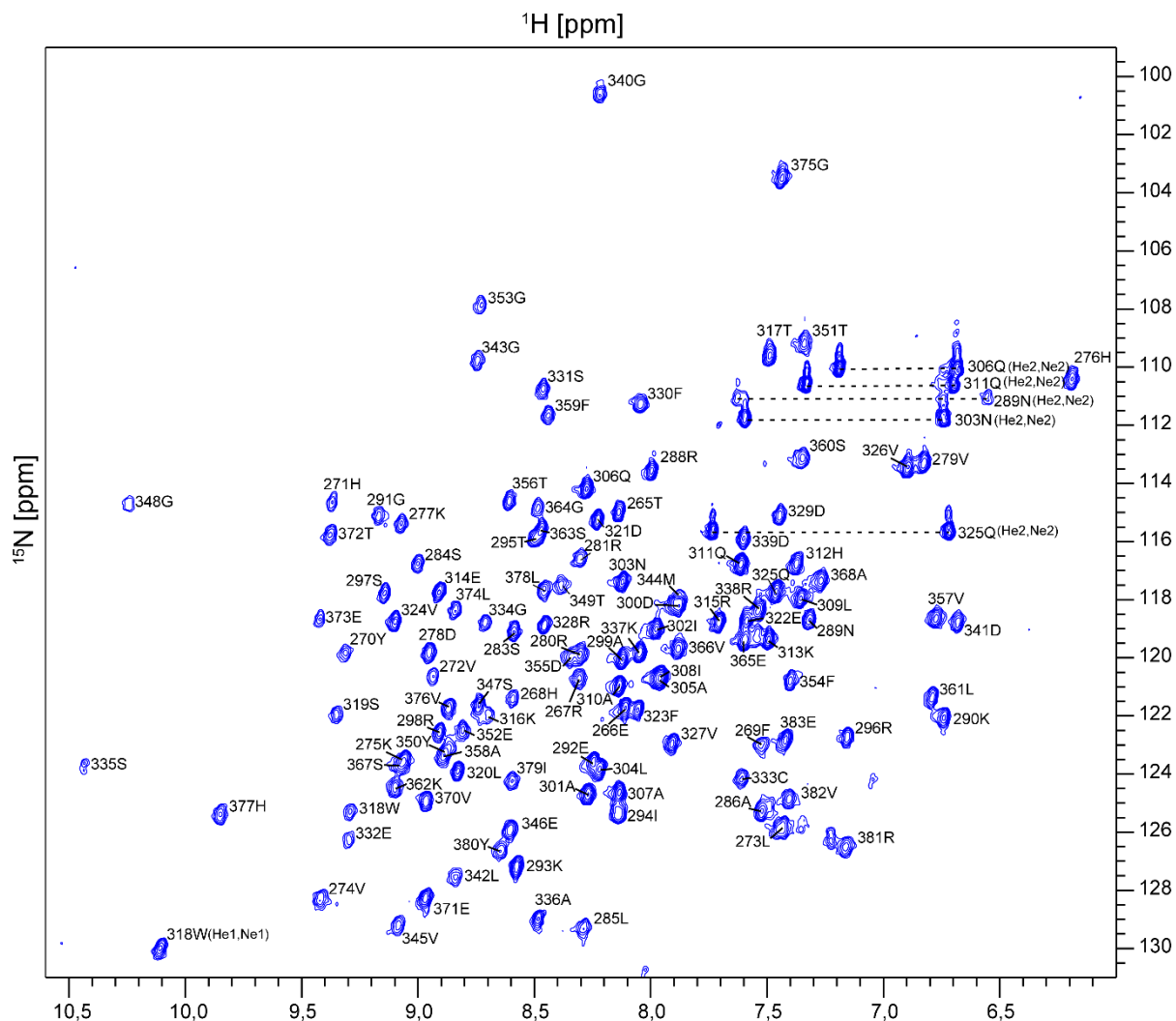


Abbildung 3.12 Vollständig zugeordnetes $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum der PPIase-Domäne

Jedes Signal im Spektrum entspricht einer Aminosäure der Primärsequenz der PPIase-Domäne. Nicht enthalten sind Proline und das initiale GP der PreScission-Schnittstelle. Die Signale der Q und N Seitenketten-NHs sind durch gestrichelte Linien verbunden.

Die H_α -Resonanzen, die ebenfalls zum Protein-Rückgrat gehören, wurden zusammen mit den Seitenketten-Protonen durch die Auswertung weiterer Spektren ermittelt. Ausgehend von der $\text{H}_\text{N}\text{N}_\text{H}$ -Kopplung sind im $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TOCSY-HSQC-Spektrum alle Protonen des eigenen Spinsystems detektierbar (Abbildung 3.13). Trotzdem war es über das ^{15}N -TOCSY-HSQC nicht möglich, die H_α -Resonanzen aller Aminosäuren zu identifizieren. So wurde zur Ergänzung der H_α -Resonanzen das zweidimensionale H, H-COSY-Spektrum herangezogen. In diesem Spektrum ist die skalare Kopplung der Wasserstoffkerne über drei Bindungen dargestellt. Über das $\text{H}_\text{N}\text{N}_\text{H}$ lässt sich somit das H_α identifizieren (Abbildung 3.13 B). In dem exemplarischen Sequenzabschnitt der PPIase-Domäne ist dieses für Valin 366 gezeigt. Das COSY-Spektrum ist jedoch aufgrund von Signalüberlagerungen nicht immer auswertbar. Das fehlende H_α -Signal für Glycin 364 sowie zahlreiche weitere H_α -Resonanzen wurden mit Hilfe des HBHACONH-Spektrums ermittelt. So sind auf der $\text{H}_\text{N}\text{N}_\text{H}$ -chemischen Verschiebung

(119,4 ppm) der Aminosäure i, die H α - und H β -Peaks der Aminosäure i-1 zu sehen. In dem H_NN_H-Streifen von Glutamat 365 war bei 3,6 ppm das H α von Glycin 364 zu sehen (Abbildung 3.13 C).

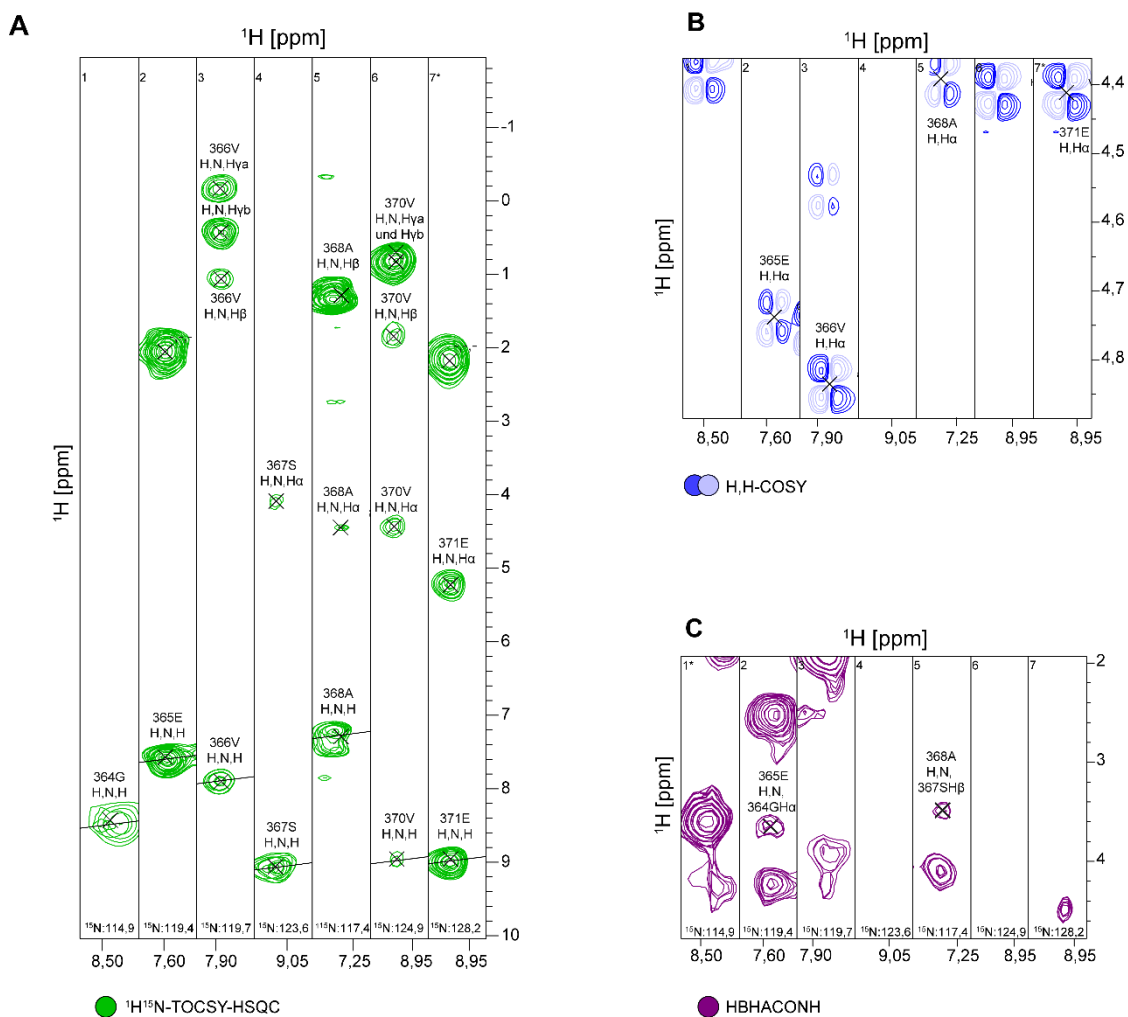


Abbildung 3.13 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TOCSY-HSQC, H, H-COSY und HBHACONH

A: In grün dargestellt ist das $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TOCSY-HSQC-Spektrum für die Aminosäuren 364G bis 371E mit beschrifteten Signalen, die eindeutig zuordenbar waren. **B:** Zu sehen ist der H, H-COSY-Ausschnitt, in dem die Kopplung zwischen den H_N und dem H α zu sehen ist. **C:** In Magenta dargestellt ist das HBHACONH-Spektrum. Über den H_NN_H-Streifen des Glutamat 365 konnte das H α -Signal von Glycin 364 zugeordnet werden.

Die H β -Signale sind im HBHACONH ebenfalls zu sehen, dennoch ist die Unterscheidung zwischen chemisch nicht äquivalenten Resonanzen H β _a und H β _b oft nicht möglich. Dieses Problem tritt auch in dem ^{15}N -TOCSY-HSQC-Spektrum auf. Wenn zudem die H γ -Resonanzen auf ähnlicher Frequenz liegen, so sind H β und H γ nicht zu differenzieren (Abbildung 3.13 A, 365E, 371E).

Aus diesem Grund werden aliphatische Seitenketten-Resonanzen mit dem Spektrensatz HCCH-COSY und HCCH-TOCSY zugeordnet. Bei diesen Spektren spielt die HC-Kopplung die entscheidende Rolle. Im HCCH-COSY-Experiment gelangt man von einem

Wasserstoffkern zum nächstgelegenen Proton, dass maximal drei Bindungen entfernt ist und im HCCH-TOCSY-Experiment zu den Wasserstoffkernen der kompletten Seitenkette. Im HCCH-TOCSY ist somit die Information aus dem HCCH-COSY enthalten, nur kommt es im zuletzt genannten Spektrum zu weniger Signalüberlagerung. Die Korrelation zu der Amidgruppe und somit zu den Rückgrat-Resonanzen erfolgt über die bereits zugeordneten C α - und C β -Signale. Das genaue Vorgehen soll anhand der Zuordnung der Aminosäure Prolin 369 beschrieben werden (Abbildung 3.14 A).

3.4.2 Zuordnung der Prolin-Resonanzen am Beispiel des Prolin 369

Die C α - und C β -Resonanzen von Prolin 369 wurden während des *backbone assignments* indirekt über die nachfolgende Aminosäure, Valin 370, bestimmt (Abbildung 3.14 B). Im HBHACONH-Spektrum war im H_NN_H-Streifen von Valin ebenfalls ein Signal bei 1,85 ppm detektierbar. Da in diesem Experiment nur die H α - und H β -Resonanzen vorkommen, musste das Signal zu einem der H β -Signale von Prolin gehören. In Abbildung 3.14 C sind Richtwerte für die einzelnen ¹H- und ¹³C-chemischen Verschiebungen für Prolin dargestellt. Da diese stark von der chemischen Umgebung der Aminosäure anhängig sind, wurden sie lediglich zur Orientierung genutzt und müssen mit den experimentell bestimmten Resonanzen nicht exakt übereinstimmen. Über die C β H β -Verknüpfung bei 30,2 ppm und 1,85 ppm konnten im HCCH-COSY-Spektrum (Abbildung 3.14 D) das H α bei 4,68 ppm, das zweite H β bei 2,28 ppm und das H γ bei 1,94 ppm bestimmt werden. In einem ersten Schritt gelangt man über die C β H β -Navigation auf den Diagonalpeak H β a/H β a. Von diesem war das H β b-Signal bei 2,28 ppm zu sehen. Die H β -Resonanzen sind über drei Bindungen sowohl mit dem H α als auch mit dem H γ verbunden. Bleibt man auf der chemischen Verschiebung von C β (30,2 ppm), sind ausgehend von den zwei H β -Signalen zum einen das H α von Prolin bei 4,68 ppm und zum anderen ein weiteres Signal bei 1,94 ppm zu erkennen. Dieses Signal gehört zu den H γ -Resonanzen. Da H γ a und H γ b chemisch äquivalent sind, ist nur ein Signal für beide Resonanzen zu sehen. Für die komplette Zuordnung der Seitenkettenprotonen wurden lediglich noch die Informationen über die H δ -Resonanzen benötigt. Die H δ -Protonen konnten im HCCH-TOCSY identifiziert werden (Abbildung 3.14 E). Erneut ist nur ein Signal bei 3,48 ppm für beide H δ -Resonanzen zu erkennen (H δ a=H δ b). Nachdem alle Protonen der Seitenkette zugeordnet waren, war es ebenfalls möglich, Informationen über das gebundene Kohlenstoffatom zu erlangen. Dazu musste die Perspektive der zwei zuletzt benutzten Spektren geändert werden. Nun wurde anstelle der ¹H¹³C- die ¹H¹³C¹H Projektion genutzt. So war es möglich, über das bereits bekannte H γ auf das C γ bei 26,85 ppm zu schließen. Nach dem gleichen Prinzip wurde die C δ -chemische Verschiebung bei 49,39 ppm ermittelt. Auf diese Weise konnten alle vier Proline der PPIase-Domäne vollständig zugeordnet werden.

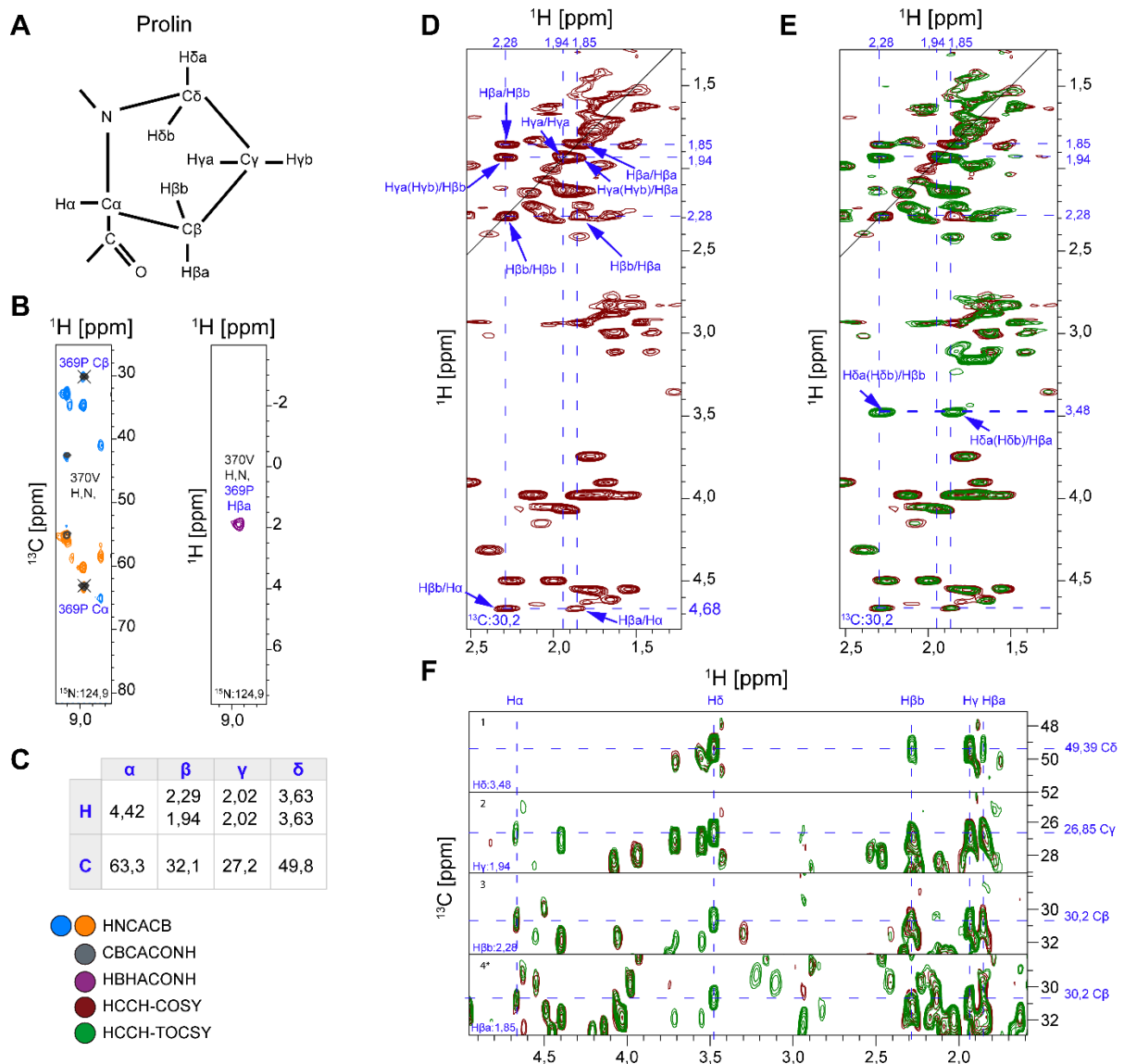


Abbildung 3.14 Zuordnung der Seitenkettenresonanzen des Prolins 369

A: Strukturformel von Prolin nach IUPAC **B:** Links: Auf dem $H_N N_H$ -Streifen von Valin 370 sind im HNCACB-Spektrum nicht nur die eigenen Kohlenstoff-Resonanzen, sondern auch das C_α und C_β (blau beschriftet) des Prolins 369 zu sehen. Rechts: Im HBHACONH-Spektrum ist auf dem $H_N N_H$ -Streifen von Valin 370 ein H_β -Signal vom Prolin zu erkennen. **C:** Tabelle mit den 1H - und ^{13}C -chemischen Verschiebungen von Prolin (nach Wüthrich). **D:** In dunkelrot zu sehen ist ein Ausschnitt aus dem HCCH-COSY-Spektrum. Über die $C_\beta H_\beta$ -Verknüpfung (30,2 ppm und 1,85 ppm) konnten in der H, H-Projektion des Spektrums das H_α bei 4,68 ppm, das zweite H_β bei 2,28 ppm und das H_γ bei 1,94 ppm zugeordnet werden. **E:** Überlagert abgebildet sind das HCCH-COSY (dunkelrot) und das HCCH-TOCSY-Spektrum (grün). Erneut ist die H, H-Projektion zu sehen. Ausgehend vom H_β -Signal ist es möglich, das H_δ bei 3,48 ppm zu identifizieren. **F:** Überlagert dargestellt sind das HCCH-COSY in dunkelrot und das HCCH-TOCSY-Spektrum (grün) in der HC-Projektion. Zu sehen sind Steifen, die zu den C_β/H_β -, C_β/H_β -, C_γ/H_γ - sowie C_δ/H_δ -Verknüpfungen passen. Somit konnten zusätzlich das C_γ bei 26,85 ppm und das C_δ bei 49,39 ppm zugeordnet werden.

3.4.3 Zuordnung der Seitenketten-Protonen aromatischer Aminosäuren

Für die Zuordnung der Aromaten-Ringprotonen wurden die klassischen zweidimensionalen H, H-Spektren COSY, TOCSY und NOESY verwendet. Neben der regulären Aufnahme der Spektren in wässriger Umgebung wurden auch Spektren von Proben in D₂O aufgenommen. Dadurch wird das Proton der H_NN_H-Verbindung durch ein Deuteron ersetzt, sodass die an den Kohlenstoffen gebundenen Protonen aufgrund der nun fehlenden Stickstoffprotonen eindeutig identifizierbar werden. Eine Zuordnung der Ringprotonen soll exemplarisch anhand des Phenylalanins 354 veranschaulicht werden.

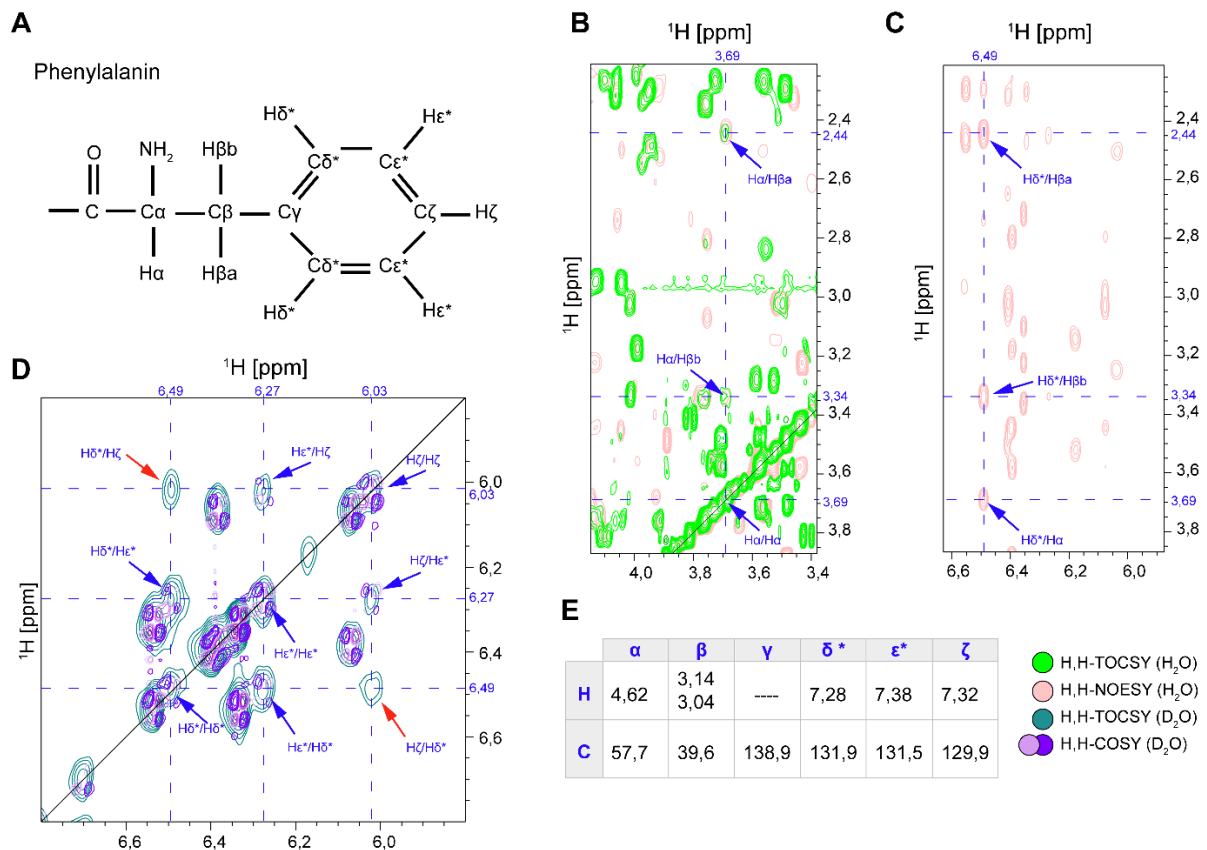


Abbildung 3.15 Zuordnung eines Ringsystems am Beispiel des Phenylalanins 354

A: Strukturformel des Phenylalanins nach IUPAC. **B:** Überlagertes TOCSY (grün)- und NOESY-Spektrum (rosa). Vom H_α-Signal des Phenylalanins ausgehend sind in beiden Spektren die zwei eigenen H_βs bei 2,44 ppm und 3,34 ppm zu sehen. **C:** Gezeigt ist nur das NOESY-Spektrum (rosa). Das H_α-sowie die zwei H_β-Signale sind auf der H_δ*-Resonanz bei 6,49 ppm zu erkennen. **D:** Ausschnitt mit überlagertem COSY (lila/rosa)- und TOCSY-Spektrum (cyan) in D₂O. Auf dem H_δ* bei 6,49 ppm ist ein COSY-Signal zum H_ε* bei 6,27 ppm und ein TOCSY-Signal für die Kopplung zum H_ζ (6,03 ppm) zu sehen. Das H_ε* ist drei Bindungen vom H_δ* und vom H_ζ entfernt, wodurch beide Kopplungen sowohl im COSY als auch im TOCSY zu sehen sind. Ausgehend vom H_ζ bei 6,03 ppm ist ein reines TOCSY-Signal zum H_δ* und ein überlagertes COSY/TOCSY-Signal für die Kopplung zum H_ε* zu sehen. **E:** Gezeigt ist die Tabelle mit den ¹H- und ¹³C-chemischen Verschiebungen von Phenylalanins nach Wüthrich.

Im Gegensatz zum TOCSY-Spektrum ist im NOESY-Spektrum nicht nur das eigene Spinsystem zu erkennen, sondern auch die Kopplung von Protonen, welche bis zu 6 Å voneinander entfernt sind (über den Raum). Das Spektrum liefert somit Informationen über die

Abstände der Protonen. Kurze Abstände (1,8 bis 3 Å) führen in einem NOESY-Spektrum zu starken Kreuzsignalen wohingegen für längere und lange Abstände (3 bis 6 Å) schwächere Signale zu sehen sind. Mit der sechsten Potenz zur Distanz der interagierenden Kerne nimmt die NOE-Intensität ab [106]. Die H α -Resonanz (3,69 ppm) sowie die zwei H β -Resonanzen (H β a bei 2,44 ppm und H β b bei 3,34 ppm) von 354F wurden mit den bisher beschriebenen Zuordnungsmethoden ermittelt und sind sowohl im TOCSY- als auch im NOESY-Spektrum auf der H α -Koordinate zu sehen (Abbildung 3.15 B). Signale auf der identischen Höhe befinden sich im NOESY-Spektrum ebenfalls bei der chemischen Verschiebung von 6,49 ppm (Abbildung 3.15 C). Wie die Struktur von Phenylalanin zeigt (Abbildung 3.15 A), sind im Aromatenring fünf Wasserstoffatome zu erkennen. Die zwei H δ -Resonanzen sind wie die zwei H ϵ -Resonanzen chemisch äquivalent, weshalb sie als H δ^* und H ϵ^* zusammengefasst werden. Zusammen mit dem H ζ sind somit drei Signale für die Ringprotonen von Phenylalanin zu erwarten. Das H δ^* ist dem H α - und H β -Atom am nächsten, weshalb es im NOESY-Spektrum als starkes Kopplungssignal erscheint. Daher kann die chemische Verschiebung bei 6,49 ppm dem H δ^* zugeschrieben werden. Das Diagonalsignal H $\delta^*/$ H δ^* ist in Abbildung 3.15 D klar zu erkennen, da in den D₂O-Experimenten durch das Wegfallen der Signale für die H_N-H_N-Kopplungen keine Störsignale auftreten. Die Wasserstoff-Ringresonanzen sind auf engem Spektrumbereich (6-6,6 ppm) verteilt. Das H δ^* ist über drei Bindungen mit dem H ϵ^* verbunden und für die Kopplung ist ein Kreuzsignal (6,49 ppm/6,27 ppm) im COSY (D₂O)-Spektrum zu sehen. Auf der H δ^* -Resonanz ist im TOCSY-Spektrum bei 6,03 ppm auch das H ζ zu erkennen. Das H ϵ^* ist sowohl mit dem H δ^* als auch mit dem H ζ skalar gekoppelt, weshalb man im COSY zwei Kreuzsignale bei 6,27 ppm erhält. Vom H δ^* ist das H ζ (und *vice versa*) als alleiniges Signal im TOCSY zu identifizieren. Somit entsteht ein bestimmtes Gitter-Muster für die Ringprotonen des Phenylalanins. Bis auf das H ϵ 1 des Histidins 312 konnten alle Wasserstoffatome der restlichen Aromaten nach dieser Vorgehensweise zugeordnet werden.

3.4.4 Zuordnung der Aminprotonen von Glutamin/Asparagin

Die Seitenkettenresonanzen von Glutamin und Asparagin konnten über das HNCACB-Spektrum bestimmt werden. Charakteristisch für die H_N der Seitenkette ist das Auftreten als Doppelsignal. Exemplarisch dargestellt ist dieses für Asparagin 303 (Abbildung 3.16). Die Signale haben die gleiche N δ -Resonanz (111,6 ppm) jedoch unterschiedliche chemische Verschiebungen der H δ -Atome (7,59 ppm und 6,74 ppm). Die H δ N δ -Gruppe zeigt im HNCACB ebenfalls Signale. Diese sind schwächer als die Signale, die auf der Rückgrat-H_NN_H-Gruppe aufbauen und umgekehrt in der Phase (Abbildung 3.16 B). Vergleicht man diese mit zuvor ermittelten C α - und C β -Resonanzen, so ist eine eindeutige Übereinstimmung der Frequenzen mit den Kohlenstoff-Signalen von 303N zu beobachten (Abbildung 3.16 C). Die

Seitenketten-Amidprotonen beider Asparagine und aller drei Glutamine der PPIase-Domäne wurden auf diese Weise vollständig zugeordnet.

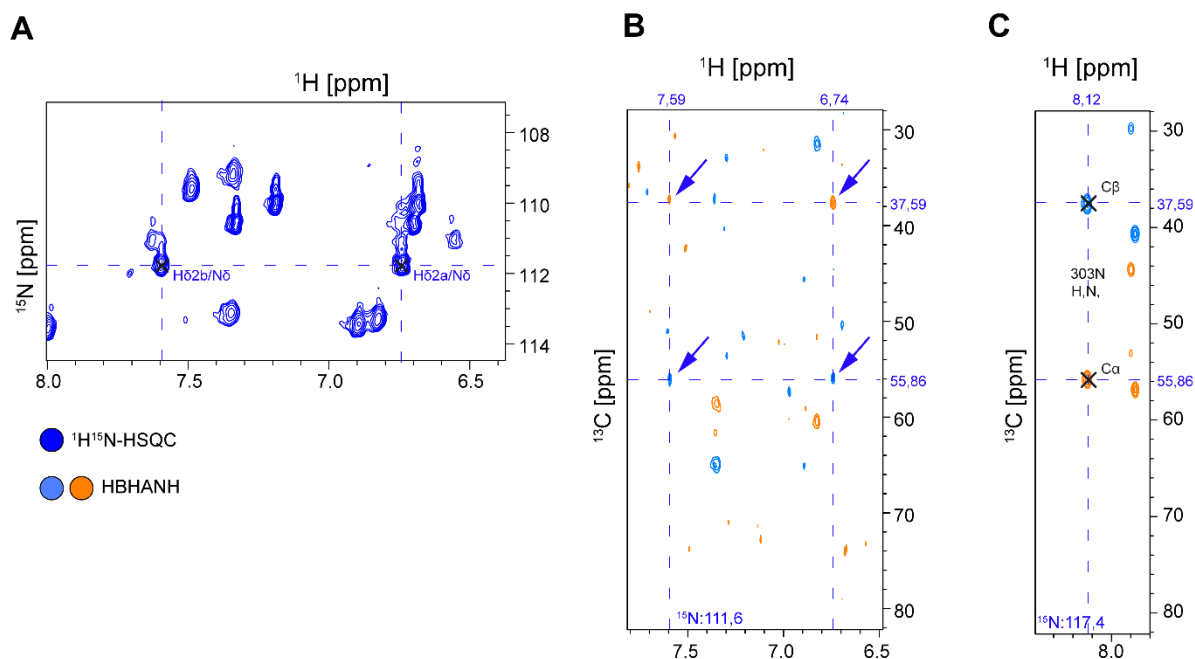


Abbildung 3.16 Zuordnung der Seitenketten-N_HH_N-Signale am Beispiel von Asparagin 303

A: Ausschnitt aus dem ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum. Verbunden sind die H δ N δ -Signale des Asparagins. **B:** Die schwachen blauen und orangenen Signale (verbunden mit gestrichelter Linie), die in dem Ausschnitt des HNCACB-Spektrums zu sehen sind, gehen von den H δ N δ -Koordinaten aus und gehören zu den C α - und C β -Resonanzen des Asparagins 303. **C** Dargestellt sind die C α - und C β -Resonanz von 303N im HNCACB-Spektrum aufbauend auf den Rückgrat-N_HH_N-Koordinaten.

3.4.5 Bestimmung der Wasserstoffbrücken-Donoren für die Strukturberechnung

Von der Substitution der Amidprotonen durch Deuterone bei Lösungsmittelwechsel wird in einem weiteren Experiment Gebrauch gemacht. Der Austauschprozess der Rückgrat-Wasserstoffkerne erfolgt in ungefalteten Peptiden zwar sehr schnell innerhalb weniger Sekunden, aber nicht simultan bei allen Atomen. Ist das Proton in eine Wasserstoffbrücke eingebunden, so tauschen die H_NH_N-Protonen in D₂O langsamer aus, so dass die Signale der Amidprotonen noch Minuten nach dem Lösungsmittelwechsel erkennbar sind. Um den Austausch zu verfolgen, wurde eine Reihe direkt hintereinander geschalteter ^1H - ^{15}N -SOFAS-HMQC-Experimente aufgenommen. Zuvor wurde die gereinigte ^{15}N -markierte PPIase-Domäne von *TbPar42* lyophilisiert. Nachdem dem Protein das Wasser entzogen wurde, erfolgte eine Resuspension in 100 % D₂O und direkt im Anschluss die Spektrenaufnahme. Obwohl nach dem ersten Spektrum viele Signale verschwunden waren, war nach 24 Minuten immer noch die Hälfte der Signale aus dem zugeordneten ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum zu erkennen (Abbildung 3.17 A). Diese sind somit an der Ausbildung von Wasserstoffbrücken beteiligt. Nach einer Stunde reduzierte sich die Zahl auf 40 Signale und nach Aufnahme des letzten

Spektrums (nach 120 Minuten) blieben nur noch 20 sichtbare Signale übrig. Diese dazu gehörenden Reste bilden die stärksten Wasserstoffbrücken im Protein aus. Für die Strukturrechnung wurden 46 Reste (beigefügte CD), deren Signale im Spektrum nach 24 min noch zu sehen waren, als H-Brücken-Donoren eingesetzt.

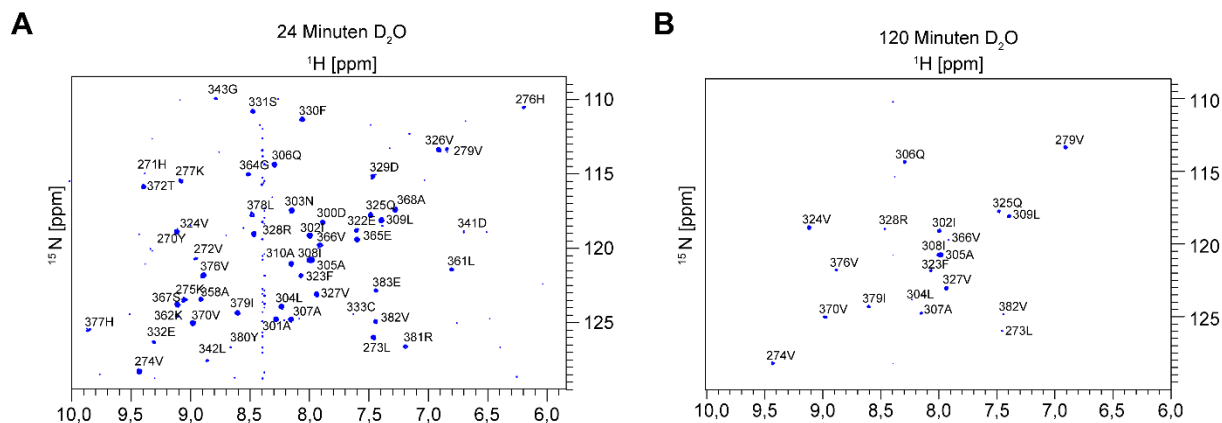


Abbildung 3.17 H-Brücken-Donoren

A: Zu sehen sind Rückgrat $H_N N_H$ -Signale der PPlase-Domäne im $^1H^{15}N$ -HSQC-Spektrum, die 24 Minuten nach Aufnahme des Proteins in D_2O noch zu sehen waren. 46 Reste wurden in der Strukturrechnung als Wasserstoffbrücken-Donoren gesetzt. **B:** Im $^1H^{15}N$ -HSQC-Spektrum sind die Signale der 20 Aminosäuren zu sehen, dessen Amidprotonen 120 Minuten nach Lösungsmittelwechsel nicht durch ein Deuteron ersetzt wurden.

3.4.6 Sekundärstrukturanalyse der PPlase-Domäne von *TbPar42*

Wasserstoffbrücken stabilisieren Sekundärstrukturelemente innerhalb einer Proteinstruktur. Somit wurden die langsam austauschenden Amidprotonen in D_2O in die Sekundärstrukturanalyse einbezogen. Hinzu kamen zwei weitere Parameter: der chemische Verschiebungsindex (CSI) sowie das Vorhandensein bestimmter NOE-Verteilungsmuster in den Sekundärstrukturelementen.

Der chemische Verschiebungsindex ist eine Methode zur Sekundärstrukturbestimmung nach Wishart *et al.* [258]. Dabei werden die ermittelten chemischen Verschiebungen der Rückgratresonanzen im Protein mit Frequenzen der jeweiligen Aminosäure verglichen, welche in einem kurzen Peptid (GG-X-Ala(Pro)GG) ermittelt wurden und somit der chemischen Verschiebung in unstrukturierten (*random coil*) Bereichen entsprechen [257, 259]. Beträgt die Abweichung des gemessenen Wertes für die $H\alpha$ -Resonanz im Protein mehr als $\pm 0,1$ ppm gegenüber dem Referenzwert, so bekommt die entsprechende Rückgratresonanz den Wert ± 1 . Ist die Differenz kleiner 0,1 ppm, so wird der Wert 0 vergeben. Im Falle von $C\alpha$ und $C\beta$ beträgt die Differenz 0,7 ppm und bei dem CO ist der Unterschied von 0,5 ppm zu beachten. In α -Helices besitzen die $C\alpha$ und CO-Resonanzen eine positive Abweichung zu den *random coil*-Verschiebungen, wohingegen die $C\beta$ und $H\alpha$ Resonanzen eine negative Abweichung zeigen. In β -Faltblättern verhält sich diese Verteilung genau entgegengesetzt. Trägt man den

chemischen Verschiebungsindex gegen die Aminosäuresequenz auf, so lassen sich Sekundärstrukturelemente vorhersagen.

Eine noch genauere Methode zur Sekundärstrukturbestimmung ist die Analyse der NOE-Signale im NOESY-Spektrum [252]. Charakteristisch für α -Helices ist das NOE-Muster, in dem aufeinanderfolgende H_N -Protonen der Aminosäure i und $i+1$ ($d_{NN}(i, i+1)$) zu starken Signalen führen, ebenso wenn NOEs zwischen dem $H_{\alpha i}$ - und dem H_N von Aminosäure $i+3$ ($d_{\alpha N}(i, i+3)$) und $i+4$ ($d_{\alpha N}(i, i+4)$) zu sehen sind und der NOE-Kontakt zwischen $H_{\alpha i}$ und $H_{\beta i+3}$ ($d_{\alpha\beta}(i, i+3)$) erscheint. β -Faltblätter lassen sich durch starke NOEs zwischen dem H_{α} der Aminosäure i und dem sequentiell benachbarten Amidproton der Aminosäure $i+1$ ($d_{\alpha N}(i, i+1)$) identifizieren.

In Abbildung 3.18 sind die typische NOE-Verteilung, der chemische Verschiebungsindex (CSI_{cons}) sowie die in D_2O langsam austauschenden Amidprotonen mit den daraus ermittelten Sekundärstrukturelementen dargestellt.

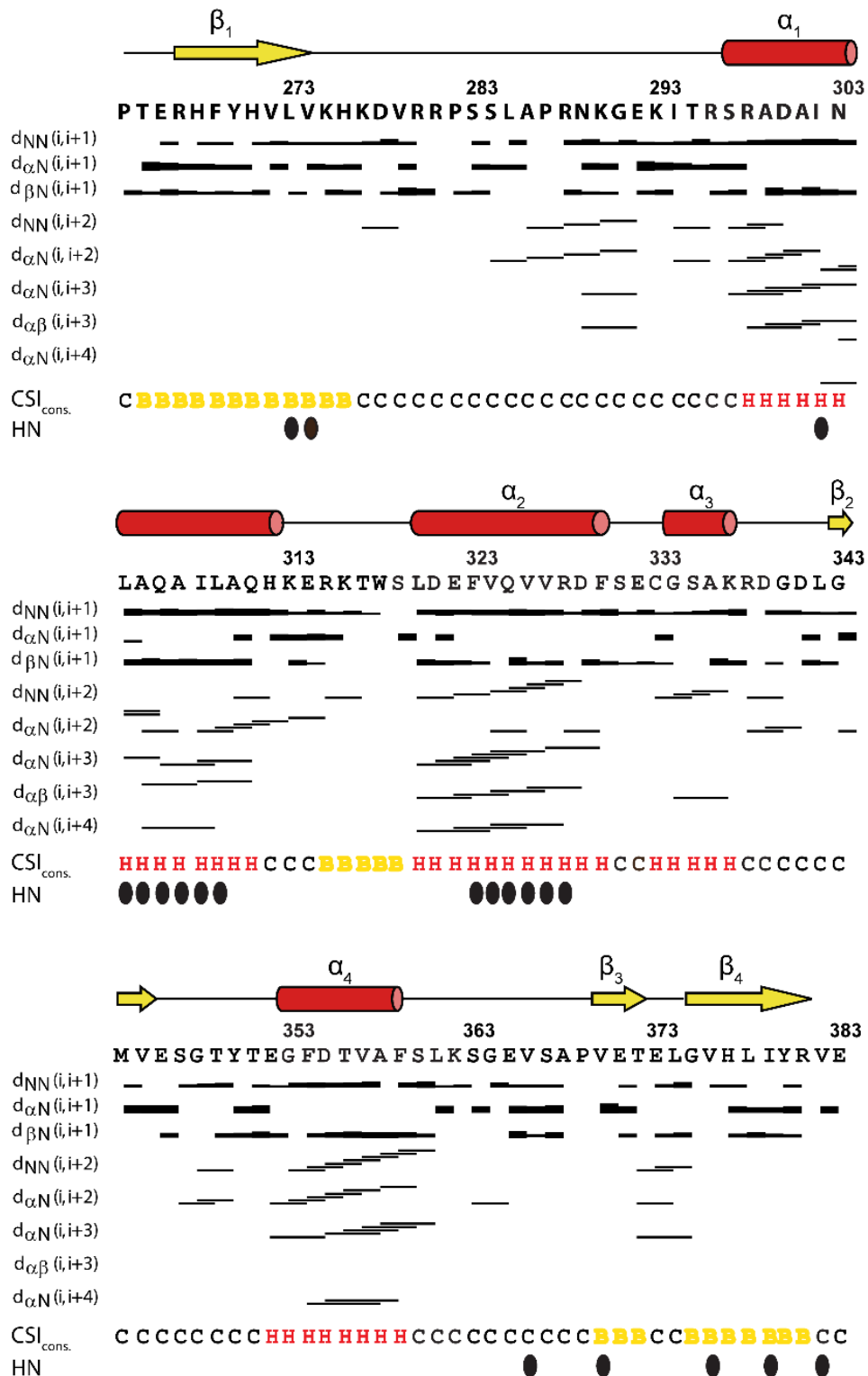


Abbildung 3.18 Definition der Sekundärstrukturelemente der PPLase-Domäne

Über der *TbPar42*-PPLase-Sequenz im Einbuchstabencode sind mit Zylinderformen die Helices dargestellt und mit Pfeilen die Faltränge. Unter der Sequenz sind typische NOE-Muster für Helices und Falblätter abgebildet. Je dicker ein Balken ist, desto intensiver ist das NOE-Signal. Die linke Spalte zeigt die Verbindungen zwischen den Protonen der einzelnen Aminosäuren. Der Konsensus des chemischen Verschiebungsindex $CSI_{cons.}$ ist in der vorletzten Reihe zu sehen. Ein rotes H steht für Helix, ein gelbes B für β -Falblatt und ein schwarzes C für *random coil*. Die schwarzen Punkte in der letzten Reihe beschreiben die Rückgrat-Amidprotonen, deren Signale 120 Minuten nach Aufnahme in D_2O noch vorhanden waren.

Das N-terminal gelegene Sekundärstrukturelement ist ein β -Faltblattstrang (267R-274V). Die anschließende Loop-Region reicht von Lysin 275 bis Arginin 296, worauf eine lange α -Helix folgt (297S-312H). Die zweite Helix geht von Leucin 320 bis Phenylalanin 330. Dem chemischen Verschiebungsindex zufolge liegt zwischen den zwei Helices ein Faltblatt, jedoch waren keine eindeutigen Helix-typischen NOEs zu erkennen. Somit wurde der von Helices umschlossene Bereich (331S-319S) als Loop definiert. Die chemischen Verschiebungen weisen auf eine dritte Helix im Bereich 334G bis 337K. hin, allerdings war die charakteristische Helix-NOE-Verteilung nicht komplett zu erkennen. Zudem verschwanden die $H_N N_H$ -Protonen sehr schnell nach Aufnahme in D_2O . Daher könnte Helix 3 auch als α -helikale Windung betrachtet werden. Der zweite, drei Aminosäuren lange Strang, geht von 343G-345V. Ihm folgt eine vierte Helix, welche sich von Glycin 353 bis zum Phenylalanin 359 erstreckt. Der dritte β -Faltblattstrang ist ebenfalls nur drei Aminosäuren lang (370V-372T) und wird über einen kurzen Loop von einem β -Strang (375G-381E) am C-Terminus getrennt. Insgesamt wurden vier α -Helices und vier β -Faltblattstänge definiert.

3.4.7 Strukturrechnung der PPlase-Domäne

Die insgesamt 1265 zugeordneten Resonanzen (96,4 %) wurden sowohl im Winkelvorhersageprogramm TALOS als auch zur Strukturrechnung in CYANA genutzt. Für die Strukturrechnung wurden 206 Winkelinformationen genutzt. Für 13 Aminosäuren, abzüglich der vier Proline, wurden die Torsionswinkel von der Kalkulation ausgeschlossen, da diese zu hohen energetischen Verletzungen während der finalen Tertiärstrukturberechnung führten. Bei der Strukturbestimmung wurden auch die Wasserstoffbrücken-Informationen berücksichtigt. Da die ermittelten H-Brücken-Donoren nur einen Teil der Brücke bilden, wurden die Protonen-Akzeptoren durch Vergleiche mit den homologen Strukturen *TbPin1* und *hPin1* ergänzt. Für die räumliche Anordnung der Proteinstruktur wurden Abstandsinformationen aus dem NOESY-Spektrum genutzt. Da die PPlase-Domäne von *TbPar42* eine gute Signaldispersion aufwies, reichte ein 2D-NOESY-Spektrum für die Strukturberechnung aus. Es wurden 3668 NOESY-Signale in CYANA eingelesen. CYANA übt dann ein automatisiertes NOESY-Assignment aus. Die Distanzen dienen als Input für einen Torsionswinkel-Dynamik-Algorithmus. Über sieben Zyklen kombiniert CYANA diesen Algorithmus mit einer simulierten Abkühlung des Systems, um am Ende Strukturen mit der besten Zielfunktion auszugeben [82, 84]. Aus 60 berechneten Strukturen wurden 10 Strukturen mit dem kleinsten Zielfunktionswert in einem Ensemble zusammengefasst (Abbildung 3.19).

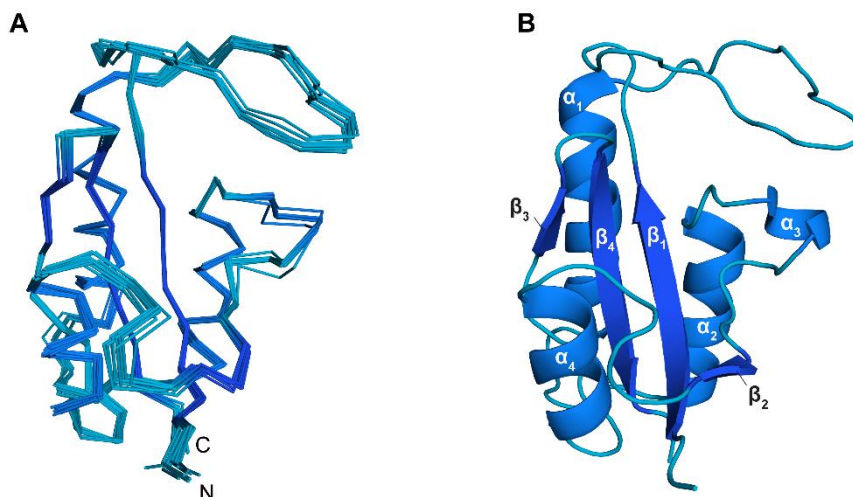


Abbildung 3.19 Struktur-Ensemble der *TbPar42*-PPIase-Domäne

A: In *ribbon*-Darstellung sind die 10 besten Strukturen der PPIase-Rechnung mit den kleinsten Zielfunktionswerten dargestellt. N und C markieren die Termini. **B:** Die erste Struktur mit dem kleinsten Zielfunktionswert ist in *cartoon*-Darstellung zu sehen. Beschriftet sind die 4 α -Helices und 4 β -Stränge der PPIase-Domäne. PDB-ID: 2MNT / 2N87

Von den 3668 eingelesen NOE-Signalen wurden in CYANA für die Berechnung 3023 Abstandsinformationen benutzt. Tabelle 3.1 stellt eine Zusammenfassung aller Daten für die 10 Strukturen dar.

Tabelle 3.1 Statistik des mit Cyana 2.1 berechneten Ensembles aus 10 *TbPar42*-PPIase-Strukturen

NOE-Abstandsbeschränkungen	
Gesamtzahl der eingesetzten NOEs	3023
Intraresidual und Sequentiell $ i-j \leq 1$	1910
mittlere Entfernung, $1 < i-j < 5$	408
Weitreichend $ i-j \geq 5$	705
Gesamtzahl der Torsionswinkel	206
Φ -Winkel	103
Ψ -Winkel	103
Wasserstoffbrücken	46
Ramachandranplot-Regionen (% aller Aminosäuren)	
Favorisiert	78,8
Erlaubt	21,2
Außerhalb liegend	0
Root mean square deviation (RMSD [Å])	
Proteinrückgrat (durchschnittl.)	$0,41 \pm 0,08$ Å
Schwere Atome (durchschnittl.)	$0,93 \pm 0,05$ Å

Die Struktur sowie der niedrige RMSD-Wert von 0,41 Å zeigen ein kompakt gefaltetes Protein mit wenigen flexiblen Regionen. Die Verteilung der Rückgrat Φ - und Ψ -Winkel ist in dem

Ramachandran-Plot in Abbildung 3.20 zu sehen. Es befinden sich keine Winkel in unerlaubten Regionen. 78 % sind in favorisierten Bereichen zu finden und 21,2 % der Winkel kommen in erlaubten Regionen vor.

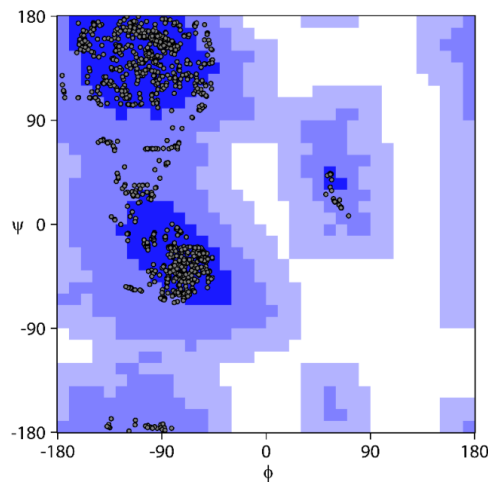


Abbildung 3.20 Ramachandran-Plot für die 10 besten PPlase-Domäne-Strukturen

78 % der Φ - und Ψ -Winkel sind in favorisierten Bereichen zu finden. 21,2 % der Winkel kommen in erlaubten Regionen vor.

Die Struktur der PPlase-Domäne des *Trypanosoma Parvulins* 42 besteht aus vier α -Helices und 4 β -Strängen (Abbildung 3.19 B). Die β -Faltblattstänge sind in der Reihenfolge 3-4-1-2 antiparallel zueinander ausgerichtet und werden von vier Helices umschlossen. Helix 4 befindet sich auf der konkaven Seite des β -Faltblatts wohingegen Helix 1, 2 und 3 auf der Außenseite liegen. Der lange Loop zwischen α_1 und β_1 ist zur Helix 3 orientiert, so dass das Faltblatt-Element nicht überdeckt wird. Dieses ist auf den NOE zwischen $H\beta$ von 286A und $H\beta$ von 336A zurückzuführen. Helix 3 ist von den vier Helices am flexibelsten, da die Aminosäuren der Helix 3 nur wenige NOEs aufweisen (Abbildung 3.21). Dagegen zeichnen sich die terminalen β -Faltblattstänge durch eine hohe Zahl an NOEs aus. Vor allem weitreichende Kreuzsignale sind in diesen Bereichen vorzufinden.

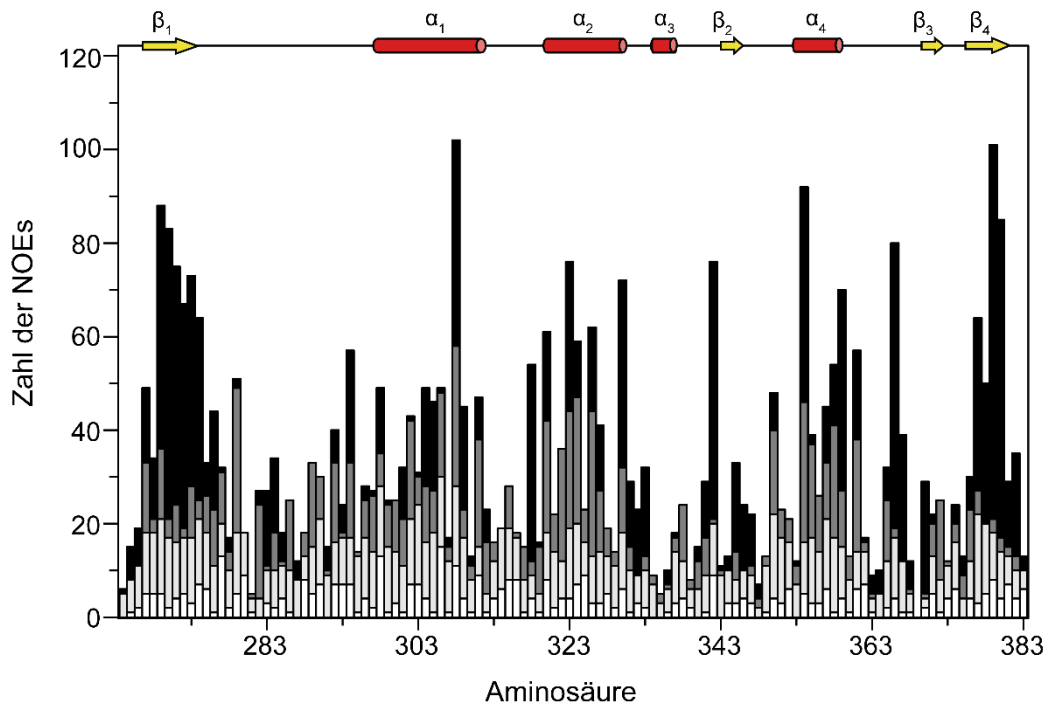


Abbildung 3.21 Anzahl und Art der NOEs pro Aminosäure

Rote Zylinder stellen Helices und gelbe Pfeile die β -Faltstränge der PPLase-Domäne dar. Weiße Balken markieren intraresidualen Kopplungen. Die dunkelgrauen Balken entsprechen den mittelreichenden Kopplungen und die schwarzen Balken stellen die weitreichenden Kopplungen dar. Erstellt mit CYANA.

3.4.8 Dynamik der PPLase-Domäne von *TbPar42*

Nachdem die Struktur der PPLase-Domäne aufgeklärt wurde, sollte über Dynamikstudien die Flexibilität der einzelnen Strukturregionen untersucht werden. Dafür wurden drei Parameter bestimmt: die longitudinale Relaxationsrate ($R_1=1/T_1$), die transversale Relaxationsrate ($R_2=1/T_2$) sowie der heteronukleare $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -NOE. Allen Parametern ist gemeinsam, dass sie als eine Funktion der Rotationskorrelationszeit τ_c angegeben werden können, die die Dauer beschreibt, welche ein Molekül braucht, um einen Radian zu rotieren (60°) [29]. τ_c ist von der Partikelgröße abhängig.

Sowohl die longitudinale T_1 - als auch die transversale T_2 -Relaxation wurden über Intensitätsmessungen der Signale aus einer Serie an HSQC-Spektren mit unterschiedlichen *delay*-Zeiten (t) ermittelt. Relaxationsabhängig wurden unterschiedliche *delay*-Zeiten gesetzt. Diese können der Tabelle 2.23 entnommen werden. T_1 bzw. T_2 wurden durch Fitten der Intensitätsverläufe nach Formel 2.4 bestimmt. In strukturierten Regionen haben Aminosäuren einen großen T_1 - und einen kleinen T_2 -Wert. Anders ist dies in unstrukturierten Proteinbereichen, dort ist T_2 hoch und T_1 niedrig.

Über den $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -hetNOE wird die Bewegung des $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Bindungsvektors gemessen. Diese ist sowohl von der Gesamtrotation des Proteins als starre Kugel (*molecular tumbling*) als auch von internen strukturellen Proteinfuktuationen anhängig [104], wodurch im NOE alle

Bewegungsmöglichkeiten erfasst werden, die die direkte Spin-Spin Kopplung im ns- bis ps-Bereich beeinflussen. Um den hetNOE zu bestimmen, werden zwei simultan aufgenommene Spektren verwendet. Im Ersten wird das Proton saturiert, dadurch ein heteronuklearer NOE aufgebaut und die Signalveränderung des ^{15}N -Kernes beobachtet [251]. Das zweite Spektrum wird ohne Vorsättigung aufgenommen und dient als Referenz. Aufgrund der gyromagnetischen Eigenschaften der interagierenden Kerne und der daraus resultierenden theoretischen NOE-Verstärkung im Bereich -5 bis 0 [173], sind im Spektrum mit Saturierung sowohl positive als auch negative Signale sichtbar. Dagegen erscheinen im Referenzspektrum ausschließlich positive Signale. Das Verhältnis zwischen den Signalintensitäten aus dem Spektrum mit Vorsättigung I_{sat} und dem Referenzspektrum I_{ref} ergibt schließlich den hetNOE. Da das NOE-Signal von der ^{15}N -Relaxation abhängig ist und diese in rigiden (strukturierten) Bereichen schneller ist als in beweglichen Regionen, erlaubt die Auswertung der NOEs, Aussagen über die Flexibilität des Proteins zu treffen. Kleine NOE Werte (-4 bis 0,5) sprechen für flexible Bereiche, wohingegen ein hetNOE $>0,5$ rigiden Regionen zuzuteilen ist. In Abbildung 3.22 sind die longitudinale Relaxationsrate (R_1), die transversale Relaxationsrate (R_2) und der hetNOE für die Aminosäuren der PPIase-Domäne dargestellt. Wie im hetNOE zu sehen, hat nur das N-terminale Threonin 264 einen Wert unter 0,5. Die übrigen Aminosäuren haben einen NOE-Wert über dem genannten cut-off und befinden sich somit in rigiden Regionen der PPIase-Domäne. Insgesamt zeigt die Auswertung der Dynamik, dass die PPIase keine stark flexiblen Regionen aufweist. Es ist lediglich eine tendenzielle Flexibilität in dem Loop α_1 - α_2 (313K-319S), sowie im Loop (346E-352E) zwischen dem zweiten Faltblatt und Helix 4 zu beobachten. Der lange Loop (275K-296R) β_1 - α_1 ist bis auf das flexiblere Isoleucin 294 beschränkt beweglich. Helix 3 ist dagegen allen Parametern zur Folge flexibler als die restlichen Helices.

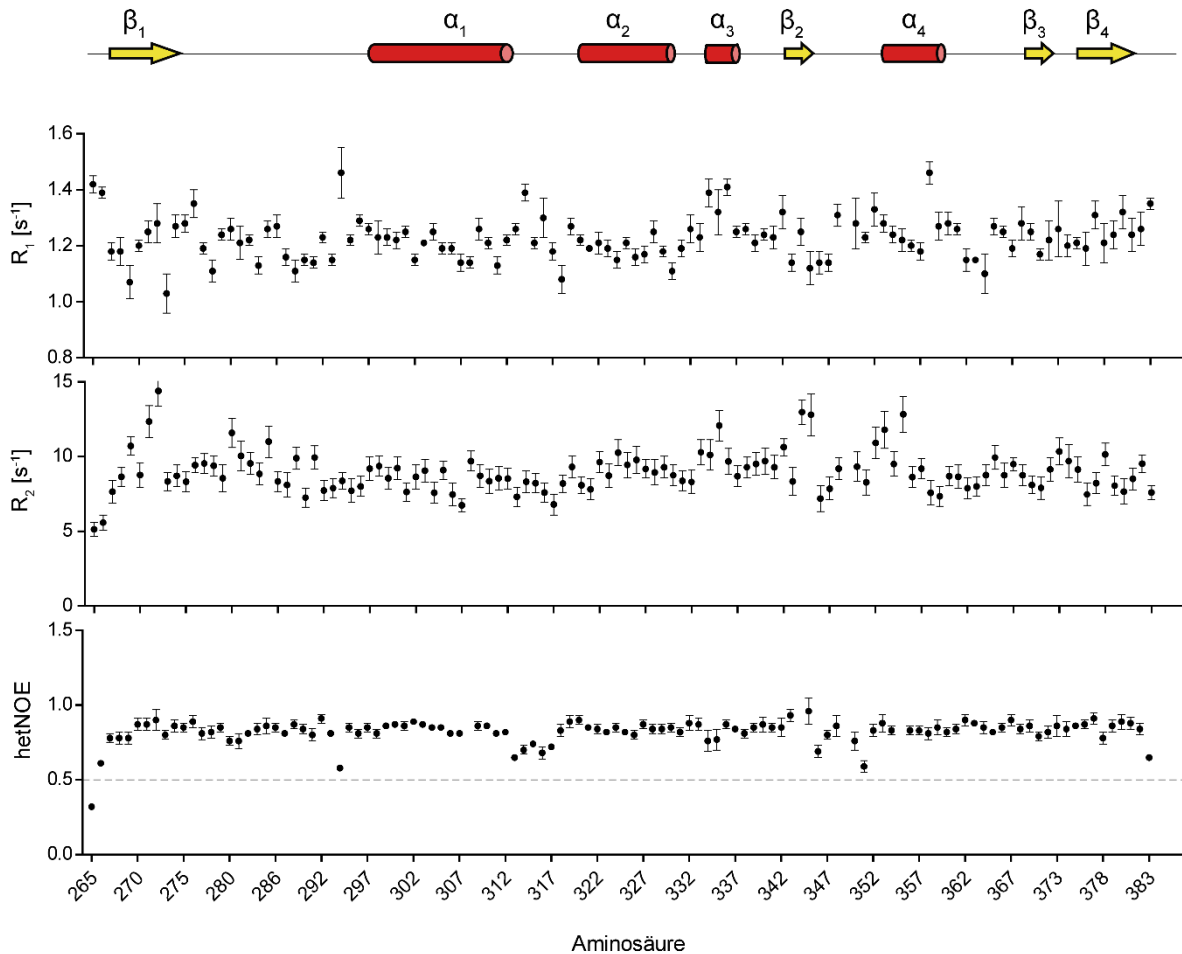


Abbildung 3.22 Relaxationsraten und $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -hetNOE der PPIase-Domäne

Oben ist die Sekundärstrukturverteilung der PPIase-Domäne abgebildet. Helices sind als rote Zylinder und β -Stränge als gelbe Pfeile dargestellt. Darunter sind die longitudinale Relaxationsrate (R_1), die transversale Relaxationsrate (R_2) und der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -hetNOE über die Aminosäuresequenz aufgetragen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen der Fits.

Aus den gemittelten T_1 (818,67 ms)- und T_2 (113,40 ms)-Relaxationszeiten wurde die Rotationskorrelationszeit τ_c berechnet. Daraus resultiert für die PPIase-Domäne eine Rotationskorrelationszeit von 6,76 ns. Über Rotationskorrelationszeiten anderer Proteine bekannter Größe unter vergleichbaren Messbedingungen wurde eine Regressionsgerade erstellt. So wird für die PPIase-Domäne ein Molekulargewicht von 11,05 kDa berechnet. Somit liegt die PPIase-Domäne unter den NMR-Messbedingungen (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,26; $c = 600 \mu\text{M}$, $T = 27 \text{ }^\circ\text{C}$) in monomerer Form vor.

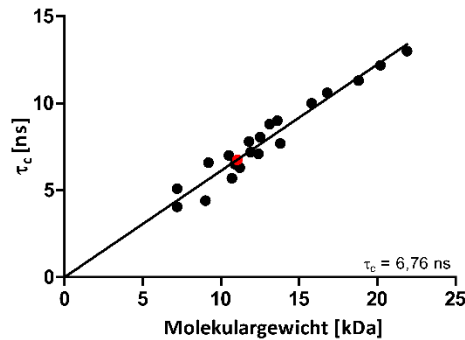


Abbildung 3.23 τ_c der PPIase-Domäne im Vergleich zu den bekannten Rotationskorrelationszeiten anderer Proteine [199]

Aufgetragen sind die τ_c -Werte anderer Proteine (schwarze Punkte) und das τ_c der PPIase-Domäne (roter Punkt) gegen das dazugehörige Molekulargewicht.

3.5 Untersuchung der NterFHA-Domäne

3.5.1 Vorarbeiten zur strukturellen Analyse der NterFHA-Domäne

Nachdem die Struktur der PPIase-Domäne aufgeklärt wurde, sollte als nächstes die FHA-Domäne von *TbPar42* zusammen mit dem N-Terminus untersucht werden. Die optimalen Expressionsbedingungen für das 54,3 kDa große GST-Fusionsprotein in *E. coli* ergaben sich über Nacht bei 25°C. Um das Fusionsprotein von den *E. coli*-eigenen Proteinen zu separieren, wurde eine GST-Affinitätschromatographie durchgeführt. Nachdem der GST-Tag mit Hilfe der PreScission-Protease abgespalten wurde, folgte eine Gelfiltration. An die Gelfiltrationssäule wurde eine GSH-Säule nachgeschaltet. Diese sollte die getrennte GST abfangen und somit Verunreinigungen der Proteinprobe mit GST verhindern. Wie das SDS-Gel in Abbildung 3.24 A (Spur: P) zeigt, entspricht das letzte Signal im Chromatogramm, bei einem Volumen zwischen 120 ml und 150 ml, dem zu erwartenden Molekulargewicht der NterFHA-Domäne von *TbPar42* von 19,1 kDa. Die Bande bei ca. 55 kDa, die in den Fraktionen der zwei vorderen Signale zu sehen ist (G_1 , G_2), entspricht dem GST-NterFHA-Fusionsprotein (54,3 kDa). Dieses deutet darauf hin, dass das Fusionsprotein nicht vollständig von der PreScission-Protease geschnitten wurde. Die Reinheit der Probe wurde mit einer MALDI-TOF-Analyse bestätigt (Abbildung 3.24 B).

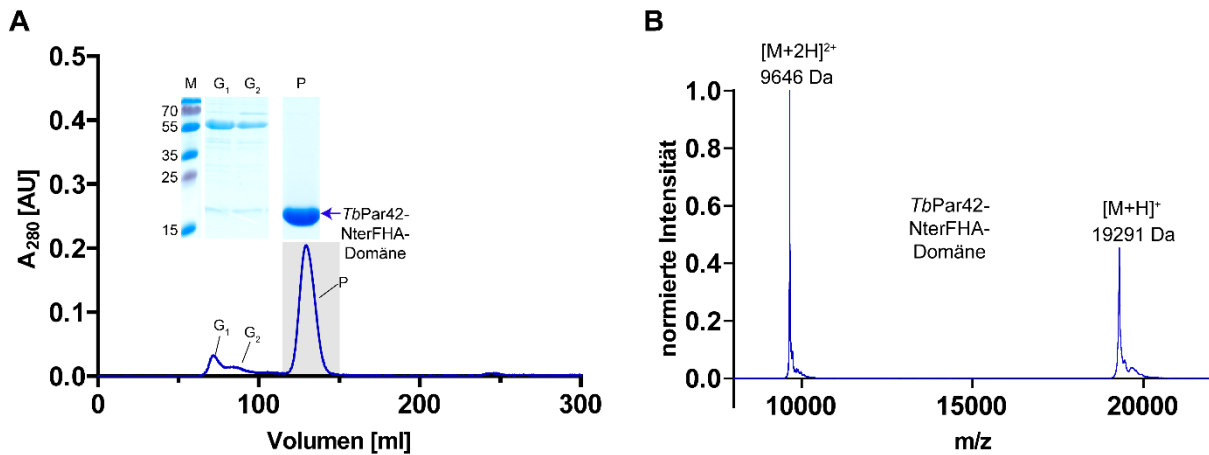


Abbildung 3.24 Gelfiltrationslauf und MALDI-TOF-Massenspektrum der NterFHA-Domäne

A: Chromatogramm der Gelfiltration der NterFHA-Domäne mit dem dazugehörigen SDS-Gel. Die zwei vorderen Signale deuten im SDS-Gel auf nicht vollständig geschnittenes Fusionsprotein hin, da eine Bande bei ca. 55 kDa zu sehen ist. Das letzte Signal gehört zur NterFHA-Domäne, da die SDS-Probe (P) eine eindeutige Bande bei ca. 19 kDa zeigt. **B:** Das Massenspektrum zeigt zwei Signale, von denen das rechte Signal der erwarteten Masse der *TbPar42*-NterFHA-Domäne und das linke Signal dem der 2-fach geladenen *TbPar42*-NterFHA-Domäne entspricht.

3.5.2 Untersuchung einer möglichen Multimerisierung der NterFHA-Domäne

Über analytische Gelfiltration sollte eine mögliche Multimerisierung der NterFHA-Domäne untersucht werden. Im ersten Schritt wurde ein Kalibrationslauf mit Proteinen bekannter Größe durchgeführt. Da die NterFHA-Domäne über NMR-Spektroskopie strukturell charakterisiert werden sollte, wurde die Größenausschluss-Chromatographie im NMR-Puffer (50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,26) mit zusätzlichen 150 mM KCl durchgeführt. Es wurden 250 μ M NterFHA-Domäne über die Säule gegeben.

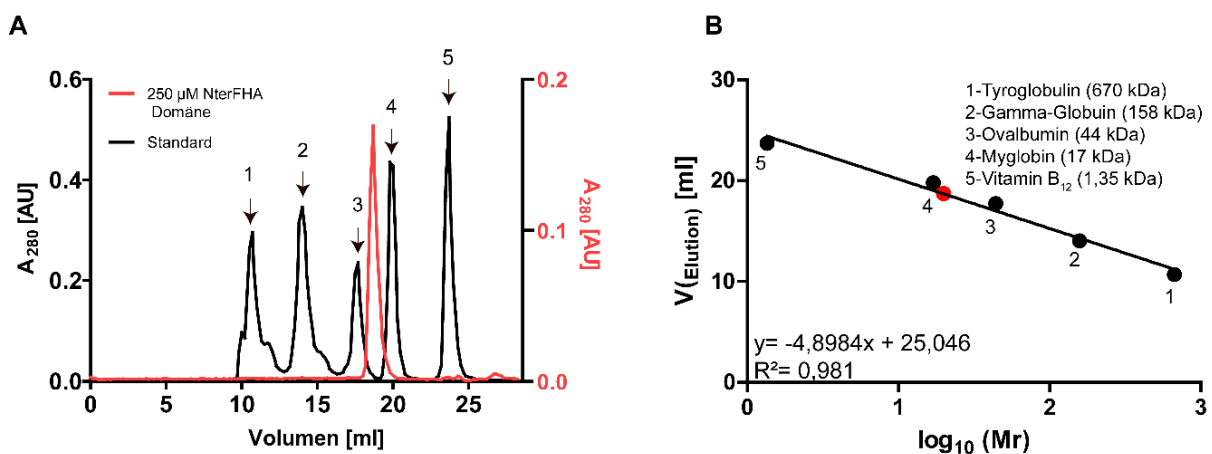


Abbildung 3.25 Analytische Gelfiltration der NterFHA-Domäne

A: Kalibrationslauf (schwarz) und der Lauf mit 250 μ M NterFHA-Domäne (rot). Das Signalmaximum ist bei 20,4 ml zu sehen. **B:** Zu sehen ist die Regressionsgerade, erstellt mit den Elutionsvolumina der Standardproteine 1-5 und den zugehörigen dekadischen Logarithmen der Molekulargewichte. Das berechnete Molekulargewicht der NterFHA-Domäne beträgt 19,95 kDa, was auf eine monomere Form der NterFHA hindeutet. Für die Läufe wurde die *Superdex 200 Increase*-Säule verwendet.

Wie in Abbildung 3.25 zu sehen, eluiert das Protein zwischen 18 und 20 ml. Mit dem Signalmaximum bei 18,7 ml (Abbildung 3.25 A) und der Formel aus Abbildung 3.25 B, wurde für die NterFHA-Domäne ein Molekulargewicht von 19,95 kDa berechnet. Dieses stimmt mit dem theoretischen Molekulargewicht der NterFHA-Domäne in monomerer Form überein.

3.5.3 Strukturelle Charakterisierung der NterFHA-Domäne

Für die strukturelle Aufklärung der NterFHA-Domäne wurde das Protein sowohl unmarkiert als auch isotonenangereichert (^{13}C oder ^{15}N bzw. ^{13}C , ^{15}N) exprimiert und gereinigt. Sowohl die sequentielle Zuordnung des Rückgrats als auch die Zuordnung der Seitenketten erfolgte nach dem gleichen Vorgehen wie in den Kapiteln 3.4.1-3.4.4 für die PPlase-Domäne beschrieben. Das NterFHA-Konstrukt ist 177 Aminosäuren lang und somit 57 Aminosäuren länger als die PPlase-Domäne. In den Spektren äußerte sich die höhere Aminosäurezahl durch mehrfache Signalüberlagerungen. Aus diesem Grund waren für die Zuordnung des Rückgrats und der Seitenketten im Vergleich zur PPlase-Domäne zusätzliche Spektren (CCCONH, HCCONH, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -TOCSY-HSQC, $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC, $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC) notwendig. Anhand des Tyrosins 57 soll das Vorgehen exemplarisch beschrieben werden.

Im CCCONH-Spektrum sind ausgehend von der HN-Kopplung der Aminosäure i alle ^{13}C -Resonanzen der Aminosäure $i-1$ zu sehen. Dies erlaubt, die sequentielle Zuordnung, welche mit den klassischen HNCACB- und CBCACONH-Spektren erfolgte, zu ergänzen oder zu überprüfen. In dem HN-Streifen von Phenylalanin 58 (7,75 ppm und 118,5 ppm) konnte die $\text{C}\beta$ -Resonanz (40,26 ppm) von Tyr 57 bestätigt werden (Abbildung 3.26 B). Das $\text{C}\alpha$ (58,67 ppm) wurde bei der sequentiellen Zuordnung mit dem HNCACB-Spektrum ermittelt. Analog zum CCCONH-Spektrum sind in dem HCCONH alle Protonen der Aminosäure $i-1$ auf den HN-Koordinaten der Aminosäure i sichtbar. Im Vergleich zu dem standardmäßig genutzten HBHACONH waren die Signalintensität sowie die Auflösung der Signale im HCCONH besser. Auf dem HN von 58F konnten im HCCONH dem Tyrosin 57 bei 2,59 ppm und 3,03 ppm die $\text{H}\beta$ s und bei 4,34 ppm das $\text{H}\alpha$ zugeordnet werden (Abbildung 3.26 C). Wie die Tyrosinstruktur in Abbildung 3.26 A und die Tabelle links unten in der Abbildung zeigen, sind zu den bisher zugeordneten Resonanzen noch zwei weitere Resonanzen ($\text{H}\delta^*$ und $\text{H}\epsilon^*$) für die Ringprotonen des Tyrosins zu erwarten. Diese sind in dem $^1\text{H}^{15}\text{N}$ NOESY-HSQC auf dem eigenen HN-Streifen (7,66 ppm/117 ppm) vom Tyrosin 57 klar zu erkennen (7,03 ppm; 6,79 ppm, Abbildung 3.26 D). Im H^1H -COSY- und TOCSY-Spektrum war zudem das Signal für die Kopplung (über drei Bindungen) zwischen dem $\text{H}\delta^*$ und dem $\text{H}\epsilon^*$ zu sehen (rote Pfeile in Abbildung 3.26 E). Nachdem alle Protonen zugeordnet waren, wurden die Kohlenstoff-Resonanzen mit dem $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC und dem $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -NOESY- sowie -TOCSY-HSQC zugeordnet. Dafür wurde die Aufnahme-region der drei zuletzt genannten Spektren den aromatischen Aminosäuren angepasst. Im $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum, in dem die Kopplung

zwischen den Protonen mit den direkt benachbarten ^{13}C -Kernen sichtbar ist, konnten über die bereits bekannten Resonanzen des $\text{H}\delta^*$ und $\text{H}\epsilon^*$, das $\text{C}\delta^*$ (133,14 ppm) und $\text{C}\epsilon^*$ (118,44 ppm) gefunden werden (Abbildung 3.26 F).

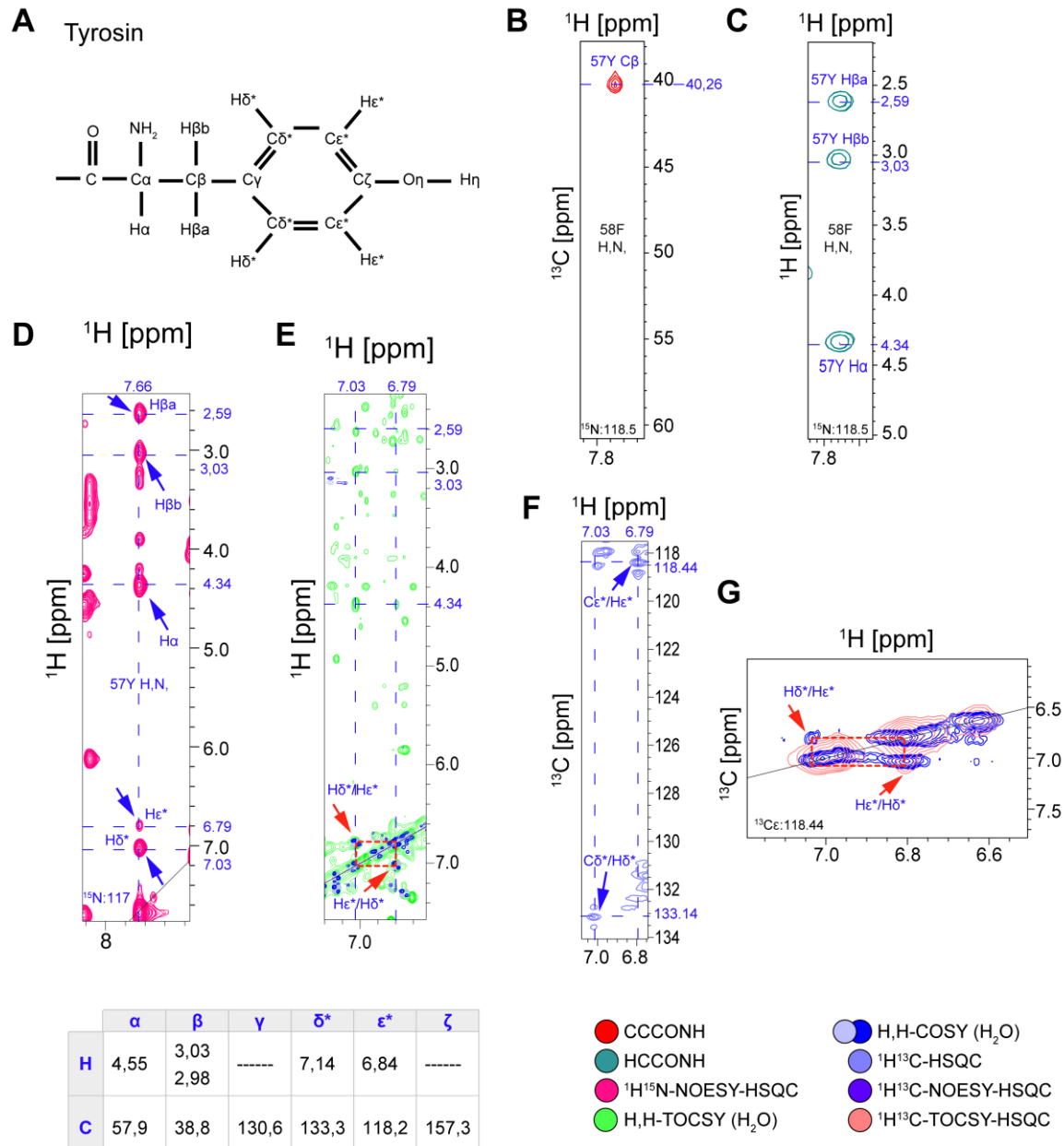


Abbildung 3.26 Zuordnung des Tyrosins 57 der NterFHA-Domäne mit weiteren 3D-Spektren

A: Struktur des Tyrosins nach IUPAC **B** Ausschnitt aus dem CCONH-Spektrum. Auf dem $\text{H}_\text{N}\text{N}_\text{H}$ -Streifen des Phe58 ist das $\text{C}\beta$ des Tyr57 zu sehen. **C** Ausschnitt aus dem HCCONH-Spektrum. Auf dem $\text{H}_\text{N}\text{N}_\text{H}$ Streifen des Phe58 sind das $\text{H}\alpha$ und die zwei $\text{H}\beta$ s des Tyr57 zu sehen. **D:** Dargestellt ist der $\text{H}_\text{N}\text{N}_\text{H}$ -Streifen des 57Y im $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -NOESY-HSQC-Spektrum mit den bereits zugeordneten Resonanzen: $\text{H}\alpha$, $\text{H}\beta\text{a}$ und $\text{H}\beta\text{b}$. Hinzu kamen die Signale des $\text{H}\delta^*$ sowie des $\text{H}\epsilon^*$. **E** Auf den Koordinaten des $\text{H}\delta^*$ sowie des $\text{H}\epsilon^*$ sind die zugeordneten Resonanzen wiederzuerkennen (gestrichelte Linien). In der Überlagerung des TOCSY-Spektrums (grün) mit dem COSY-Spektrum (blau) ist die Kopplung der Ringprotonen zu sehen (roter Kasten mit Pfeilen). **F** Im $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum konnten über die Ringprotonen die zugehörigen Kohlenstoff-Resonanzen zugeordnet werden (blaue Pfeile). **G** Auch in der Überlagerung der 3D-Spektren $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -TOCSY-HSQC (rosa)- sowie $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -NOESY-HSQC (dunkellila) ist die Kopplung der Ringprotonen zu detektieren.

Die 3D-Spektren ($^1\text{H}^{13}\text{C}$ -NOESY- sowie -TOCSY-HSQC) dienten dabei als Bestätigung einer richtigen Zuordnung. Auf der $\text{C}\epsilon^*$ -Resonanz von 118,4 ppm war bei dem $\text{H}\epsilon^*$ (6,79 ppm) das Kopplungssignal zum $\text{H}\delta^*$ (7,03 ppm) zu erkennen (Abbildung 3.26 G).

Da nicht alle Seitenkettenprotonen zugeordnet werden konnten und die Domäne über 18 Proline (ohne das Prolin aus dem GP-Überhang der PreScission-Schnittstelle) verfügt, lag die Vollständigkeit der Zuordnung der NterFHA-Domäne bei 93,4 %. Von den 177 Aminosäuren der NterFHA-Domäne waren, abzüglich der Proline, im $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC 159 Signale zu sehen (Abbildung 3.27). Jedes Signal konnte erfolgreich der zugehörigen Aminosäure zugeordnet werden.

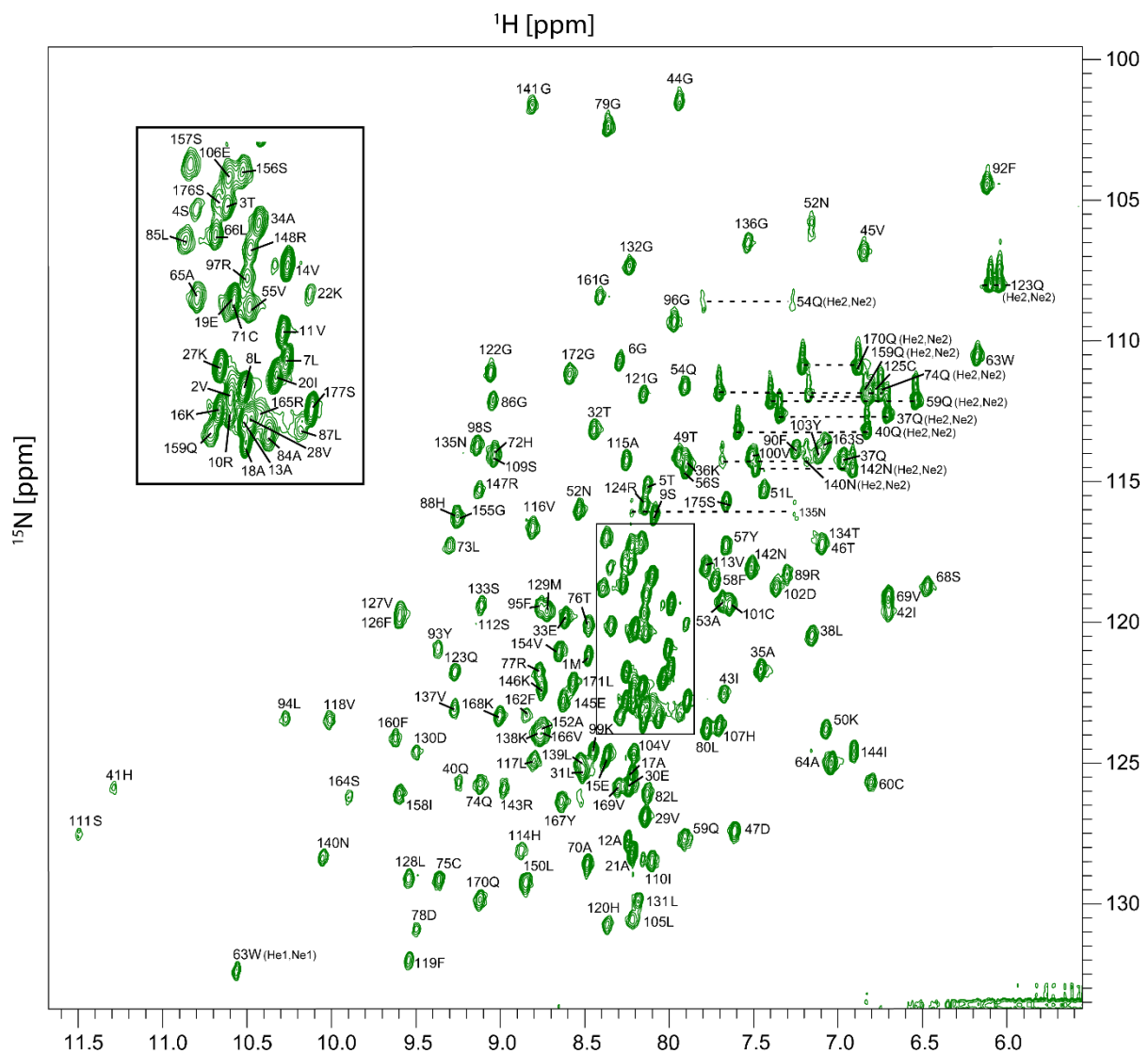


Abbildung 3.27 Vollständig zugeordnetes $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum der NterFHA-Domäne

Jedes Signal im Spektrum entspricht einer Aminosäure der Primärsequenz der NterFHA-Domäne. Nicht zu sehen sind Proline und das initiale GP der PreScission-Schnittstelle. Die Signale der Q und N Seitenketten-NHs sind durch gestrichelte Linien verbunden.

3.5.4 Sekundärstrukturanalyse der NterFHA-Domäne

Die Sekundärstrukturelemente wurden wie bei der PPIase-Domäne (Kapite 3.4.6) mit Hilfe des chemischen Verschiebungsindex, der Sekundärstrukturelement-charakteristischen NOE-Muster und der nichtaustauschenden H_N -Signale in deuterierter Umgebung definiert.

Wie in Abbildung 3.28 zu sehen, ist allen Parametern zur Folge ein langer Teil des N-Terminus (Aminosäure 1-32) unstrukturiert. Die erste Helix reicht von Glutamat 33 bis zum Asparagin 37 und ist über einen kurzen Loop (38L-41H) von der nächsten Helix (42I-45V) getrennt. Zwei Aminosäuren weiter folgt die dritte und längste Helix (48P-57Y), die über einen langen Loop (58F-70A) mit dem 7 Aminosäuren langen β -Faltblattstrang (71C-77R) verbunden ist. Der nächste Faltblattstrang befindet sich 4 Aminosäuren weiter und geht vom Leucin 82 bis zum Glycin 86. Der dritte Faltblattstrang umfasst den Abschnitt zwischen Phenylalanin 92 und Glycin 96. Darauf folgt ein Loop (97R-102D), an den der nächste Faltblattstrang (103Y-104V) angrenzt. Dieser ist 10 Aminosäuren (Loop: 105L-114H) vom fünften Strang (115A-120H) entfernt. Zwischen Strang 6 (125C-130D) und 7 (137V-139L) liegt ein weiterer Loop (131L-136G). Für diesen deutete die CSI-Analyse auf eine Helix hin. Da jedoch die NOEs zwischen dem $H_{\alpha i}$ und dem H_N von Aminosäure $i+4$ ($d\alpha N(i, i+4)$) fehlten und die Signale ($dNN(i, i+1)$) relativ schwach waren, waren die Kriterien für eine Definition als Helix nicht erfüllt. Gleiches trifft für den Bereich zwischen Isoleucin 110 und Histidin 114 zu. Die Faltblattstränge 8 (142N-143R) und 9 (149P-150L) sind nur zwei Aminosäuren lang und durch einen kurzen Loop (144I-148R) voneinander getrennt. Ausschlaggebend für die Definition der zuletzt erwähnten β -Faltblattstränge war die identifizierte Wasserstoffbrücke zwischen dem Leucin 128- H_N (aus β_6) und dem Leucin 150-Sauerstoff. Die zwei letzten Faltblattstränge erstrecken sich von Glycin 155 bis Phenylalanin 160 und von Valin 166 bis Leucin 171. Insgesamt umfasst die NterFHA-Domäne 3 α -Helices und 11 β -Faltblattstränge.

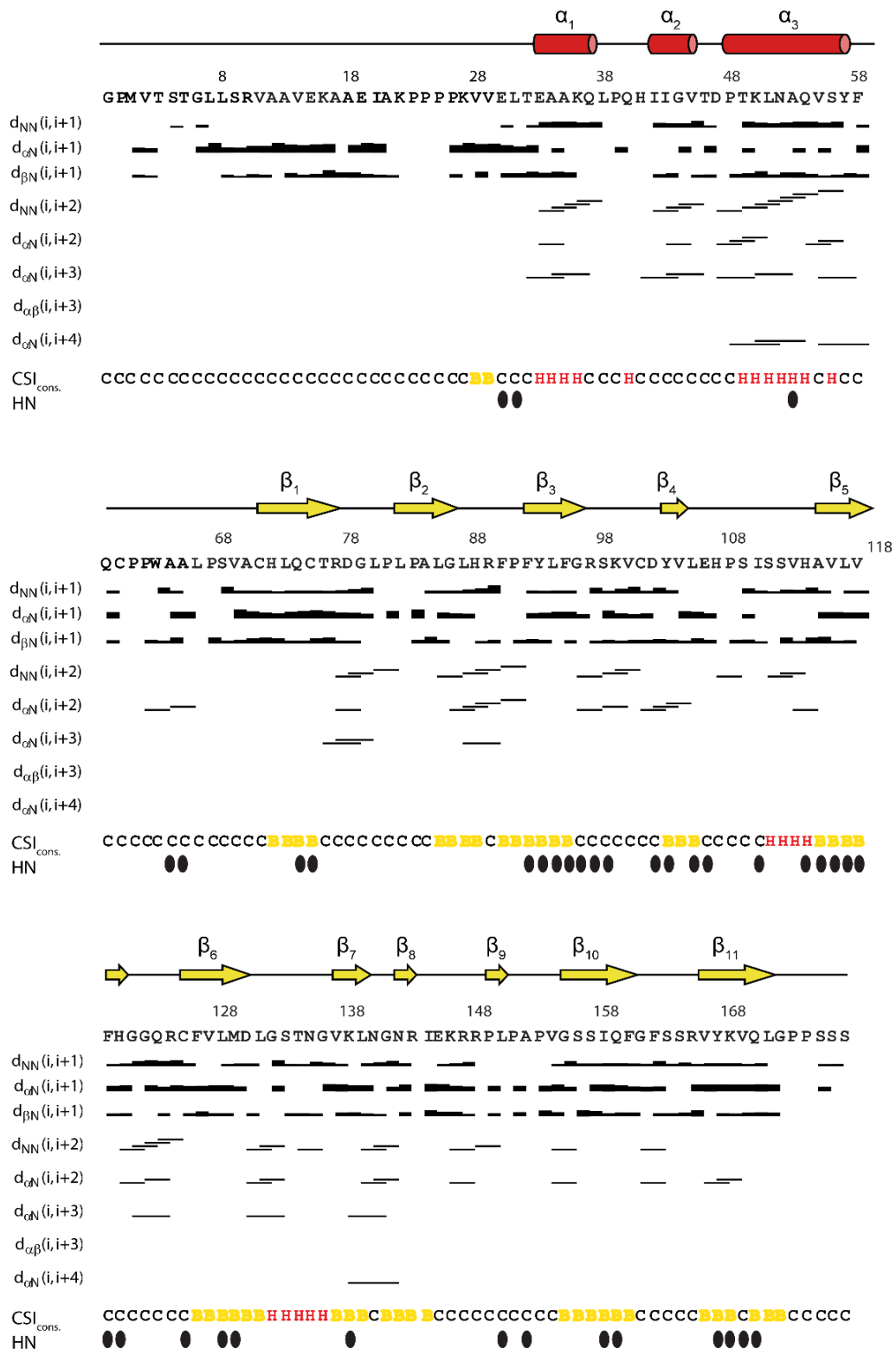


Abbildung 3.28 Definition der Sekundärstrukturelemente der NterFHA-Domäne

Über der *Tb*Par42-NterFHA-Sequenz im Einbuchstabencode sind mit Zylinderformen die Helices dargestellt und mit Pfeilen die Faltränge. Unter der Sequenz sind typische NOE-Muster für Helices und Falträtter abgebildet. Je dicker ein Balken ist, desto intensiver ist das NOE-Signal. Die linke Spalte zeigt die Verbindungen zwischen den Protonen der einzelnen Aminosäuren. Der Konsensus des chemischen Verschiebungsindex CSI_{cons.} ist in der vorletzten Reihe zu sehen. Ein rotes H steht für Helix, ein gelbes B für β -Falträtter und ein schwarzes C für *random coil*. Die schwarzen Punkte in der letzten Reihe beschreiben die Rückgrat-Amidprotonen, die 180 Minuten nach Aufnahme in D₂O noch zu sehen waren.

3.5.5 Strukturrechnung der NterFHA-Domäne

Von insgesamt 3843 NOEs aus den zwei- und dreidimensionalen ^{15}N -NOESY-Spektren, die in CYANA eingelesen wurden, wurden über die automatische NOE-Zuordnung 2667 Abstandsinformationen für die Strukturrechnung genutzt. Die Gesamtzahl der eingesetzten Winkel betrug 262. 42 Aminosäuren wurden mit dem D_2O -Austauschexperiment als Wasserstoffbrücken-Donoren (beigefügte CD) identifiziert. In Tabelle 3.2 sind die Strukturrechnungsdaten der NterFHA-Domäne zusammengefasst.

Tabelle 3.2 Statistik des mit Cyana 2.1 berechneten Ensembles aus 10 *TbPar42*-NterFHA-Strukturen

NOE-Abstandsbeschränkungen	
Gesamtzahl der eingesetzten NOE-s	2667
Intraresidual und Sequentiell $ i-j \leq 1$	1724
mittlere Entfernung, $1 < i-j < 5$	359
Weitreichend $ i-j \geq 5$	584
Gesamtzahl der Torsionswinkel	262
Φ -Winkel	131
Ψ -Winkel	131
Wasserstoffbrücken	42
Ramachandran Plot-Regionen (% aller Aminosäuren)	
Favorisiert	80,1
Erlaubt	19,9
Großzügig erlaubt	0,1
Außerhalb liegend	0

Von 60 gerechneten Strukturen sind 10 Strukturen mit der besten Zielfunktion in Abbildung 3.29 A dargestellt.

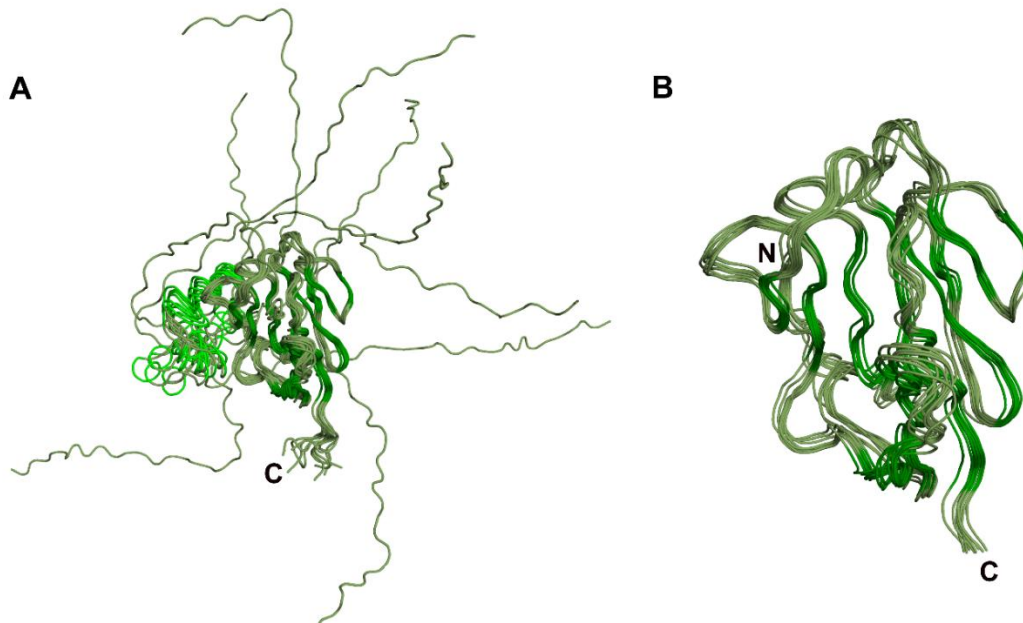


Abbildung 3.29 Ribbon-Darstellung der 10 besten NterFHA-Strukturen

Dargestellt sind die 10 Strukturen, die nach der Strukturrechnung den kleinsten Zielfunktionswert hatten. N und C markieren die Termini. **A:** NterFHA₁₋₁₇₇ **B:** β -Faltblatt-Kern der NterFHA-Domäne (NterFHA₅₈₋₁₇₃)

Der RMSD-Wert über dem Rückgrat der kompletten NterFHA Domäne (Aminosäuren 1-177) lag mit 12,53 Å sehr hoch. Wie die Überlagerung der 10 besten Strukturen in Abbildung 3.29 A zeigt, sind die größten Abweichungen zwischen den Strukturen auf den N-terminalen Bereich des Proteins zurückzuführen. Wird der helikale Bereich und vor allem der flexible N-Terminus von der Berechnung der RMSD ausgenommen, so sinkt die RMSD über dem Proteinrückgrat (Aminosäure 58-173) auf 0,33 Å (Abbildung 3.29 B).

Wie im Ramachandran-Plot zu sehen ist, befanden sich trotz des divergierenden N-Terminus in den 10 Strukturen keine Torsionswinkel in unerlaubten Regionen. Fast alle Winkel lagen in favorisierten (80,1 %) und erlaubten (19,9 %) Regionen. Nur 0,1 % der Ψ - und Φ -Winkel waren in großzügig erlaubten Regionen zu finden.

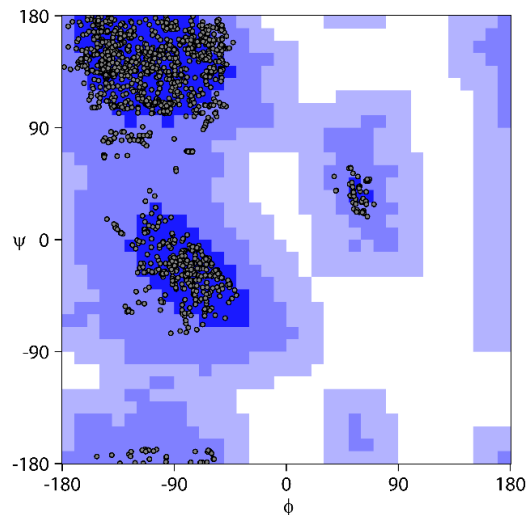


Abbildung 3.30 Ramachandran-Plot für die 10 besten NterFHA-Domäne-Strukturen

80,1 % der Φ - und Ψ -Winkel sind in favorisierten Bereichen zu finden. 19,9 % der Winkel kommen in erlaubten Regionen vor und 0,1 % der Winkel sind in großzügig erlaubten Regionen vorzufinden.

Die *Cartoon*-Darstellung der Struktur lässt klar erkennen, dass die ersten 30 Aminosäuren des N-Terminus unstrukturiert sind (Abbildung 3.31 A). Über den weiteren 30 Aminosäuren sind 3 Helices verteilt (Abbildung 3.31 B). Die längste Helix (α_3) liegt auf der konvexen Seite der Stränge β_3 , β_4 und β_5 . Diese bilden zusammen mit den Strängen β_6 und β_7 das erste Faltblatt. Bis auf β_4 sind die Stränge antiparallel ausgerichtet. Auf der gegenüberliegenden Seite befindet sich das zweite und etwas längere Faltblatt, bestehend aus 6 antiparallel verlaufenden Strängen (β_2 , β_1 , β_{11} , β_{10} , β_7 und β_8).

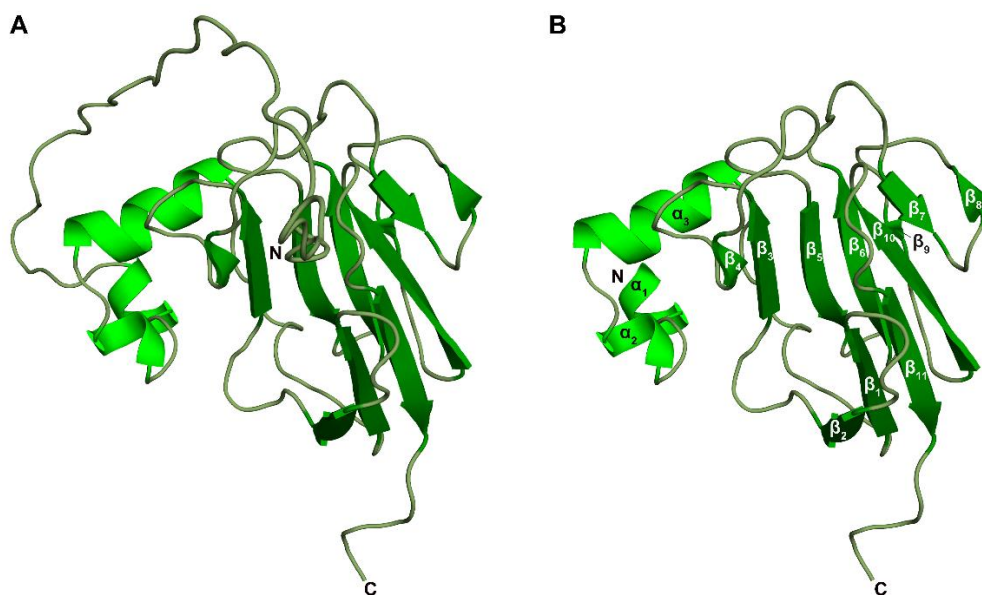


Abbildung 3.31 *Cartoon*-Darstellung der NterFHA₁₋₁₇₇ und NterFHA₃₃₋₁₇₇

A: Zu sehen ist die komplette NterFHA-Domäne einschließlich des initialen GP-Überhanges aus der PreScission-Schnittstelle. Klar zu erkennen ist der flexible N-Terminus. **B:** Abgebildet ist die Struktur NterFHA₃₃₋₁₇₇ ohne N-Terminus mit beschrifteten Sekundärstrukturelementen.

Die β -Faltblätter nehmen eine „Sandwich“-Anordnung ein, mit der geringsten Distanz zwischen den Faltblattsträngen β_6 und β_7 .

In der NOE-Verteilung pro Aminosäure (Abbildung 3.32) wird deutlich, dass der N-Terminus inklusive der zwei kleinen Helices (AS 1-47) nicht in die kompakte Faltung der Domäne eingebunden ist, da ausgehend von diesen Aminosäuren keine weitreichenden Kreuzsignale zu sehen sind. Dagegen verfügt Glutamin 54 in der Helix3 über 40 NOEs. Der Kontakt von Q54 zu Phenylalanin 92 und Leucin 94 im dritten Faltblattstrang sowie zu Valin 100, Cystein 101 und Aspartat 102 im Loop zwischen β_3 und β_4 ist für die nahe Ausrichtung der Helix zum kürzeren β -Faltblatt verantwortlich.

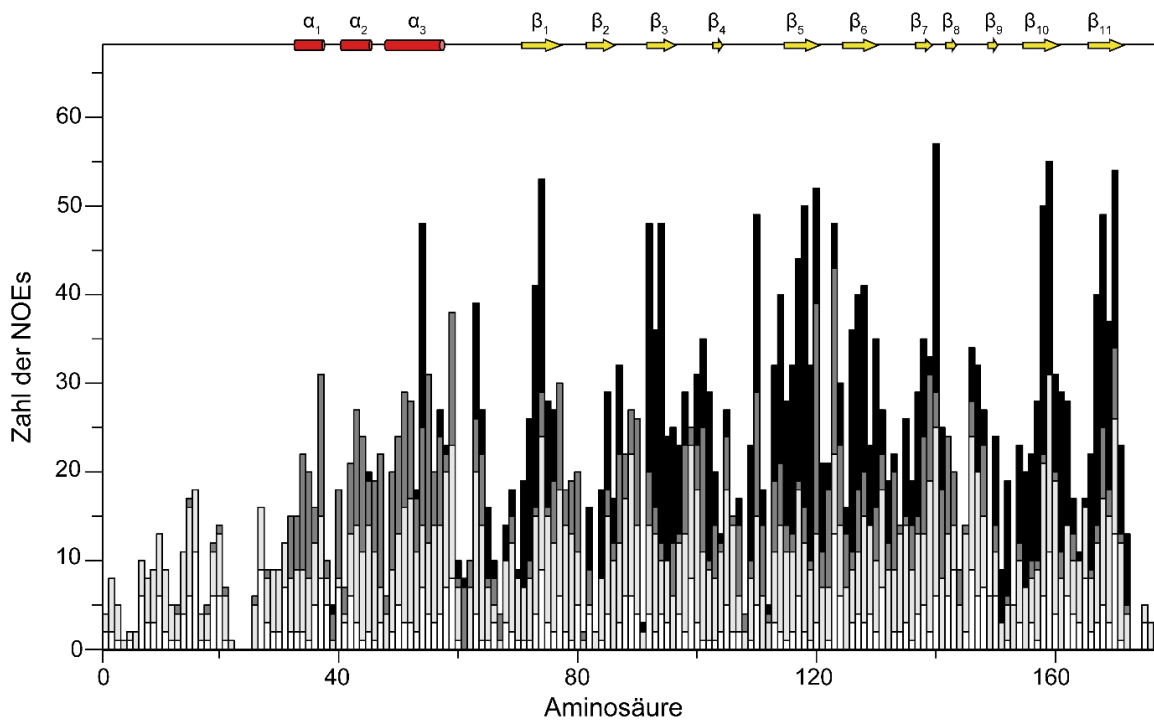


Abbildung 3.32 Anzahl und Art der NOEs pro Aminosäure

Rote Zylinder stellen Helices und gelbe Pfeile die β -Faltblattstränge der NterFHA-Domäne dar. Weiße Balken markieren intraresiduale Kopplungen. Die dunkelgrauen Balken entsprechen den mittelreichenden Kopplungen und die schwarzen Balken stellen die weitreichenden Kopplungen dar. Bei den zwei Lücken im Plot, von denen keine NOEs ausgehen, handelt es sich um nicht zugeordnete Proline aus dem Polyprolin-Sequenzbereich. Erstellt mit CYANA.

3.5.6 Dynamik der *TbPar42*-NterFHA-Domäne

Um die Dynamik der NterFHA-Domäne zu untersuchen, wurden, wie in Kapitel 3.4.8 beschrieben, die transversale und longitudinale Relaxationsrate (R_1 und R_2), sowie der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -hetNOE analysiert (Abbildung 3.33).

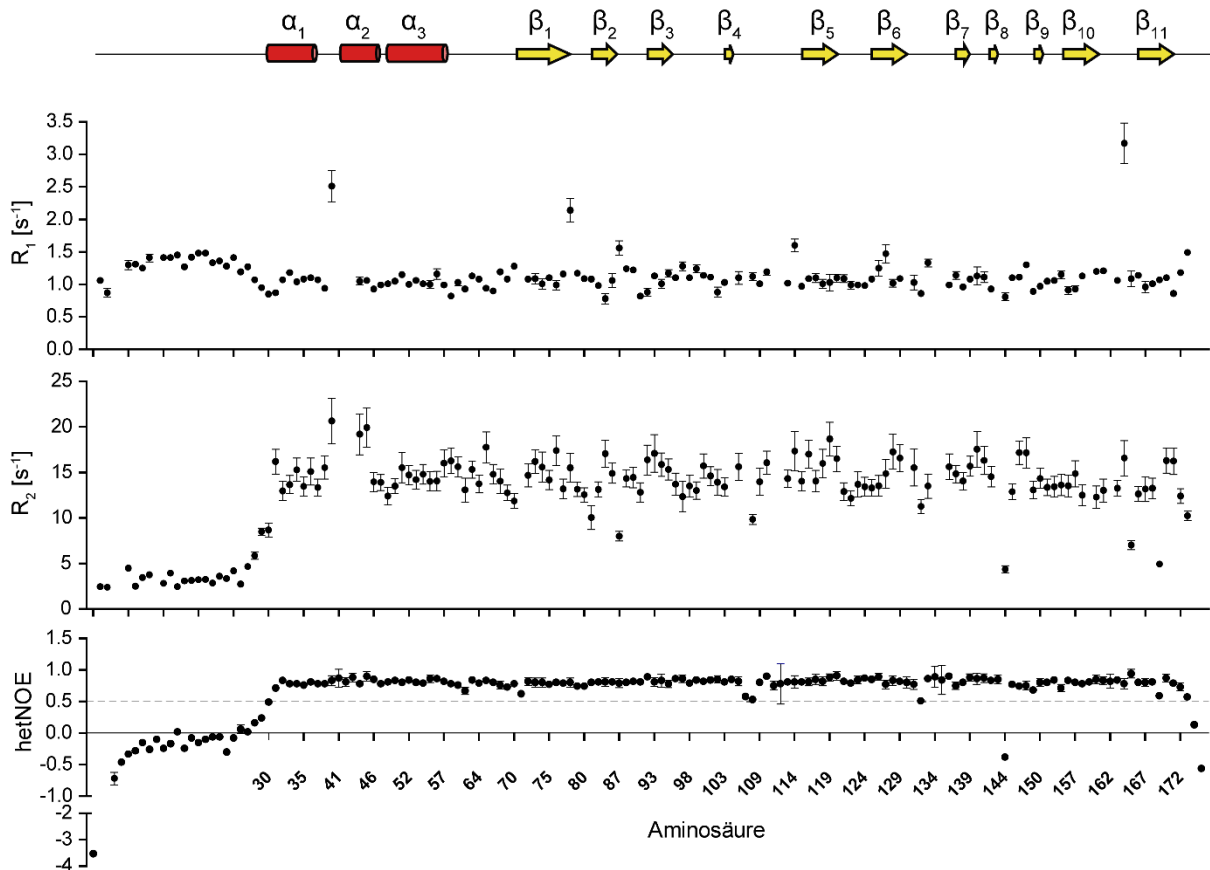


Abbildung 3.33 Relaxationsraten R_1 und R_2 und der $^1H^{15}N$ -hetNOE der NterFHA-Domäne

Oben ist die Sekundärstrukturverteilung der NterFHA-Domäne abgebildet. Helices sind als rote Zylinder und β -Stränge als gelbe Pfeile dargestellt. Darunter sind die longitudinale Relaxationsrate (R_1), die transversale Relaxationsrate (R_2) und der $^1H^{15}N$ -hetNOE über die Aminosäuresequenz geplottet. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen der Fits.

Die ermittelten Werte zeigen, dass die ersten 30 Aminosäuren des Proteins sehr flexibel sind. Der helikale Bereich (E33-Y57) ist jedoch gleichermaßen rigide wie der Rest der Domäne bestehend aus β -Faltblättern. Etwas flexibler sind lediglich die Loops zwischen β_4 - β_5 und β_6 - β_7 . Das Isoleucin 144 führt zudem zur Fluktuation in dem Loop zwischen β_8 - β_9 . Die negativ werdenden Werte der letzten C-terminalen Aminosäuren im hetNOE sprechen für ein flexibles Ende der NterFHA-Domäne.

Von der Berechnung der Rotationskorrelationszeit mit den gemittelten T_1 - und T_2 -Zeiten wurden die flexiblen Termini sowie die Aminosäuren mit einem negativen hetNOE ausgeschlossen. Die Berechnung ergab einen Wert von 9,43 ns. Mit Hilfe des τ_c -Wertes wurde ein Molekulargewicht von 15,41 kDa berechnet. Daraus lässt sich schließen, dass die NterFHA-Domäne von *TbPar42* unter den gegebenen Messbedingungen (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,26; $c=600 \mu M$, $T=27 \text{ }^\circ C$) als Monomer vorliegt.

3.6 Untersuchung des Linkers von *TbPar42*

Wie zu Beginn erwähnt, ist das 42 kDa große Parvulin aus *T. brucei* ein Mehrdomänenprotein. In den vorherigen Kapiteln wurden die terminalen Domänen strukturell analysiert, nun soll zuletzt auf die Struktur des 95 Aminosäuren langen Linkers (172-266E) eingegangen werden.

3.6.1 Expression und Reinigung des Linkers

Der Linker wurde als GST-Fusionsprotein in *E. coli* bei 37°C über Nacht exprimiert. Nach dem Aufschließen der Zellen konnte das Fusionsprotein über eine GST-Affinitätschromatographie erfolgreich von den restlichen Proteinen im Überstand separiert werden. Der GST-Tag wurde durch Zugabe der PreScission-Protease abgetrennt und der Linker mittels Gelfiltration mit nachgeschalteter GSH-Säule isoliert. Da der 10,3 kDa große Linker über keine aromatischen Aminosäuren verfügt, wurde die Reinigung über die Absorption der Peptidbindung bei 214 nm verfolgt. Im Chromatogramm in Abbildung 3.34 A sind 4 Signale zu sehen. Die Fraktionen der ersten zwei Signale zeigen in dem SDS-Gel eine schwache Bande bei 70 kDa. Da eine GSH-Säule an die Gelfiltrationssäule nachgeschaltet war, blieb der GST-Tag an der Affinitätssäule gebunden. Das letzte Signal gehört zum Glutathion, welches noch im Puffer der eingesetzten Probe vorhanden war und aufgrund des geringen Molekulargewichts nicht im SDS-Gel erscheint. Das dritte Signal zeigt eine deutliche Bande bei ca. 18 kDa. Da keine der Fraktionen eine Bande bei der zu erwartenden Größe des Linkers zeigte, wurde aus der Fraktion des dritten Signals (P) eine Probe für die MALDI-TOF-Analyse vorbereitet.

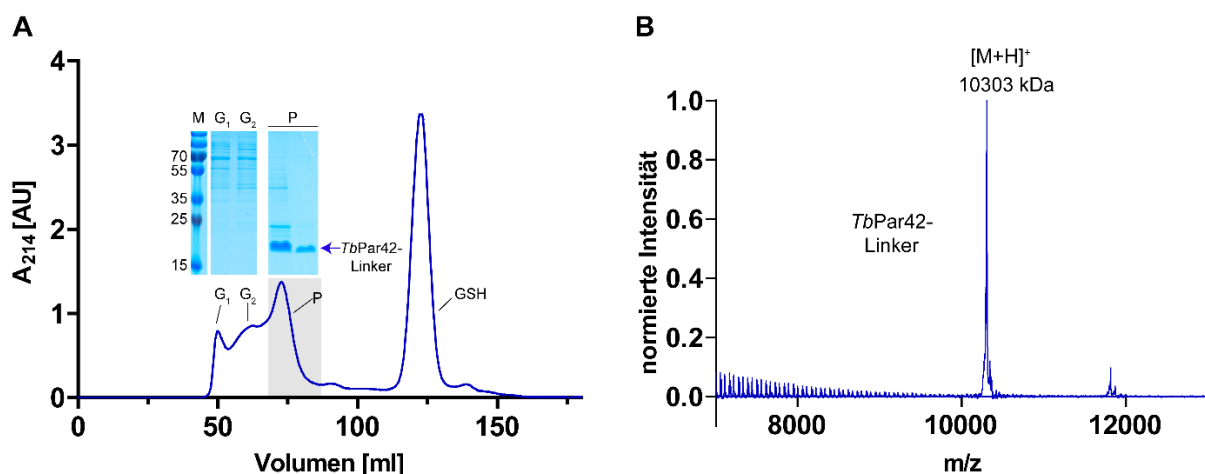


Abbildung 3.34 Gelfiltrationslauf und MALDI-TOF-Massenspektrum des *TbPar42*-Linkers

A: Chromatogramm der Gelfiltration des Linkers mit dem dazugehörigen SDS-Gel. Die Fraktionen des Signals (P) zeigen im Gel eine Bande bei 18 kDa. **B:** Das Massenspektrum zeigt ein Signal, dass der erwarteten Masse des *TbPar42*-Linkers entspricht.

Im Massenspektrum (Abbildung 3.34 B) ist ein eindeutiges Signal bei 10,3 kDa zu sehen, welches der einfach geladenen Form des Linkers entspricht. Somit konnte bestätigt werden,

dass der Linker bei einem Volumen zwischen 70 und 85 ml von der Säule eluiert und im Gel bei 18 kDa anstelle der erwarteten 10 kDa zu sehen ist.

3.6.2 Strukturelle Charakterisierung des Linkers

Für die strukturelle Untersuchung des Linkers wurde das Protein isotopenmarkiert exprimiert und gereinigt. Wie für die zuvor beschriebenen Domänen wurde auch der Linker im NMR-Puffer ohne Reduktionsmittel untersucht. Das $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum des Linkers ist in Abbildung 3.35 in Orange zu sehen.

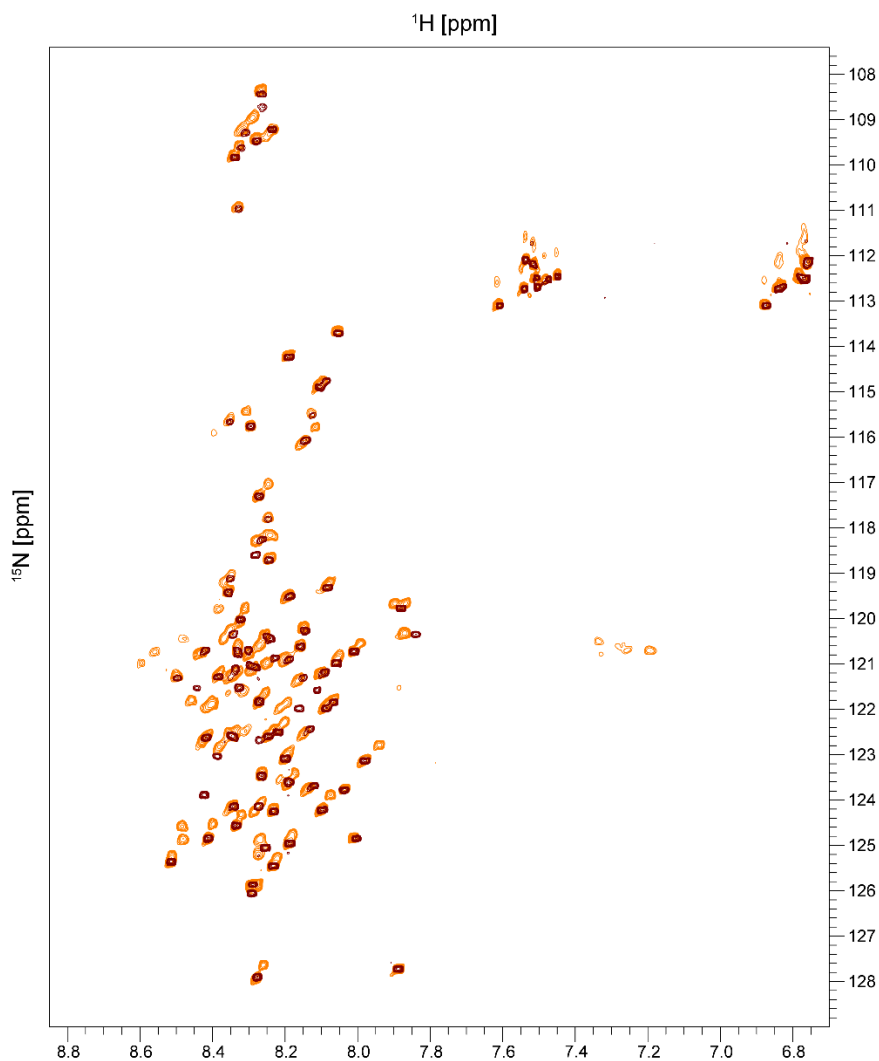


Abbildung 3.35 $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum des Linkers

In Orange dargestellt ist das $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum des Linkers in reduktionsmittelfreiem NMR-Puffer. In Dunkelrot zu sehen ist das $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum im NMR-Puffer mit 2 mM DTT.

Die Signalverteilung der Rückgrat-HNs auf 1 ppm in der Protonendimension deutet auf ein unstrukturiertes Protein hin. Bei der Zuordnung der Rückgratresonanzen mit den komplementären Spektren HNCACB/CBCACONH und HNCO/HNCO fiel auf, dass für einige Aminosäuren mehrere Signale vorlagen, wohingegen Signale für Sequenzbereiche um das

Cystein 196 und Cystein 249 komplett fehlten. Dieses lieferte Hinweise auf eine mögliche artifizielle Multimerisierung des Linkers über Disulfidbrücken. Die wiederholte Aufnahme eines $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums im NMR-Puffer mit zusätzlichen 2 mM DTT zeigte eine geringere Signalanzahl als die in einer reduktionsmittelfreien Umgebung (Abbildung 3.35, dunkelrotes Spektrum). Somit konnten die zusätzlichen Signale in den Spektren ohne DTT durch das Vorhandensein einer Mischpopulation aus monomerer und multimerer Form des Linkers erklärt werden. Nach Zugabe des Reduktionsmittels wurde das Gleichgewicht zu Gunsten des Monomers verschoben. Als Resultat wurden auch die Regionen um die zwei Cysteine in den Spektren sichtbar (Daten nicht gezeigt).

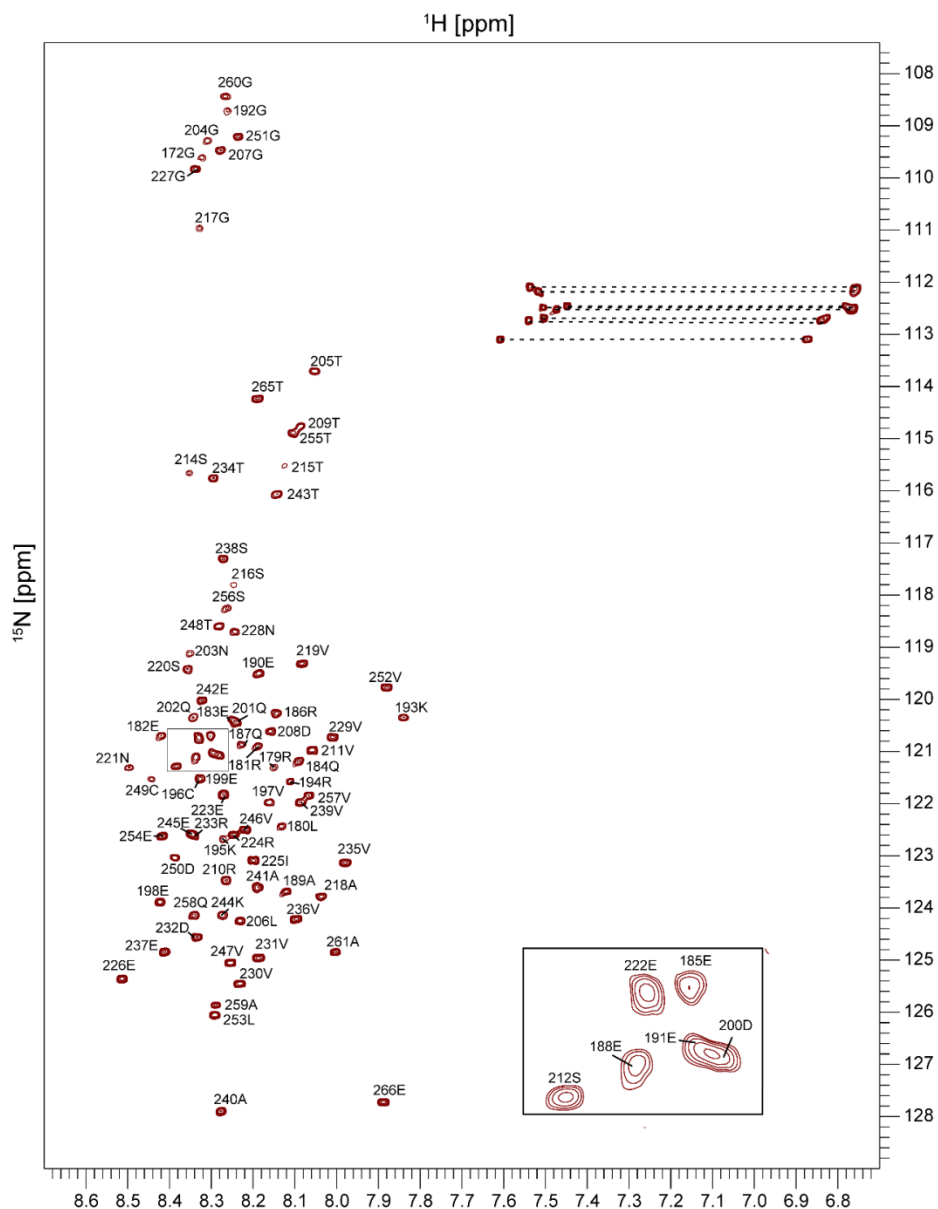


Abbildung 3.36 Zugeordnetes $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum des Linkers

Nicht zugeordnet sind der vordere Bereich 174P-178K sowie die Seitenketten-HNs von Asparagin und Glutamin. Der NMR-Puffer war mit 2 mM DTT versehen.

Für das 95 Aminosäuren lange Proteinfragment waren im $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum 89 Signale abzüglich der 6 Proline zu erwarten. Von diesen konnten bis auf den N-terminalen Bereich zwischen 174P-178K alle Rückgratssignale im $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum der monomeren Form des Linkers im NMR-Puffer mit 2 mM DTT zugeordnet werden (Abbildung 3.36). Die Vollständigkeit der Zuordnung betrug für H_N : 96,63 %, N_H : 96,6 %, CO : 78,94 %, $\text{C}\alpha$: 90,5 % und $\text{C}\beta$: 90,8 %.

3.6.3 Sekundärstrukturanalyse des Linkers

Mit den zugeordneten $\text{C}\alpha$ -, $\text{C}\beta$ - und CO -Resonanzen wurde zur Sekundärstrukturbestimmung eine Analyse nach Wishart durchgeführt.

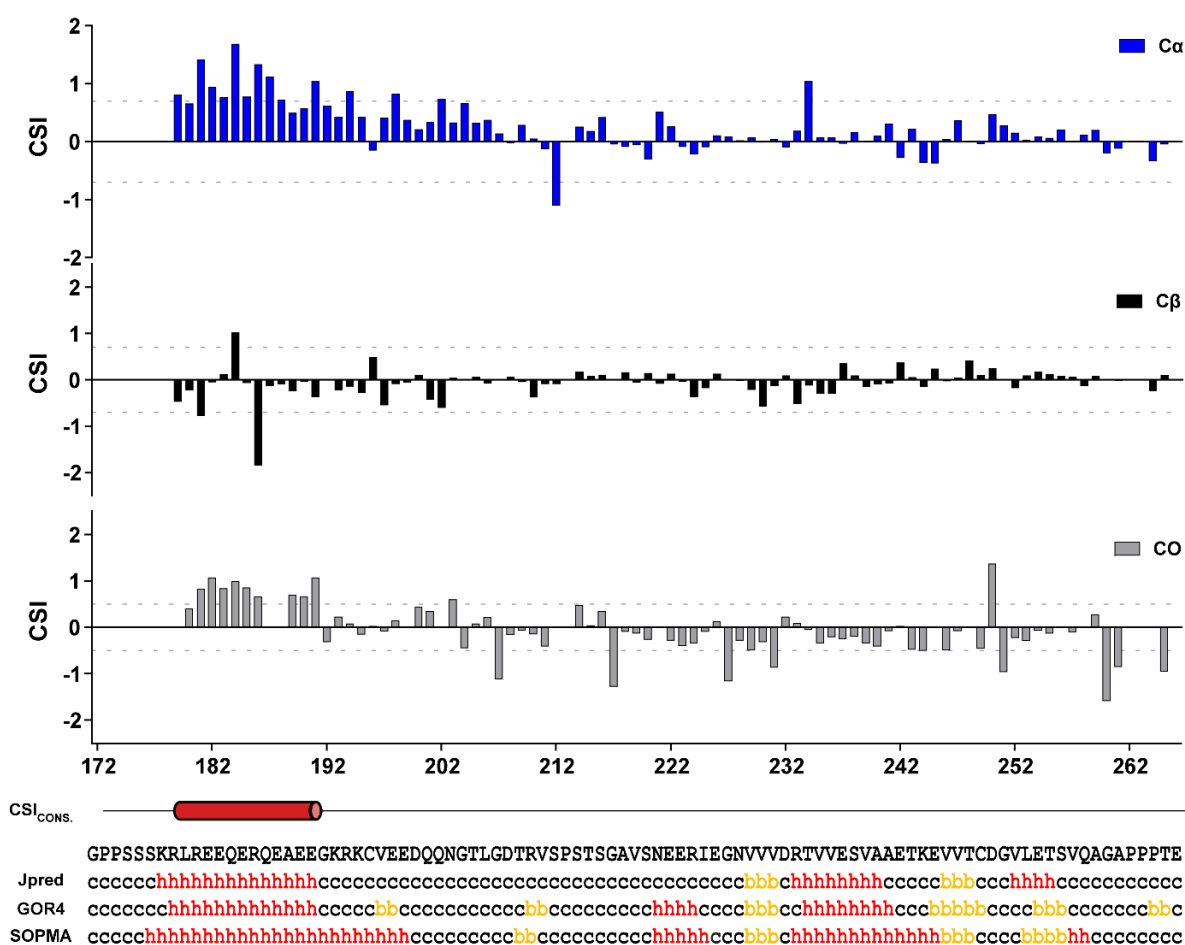


Abbildung 3.37 Chemischer Verschiebungsindex (CSI) für den Linker

Untereinander dargestellt sind die berechneten CSI-Werte für $\text{C}\alpha$ (blau), $\text{C}\beta$ (schwarz) und CO (grau). Darunter ist der ermittelte Konsensus des CSI zu sehen. Aufgrund der Differenzen der chemischen Verschiebungen des $\text{C}\alpha$ und CO zu den *random coil*-Werten befindet sich am N-Terminus zwischen 179R-265T eine Helix (roter Zylinder). Über den Sekundärstrukturvorhersagen von Jpred, GOR4 und SOPMA ist die Sequenz des Linkers im Einbuchstabencode zu sehen. Alle Algorithmen sagen für den N-terminalen Bereich eine Helix voraus (mit rotem Buchstaben h dargestellt). Den Programmen nach zu urteilen, sind zudem einige kurze β -Stränge in dem Protein vertreten sowie eine weitere Helix am C-Terminus. Dieses konnte mit den ermittelten CSI-Werten nicht bestätigt werden.

Wie in Kapitel 3.4.6 beschrieben, werden dafür die ermittelten chemischen Verschiebungen mit denen aus kurzen unstrukturierten Peptiden verglichen. In α -Helices besitzen die C α und CO-Resonanzen eine positive Abweichung ($>+0,7$ ppm für C α und $>+0,5$ für CO) zu den *random coil*-Verschiebungen, wohingegen C β - und H α -Resonanzen zu mehr als $-0,7$ ppm bzw. $-0,1$ von den Referenzwerten abweichen. In β -Faltblättern verhält sich diese Verteilung genau entgegengesetzt. In Abbildung 3.37 ist die Wishart-Analyse des Linkers für die Aminosäuren 179R-265T zu sehen. Anhand aller CSI-Werte ist zu erkennen, dass das Protein größtenteils unstrukturiert ist. Nur im vorderen Proteinabschnitt kann aufgrund der C α - und CO-CSI-Werte eine α -Helix (179R-193G) definiert werden. Die CSI-CO-Werte deuten im Bereich zwischen 227G-231V auf einen β -Strang hin, jedoch wurde dieses durch den chemischen Verschiebungsindex der C α - und C β -Resonanzen nicht bestätigt. Da die Zuordnung der Linker-Resonanzen nicht vollständig war und die Wishart-Analyse ohne die H α -Resonanzen durchgeführt wurde, wurde die Analyse beruhend auf den chemischen Verschiebungen mit sequenzbasierten Sekundärstrukturvorhersagen (Jpred [50], GOR4 [71, 72] und SOPMA [74]) verglichen. Die N-terminale Helix wird von allen Programmen erkannt, variiert jedoch in der Sequenzlänge. GOR4 und SOPMA zeigen von 222N-225R/226I eine weitere Helix, die von der Vorderen durch kurze β -Stränge unterbrochen wird. Allen gemeinsam ist die Vorhersage eines 3 Aminosäuren langen β -Stranges von Valin 230 bis Valin 232 sowie einer Helix zwischen 234R und 242A. Bei der SOPMA-Vorhersage ist die zuletzt erwähnte Helix bis zum nächsten β -Strang (247V-249T) verlängert, wohingegen bei den Jpred- und GOR4-Vorhersagen eine kurze Loopregion dazwischen liegt. Im C-terminalen Abschnitt unterscheiden sich die Vorhersagen. Bei Jpred ist als letztes Element eine Helix zu finden (253V-256T), bei GOR4 werden zwei kurze β -Faltblattstränge (254L-256T) und (265P-266T) erkannt und SOPMA schließt die Strukturvorhersage mit einem β -Strang (254L-257S) und einer daran angrenzenden Helix (258V-259Q) ab.

3.6.4 Strukturmodell des Linkers mit CS-Rosetta

Mit den zugeordneten Rückgatesonanzen wurde mit Hilfe des CS-Rosetta-Servers ein Modell des Linkers erzeugt [220, 221]. In Abbildung 3.38 ist exemplarisch ein Modell des Linkers dargestellt. Die generierte Struktur zeigt ein flexibles Protein mit fünf Helices. Die erste Helix (α_1 : 179R-197V) stimmt mit den sequenzbasierten Sekundärstrukturvorhersagen sowie mit der Wishart-Analyse überein. Nach einem langen unstrukturierten Bereich folgt die zweite Helix (α_2) von Glycin 217 bis Isoleucin 225. Im gleichen Bereich wird auch von den Programmen GOR4 und SOPMA eine Helix vorhergesagt. Die dritte Helix (α_3 : 235V-242E) wird von den Algorithmen der Vorhersageprogramme erkannt, konnte jedoch über die Wishart-Analyse nicht bestätigt werden. Am C-Terminus befindet sich im Modell eine weitere helikale Windung (α_4 : 246V-248T) und eine zusätzliche kurze Helix (α_5 : 253L-259A). In dieser Region

unterscheiden sich Vorhersagen der genutzten Programme und der Wishart-Plot deutete eher auf eine *coil*-Region hin. Die hier präsentierte Struktur ist nur eine der 10 ausgegebenen Strukturen der CS-Rosetta-Berechnung. Die Weiteren unterscheiden sich in der Ausrichtung, der Anordnung und Länge der Sekundärstrukturelemente (Daten nicht gezeigt). Allen gemeinsam ist jedoch, dass sie nur aus helikalen und unstrukturierten Anteilen bestehen. Anders als von den Programmen vorhergesagt, war in keinem der Modelle ein β -Strang vorhanden.

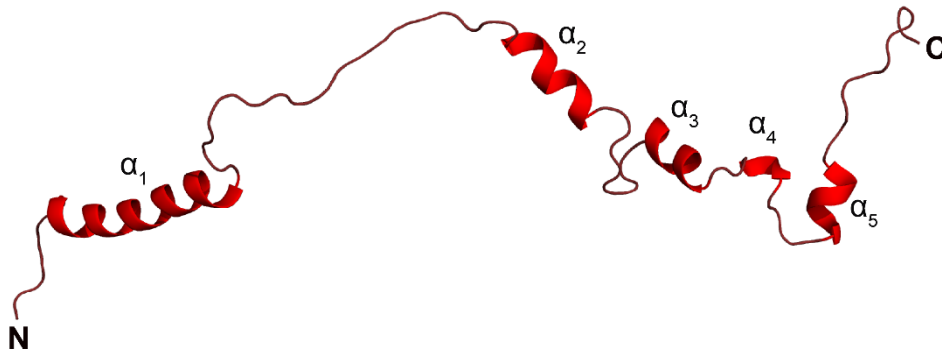


Abbildung 3.38 CS-Rosetta-Modell des Linkers

Gezeigt ist eine mögliche Linker-Struktur nach der CS-Rosetta-Rechnung in *cartoon*-Darstellung. Beschriftet und in Rot dargestellt sind die Helices. Angezeigt werden 5 Helices, von denen die erste lange Helix (179R-197V) mit den Sekundärstrukturvorhersagen und den ermittelten CSI-Werten übereinstimmt.

3.7 Vergleich der isolierten Domänen mit dem vollständigem *TbPar42*-Protein

Nachdem sowohl der N-Terminus mit der FHA-Domäne, die PPlase-Domäne und schließlich der Linker NMR-spektroskopisch untersucht wurden, lagen von allen Konstrukten zugeordnete $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren vor. Über einen Vergleich der einzelnen HSQC-Spektren mit dem TROSY-Spektrum des vollständigen Proteins sollte analysiert werden, ob die Domänen im Protein interagieren. Wenn dem so wäre, dann würde die chemische Verschiebung der Interface-Signale im vollständigen Protein von denen in isolierten Konstrukten abweichen.

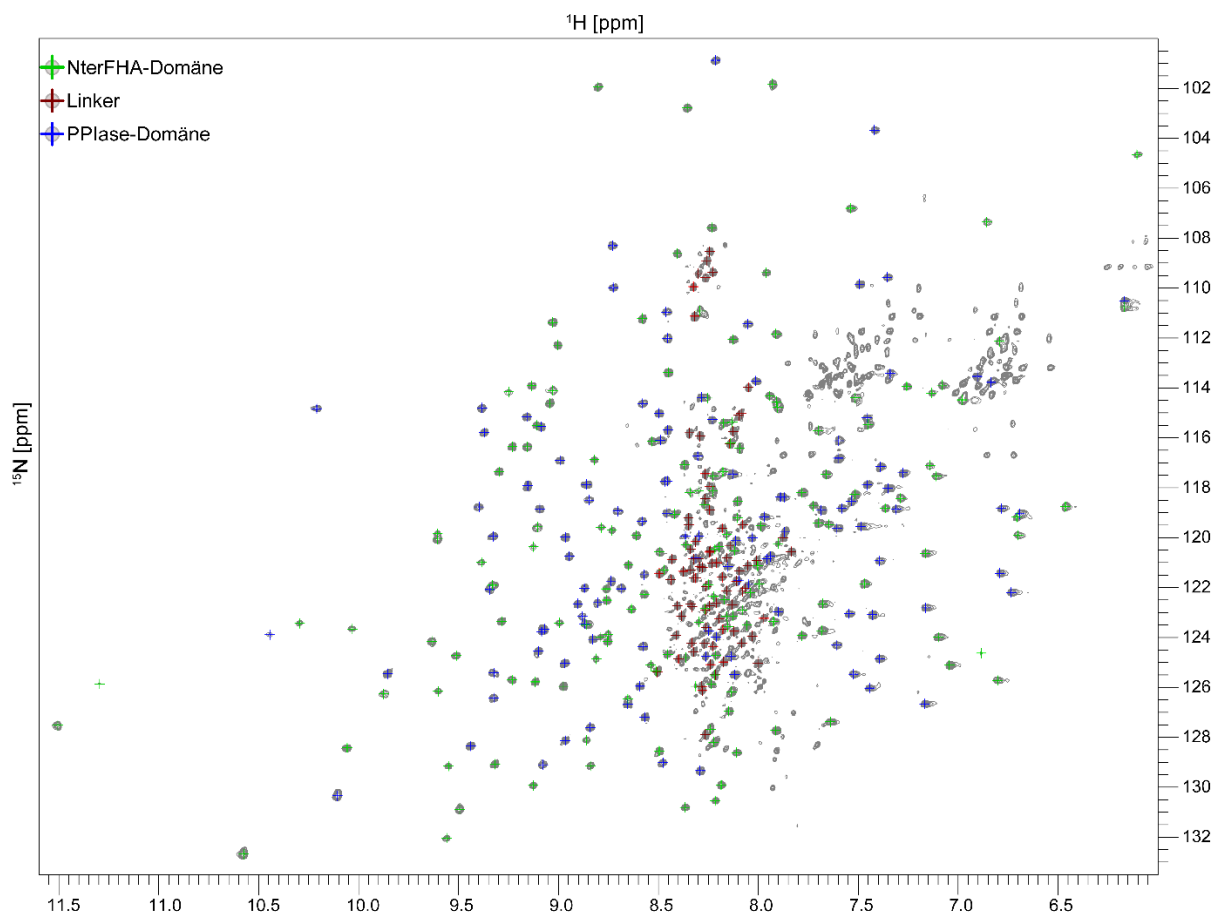


Abbildung 3.39 Übertragung der Zuordnung der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren auf das TROSY-Spektrum
Die Signale, die zur NterFHA-Domäne gehören, sind mit einer grünen Markierung versehen. Die Signale des Linkers sind in dunkelrot und die der PPlase-Domäne in blau dargestellt.

Die Signale der NterFHA-Domäne (grün in Abbildung 3.39) überlagern sehr gut mit denen des TROSY-Spektrums des vollständigen Proteins. Von den 159 Signalen, die im HSQC-Spektrum vorhanden waren, konnten bis auf das Arginin 10 am N-Terminus und die zwei C-terminalen Serine alle Signale auf das TROSY-Spektrum übertragen werden. Auch die Signale des Linkers (dunkelrot) wichen kaum von denen des TROSY-Spektrums ab. Nur das N-terminale Lysin 178 sowie das C-terminale Threonin 265 konnten nicht im TROSY gefunden werden. Bei der PPlase stimmten bis auf 2 Anfangsaminosäuren alle Signale des $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQCs mit den TROSY-Signalen überein. Insgesamt konnten durch die Kombination der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren aller Konstrukte von den 358 Aminosäuren des vollständigen *TbPar42*-Proteins im TROSY 353 Signale zugeordnet werden. Es fehlten lediglich das N-terminale Arginin 10, die drei Signale S176, S177, K178, die sich zwischen der NterFHA-Domäne und dem Linker befinden, sowie das Threonin 265, welches am C-Terminus des Linkers oder am N-Terminus der PPlase liegt. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die Domänen im *TbPar42*-VL Protein unabhängig voneinander agieren.

3.8 Funktionelle Charakterisierung der PPlase-Domäne

Nachdem die einzelnen Domänen des *TbPar42* strukturell aufgeklärt wurden, sollte auf die mögliche Funktion des Proteins eingegangen werden. Da das *TbPar42* 2010 als neues Parvulin-Mitglied entdeckt wurde [60], sollte zunächst die Funktion der PPlase-Domäne untersucht werden.

3.8.1 Untersuchung der Phosphospezifität der PPlase-Domäne

Ein Vergleich der neu aufgeklärten *TbPar42*-PPlase-Struktur mit bekannten Strukturen der Proteindatenbank über den DALI-Server [99] ergab als besten Treffer die PPlase-Domäne des bestuntersuchten phosphospezifischen Parvulins *hPin1* (Z-Score 13,9; Sequenzübereinstimmung: 40 %). Die PPlase-Domäne des humanen Parvulins *Pin1* ist katalytisch aktiv. Zudem ist sie phosphospezifisch, was bedeutet, dass sie die *cis/trans*-Isomerisierung von Phospho-Serin/Threonin-Prolin-Motiven beschleunigt. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zur *hPin1*-PPlase (RMSD 1,58 Å) sollte die katalytische Aktivität sowie Phosphospezifität der *TbPar42*-PPlase untersucht werden. Die Einstellung des *cis/trans* Gleichgewichts stellt einen dynamischen, jedoch langsam ablaufenden Prozess dar. Dynamische Abläufe in einem Zeitfenster von 10 ms bis 5 s lassen sich im NMR im EXSY (**EX**change **S**pectroscop**Y**)-Spektrum beobachten [118]. Das EXSY ist eine Version des NOESY-Spektrums mit kurzer Mischzeit und langem Relaxationsintervall. Für die *cis/trans*-Isomerisierung bedeutet dieses, dass sowohl Signale für den *cis*- als auch für den *trans*-Zustand zu sehen sind, aber auch Austauschsignale zwischen den Zuständen in Form von Kreuzsignalen detektiert werden können. Für die Untersuchung der katalytischen Aktivität der PPlase-Domäne wurde das Peptid Suc-Ala-pThr-Pro-Ala-NH₂ genutzt.

Bei 3,68 ppm und 3,87 ppm waren im EXSY-Spektrum klare Signale für die zwei H δ -Atome vom *trans*-Prolin zu erkennen (Abbildung 3.40 A und B). Die schwächeren Signale bei 3,47 ppm und 3,55 ppm gehören zu dem H α a und H α b von *cis*-Prolin. Nach Zugabe einer aktiven *cis/trans*-Isomerase sind zwischen den zwei Zuständen Austauschsignale zu erwarten.

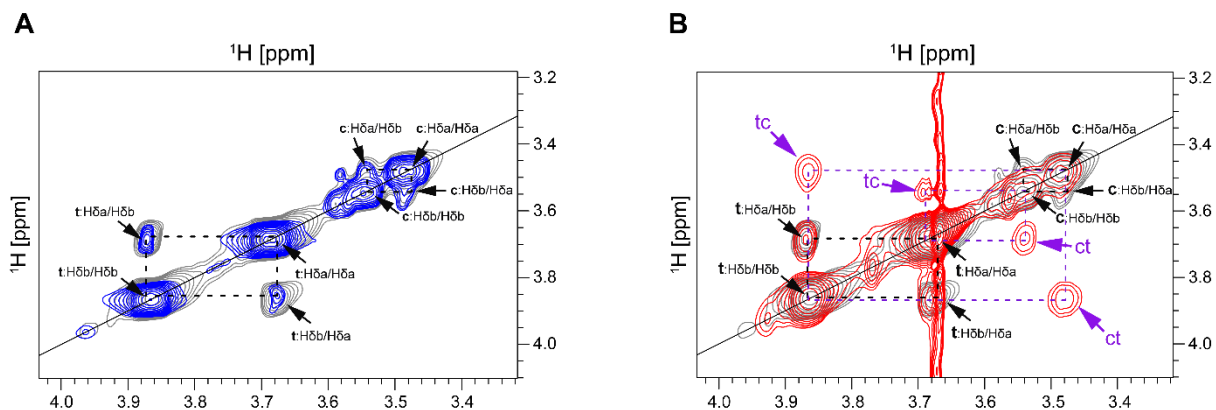


Abbildung 3.40 EXSY-Experiment mit einem Phosphopeptid, der *TbPar42*- und *hPin1*-PPIase
 Dargestellt ist ein EXSY-Ausschnitt der H δ -Protonen des Prolins in *cis* (c)- und *trans* (t)-Zustand. In Grau sind die H δ s des Prolins aus dem Phosphopeptid Suc-Ala-pThr-Pro-Ala-NH $_2$ ohne Proteinzugabe zu sehen. **A:** In Blau zu sehen sind die H δ s des Prolins aus dem Phosphopeptid Suc-Ala-pThr-Pro-Ala-NH $_2$ in Anwesenheit der *TbPar42*-PPIase-Domäne. Es sind keine Austauschsignale zu sehen. **B:** In Rot zu sehen sind die H δ s des Prolins aus dem Phosphopeptid Suc-Ala-pThr-Pro-Ala-NH $_2$ in Anwesenheit der *hPin1*-PPIase-Domäne. Bei 3,87/3,47 ppm und 3,68/3,55 ppm sind Austauschsignale (tc, ct) zwischen der *cis*- und der *trans*-Form des Prolin-H δ s zu sehen.

In einem ersten Versuch wurde *TbPar42*-PPIase zu dem Peptid gegeben und das Auftauchen der Kreuzsignale beobachtet (Abbildung 3.40 A). Als Positivkontrolle wurde in einem zweiten Experiment zum gleichen Peptid die PPIase von *hPin1* zugegeben (Abbildung 3.40 B). Wie die Abbildung 3.40 A zeigt, waren nach Zugabe der *TbPar42*-PPIase keine Kreuzsignale detektierbar. Bei der aktiven PPIase des *hPin1* tauchten bei 3,87/3,47 ppm und 3,68/3,55 ppm Austauschsignale (tc, ct) zwischen der *cis*- und der *trans*-Form auf (markiert mit lila Pfeilen in Abbildung 3.40 B). Somit konnte gezeigt werden, dass die PPIase-Domäne aus *TbPar42* trotz hoher Sequenzähnlichkeit zu *hPin1* die *cis/trans*-Isomerisierung von Phosphothreonin-Prolin-Motiven nicht katalysiert.

3.8.2 Untersuchung der katalytischen Aktivität der PPIase-Domäne

Nachdem gezeigt wurde, dass die PPIase-Domäne keine Isomeraseaktivität gegenüber dem Phosphopeptid Suc-Ala-pThr-Pro-Ala-NH $_2$ aufweist, sollte untersucht werden, ob ein und falls ja, welches X-Pro Motiv (X steht für eine beliebige natürlich vorkommende Aminosäure) von der *TbPar42*-PPIase-Domäne erkannt und isomerisiert wird. Dafür wurde ein α -Chymotrypsin-Protease-gekoppelter Isomeraseassay durchgeführt. Es wurden unterschiedliche Substratpeptide mit dem Grundgerüst Suc-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA getestet. Die Protease α -Chymotrypsin schneidet nur die *trans*-Form des Peptids, C-terminal vom Phenylalanin. Für das abgespaltene *para*-Nitroanilin (pNA) ist anschließend ein Signal bei 390 nm detektierbar. Ohne einen Katalysator ist die Umwandlung der *cis*- in die *trans*-Form ein langsam ablaufender, thermischer Prozess. Die PPIase übernimmt die Rolle eines

Katalysators, so dass bei einer erfolgreichen Isomerisierung ein steiler Anstieg in der Messkurve bei 390 nm zu erwarten ist.

Die Phosphospezifität der *TbPar42*-PPLase wurde in dem EXSY-Experiment mit einem phosphoryliertem Threonin N-terminal zum Prolin untersucht. Um auszuschließen, dass das Protein zwischen Phosphothreonin und Phosphoserin diskriminiert, wurde der Protease-gekoppelte Assay mit dem Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA-Peptid begonnen. Als Positivkontrolle diente erneut die PPLase-Domäne des humanen Pin1. Die Negativkontrolle bestand aus alleinigem Peptid.

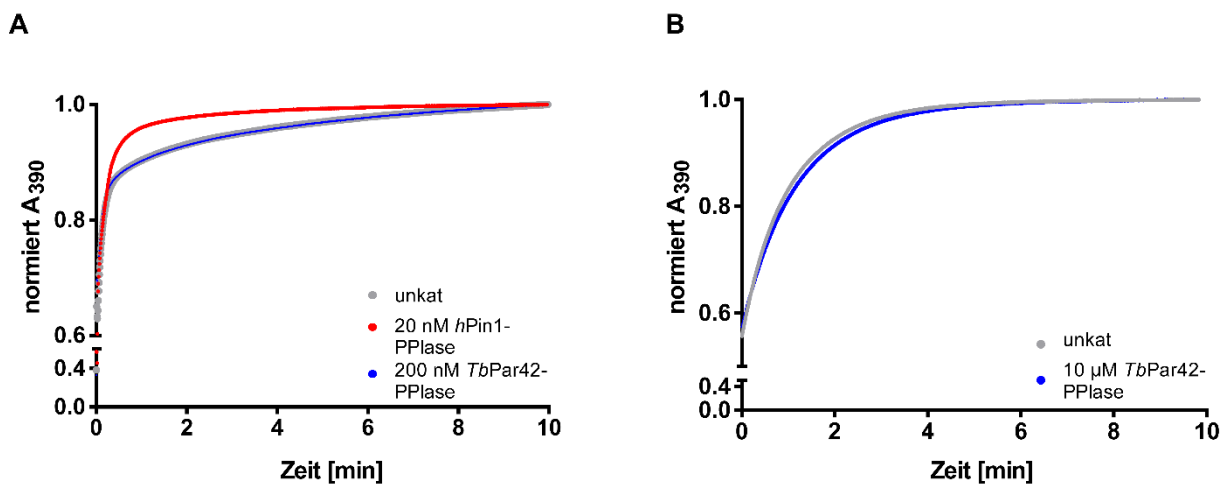


Abbildung 3.41 Protease-gekoppelter *cis/trans*-Isomeraseassay

A: Die graue Kurve zeigt das Ergebnis des Assays des unkatalysierten Peptids Suc-Ala-pSer-Pro-Phe-pNA ohne Zugabe der Isomerase. Die *cis/trans*-Isomerisierung läuft ohne Katalysator rein thermisch ab. Eine katalytische Aktivität ist bei der Zugabe der *hPin1*-PPLase im deutlich steileren Anstieg der Kurve (rot) zu erkennen. Die Zugabe der *TbPar42*-PPLase änderte nichts am Kurvenverlauf (blaue Kurve), sodass eine Isomeraseaktivität für das Phosphopeptid ausgeschlossen werden konnte. **B:** Die graue Kurve gehört zum unkatalysierten Peptid Suc-Ala-Arg-Pro-Phe-pNA ohne Zugabe der Isomerase. Durch Zugabe der *TbPar42*-PPLase (10 µM) änderte sich der Kurvenverlauf nicht. Die *TbPar42*-PPLase katalysiert somit auch keine Arg-Pro-Isomerisierung.

Wie in Abbildung 3.41 A zu sehen, stimmt die Messkurve nach Zugabe der *TbPar42*-PPLase-Domäne exakt mit der Kurve des unkatalysierten Peptids überein, wohingegen bei *hPin1* ein klarer Unterschied im Kurvenverlauf (rot) zu erkennen ist. Das Phosphoserin-Prolin-Motiv wird somit von der *TbPar42*-PPLase nicht isomerisiert.

Zum Testen der weiteren Motive wurde in den Ansätzen die Konzentration an *TbPar42*-PPLase von 200 nM auf 10 µM erhöht. Nicht-Phosphospezifische Parvuline wie das humane Par14 oder das archaeale Parvulin *NmPin* favorisieren ein Arginin-Prolin Motiv [100]. In Abbildung 3.41 B ist exemplarisch die Messung der Isomeraseaktivität der *TbPar42*-PPLase mit dem Suc-Ala-Arg-Pro-Phe-pNA-Peptid dargestellt. Erneut waren nach *TbPar42*-PPLase-Zugabe im Vergleich zur Negativkontrolle keine Unterschiede zu erkennen. Des Weiteren wurden Peptide mit Lysin, Glutamat, Aspartat, Phenylalanin, Glutamin oder Serin vor dem

Prolin als Substrate getestet. Für keines der potentiellen Substrate konnte eine Isomerase-Aktivität festgestellt werden.

Um auszuschließen, dass die *TbPa42*-PPLase-Domäne während des Assays von der Protease Chymotrypsin geschnitten wird und dadurch keine Isomeraseaktivität vertreten war, wurde ein Chymotrypsin-Verdau mit der PPLase-Domäne durchgeführt. Eine anschließende SDS-Page zeigte, dass die PPLase nicht von der Protease angegriffen wird (Kap. 7.3).

3.8.3 Bindungsstudien zwischen der PPLase und dem Suc-Ala-pThr-Pro-Ala-NH₂-Peptid

Da die PPLase-Domäne des *TbPar42* keine Isomeraseaktivität aufwies, sollte überprüft werden, ob das Protein das Peptid überhaupt bindet, aber aus bisher unbekanntem Gründen nicht isomerisiert, oder ob die PPLase-Domäne das Peptid gar nicht erst erkennt. Dieses wurde mittels NMR über eine *chemical shift perturbation*-Analyse untersucht.

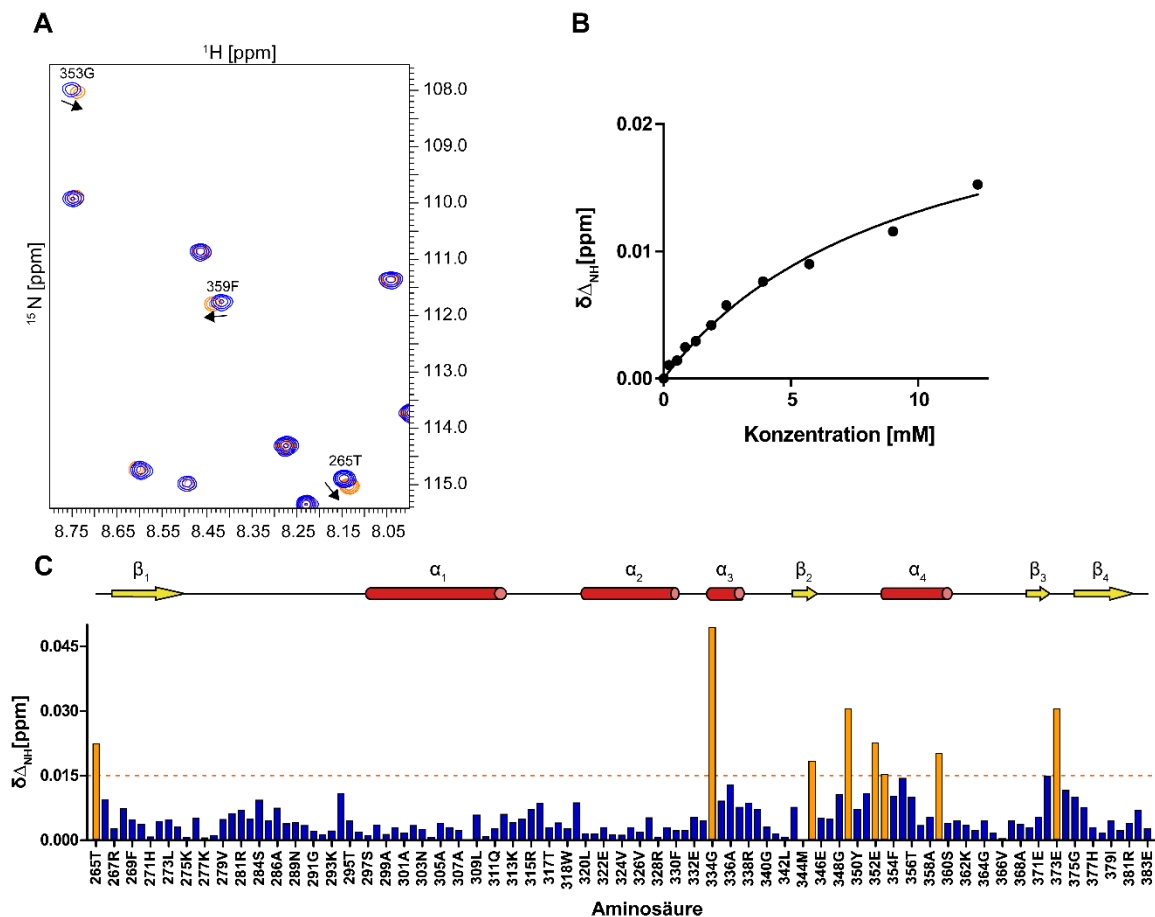


Abbildung 3.42 Bindung des Suc-Ala-pThr-Pro-Ala-NH₂-Peptids an die *TbPar42*-PPLase

A: Ausschnitt aus dem ¹H¹⁵N-HSQC-Spektrum, in dem der Signalschift nach dem letzten Titrationsschritt dargestellt ist. Blaue Signale entsprechen der *TbPar42*-PPLase-Domäne ohne Peptidzugabe und orangefarbene Signale nach Zugabe von 13 mM Peptid. Drei Signale, die eine Gesamtverschiebung $>0,015$ ppm aufweisen, sind beschriftet und die Richtung der Verschiebung mit Pfeilen dargestellt. **B:** Exemplarisch dargestellt ist die Titrationskurve des Glycins 353. **C:** Oben ist die Sekundärstrukturverteilung der PPLase-Domäne aufgeführt (roter Zylinder: Helix, gelber Pfeil: β -Strang, Strich: unstrukturiert). Unterhalb ist die Gesamtverschiebung pro Aminosäure nach Zugabe von 13 mM Peptid aufgeführt. Orange gefärbt sind Aminosäuren mit einer Gesamtverschiebung $>0,015$ ppm.

Dabei wurde das Peptid Suc-Ala-pThr-Pro-Ala-NH₂ graduell zur *TbPar42*-PPIase-Domäne zugegeben. Nach jedem Schritt wurde ein ¹H¹⁵N-HSQC-Spektrum aufgenommen. Eine Bindung des Liganden an das Protein hat eine Änderung der chemischen Umgebung der Aminosäuren, die sich in unmittelbarer Nähe zum Liganden befinden, zur Folge. In ¹H¹⁵N-HSQC-Spektren äußert sich dieses in der Verschiebung der H_N-Signale (*shift*), (Abbildung 3.42 A). Abbildung 3.42 C zeigt die Gesamtverschiebung der Aminosäuren nach dem letzten Titrationsschritt. Insgesamt 8 Aminosäuren der *TbPar42*-PPIase-Domäne wiesen einen Gesamtshift >0,015 ppm auf. Ein Übertragen dieser auf die Struktur der PPIase-Domäne ist in Abbildung 3.43 A und B zu sehen.

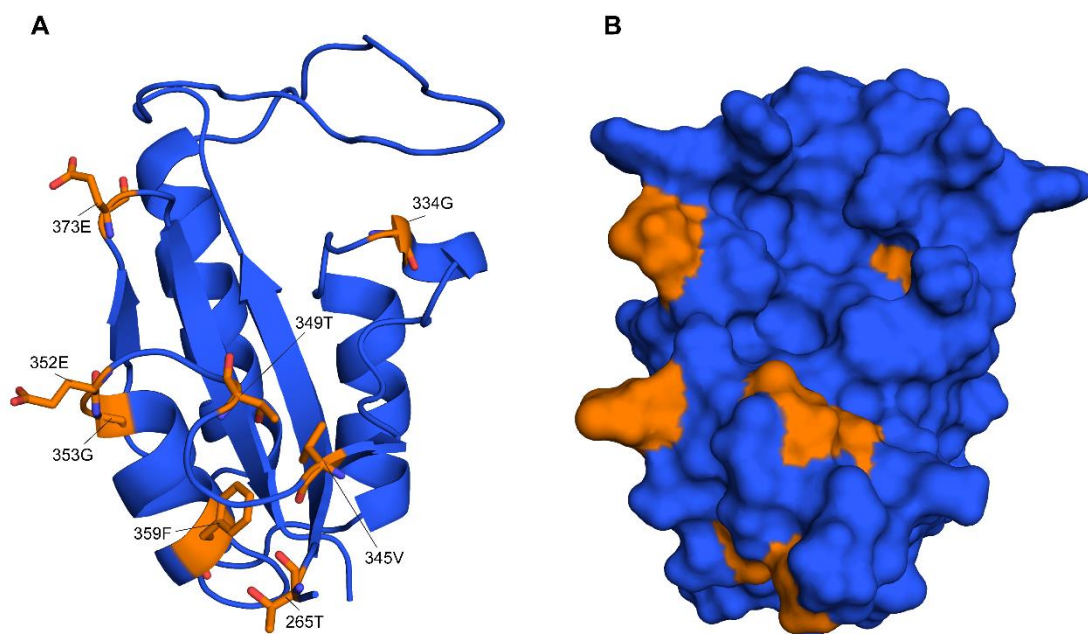


Abbildung 3.43 Markierung der Aminosäuren mit der H_N-Gesamtverschiebung >0,015 ppm in der Struktur der PPIase-Domäne

A Aminosäuren, die eine H_N-Gesamtverschiebung >0,015 ppm zeigten, sind beschriftet und als orangene sticks in der PPIase-Struktur (blaue cartoon-Darstellung) zu sehen. **B** Oberflächendarstellung der PPIase-Domäne (blau) mit den markierten Aminosäuren, die eine H_N-Gesamtverschiebung >0,015 ppm zeigten (orange).

Das Glycin 343 in Helix 3 zeigte mit 0,049 ppm die größte Verschiebung der H_N-Resonanzen, gefolgt vom Threonin 349 sowie vom Glutamat 373, welche in den Loopregionen sitzen und den hydrophoben Kern der PPIase-Domäne flankieren. Des Weiteren shiften Glycin 353 und Phenylalanin 359 in Helix 4, ebenso wie Valin 345 im kurzen β₂-Strang. Das Glutamat 352 und das N-terminale Threonin 265 gehörten auch zu den Aminosäuren mit einer Gesamtverschiebung >0,015 ppm. Bei den Aminosäuren des langen β1-α1-Loops, der bei der PPIase-Domäne des humanen *hPin1* mit der Phosphospezifität in Verbindung gebracht wird, kommt es nach Peptidzugabe zu keinen signifikanten Verschiebungen. Von den shiftenden

Aminosäuren wurden Titrationskurven erstellt (Bsp. siehe Abb. 3.50 B) und mit Formel 2.3 gefittet. Der dadurch erhaltene K_D -Wert gibt Auskunft über die Bindungsaffinität zum Liganden. Die durchschnittliche Dissoziationskonstante betrug 10 mM, was auf eine sehr schwache Bindung hindeutet.

3.8.4 Untersuchung der Chaperonaktivität der *TbPar42*-PPIase-Domäne

Einige Mitglieder der PPIase-Familie [180], wie die bakteriellen Parvuline SurA und PpiD sind unabhängig von Ihrer Isomeraseaktivität in der Lage, andere Proteine bei ihrem Faltungsprozess zu unterstützen [14, 255, 268] [255]. Dabei übernehmen sie die Rolle eines Chaperons. Aus diesem Grund sollte mit einem Chaperonassay die Funktion der *TbPar42*-PPIase-Domäne bzw. des kompletten Proteins als Faltungshelfer untersucht werden. Für den Versuch wurde die Muskel-Kreatinkinase aus Kaninchen als Modellprotein genutzt. Vorerst wird diese in 3 M Guanidiniumhydrochlorid-Puffer vollständig entfaltet. Eine Überführung des Proteins in den gleichen Puffer ohne Denaturierungsmittel resultiert in einer vollständigen Aggregation des Proteins. Anders ist dieses, wenn sich im Puffer ohne Guanidiniumhydrochlorid zusätzlich ein Chaperon befindet. Das Chaperon fördert die korrekte Rückfaltung des Proteins und verhindert somit die Aggregation. Im Experiment wurde die Aggregation über die Trübung, bzw. ein Absorptionssignal bei 400 nm gemessen. Bei einer Aggregationssuppression erwartet man keinen Anstieg der Absorption bei 400 nm.

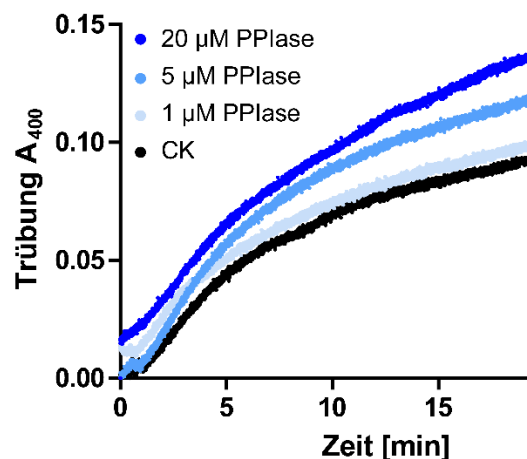


Abbildung 3.44 Chaperonassay der *TbPar42*-PPIase-Domäne

Gezeigt ist die Trübung der Muskel-Kreatinkinase (CK) ohne *TbPar42*-PPIase im Rückfaltungspuffer (schwarze Kurve) sowie mit 1 µM (hellblaue Kurve), 5 µM (mittelblaue Kurve) und 20 µM (blaue Kurve) PPIase-Domäne im Rückfaltungspuffer. Die PPIase-Domäne konnte die Aggregation nicht unterbinden oder verlangsamen.

Wie in Abbildung 3.44 zu sehen, konnte die PPIase-Domäne die Aggregation der Kreatinkinase nicht unterbinden. Eine Wiederholung des Experimentes mit dem vollständigen

TbPar42 zeigte ebenfalls keinen Effekt (Daten nicht gezeigt). Somit konnte die Funktion des *TbPar42* oder der PPIase-Domäne als Chaperon ausgeschlossen werden.

3.9 Funktionelle Untersuchung der FHA-Domäne von *TbPar42*

Allen bisher entdeckten FHA-Domänen ist gemeinsam, dass sie eine Affinität zu phosphoryliertem Threonin aufweisen [98] und auf diese Weise in vielzählige Signalwege involviert sind [184]. Für die *TbPar42*-FHA-Domäne wurde die Bindung eines Phosphothreonins mittels NMR in einer Titrationsreihe mit dem Peptid Suc-Ala-pThr-Pro-Ala-NH₂ untersucht, da mit dem gleichen Peptid Bindungsstudien mit der PPIase-Domäne durchgeführt wurden. Das Peptid wurde bis zu einer Gesamtkonzentration von 13 mM titriert und die Gesamtverschiebung der H_N-Signale in den ¹H¹⁵N-HSQC Spektren berechnet. Aminosäuren, die einen Gesamtshift >0,04 ppm zeigten, sind in Abbildung 3.45 A dargestellt.

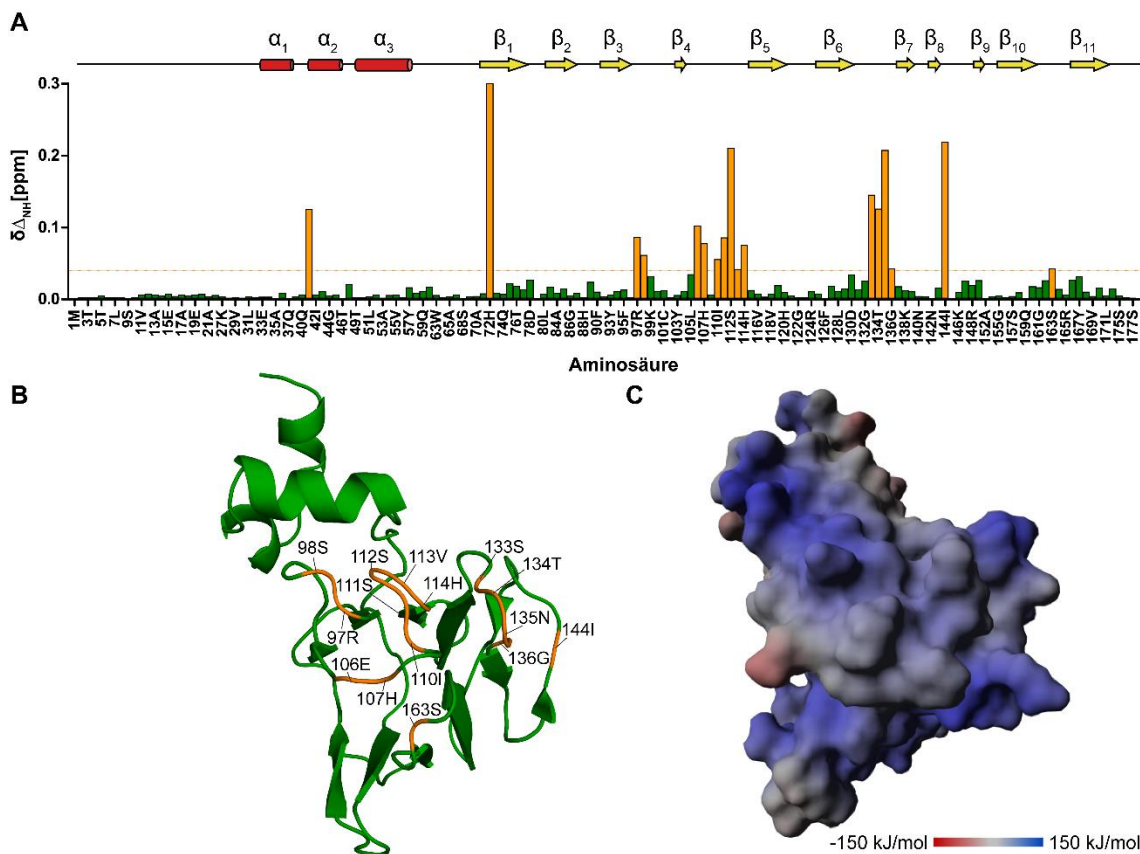


Abbildung 3.45 Bindung des Suc-Ala-pThr-Pro-Ala-NH₂-Peptids an die *TbPar42* NterFHA-Domäne

A: Oben ist die Sekundärstrukturverteilung der NterFHA-Domäne aufgeführt (roter Zylinder: Helix, gelber Pfeil: β -Strang, Strich: unstrukturiert). Unterhalb ist die Gesamtverschiebung pro Aminosäure nach Zugabe von 13 mM Peptid aufgeführt. Orange gefärbt sind Aminosäuren mit einer HN-Gesamtverschiebung >0,04 ppm. **B:** Die Aminosäuren mit der HN-Gesamtverschiebung >0,04 ppm sind in der *cartoon*-Darstellung der NterFHA-Struktur orange gefärbt und beschriftet. **C:** Von der NterFHA-Domäne in der Orientierung wie in B ist die elektrostatische Oberfläche (erstellt mit YASARA nach der *Particle Mesh Ewald* Methodik) zu sehen. Der Farbgradient kennzeichnet das Ladungsvorzeichen und die Energiedichte, wobei dunkelrot zu einer maximal negativen Ladung (-150 kJ/mol), grau zu neutraler (0 kJ/mol) und dunkelblau zu einer maximal positiven Ladung (+150 kJ/mol) gehört.

Durch das Anzeigen der zum Bindungsepitop gehörenden Aminosäuren in der NterFHA-Struktur ist zu erkennen, dass diese zu den Loopregionen gehören. An der Bindung beteiligt sind Aminosäuren des β_6 - β_7 -Loops (133S-136G) sowie das Isoleucin 144 im Loop β_8 - β_9 . Ein Sequenzabschnitt (106E, 107H, 110I-114H) um das Serin 112 im β_4 - β_5 -Loop reagierte ebenfalls auf die Peptidzugabe. Zusätzlich kam es bei Arginin 97 und Serin 98 im β_3 - β_4 -Loop sowie bei Serin 163 im β_{10} - β_{11} -Loop zu einer Änderung der chemischen Umgebung. In der elektrostatischen Oberfläche (Abbildung 3.45 C) der NterFHA-Domäne ist die positive Ladungsverteilung der Loopregionen zu erkennen, welche eine Bindung der negativen Phosphatgruppe begünstigt. Es besteht eine Affinität zum Phosphothreonin, jedoch liegt die durchschnittliche Dissoziationskonstante bei 5,4 mM.

3.9.1 Titrations mit Ala-Glu-Ala-pThr-Ala-Glu-Xaa-Peptiden

Die schwache Bindung des Suc-Ala-pThr-Pro-Ala-NH₂-Peptids an die NterFHA-Domäne könnte die Favorisierung einer bestimmten Aminosäure an +3-Position („pT+3 Regel“) nach dem phosphorylierten Threonin von Seiten der FHA-Domäne zur Ursache haben [54, 142]. Um dieses zu testen, wurden fünf Peptide mit unterschiedlichen Aminosäuren (Xaa: Aspartat, Isoleucin, Valin, Serin oder Glutamin) an der dritten Position entworfen. Das Peptidgrundgerüst bestand aus Ala-Glu-Ala-pThr-Ala-Glu-Xaa. Zum einen passt das negativ geladene Grundgerüst sehr gut zu der positiven Ladung der Loopregionen in der *TbPa42*-FHA-Struktur und zum anderen stellt es ein ähnliches Bindemotiv der FHA1-Domäne aus Rad53p dar, welches über Peptidbibliotheken ermittelt wurde und die Sequenzabfolge Asp-Ala-Glu-pThr-Val-Glu besitzt [54]. Die FHA1-Domäne des Hefeproteins ist eine der meistuntersuchten, was einen genauen Vergleich der Bindeepitope ermöglicht.

In einer Titrationsreihe wurde jedes Peptid schrittweise bis zu einer Endkonzentration von 8 mM zu der *TbPa42*-NterFHA (250 μ M) zugegeben. Nach jedem Schritt wurde ein ¹H¹⁵N-HSQC-Spektrum aufgenommen. Die Auswertung der *chemical shift perturbation* des letzten Titrationschrittes (Abbildung 3.46) zeigte das gleiche Muster wie nach der Titration mit dem Peptid, das nur die NH₂-Gruppe an der +3-Position aufwies. Erneut waren die zuvor erwähnten Loopregionen mit zusätzlichen Shifts im β_{10} - β_{11} -Loop an der Bindung beteiligt.

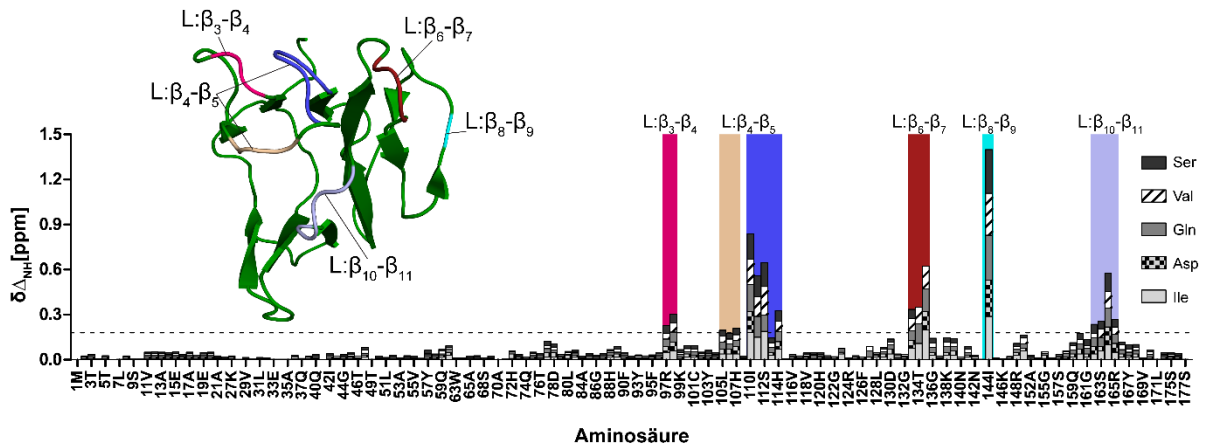


Abbildung 3.46 Bindung der Ala-Glu-Ala-pThr-Ala-Glu-Xaa-Peptide an die *TbPar42* NterFHA-Domäne

Dargestellt ist die addierte Gesamtverschiebung pro Aminosäure nach Zugabe von 8 mM Ala-Glu-Ala-pThr-Ala-Glu-Xaa-Peptid. Xaa steht dabei für Serin, Valin, Glutamin, Aspartat oder Isoleucin. Die Loops, in denen die Aminosäuren einen Gesamtshift $>0,04$ zeigen, sind farbig hinterlegt und in der Struktur (grün, cartoon-Darstellung) markiert.

Eine ausgeprägte Präferenz zu einer der getesteten Aminosäuren an der pT+3-Stelle gab es, den durchschnittlichen K_D -Werten zufolge, nicht. Diese liegen weiterhin im millimolaren Bereich. Eine Tabelle mit den durchschnittlichen K_D -Werten für die getesteten Aminosäuren an Position +3 im Peptid ist in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Tabelle 3.3 Durchschnittliche K_D -Werte nach Titrationen mit Ala-Glu-Ala-pThr-Ala-Glu-Xaa-Peptiden

Xaa	Serin	Aspartat	Valin	Isoleucin	Glutamin
Kd [mM]	3,1	3,4	3,9	4,1	5,4

3.9.2 Fluoreszenz-Anisotropie-Studien

Obwohl sie sich sequentiell unterscheiden, ist die Struktur der FHA-Domänen stark konserviert. Eine Suche mit dem DALI-Programm [99] nach verwandten Proteinstrukturen und der *TbPar42*-NterFHA-Domäne als Vorlage, ergab eine Ähnlichkeit zu FHA-Domänen aus unterschiedlichen Proteinen und Organismen. Der beste Treffer entspricht der FHA-Struktur des humanen Kanadaptin-Proteins (*kidney anion exchanger adaptor protein*) (siehe Tabelle 3.4) [266]. Bisher sind jedoch weder Interaktionspartner noch die Funktion der Kanadaptin-FHA-Domäne bekannt.

Tabelle 3.4 Treffer der DALI-Suche mit der *TbPar42-NterFHA* als Vorlage

PDB	Z-Score	RMSD	Seq. % id.	Protein	Organismus	Struktur
4H87	13	2,9	37	Kanadaptin	<i>Homo sapiens</i>	X-Ray
3VPY	12,2	3,5	37	Dawdle	<i>Arabidopsis thaliana</i>	X-Ray
2JPE	12,1	2,7	35	NIPP1	<i>Mus musculus</i>	NMR
2JKD	10,2	2,7	23	PML1 splicing factor	<i>S. cerevisiae</i>	X-Ray
4JON	10,1	2,8	22	centrosomal protein 170kDa	<i>Homo sapiens</i>	X-Ray
3ELV	9,9	2,6	25	Pml1p	<i>S. cerevisiae</i>	X-Ray
2AFF	8,8	2,3	26	Ki67	<i>Homo sapiens</i>	NMR
3GGS	8,6	2,8	24	purine nucleoside phosphorylase	<i>Homo sapiens</i>	X-Ray
2FF4	8,1	4,2	22	EmbR	<i>M. tuberculosis</i>	X-Ray
5A8I	7,8	2,9	20	ArnA	<i>S. acidocaldarius</i>	X-Ray
2PIE	7,8	3,3	28	RNF8	<i>Homo sapiens</i>	X-Ray
2UNM	7,7	3,2	22	MDC1	<i>Homo sapiens</i>	X-Ray
5DJO	7,6	16,2	15	Kinesin-3 KIF13A	<i>Mus musculus</i>	X-Ray
3I0M	7,5	2,9	19	Nbs1	<i>S. pombe</i>	X-Ray
2GIL	7,5	2,7	17	GTPase Rab6A	<i>Homo sapiens</i>	X-Ray
3MDB	7,5	2,7	19	centaurin alpha-1, KIF13B	<i>Homo sapiens</i>	X-Ray
1YJ5	7,5	3,5	13	polynucleotide kinase	<i>Mus musculus</i>	X-Ray
2JQL	7,4	5,6	24	Dun1	<i>S. cerevisiae</i>	NMR
3OUN	7,4	2,8	24	FHA_A	<i>M. tuberculosis</i>	X-Ray
1G6G	7,3	3,0	27	RAD53P-FHA1	<i>S. cerevisiae</i>	X-Ray
2W3O	7,5	3,5	14	PNKP	<i>Homo sapiens</i>	X-Ray

Die *TbPar42-FHA* besitzt eine annähernd hohe Sequenzähnlichkeit zu den FHA Domänen aus dem pflanzlichen Dawdle-Protein (39 %), sowie dem NIPP1-Protein aus der Maus (35 %). Den RMSD-Werten zur Folge ist die Struktur der *TbPar42-FHA* der NIPP1-FHA Struktur verwandter. Der nukleare Inhibitor der Proteinphosphatase 1 besitzt am N-Terminus eine FHA-Domäne, die Interaktionen mit dem Splicingfaktor SAP155 eingeht [20]. Dafür entscheidend ist ein Threonin-Prolin-reicher Bereich im Sap155 Protein [20]. Ein Dekapeptid (308-318) aus dieser Region, welches an Position 313 ein phosphoryliertes Threonin besitzt, war jedoch in der Lage, die Komplexbildung zwischen NIPP1 und SAP155 zu unterbinden, indem es kompetitiv an die phosphobindenden Loops der NIPP1-FHA bindet. Eine BLAST-Suche mit anschließendem Sequenzalignment zeigte, dass das Threonin 313 in dem SAP155-Homolog in *T. brucei* (Sequence ID: ref|XP_829247.1) konserviert ist. Um eine mögliche Interaktion der *TbPar42-NterFHA*-Domäne mit dem SAP155-Homolog zu untersuchen, wurde das 10 Aminosäuren lange Peptid aus *TbSAP155* mit der Sequenz GSGpTPMFTGA entworfen. Am Peptid war N-terminal ein Fluorophor (Rhodamin-B) konjugiert, welcher Bindungsstudien über Fluoreszenz-Anisotropie erlaubt.

Das pTPMF-Motiv aus dem SAP155-Homolog konnte zudem in der glycosomalen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase in *T. brucei* (Sequence ID: ref|XP_822929.1) gefunden werden (DDpTPMFVMG), weshalb es ebenfalls, in Fluorophor-markierter Form, synthetisch hergestellt wurde.

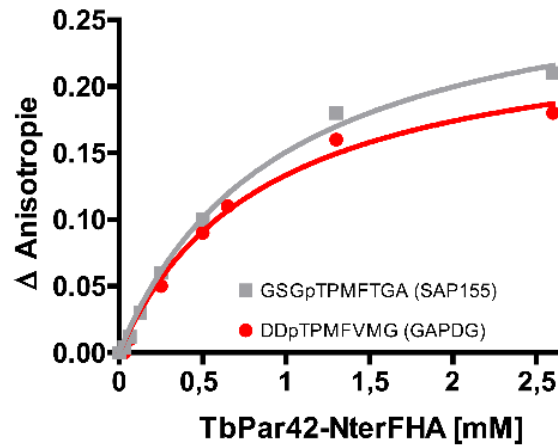


Abbildung 3.47 Affinität der konservierten NIPP1-Bindemotive zur *TbPar42-NterFHA*-Domäne

Titrationen der NterFHA-Domäne und den Peptiden, die das pTPMF-Motiv enthalten. Graue Kurve steht für das Peptid aus SAP155 (K_D 870 μM) und die rote Kurve für das Peptid aus GAPDG (K_D 960 μM).

Die Messung der Bindung mit dem Peptid aus *TbSAP155* ergab einen K_D -Wert von 870 μM (Abbildung 3.47). Die Dissoziationskonstante, ermittelt für das Peptid aus der *TbGAPDG*, betrug 960 μM . Beide Peptide enthielten das Motiv pTPMF.

4 Diskussion

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Parvulin stammt aus dem Parasiten *Trypanosoma brucei* und ist 42 kDa groß. Es ist ein Mehrdomänen-Protein mit einer C-terminalen PPIase- und einer N-terminalen FHA-Domäne. Die strukturelle Aufklärung des Proteins, sowie die Anordnung der einzelnen Domänen sollten Hinweise über die mögliche Funktion von *TbPar42* liefern und zudem einen Vergleich zu bisher untersuchten Parvulin- und FHA- Strukturen ermöglichen.

4.1 Das *Trypanosoma brucei* Parvulin 42 ist ein Monomer mit unabhängig voneinander agierenden Domänen

Die NMR-spektroskopische Charakterisierung von Proteinen in Lösung ist stark vom Molekulargewicht abhängig, was sich auch bei dem zu untersuchenden Parvulin widerspiegelte. Sein relativ hohes Molekulargewicht führt zu schneller transversaler Relaxation mit daraus resultierenden breiten Resonanzlinien. Im $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum des vollständigen Proteins waren nur ein Drittel der 358 zu erwartenden Signale zu sehen. Aus diesem Grund wurde ein TROSY-Spektrum einer deuterierten Probe des *TbPar42*-Proteins aufgenommen. In diesem Spektrum waren nahezu alle zu erwartenden Signale des Parvulins zu sehen. Die Expression in D_2O minderte aber die Proteinausbeute erheblich, weshalb das Gesamt-*TbPar42* aus Kosten- und technischen Gründen nicht NMR-spektroskopisch untersucht werden konnte. Dagegen ließen sich die einzelnen Domänen, die PPIase-Domäne, NterFHA-Domäne und der Linker, separat strukturell und funktionell charakterisieren. Ein Vergleich der zugeordneten $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren der isolierten Domänen, aufgenommen unter identischen Bedingungen mit dem TROSY-Spektrum des vollständigen *TbPar42* zeigte, dass die Signale beider Spektren sehr gut übereinstimmten. Bis auf wenige terminale Aminosäuren der Konstrukte konnte die Zuordnung von insgesamt 353 Signalen auf das TROSY-Spektrum übertragen werden. Zudem stellte sich heraus, dass die Signale im $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC vom vollständigen Protein den Aminosäuren des weitgehend unstrukturierten Linkers angehörten. Aus beiden Beobachtungen lässt sich schließen, dass die Domänen im Protein unabhängig voneinander agieren und der Linker flexibel und unstrukturiert zwischen den Domänen liegt. Diese „Perlenketten“-Theorie der „aufgereihten Domänen“ hätte eine Vergrößerung des hydrodynamischen Radius des Gesamtproteins im Vergleich zu einer kompakten Domänenanordnung zur Folge, was das berechnete zu hohe Molekulargewicht des *TbPar42* in der analytischen Gelfiltration erklären würde. Da Signale der Aminosäuren, die an einem Dimerinterface beteiligt wären (oder Oligomer), eine signifikante Verschiebung im HSQC-Spektrum aufweisen würden, kann eine Di-/Oligomerisierung des Proteins ausgeschlossen werden. Zusätzlich wäre im Falle einer Multimerisierung zu erwarten, dass

aufgrund des sehr hohen Molekulargewichts, trotz Deuterierung nicht mehr alle Signale im TROSY-Spektrum sichtbar wären. Aus all dem kann geschlossen werden, dass das *TbPar42* unter den gewählten Bedingungen als Monomer vorliegt, in dem die Domänen aneinandergereiht über einen flexiblen Linker verbunden sind.

4.2 Vergleich der PPlase-Domäne aus *TbPar42* mit weiteren PPlasen

2010 entdeckten Goh *et al.* in der genomischen Datenbank von *T. brucei* zwei potentielle Homologe des humanen Pin1 [76]. Die NMR-Struktur des kleineren 115 Aminosäuren langen und nur aus der PPlase-Domäne bestehenden *TbPin1* wurde zwei Jahre später von Sun *et al.* gelöst [234]. *TbPin1* ist wie erwartet eine aktive PPlase, welche die *cis/trans*-Isomerisierung von phosphorylierten Aminosäuren vor dem Prolin katalysiert [76, 234]. Das zweite potentielle Homolog ist das größere *TbPar42*, welches am C-Terminus ebenfalls über eine PPlase-Domäne verfügt. Die strukturelle Aufklärung dieser Domäne erfolgte im Rahmen dieser Arbeit und die NMR-Struktur ist in der Protein-Datenbank unter dem Code 2MNT hinterlegt. Die PPlase-Domäne von *TbPar42* ist 120 Aminosäuren lang und ein globulär gefaltetes Protein, welches in Lösung als Monomer vorliegt. Die Anordnung der vier β -Stränge und vier α -Helices entspricht der typischen Parvulinfaltung [62].

Die *TbPar42*-PPlase-Domäne weist eine höhere Strukturähnlichkeit zu phosphoselektiven als zu nicht-phosphoselektiven Parvulinvertretern auf (Abbildung 4.1).

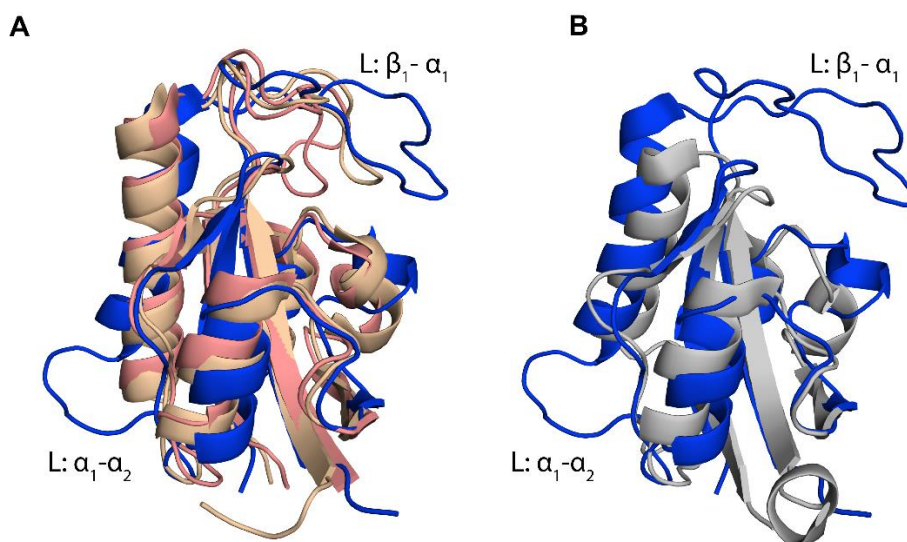


Abbildung 4.1 Vergleich der *TbPar42*-PPlase Domäne mit den phosphoabhängigen PPlasen aus *TbPin1* und *hPin1*, sowie mit der phosphounabhängigen humanen PPlase *Par14*

A: Überlagerte Strukturen der PPlase Domänen von *TbPin1*(2LJ4) rosa, *TbPar42* (2MNT) blau und *hPin1* (1NMW) beige zu sehen. **B:** PPlase Domäne von *TbPar42* (2MNT) blau überlagert mit der PPlase des *hPar14* (3UI4) in Grau dargestellt. Unterschiede sind in den Loops zwischen α_1 - α_2 und β_1 - α_1 zu sehen.

Wie das bestuntersuchte phosphospezifische humane Pin1 zeigt auch die *TbPar42*-PPlase einen verlängerten β_1 - α_1 -Loop (Abbildung 4.1 A), welcher in *hPin1* mit der Phosphospezifität in Verbindung gebracht wird [195]. Im Unterschied zu *hPin1*, aber auch zum nicht-

phosphospezifischen humanen Parvulin *hPar14* (Abbildung 4.1 B), ist in der *TbPar42*-PPLase der α_1 - α_2 -Loop ebenfalls verlängert. Die Sekundärstrukturelemente haben in allen Strukturen die gleiche Anordnung und variieren lediglich in der Länge. Trotz der höheren Ähnlichkeit zu phosphospezifischen Parvulinen konnten schon Goh *et al.* und Erben *et al.* zeigen, dass *TbPar42* kein typisches Pin1-Parvulin ist [60, 76]. Zum einen war es nicht in der Lage, das Pin1-Homolog Ess1 in Temperatur-sensitiven Hefezellen zu substituieren und zum anderen zeigte es keine Aktivität gegenüber dem *TbPin1*-Substrat, welches phosphoryliert war [234]. Das Fehlen der Isomeraseaktivität gegenüber einem Phosphothreonin vor dem Prolin konnte auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Das EXSY-Experiment mit dem Suc-Ala-pThr-Pro-Ala-NH₂-Peptid zeigte nach Zugabe der PPLase aus *hPin1* klare Kreuzsignale zwischen den Prolin-H δ -Atomen des *cis*- und *trans*-Zustandes. Stattdessen fehlten die Kreuzsignale nach Zugabe der *TbPar42*-PPLase auch nach Variation der Mischzeit oder längerer Aufnahme der Spektren (Abbildung 3.40). Eine Aktivität für ein Phosphoserin-Prolin-Motiv konnte mit einem Protease-gekoppelten PPLase-Assay ebenfalls ausgeschlossen werden (Abbildung 3.41 A). Weiterhin wurden Peptide mit positiven (Arg/Lys-Pro), negativen (Asp/Glu-Pro), polaren (Gln/Ser-Pro) und unpolaren (Phe-Pro) Resten vor dem Prolin als potentielle Substrate getestet. Für die *TbPar42*-PPLase war für keines der Peptide eine Isomeraseaktivität festzustellen (Abbildung 3.41 B). Da mit einem Chymotrypsin-Verdau ausgeschlossen werden konnte, dass die PPLase während des Assays von der Protease angegriffen wird, deuten alle Ergebnisse auf das Vorhandensein einer katalytisch inaktiven PPLase-Domäne in dem *Trypanosoma* Parvulin 42 hin. Eine fehlende Isomeraseaktivität wurde bereits für die bakteriellen periplasmatischen PPlasen SurA und PpiD beschrieben [14, 255]. Stattdessen konnte aktivitätsunabhängig gezeigt werden, dass einige PPlasen die Faltung anderer Proteine unterstützen und somit als Faltungshelfer fungieren [180, 248]. Dass das *TbPar42* wahrscheinlich keine Chaperonfunktion übernimmt, kann aus dem Rückfaltungsexperiment der Muskel-Kreatinkinase geschlossen werden. Die Aggregation der Kreatinkinase (Abbildung 3.44) wurde auch in Anwesenheit des vollständigen *TbPar42* oder der isolierten PPLase-Domäne nicht verhindert.

Im Gegensatz zu *TbPar42* gibt es im einzelligen Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* ein, FHA- und PPLase-Domäne enthaltendes Parvulin (*DdPinA*), das sehr wohl Isomeraseaktivität zeigt. Die PPLase-Domäne des *DdPinA* ist für phosphorylierte Aminosäuren vor dem Prolin katalytisch aktiv [31]. Ein Vergleich der *TbPar42*-PPLase-Sequenz mit der PPLase des Schleimpilzes sowie mit weiteren aktiven phosphoselektiven PPlasen zeigt, dass, anders als für die *TbPar42*-PPLase, in der PPLase des Schleimpilzes alle Reste, die in Pin1 mit der katalytischen Aktivität in Verbindung stehen, konserviert sind (Abbildung 4.2).

```

TbPar42 (264) PTERHFYHVLVKKHKDVRPSSSLAPRNKGEKITRSRADAINLAQAAILAQHKERKTWSLDEF
TbPin1 (5) SEKLRAAHLLVKKFSGSRNPVSRRTGDS--TADVYEDAIKELQKW----SQRIASGEVSF
CaEss1 (90) DGQVRVSHLLIKNNQSRKPKSWKSPDG---ISRTRDESIQILKKH----LERILSGEVKL
AtPin1 (5) RDQVKASHILIKKHQGSRRKASWKDPEGKIILTTTREAAVEQLKSI----REDIVSGKANF
hPin1 (50) PARVRCSHLLVKKHSQSRNPSSWRQEK----ITRTKEEALELINGY----IQKIKSGEEDF
DdPinA (159) PKTVTCRHLLVKKHQGSRNPSSWRESK----ITRTKERAIKLENEY----RATIISGSATF

```

```

TbPar42 (264) VQVVRDFSECGSAKRGDGLGMVESGTYTEGFDITVAFSLKSGEVSAPVETELGVHLLIYRVE
TbPin1 (59) EEAASQRSDCGSYASGGDLGFFSSGEMMKPFEDAVRALKIGDISPIVQTDSSGLHIKRLA
CaEss1 (118) SELANTESDCSSHDRGGDLGFFSKGQMPPFEEAAFNLHVGEVSNIIETNSGVHILQRTG
AtPin1 (61) EEVATRVSDCSSAKRGGDLGSFGRGQMOKPFEEATYALKVGDISDIVDTDSSGVHIKRTA
hPin1 (104) ESLASQFSDCSSAKARGDLGAFSRGQMOKPFEDASFALRTGEMSGPVFTDSSGIHIIILRTE
DdPinA (211) EDLAHKNSDCSSAKRGGYLDPFKRGQMORPFEDCAFSLKVGEVSGIVDTDSSGVHIIERLA

```

Abbildung 4.2 Sequenzvergleich der *TbPar42*-PPIase Domäne mit verschiedenen aktiven phosphoselektiven PPIase-Domänen

Blau umrahmt sind Reste des basischen Clusters im β_1 - α_1 -Loop. Grün umrandet sind Aminosäuren der hydrophoben Prolin-Bindetasche und rot umrandet sind Reste der katalytischen Tetrade. Für die Überlagerung wurden folgende PDB- oder Sequenz-IDs benutzt: *TbPar42* (2MNT), *TbPin1* (2LJ4), *CaEss1* (1YW5), *AtPin1* (1J6Y), *hPin1* (1NMW) und *DdPinA* UniProt Q55EZ0-1.

Der ursprünglich beschriebene Katalyse-Mechanismus für die *hPin1*-PPIase beruht auf einem nukleophilen Angriff des Cysteins 113-Sy auf den Carbonylkohlenstoff des Substrats (Abbildung 4.3). Im ersten Schritt wird das Substrat in der *cis*-Konformation im 0° -Winkel vom Enzym gebunden. Anschließend entzieht das deprotonierte Histidin 59 dem Cystein ein Proton, wodurch dieses aktiviert wird und die neu entstandene Thiolatseitenkette den nukleophilen Angriff auf den Carbonylkohlenstoff ausübt (Schritt 2). Die Reaktion führt zur Drehung des Substrats (90° -Winkel) und zur Ausbildung eines intermediären tetrahedralen Zustandes (Schritt 3). Die aus der Reaktion resultierende negative Ladung am Carbonylsauerstoff wird durch elektrostatische Wechselwirkungen mit dem protonierten Histidin 157 und dem Serin 154 stabilisiert. Im letzten Schritt 4 relaxiert das energiereiche Intermediat entweder in den Grundzustand oder in die *trans*-Konformation (180° -Winkel) [195].

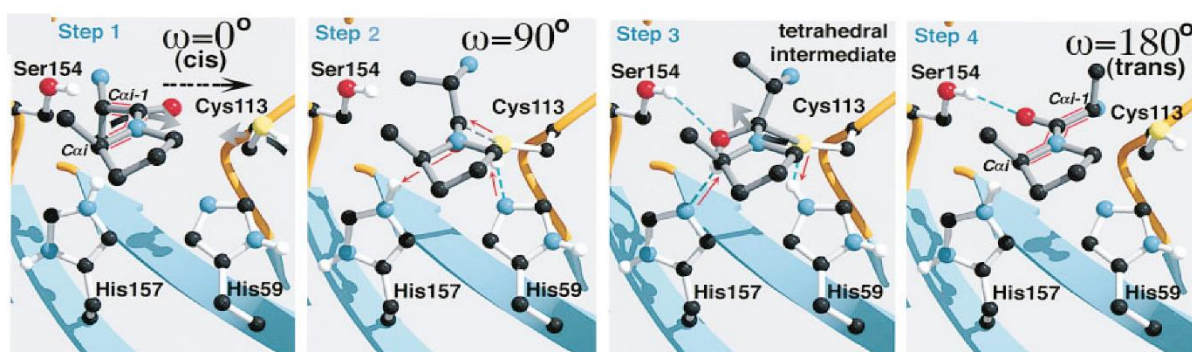


Abbildung 4.3 Ursprünglich beschriebener Isomerisierungsmechanismus der *hPin1*-PPIase

Schritt 1-4 zeigt den ursprünglich beschriebenen Mechanismus der Isomerisierung des Substrats über den nukleophilen Angriff des Cysteins 113 auf das Carbonylkohlenstoffatom, indem es vorher vom Histidin 59 aktiviert wird. Das zweite Histidin 157 und das Serin 154 stabilisieren die negative Ladung am Carbonylsauerstoff und ermöglichen die Relaxation des Substrates in den Grund (*cis*)- oder *trans*-Zustand. [195]

Die zwei Histidine, das Cystein sowie das Serin bilden demnach die katalytische Tetrade des *hPin1* (Abbildung 4.4 A). Das prominente Cystein sowie das duale Histidinmotiv sind auch in der *TbPar42*-PPIase vorhanden. Lediglich das Serin ist durch ein Leucin ersetzt (Abbildung 4.4 C).

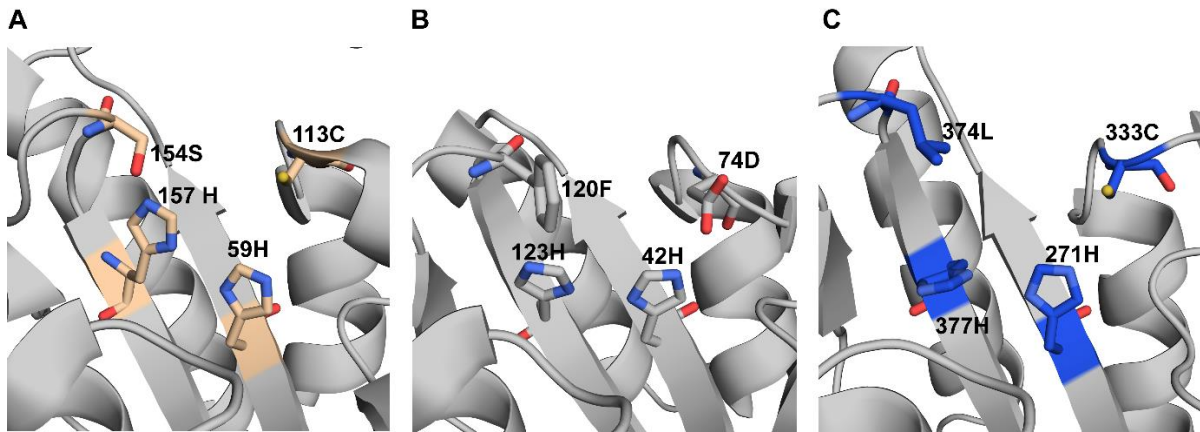


Abbildung 4.4 Katalytische Tetrade in den PPIasen von *hPin1*, *hPar14* und *TbPar42*

A: Die katalytische Tetrade der *hPin1*-PPIase (1NMW) bestehend aus His59, His157, Ser154 und Cys113 zu sehen. **B:** Die katalytische Tetrade mit den zwei Histidinen (H42, H123), F120 und D74 in *hPar14* (3U14). **C:** Die mögliche katalytische Tetrade der *TbPar42*-PPIase mit dem dualen Histidinmotiv (H271, H377), dem Cys113 und dem Leu374 zu sehen.

Diese Substitution dürfte jedoch nicht für die fehlende Aktivität der *TbPar42*-PPIase verantwortlich sein, da in nicht-phosphospezifischen Parvulinen, wie dem Par14, an der besagten Position ein Phenylalanin vorzufinden ist (Abbildung 4.4 B) [214]. Auch die Notwendigkeit der anderen Reste der katalytischen Tetrade wurde seit der Theorie des Isomerisierungsmechanismus für *hPin1* stark diskutiert. Mutationsstudien an den zwei Histidinen zeigten, dass nur das erste Histidin für die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke von entscheidender Bedeutung ist [15] und dass beide Histidine eher für die strukturelle Stabilität als für die katalytische Aktivität der PPIase-Domäne verantwortlich sind [6]. Zudem wird die Rolle des Cysteins als Nukleophil in Frage gestellt [128]. Während die C113D-Mutante in Komplementationsstudien mit Ess1 aus der Hefe den Wildtyp ersetzen konnte [171, 262] und über Isomeraseaktivität verfügt [15], führte eine C65A-Mutante im *TbPin1* zum Verlust der katalytischen Aktivität [234]. Da anstelle des Cysteins in nicht Pin1-Typ-PPIasen mit Ausnahme des *E. coli* Par10 [122] ein Aspartat vorhanden ist [95, 214], wird angenommen, dass das Cystein bzw. Aspartat für die Destabilisierung des partiellen Doppelbindungscharakters der Peptidbindung zuständig ist, indem es eine negativ geladene Umgebung aufrechterhält und somit die Rotation um die Substrat-Amidbindung ermöglicht. 2011 zeigten Müller *et al.* mit einem Par14-Kristall ein Modell des Protonennetzwerkes, welches das bisher unerwähnte Threonin 118 miteinbezieht [171]. Mutationen des Threonins zu einem Serin wirkten sich nur geringfügig auf die PPIase-Aktivität aus, während

Alaninmutanten zwar keinen großen Einfluss auf die Proteinstabilität hatten, jedoch die Aktivität signifikant verminderten [171]. Dieses Threonin ist auch in *TbPar42* im kurzen β 3-Strang vorhanden, mit der gleichen Orientierung zum Proteininneren wie in *hPin1* oder *hPar14*. Somit würde die *TbPar42*-PPIase alle für die katalytische Aktivität als bedeutsam angenommenen Reste enthalten.

Ein weiteres Merkmal Pin1-typischer Parvuline ist der basische Cluster im β 1- α 1-Loop. Die bedeutende Region besteht in *hPin1* aus den Aminosäuren Lys63, Arg68 und Arg69 [15, 195] und soll für die Interaktion mit der Phosphatgruppe des Substrats relevant sein [147, 239] oder eine negativ geladene Aminosäure vor dem Prolin als Substrat bevorzugen. Neuere Studien belegen, dass die Wechselwirkung mit dem Phosphat über das Lys63 gewährleistet wird und dass die zwei Arginine nicht evolutionär konserviert sind [15]. So ist das zweite Arginin in dem *Candida albicans* Ess1 durch ein Lysin [140] und in den *Trypanosoma*-Homologen *TbPin1* und *TcPin1* durch ein Asparagin ersetzt [58, 234]. Bei der *TbPar42*-PPIase besteht der basische Cluster wie bei *hPin1* aus einem Lysin und zwei Argininen. Deshalb erscheint es umso interessanter, dass die *TbPar42*-PPIase die Isomerisierung eines Phosphopeptids nicht katalysiert.

Pflanzliche phospho-selektive Parvuline haben in der Nähe des aktiven Zentrums eine vier Aminosäuren lange Erweiterung, welche für die Interaktion mit dem Substrat wichtig ist [271]. Auch *TbPar42* verfügt an zwei Stellen über vier Aminosäuren lange Einschübe, zum einen im β 1- α 1-Loop und zum anderen am Ende der ersten Helix zum α 1- α 2-Loop hin. Goh *et al.* konnten jedoch mit Deletionsstudien zeigen, dass die Einschübe keinen Einfluss auf die Inaktivität des *TbPar42*-Parvulins haben [76].

Obwohl für die *TbPar42*-PPIase keine Isomeraseaktivität nachgewiesen werden konnte, so waren in Titrationsexperimenten mit dem Phosphopeptid Suc-Ala-pThr-Pro-Ala-NH₂ chemische Verschiebungen der Aminosäuren in der kurzen und etwas flexibleren Helix 3, der Helix 4, dem β 2-Strang sowie den Loops zwischen β 2- α 4 und β 3- β 4 zu beobachten (Abbildung 3.42). Änderungen der chemischen Umgebung in den zuvor erwähnten Regionen sind für andere Parvuline als charakteristisch bei einer Substratbindung beschrieben [95, 195]. Ein Unterschied zu bisherigen Veröffentlichungen über die Bindung eines Phosphopeptids sind fehlende Shifts im phosphobindenden β 1- α 1-Loop [12, 234]. Eine mögliche Erklärung wäre, dass dadurch, dass das Protein während der Titration in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer vorlag, die Bindestellen des basischen Clusters schon durch das Phosphat aus dem Puffer besetzt waren. Bei *TbPin1* war zudem nach der Titration mit dem Phosphopeptid ein starker Shift des Methionins 83 zu beobachten [234]. Dieses Methionin ist vor allem unter den phosphatspezifischen Parvulinen konserviert und bildet zusammen mit dem Leucin122 (*hPin1*) und Phenylalanin134 (*hPin1*) die hydrophobe Prolinbindetasche aus [62]. In der *TbPar42*-PPIase ist die Stelle des Methionins130 (*hPin1*) mit Tyrosin350 (*TbPar42*) besetzt

(Abbildung 4.5). Das Tyrosin hat zwar die gleiche Orientierung wie das Methionin, jedoch nimmt die Ringstruktur mehr Platz in der Bindetasche ein, wodurch eine sterische Hinderung für die Substratbindung entstehen könnte.

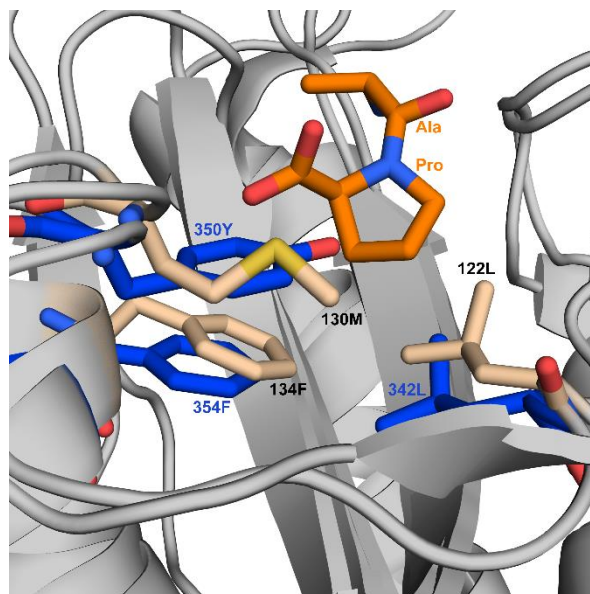


Abbildung 4.5 Prolin-Bindetasche der *hPin1*- und *TbPar42*-PPIase

Überlagert dargestellt sind die PPIase des *hPin1* und das Ala-Pro Dipeptid (orange) (1PIN) mit der *TbPar42*-PPIase (2MNT). Die hydrophobe Prolin-Bindetasche besteht in *hPin1* aus dem Met130, Leu342 und Phe354 (beige). Das Met130 ist in der Prolinbindetasche der *TbPar42*-PPIase (blau) durch Tyrosin350 ersetzt.

Wie wichtig ein definiertes Ausmaß der Bindetasche für die Funktionalität der PPIase ist, wurde erst kürzlich für das archaeale Parvulin *NmPin* beschrieben [157]. Somit könnte die Substitution des Methionins durch ein Tyrosin in der Prolin-Bindetasche der *TbPar42*-PPIase ein Grund für deren fehlende Aktivität sein.

4.3 Vergleich der FHA-Domäne aus *TbPar42* mit weiteren FHA-Domänen

Über einen langen Linker von der PPIase-Domäne getrennt, befindet sich in *TbPar42* N-terminal gelegen eine FHA-Domäne. Bisher wurden FHA-Domänen in Transkriptionsfaktoren, Kinasen, Phosphatasen, Kinesinen, RNA-Bindeproteinen und metabolischen Enzymen [52, 141] und erst vor kurzem auch in Parvulinen von einigen Einzellern identifiziert [60, 164, 247]. Die FHA-Domäne des *Trypanosoma* Parvulins 42 wurde zusammen mit dem N-Terminus des Proteins untersucht und strukturell aufgeklärt. Die NMR-Struktur ist in der Proteindatenbank unter dem Code 2N84 hinterlegt. Der N-Terminus des Proteins ist unstrukturiert und sehr flexibel. Den ¹⁵N-Relaxationsstudien zur Folge entfallen die ersten 30 Aminosäuren des Proteins auf den N-Terminus und die weiteren 143 Reste auf die FHA-Domäne. Die FHA-Domäne des *TbPar42*-Proteins ist ein globulär gefaltetes Protein, welches in Lösung als Monomer vorliegt. Zu der typischen Faltung in Form eines 11-strängigen

β -Faltblatt-Sandwiches, in dem die β -Stränge über Loops miteinander verbunden sind [88], sind auf der Seite des 5-strängigen Faltblattes drei kurze Helices zu finden. N- oder C-terminale helikale Erweiterungen sind auch bei anderen FHA-Domänen vorzufinden [25]. Über diese finden keine Interaktionen mit Partnerproteinen statt, jedoch sind sie für die Funktion von FHA-Domänen essentiell [53, 98]. Zusätzlich weisen einige FHA Strukturen, wie die N-terminale Domäne der Kinase Rad53 aus der Bäckerhefe oder der humanen Kinase Chk2, helikale Insertionen in den Loop-Regionen auf [53, 139]. FHA-Domänen sind Phosphothreonin-Bindemodule, in denen die Loopregionen die entscheidende Rolle der Substrat-Erkennung und -Bindung übernehmen [51, 54]. Obwohl sie sich sequentiell stark voneinander unterscheiden, so gibt es aus struktureller Sicht kaum Unterschiede zwischen den FHA-Domänen aus diversen Proteinen [88, 274, 275]. Über sequentielle und strukturelle Überlagerungen wurden 5 konservierte Aminosäuren identifiziert (Abbildung 4.6), die auf drei aufeinanderfolgende Loops β_3 - β_4 , β_4 - β_5 und β_6 - β_7 verteilt sind und wichtig für die Interaktion mit einem Phosphopeptid sind [141].

			L: β_3 - β_4		L: β_4 - β_5	
1J4L_Rad53FHA2	(597)	GVNPF	FFIGRSE	-DCNCK	IEDNR-L	-----SRVHCFIFKKRH
1GXC_hCHK2	(109)	VNDNYWE	GRDK	-SCEYCFDE	PLLKRTDKYRTY	SKKHFRIFRE-V
2JQJ_Dun1	(52)	NRNVTTI	GRSR	-SCDVIL	SEPD-I	-----STFHAEFHLLQM
1G6G_Rad53_FHA1	(62)	IKK	VWTEGRNP	-ACDYHLGN	ISRL	-----SNKHFFQILLG--
2AFF_ki67	(23)	SLSTCLE	GRGI	-ECDIRIQ	LPV-V	-----SKQHCKIEIHEQ
3VPY_Dawdle	(36)	RQSCYLE	GRERRIAD	IPTDHPS	-C	-----SKQHAVIQYREM
2N84_TbPar42	(89)	RFPFYLE	GRSK	-VCDYVLEHPS	-I	-----SSVHAVLVFH--
						L: β_6 - β_7
1J4L_Rad53FHA2	(631)	AVGKSMYESPAQGL	DDIWYCHTGT	INVSYL	NNNRMIQGT	TKFLLQD
1GXC_hCHK2	(151)	G-----	PK-NSYIAYIEDHSG	NGTFV	NTELVGKGKRR	PLNN
2JQJ_Dun1	(86)	DVDN-----	F-QRNLINVIDKSR	NGTF	FINGNRLVKDYILK	-N
1G6G_Rad53_FHA1	(95)	-----	EDGNLLLNDIST	NGTWL	NGQVEKNSNQLLSQ	
2AFF_ki67	(57)	E-----	AILHNFSS	TNPTQV	NGSVIDEPVRLKH--	
3VPY_Dawdle	(71)	EKEKPDGM	MGK-QVKPYIM	DLG	STNKTYINE	SPIEPQRYEL--
2N84_TbPar42	(121)	-----	GG-QRCFV	LDLG	STNGVKLN	GNRIEKRRPLPA--

Abbildung 4.6 Sequenzvergleich verschiedener FHA-Domänen

In Gelb dargestellt sind β -Stränge und in Rot Helix-Bereiche. Lila umrahmt sind konservierte Reste, die an der Bindung eines Phosphomotivs beteiligt sind. Vor dem Proteinnamen ist der PDB-Code der FHA Struktur zu finden. Die Nummerierung des Sequenzbereiches ist in Klammern zu sehen.

Das Arginin (β_3 - β_4 -Loop) und das Serin (β_4 - β_5 -Loop) bilden ein Wasserstoffbrücken-Netzwerk mit der Phosphatgruppe des Phosphothreonins aus [158]. Reste der genannten Loopregionen zeigen auch bei der *TbPar42*-FHA-Domäne starke chemische Verschiebungen der Amidprotonen nach Titrations mit Phosphothreonin enthaltenden Peptiden (Abbildung 3.45 und Abbildung 3.46). Für das konservierte Glycin am Ende des β_3 -Strangs konnte gezeigt werden, dass es Interaktionen mit dem konservierten Histidin im β_4 - β_5 -Loop eingeht und somit die Architektur der Bindestelle stabilisiert [141]. Zudem bildet das Histidin Wasserstoffbrücken

zu Resten im β_4 - β_5 - und β_6 - β_7 -Loop aus und trägt somit zusätzlich zur kompakten Faltung der FHA-Domänen bei [54]. Mutationsstudien am besagten Histidin in der FHA1-Domäne der Checkpoint-Kinase Rad53p aus *S. cerevisiae* führten zum Zusammenbruch des Netzwerks und verhinderten somit die Bindung eines Phosphomotivs [51]. In der *TbPar42*-FHA Struktur übernimmt das Histidin 124 die stabilisierende Funktion, da es ist in der gleichen Orientierung und mit räumlicher Nähe zu den Loopregionen wie in der Hefe-FHA1-Struktur vorzufinden ist. Der fünfte konservierte Rest entspricht einem Asparagin im β_6 - β_7 -Loop. Bei einigen FHA-Domänen, darunter auch der Kanadaplin-FHA-Domäne ist das Asparagin in dem β_6 - β_7 -Loop durch ein Histidin ersetzt. Das Asparagin/Histidin in der FHA-Domäne ist für die Peptidwechselwirkung mit dem Rest an den +1 und +3 Positionen nach dem phosphorylierten Threonin wichtig [184, 266]. Die Favorisierung einer bestimmten Aminosäure an der dritten Stelle führt zur Aufstellung der „pT+3 Regel“, wodurch FHA-Domänen bis auf wenige Ausnahmen nach ihrer Präferenz zu pTXXD- oder pTXXI/V/L-Motiven unterteilt werden. Die Bevorzugung von bestimmten Aminosäuren nach einem phosphoryliertem Rest wurde bereits bei SH2-Domänen beschrieben [228]. Diese sind als Bindemodule von phosphoryliertem Tyrosin bekannt und in vielen Adaptorproteinen vorhanden [201]. Eine weitere Gemeinsamkeit der SH2- und FHA-Domänen ist die kaum auftretende konformationelle Änderung nach Bindung eines Phosphomotivs [88].

Zusätzlich erinnert der FHA-Kern von der strukturellen Anordnung der β -Stränge an MH2-Domänen, die in SMAD-Transkriptionsfaktoren vertreten sind und als Phosphoserin-Bindemodule in TGF β -Signalwegen involviert sind. [54, 88]. Die genannten Bindemodule einschließlich der FHA-Domänen könnten somit aus einer Proteinfamilie hervorgegangen sein, welche sich evolutionär auf die selektive Erkennung einer bestimmten phosphorylierten Aminosäure spezialisierten [88]. Der Grund weshalb FHA-Domänen, anders als die WW-Domäne bei Pin1 [151, 267], zwischen einem Phosphoserin und Phosphothreonin unterscheiden und bevorzugt an Phosphothreonin-Epitope binden [53] ist, dass an der Bindung des phosphorylierten Threonins hauptsächlich Loops beteiligt sind. Dabei übernehmen die konservierten Reste der Loopregionen die entscheidende Funktion der Bindung. Es kommt zu vielzähligen Van-der-Waals Interaktionen mit der Methylgruppe des Phosphothreonins [88], wodurch der β -Faltblatt-Kern der FHA-Struktur rigider wird [46, 184]. Somit bestimmen die Loops über die Phosphoselektivität, aber auch wie zuvor erwähnt über die Bindung an die Sequenz um das Phosphothreonin.

Für die N-terminale FHA1-Domäne der Rad53p-Kinase wurde über Peptidbibliotheken ermittelt, dass die FHA1 einen nanomolaren K_D (330 nM) für Peptide mit einem Aspartat an der+3 Position nach dem Phosphothreonin aufweist [54]. Die Bevorzugung einer negativ geladene Aminosäure an dieser Stelle ist auf das Vorhandensein des Arg83 im β_4 - β_5 -Loop zurückzuführen [53], da die Guanidiniumgruppe der Seitenkette zwei Wasserstoffbrücken mit

der Carboxylgruppe des Aspartats eingeht [54]. Dieses Arginin ist in der *TbPar42*-FHA nicht vorhanden, wodurch der nur auf Phosphothreonin-Bindung-beruhende millimolare K_D mit dem Ala-Glu-Ala-pThr-Ala-Glu-Asp-Peptid zu erklären wäre. Die C-terminale FHA2-Domäne der Rad53p-Kinase zeigt eine Selektivität gegenüber einem Leucin oder Isoleucin an der pT+3 Position [54, 141, 158]. Diese Präferenz ist durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Peptid-Leucin und dem Isoleucin 681 im β_{10} - β_{11} -Loop in der FHA2-Domäne zu erklären [26]. Die Stelle des Isoleucins ist in der *TbPar42*-FHA-Domäne durch ein Phenylalanin (162F) besetzt. Im Vergleich zu den restlichen Shifts nach Phosphopeptid-Zugabe zeigt das Phenylalanin keine starke chemische Verschiebung der Rückgrat-Resonanz im $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum. Da der β_{10} - β_{11} Loop in der *TbPar42*-FHA kürzer ist als in der Rad53p-FHA2, könnte in der Parvulin-FHA das Serin 164 eine bedeutende Rolle bei der Peptidbindung spielen, da es den größten Shift in der genannten Loopregion aufweist. Anders als die Rad53p-FHA2- ist die Rad53p-FHA1-Domäne in der Lage, sowohl das pTXXD- als auch das pTXXI-Motiv zu binden [54]. Beim letzteren ist nicht das besagte Arginin 83 für die Interaktionen zum Peptid wichtig, sondern die hydrophoben Kontakte der angrenzenden Aminosäuren Glycin (135G) und Valin (136V) im β_{10} - β_{11} -Loop der FHA1 mit dem Isoleucin des Peptids [141].

Obwohl die *TbPar42*-FHA unter Beteiligung der Loops Phosphopeptide erkennt, wurde den K_D -Werten zur Folge keine Favorisierung einer bestimmten Aminosäure an der pT+3 Position festgestellt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Bindung nicht nur von der pT+3 Regel abhängt, sondern dass die Affinität zum Partnerprotein oder Bindepeptid durch drei Reste vor dem pT, sowie durch zwei nachfolgende Aminosäuren bis zur +3 Stelle beeinflusst wird [2, 54, 159]. Des Weiteren gibt es auch FHA-Domänen, die keine pTXXD- oder pTXXI/L/V-Motive bevorzugen. So favorisiert die in Pflanzen vorkommende FHA-Domäne der Kinase-assoziierten Phosphatase Ki-FHA ein Glutamin an der pT+1- und ein Serin an der pT+3 Position [47]. Die Bindung wird zusätzlich zu den Phosphothreonin-bindenden Loops über den langen und flexiblen β_8 - β_9 -Loop gewährleistet [47]. Bei der *TbPar42*-FHA reagiert das Isoleucin 144 im β_8 - β_9 -Loop sehr stark auf die Zugabe von Phosphopeptiden und in den ^{15}N -Dynamikstudien fiel es durch eine hohe Flexibilität auf (Abbildung 3.33).

Bisher konnten für viele FHA-Domänen über synthetisch hergestellte Peptidbibliotheken die optimalen Bindesequenzen ermittelt werden. Dabei handelt es sich um Hexa- oder Heptamere, die zwar nicht immer mit den Bindeepitopen in biologisch vorkommenden Interaktionspartnern übereinstimmen [142, 158, 213], aber erheblich zum Verständnis der Wechselwirkung zwischen FHA und Bindepartner beigetragen haben [54, 159]. So konnte gezeigt werden, dass die Bindung auf direkten Kontakten zwischen dem Peptid und den Loops der FHA-Domänen beruht und dass keine Wassermoleküle an dem Interaktionsnetzwerk beteiligt sind. Zusätzlich wurde aus den Holostrukturstrukturen ersichtlich, dass das Peptid in einer charakteristischen, gestreckten Konformation gebunden wird [54, 266] (Abbildung 4.7).

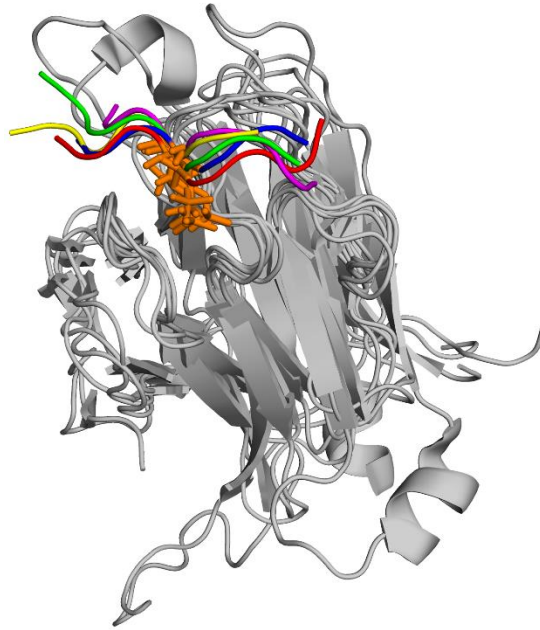


Abbildung 4.7 FHA-Strukturen mit gebundenen Phosphopeptiden

Zu sehen sind überlagerte FHA-Strukturen (PDB ID: 1G6G, 1J4L, 3POA, 3UNN, 2AFF) in grau. In unterschiedlichen Farben dargestellt sind jeweils die an die FHA gebundenen Phosphopeptide, welche stets in der gleichen Orientierung an die FHA docken. Orange und in *Sticks* dargestellt ist das Phosphothreonin.

Bei der *TbPar42*-FHA-Domäne kann aufgrund der $H_N N_H$ -Shifts nach Peptidzugabe in den charakteristischen Phosphosequenz-bindenden Loops ein identischer Dockingmechanismus erwartet werden. Über Bindungsstudien der Phosphopeptide an FHA-Domänen postulierten Durocher *et al.*, dass für repräsentative Aussagen der Bindungsaffinität das Phosphopeptid eine Mindestlänge von sechs Resten aufweisen sollte [53]. Da die *TbPar42*-FHA den Titrationsauswertungen zur Folge die pT+3 Regel nicht befolgt, könnte die Peptidlänge der getesteten Peptide der Grund für deren geringe Affinität zur FHA-Domäne sein. Solch eine Beobachtung wurde für die FHA des Tumormarkers Ki67 [24] mit dem biologischen Target, dem nuklearen Bindeprotein hNIFK beschrieben [137]. Der K_D -Wert zwischen der Ki67-FHA und dem 44-Aminosäuren langen hNIFK-Fragment (hNIFK₂₂₆₋₂₆₉) betrug 100 μ M, wohingegen die Dissoziationskonstante zwischen der Ki67-FHA und dem hNIFK-Heptamer₂₆₀₋₂₆₆ bei 42 mM lag [27, 137]. Die Länge des Bindemotivs wäre somit eine mögliche Erklärung warum die Dissoziationskonstante der *TbPar42*-FHA zum Suc-Ala-pThr-Pro-NH₂ Peptid etwas höher war als zu den Heptapeptiden mit variabler Aminosäure an pT+3 Position. Der K_D -Wert zwischen der *TbPar42*-FHA und dem Dekapeptid aus dem SAP155-Homolog in *T. brucei* war mit 870 μ M noch geringer. Trotzdem ist diese Bindungsaffinität sehr schwach im Vergleich zu anderen FHA-Domänen mit ihren Bindesequenzen [54].

Außerdem ist es möglich, dass für eine hochaffine Bindung eine sequentielle mehrstellige Phosphorylierung des Bindemotivs notwendig ist, wie es bei der Bindung der Ki67- und NIPP1-FHA-Domäne an deren Bindepartner der Falls ist [20, 27]. Die *TbPar42*-FHA zeigt eine hohe

Strukturübereinstimmung mit der NIPP1-FHA und eine BLAST-Suche in der Proteindatenbank von *T. brucei* mit NIPP1-FHA als Template ergab als einzigen Treffer die FHA-Domäne aus dem Parvulin 42. Somit ist es denkbar, dass die zwei FHA-Domänen auch eine funktionelle Gemeinsamkeit aufzeigen könnten. Ähnlich wie Ki67-FHA weist auch die FHA-Domäne des nuklearen Inhibitors der Proteinphosphatase 1 (NIPP1) keine pT+3 Bevorzugung auf. Die N-terminale FHA-Domäne von NIPP1 [176] interagiert mit Regulatoren des mRNA-Splicing-Prozesses [19, 20] und Boudrez *et al.* zeigten, dass die Wechselwirkung Phosphorylierungs- und Zellzyklus-bedingt ist [19]. Die Interaktion mit dem Splicing-Faktor SAP155, welcher Teil des U2 *small nuclear Ribonucleoprotein particles* ist, erfolgt über einen TP-reichen Bereich [20], in welchem mehrere Threonine phosphoryliert sind. Die NIPP1-FHA-Domäne verfügt nur über eine Phosphothreonin-Bindestelle, so dass die restlichen pTP-Stellen aus SAP155 zur Stabilität des Komplexes beitragen. Zudem konnte gezeigt werden, dass das synthetische SAP155-Dekapeptid₃₀₈₋₃₁₈, mit phosphoryliertem Thr 313 ausreichend ist um kompetitiv die Phospho-Bindestelle in der FHA-Domäne zu besetzen und somit die Interaktion zwischen SAP155 und NIPP1 zu unterbinden [20]. Ein Großteil der TP-Stellen (darunter auch die Bindungsrelevanten) ist in dem *Trypanosoma* SAP155 konserviert. Da die *TbPar42-FHA* eine Strukturähnlichkeit zur NIPP1-FHA aufweist, wurde die Interaktion des *TbSAP155*-Dekapeptids₁₀₉₋₁₁₉ mit der *TbPar42-FHA* untersucht. pTPMF, das Kernmotiv des Dekapeptids, ist auch in der Glyceraldehyde 3-phosphate-Dehydrogenase (*Trypanosoma*) zu finden. Die Affinität der *TbPa42-FHA* zu beiden Peptiden ist jedoch kaum unterscheidbar (870 μ M und 960 μ M). Zur höheren Affinität würde eventuell ein längeres Fragment mit mehreren naheliegenden pTP-Stellen beitragen. Da in der 339 Aminosäuren langen GAPDG nur an zwei, weit voneinander entfernten Stellen, ein TP-Motiv zu finden ist, ist die GAPDG als möglicher Interaktionspartner der *TbPar42-FHA* auszuschließen. Ob die *TbPar42-FHA* Wechselwirkungen mit dem Splicing-Faktor eingeht, für die Bindung längere Fragmente mit mehrstelliger Phosphorylierung nötig sind und die *TbPar42-FHA* am mRNA-Splicing involviert ist, erfordert weitere Untersuchungen.

5 Ausblick

Die sequentielle Phosphorylierung von Proteinen ist ein wichtiger Mechanismus bei der Auswahl des Bindepartners in Protein-Phosphoprotein-Interaktionen [137]. Obwohl FHA-Domänen mit Ausnahme der Dun1-FHA aus *S. cerevisiae* [9, 131, 273] nur über eine Phosphothreonin-Bindestelle verfügen, kann die Bindung an den Interaktionspartner von einer mehrstelligen Phosphorylierung bedingt sein [20, 27]. Interessanterweise binden die NIPP1-FHA sowie die Ki67-FHA an längere, multiphosphorylierte Fragmente aus biologischen Targets, in denen das Phosphothreonin von einem Prolin gefolgt ist [20, 27].

Phosphothreonin-/Serin-Prolin-Motive werden auch von phosphospezifischen PPIase-Domänen erkannt und isomerisiert [12, 121]. Da die PPIase-Domäne von *TbPar42* katalytisch inaktiv ist, jedoch alle notwendigen Reste für eine Phosphospezifität aufweist, könnte diese zusätzlich zur FHA-Domäne an der Bindung der mehrstelligen pTP-Motive beteiligt sein, ohne diese zu isomerisieren, und somit entweder zur Stabilisierung des FHA-Zielprotein-Komplexes beitragen oder als Andockstelle für weitere Interaktionspartner fungieren. Um diesem nachzugehen, soll in künftiger Arbeit eine mögliche Interaktion zwischen der *TbPa42*-PPIase-Domäne und dem TP-reichen Abschnitt des Splicingfaktors SAP155 aus *T. brucei* untersucht werden, vorausgesetzt die *TbPar42*-FHA-Domäne bindet spezifisch an ein längeres, mehrstellig-phosphoryliertes Fragment (aus *TbSAP155*).

Um die Auswahl an biologischen Bindeproteinen einzugrenzen, soll über Peptidbibliotheken nach optimalen Bindesequenzen der *TbPar42*-FHA gesucht werden [184] und die mögliche Favorisierung des Prolins an Position +1 nach dem Phosphothreonin kontrolliert werden.

Da *TbPar42* im Zellkern lokalisiert ist [76] und die *TbPar42*-FHA-Domäne über eine ausgeprägte positive Ladungsverteilung aufweist (Abbildung 3.45 C), soll zusätzlich eine Interaktion mit Nukleinsäuren überprüft werden.

Zudem soll die Funktion der *TbPar42*-PPIase-Domäne als Chaperon mit einem anderen Modellprotein wie der Citrat-Synthase und fungierenden Chaperonen wie GroEL, Hsp70 und Hsp90 [23] als Positivkontrolle erneut überprüft werden.

Die potentielle katalytische Tetrade der *TbPar42*-PPIase unterscheidet sich nur geringfügig von der katalytischen Tetrade der katalytisch aktiven PPIase des humanen Pin1 (Abbildung 4.4). Ein wesentlicher Unterschied besteht in der Prolin-Bindetasche. An der Position des Met130 in *hPin1* ist in der *TbPar42*-PPIase ein Tyrosin vorhanden (Abbildung 4.5). Eine Substitution des Tyrosins durch ein Methionin soll zeigen, ob dieser Rest das Binden des Substrates verhindert und somit einen Einfluss auf die Interaktion zum Substrat hat.

6 Zusammenfassung

Parvuline gehören zur Gruppe der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPlasen) und katalysieren die Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen. Sie spielen sowohl bei der Proteinfaltung als auch bei der Funktionsregulation anderer Proteine eine wichtige Rolle. 2010 wurde das 42 kDa große Parvulin aus dem humanen Pathogen *T. brucei* als neues Familienmitglied identifiziert. Das Mehrdomänen-Protein verfügt neben der konservierten C-terminalen PPlase-Domäne über eine N-terminale FHA-Domäne.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *TbPar42* strukturell sowie funktionell mit NMR-Spektroskopie charakterisiert. Wegen des hohen Molekulargewichts wurden einzelne Teilkonstrukte von *TbPar42* (Domänen und der zwischenliegende Linker) exprimiert und deren 3D-Strukturen in Lösung aufgeklärt. Mit Hilfe von HSQC- und TROSY-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die strukturierten Domänen im vollständigen Protein über einen größtenteils unstrukturierten Linker verbunden sind und nicht miteinander wechselwirken.

Obwohl die *TbPar42*-PPlase-Domäne über eine Parvulin-Topologie verfügt und strukturell dem humanen phosphospezifischen Parvulin-Vertreter Pin1 ähnelt, konnte gegenüber potentiellen phosphorylierten Substraten keine Isomeraseaktivität festgestellt werden. Da in Protease-gekoppelten Isomeraseassays auch keine Aktivität gegenüber unphosphorylierten Motiven beobachtet wurde, muss bei der *TbPar42*-PPlase von einer katalytisch inaktiven Domäne ausgegangen werden. Anders als für einige prokaryotische Parvuline, ließ sich für *TbPar42* in einem Rückfaltungs-Assay auch keine Chaperonaktivität nachweisen.

Die FHA-Domäne des *TbPar42* wurde zusammen mit den 30 Aminosäuren des vorausgehenden N-Terminus exprimiert und strukturell untersucht. Während der N-Terminus flexibel und unstrukturiert ist, ist die FHA-Domäne in Form eines 11-strängigen β -Faltblatt-Sandwiches gefaltet, mit zusätzlichen helikalen Elementen auf der Seite des 5-strängigen Faltblattes. *TbPar42*-FHA ist in der Lage Phosphothreonin-Peptide zu binden. Wie bei anderen FHA-Domänen bekannt, sind auch bei *TbPar42* an dieser Bindung hauptsächlich Loop-Regionen des Proteins beteiligt. Typische FHA-Domänen favorisieren die Bindung von Peptiden mit einer bestimmten Aminosäure an der dritten Position nach dem Phosphothreonin (pTXXD- oder pTXXI/V/L-Motive). Eine solche Präferenz ließ sich für die *TbPar42*-FHA in NMR-Titrationsstudien mit Heptapeptiden nicht belegen.

Die *TbPar42*-FHA hat eine hohe strukturelle Übereinstimmung mit der NIPP1-FHA, die eine Funktion beim mRNA-Spleißing einnimmt. Ob auch *TbPar42*-FHA oder das vollständige Protein eine Funktion bei der mRNA-Prozessierung hat, muss in weiteren Studien überprüft werden.

Abstract

Parvulins belong to the group of peptidyl prolyl cis/trans isomerases (PPIase) and catalyze the isomerization of peptidyl prolyl bonds. They play an important role both in protein folding and in functional regulation of other proteins. In 2010, the 42 kDa Parvulin from the human pathogen *T. brucei* has been identified as a new member of this protein family. In addition to the conserved C-terminal PPIase domain the multi-domain protein possesses an N-terminal FHA domain.

In this work *TbPar42* has been structurally and functionally characterized by NMR spectroscopy. Because of the high molecular weight of the full length protein, single domain constructs of *TbPar42*, including the intermediate linker, were expressed and their 3D structures were determined in solution. HSQC and TROSY experiments showed that the structured domains of the full length protein are connected via a largely unstructured linker and that the domains do not interact with each other.

Although the *TbPar42* PPIase domain exhibits a parvulin topology and a high structural similarity to the human phosphospecific parvulin representative Pin1, no isomerase activity for potential phosphorylated substrates was found. Since the PPIase domain didn't show isomerase activity for unphosphorylated motives in protease coupled isomerase assays either, we conclude that the PPIase domain of *TbPar42* is likely catalytically inactive. Furthermore unlike some prokaryotic parvulins, no chaperone activity could be observed in a refolding assay.

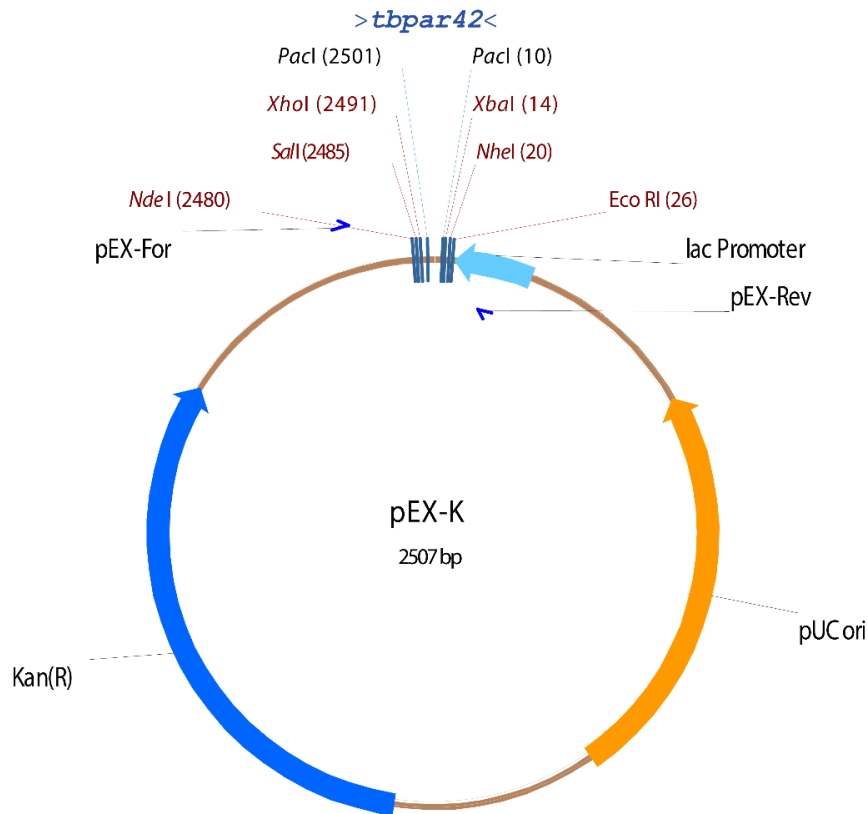
The FHA domain of *TbPar42* was expressed and structurally analyzed together with the 30 amino acids long N-terminus. While the N-terminus is flexible and unstructured, the FHA domain is folded into an 11-stranded β -sandwich, with additional helical elements flanking the 5-stranded β -sheet.

TbPar42-FHA is capable of binding phosphothreonine peptides. In the *TbPar42* FHA domain mainly loop regions of the protein are involved in peptide recognition, which has been observed for other FHA domains as well. Typical FHA domains favor the binding of peptides with a specific amino acid at the third position after the phosphothreonine (pTXXD- or pTXXI/V/L motives). In NMR titration studies with heptapeptides no such preference was observed for the *TbPar42* FHA domain.

The *TbPar42* FHA domain has a high structural similarity to the FHA domain of the NIPP1 protein, which has a function in mRNA splicing. Whether the FHA domain of *TbPar42* or the complete protein has a role in mRNA processing as well must be examined in further studies.

7 Anhang

7.1 pEX-K-Vektor mit der DNA-Sequenz (in Blau) von *tbpar42*



tbpar42:

```

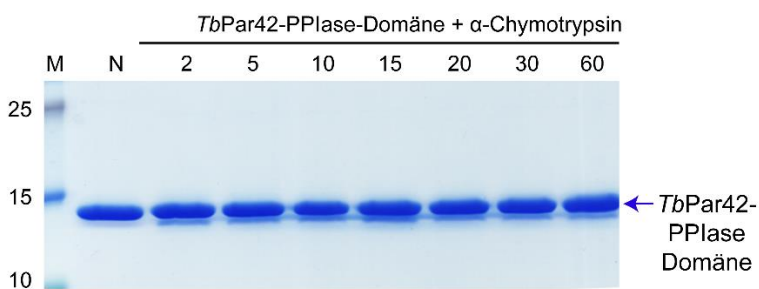
GGGCCCATGGTGACAAGCACCGGCCTGCTGAGCCGCGTGGCGGCGGTGGAAAAA
GCGGCGGAAATTGCGAAACCGCCGCCGCCGAAAGTGGTGGAAGTACCGAAGCG
GCGAAACAGCTGCCGAGCATATTATTGGCGTGACCGATCCGACCAAACCTGAAC
GCGCAGGTGAGCTATTTTCAGTGCCCGCCGTGGGCGGCTCTGCCGAGCGTGCGCT
GCCATCTGCAGTGCACCCGCGATGGCCTGCCGCTGCCGGCGCTGGGCTGCATCG
CTTCCGTTTTATCTGTTTGGCCGAGCAAAGTGTGCGATTATGTGCTGGAACATC
CGAGCATTAGCAGCGTGCAATGCGGTGCTGGTGTTCATGGCGGCCAGCGCTGCTT
TGTGCTGATGGATCTGGGCAGCACCAACGGCGTGAAACTGAACGGCAACCCGAT
TGAAAAACGCCGCCCGCTGCCGGCGCCGGTGGGCAGCAGCATTTCAGTTTGGCTTT
AGCAGCCGCGTGTATAAAGTGCAGCTGGGGCCACCGTCTTCTTCTAAACGCCTGC
GCGAAGAACAGGAACGCCAGGAAGCGGAAGAAGGCAAACGCAAATGCGTGGA
GAAGATCAGCAGAACGGCACCCCTGGGCGATACCCGCGTGAGCCCGAGCACCAGC
GGCGCGGTGAGCAACGAAGAACGCATTGAAGGCAACGTGGTGGTGGATCGCACC
GTGGTGGAAAGCGTGGCGGCGGAAACCAAAGAAGTGGTGACCTGCGATGGCGTG
CTGGAAACCAGCGTGCAGGCGGGCGCGCCGCCGCCGACCGAACGCCATTTTTATC
ATGTGCTGGTGAAACATAAAGATGTGCGCCGCCGAGCAGCCTGGCGCCGCGCA
ACAAAGCGAAAAAATTACCCGACGCCGCGGATGCGATTAACTGGCGCCGCGCA
CGATTCTGGCGCAGCATAAAGAACGCAAAACCTGGAGCCTGGATGAAATTTGTGC
AGGTGGTGC GCGATTTTAGCGAATGCGGCAGCGCGAAACGCGATGGCGATCTGG
GCATGGTGGAAAGCGGCACCTATACCGAAGGCTTTGATACCGTGGCGTTTAGCCT
GAAAAGCGGCGAAGTGAGCGCGCCGGTGGAAACCGAAGTGGGCGTGCACTGAT
TTATCGCGTGGAATAAGCTCGAG

```

7.2 Auflistung der einzelnen Konstrukte mit zugehörigem Extinktionskoeffizienten

	Aminosäuren- anzahl	Molekular- gewicht [kDa]	Theoretischer pI-Wert	Extinktions- Koeffizient [M ⁻¹ cm ⁻¹]
GST- <i>TbPar42</i> -VL	627	70,01	6,55	64290
<i>TbPar42</i> -VL	383	41,87	7,15	21430
GST- <i>TbPar42</i> -NterFHA	421	47,25	8,24	54320
<i>TbPar42</i> -NterFHA	177	19,11	9,51	11460
GST- <i>TbPar42</i> -Linker	339	38,28	5,38	42860
<i>TbPar42</i> -Linker	95	10,14	4,47	0
GST- <i>TbPar42</i> -PPlase	364	41,64	6,39	52830
<i>TbPar42</i> -PPlase	120	31,5	7,46	9970

7.3 α -Chymotrypsin-Verdau der *TbPar42*-PPlase-Domäne



M: Marker, N: PPlase vor α -Chymotrypsin-Zugabe, PPlase-Proben nach 2-60 min nach α -Chymotrypsin-Zugabe

7.4 Aufgenommene NMR-Spektren für die Zuordnung, Strukturrechnung und Dynamik-Analyse der TbPar42-Konstrukte

NS-Number of Scans, SW-sweep width, TD-data acquisition size, SI-Fourier transform size, F1, F2, F3-dimensions, MT-mixing time. Einstellungen für TbPar42-VL (schwarz), TbPar42-NterFHA (grün), TbPar42-Linker (dunkelrot) und TbPar42-PPIase (blau)

Spektrum, Pulsprogramm Quelle	NS			SW [ppm]			TD			SI		
	F3	F2	F1	F3	F2	F1	F3	F2	F1			
	64		16			32768			32768			
¹ H-1D; zgesgp [102]	64		16			32768			32768			
	64		16			32768			32768			
	64		16			32768			32768			
	2	16	40	2048	256		4096	2048				
¹ H ¹⁵ N-HSQC; hsqctf3gpsi2 [111, 182, 209]	4	16	40	2048	256		4096	2048				
	8	12	36	2048	256		4069	2048				
	4	16	40	2048	256		4096	2048				
	4	15	38	2048	512		2048	1024				
SOFAST-HMQC ; sfhmqcf3gpqh [206]	4	15	38	2048	512		2048	1024				
	4	15	38	2048	512		2048	1024				
	1	16	154 (Aro:38)	2048	512		4096	2048				
¹ H ¹³ C-HSQC; hsqcetgpsi [111, 182, 209]	32	16	154	2048	512		4096	2048				
	12	15	34	75	2048	36	128	1024	64			
CBCACONH ; cbcacohgpgw3d [11, 172]	12	15	34	75	2048	36	128	1024	64			
	12	15	34	75	2048	36	128	1024	64			
	24	15	34	80	2048	40	128	2048	128			
HNCACB ; hncacbgpgw3d [172, 260]	24	15	34	80	2048	40	128	2048	128			
	24	15	34	80	2048	40	128	2048	128			
	32	15	36	32	2048	40	64	1024	64			
HNCA ; hncagpgw3d [11, 113, 208]	32	15	36	32	2048	40	128	2048	256			
	16	16	36	32	2048	40	128	2048	256			
HNCOCA ; hncocagpgw3d [11]	16	16	36	32	2048	40	128	2048	256			
	16	16	36	22	2048	40	128	1024	128			
HNCO ; hncogpgw3d [11, 113, 208]	24	16	36	22	2048	40	128	1024	128			
	16	16	40	22	2048	40	128	1024	128			
	16	16	36	22	2048	40	128	2048	256			
HNCACO ; hncacogpgw3d [36, 113]	24	16	36	22	2048	40	128	2048	256			
	16	16	40	22	2048	40	128	2048	256			
	12	15	40	15	2048	40	128	2048	128			
HBHANH ; hbhanhgpgw3d	12	15	40	15	2048	40	128	2048	128			
	16	16	38	16	2048	40	128	2048	128			
HBHACONH ; hbhaconhgpgw3d [80, 172]	16	16	38	16	2048	40	128	2048	128			
	16	16	34	75	2048	40	128	1024	128			
CCCONH ; ccconhgpgw3d [28, 35, 79, 150, 166]	16	16	34	75	2048	40	128	1024	128			
	16	16	36	16	2048	40	128	2048	256			
HCCCONH ; hccconhgpgw3d2 [79, 150, 166]	16	16	36	16	2048	40	128	2048	256			
	16	16	36	16	2048	40	128	2048	256			
HCCH-COSY ; hcchcogpgw3d [112]	16	16	75	8	2048	64	128	2048	256			
	8	16	75	8	2048	64	128	2048	256			
HCCH-TOCSY ; hcchdigpgw3d	16	16	75	8	2048	64	128	2048	256			

[112]	8	16	75	8	2048	64	128	2048	256	512
H, H-COSY ; cosydfgpph19	112		15	15		2048	512		4096	2048
[44, 190, 226]	112		15	15		2048	512		4096	2048
H, H-TOCSY ; dipsi2etgpsi19	80		16	16		2048	512		4096	2048
[30, 190, 226]; MT: 80 ms	80		16	16		2048	512		4096	2048
H, H-NOESY ; noesygpph19	72		15	15		2048	512		4096	2048
[190, 226]; MT: 200 ms	128		15	15		2048	512		4096	2048
¹H¹⁵N-TOCSY-HSQC ;	16	15	34	15	2048	80	128	2048	128	512
dipsihsqcf3gpsi3d										
[111, 182, 209]; MT: 80 ms	8	15	34	15	2048	80	200	2048	128	512
¹H ¹⁵N-NOESY-HSQC ; Ehnhsqcnoe	4	15	15	35	1024	300	140	2048	512	512
(Ana Messias); MT: 100 ms	4	15	15	35	1024	300	140	2048	512	512
¹H ¹³C-TOCSY-HSQC ; mlevhsqcetgp3d	24	12	60	12	2048	64	128	2048	256	512
[10, 41, 111, 182, 208]; MT: 30 ms										
¹H ¹³C-NOESY-HSQC ;	24	12	70	12	2048	64	128	2048	256	512
noesyhsqcetgpsi3d										
[111, 182, 209]; MT: 100 ms										
TROSY ; bb_2D_btrosy	128		16	40		2048	256		2048	512
[135, 212]										
hetNOE	20		16	40		2048	1024		4096	2048
hsqcnoef3gpsi_pbayer										

8 Literaturverzeichnis

- [1] Acuner Ozbabacan, S. E., Engin, H. B., Gursoy, A., and Keskin, O. 2011. Transient protein-protein interactions. *Protein engineering, design & selection : PEDS* 24, 9, 635–648.
- [2] Alderwick, L. J., Molle, V., Kremer, L., Cozzone, A. J., Dafforn, T. R., Besra, G. S., and Futterer, K. 2006. Molecular structure of EmbR, a response element of Ser/Thr kinase signaling in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 8, 2558–2563.
- [3] Andreotti, A. H. 2003. Native state proline isomerization: an intrinsic molecular switch. *Biochemistry* 42, 32, 9515–9524.
- [4] Ayed, A., Mulder, F. A., Yi, G. S., Lu, Y., Le Kay, and Arrowsmith, C. H. 2001. Latent and active p53 are identical in conformation. *Nature structural biology* 8, 9, 756–760.
- [5] B. Eckert & F. X. Schmid. Proline als molekularer Schalter. *Biospektrum* 12; 151-153 2006.
- [6] Bailey, M. L., Shilton, B. H., Brandl, C. J., and Litchfield, D. W. 2008. The dual histidine motif in the active site of Pin1 has a structural rather than catalytic role. *Biochemistry* 47, 44, 11481–11489.
- [7] Bao, L., Kimzey, A., Sauter, G., Sowadski, J. M., Lu, K. P., and Wang, D. G. 2004. Prevalent Overexpression of Prolyl Isomerase Pin1 in Human Cancers. *The American journal of pathology* 164, 5, 1727–1737.
- [8] Bartek, J., Falck, J., and Lukas, J. 2001. CHK2 kinase--a busy messenger. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2, 12, 877–886.
- [9] Bashkurov, V. I., Bashkurova, E. V., Haghazari, E., and Heyer, W.-D. 2003. Direct Kinase-to-Kinase Signaling Mediated by the FHA Phosphoprotein Recognition Domain of the Dun1 DNA Damage Checkpoint Kinase. *Molecular and Cellular Biology* 23, 4, 1441–1452.
- [10] Bax, A. and Davis, D. G. 1985. MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* 65, 2, 355–360.
- [11] Bax, A. and Grzesiek, S. *Amino-Acid Type Determination in the Sequential Assignment Procedure of Uniformly C-13/N-15-Enriched Proteins*.
- [12] Bayer, E., Goetsch, S., Mueller, J. W., Griewel, B., Guiberman, E., Mayr, L. M., and Bayer, P. 2003. Structural analysis of the mitotic regulator hPin1 in solution: insights into domain architecture and substrate binding. *The Journal of biological chemistry* 278, 28, 26183–26193.
- [13] Bayer, E., Thutewohl, M., Christner, C., Tradler, T., Osterkamp, F., Waldmann, H., and Bayer, P. 2005. Identification of hPin1 inhibitors that induce apoptosis in a mammalian Ras transformed cell line. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 4, 516–518.
- [14] Behrens, S., Maier, R., Cock, H. de, Schmid, F. X., and Gross, C. A. 2001. The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity. *The EMBO journal* 20, 1-2, 285–294.
- [15] Behrsin, C. D., Bailey, M. L., Bateman, K. S., Hamilton, K. S., Wahl, L. M., Brandl, C. J., Shilton, B. H., and Litchfield, D. W. 2007. Functionally important residues in the peptidyl-prolyl isomerase Pin1 revealed by unigenic evolution. *Journal of molecular biology* 365, 4, 1143–1162.

- [16] Bell, D. W., Varley, J. M., Szydlo, T. E., Kang, D. H., Wahrer, D. C., Shannon, K. E., Lubratovich, M., Verselis, S. J., Isselbacher, K. J., Fraumeni, J. F., Birch, J. M., Li, F. P., Garber, J. E., and Haber, D. A. 1999. Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science (New York, N.Y.)* 286, 5449, 2528–2531.
- [17] Bernstein, M. A., King, K. F., and Zhou, X. J. 2004. *Handbook of MRI pulse sequences*. Academic Press, Amsterdam, Boston.
- [18] Bitto, E. and McKay, D. B. 2002. Crystallographic Structure of SurA, a Molecular Chaperone that Facilitates Folding of Outer Membrane Porins. *Structure* 10, 11, 1489–1498.
- [19] Boudrez, A., Beullens, M., Groenen, P., van Eynde, A., Vulsteke, V., Jagiello, I., Murray, M., Krainer, A. R., Stalmans, W., and Bollen, M. 2000. NIPP1-mediated Interaction of Protein Phosphatase-1 with CDC5L, a Regulator of Pre-mRNA Splicing and Mitotic Entry. *Journal of Biological Chemistry* 275, 33, 25411–25417.
- [20] Boudrez, A., Beullens, M., Waelkens, E., Stalmans, W., and Bollen, M. 2002. Phosphorylation-dependent Interaction between the Splicing Factors SAP155 and NIPP1. *J. Biol. Chem.* 277, 35, 31834–31841.
- [21] Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 1-2, 248–254.
- [22] Breitmaier, E. and Jung, G. 2012. *Organische Chemie. Grundlagen, Verbindungsklassen, Reaktionen, Konzepte, Molekülstruktur, Naturstoffe, Syntheseplanung, Nachhaltigkeit ; 145 Tabellen*. Thieme, Stuttgart u.a.
- [23] Buchner, J., Grallert, H., and Jakob, U. 1998. [27] Analysis of chaperone function using citrate synthase as nonnative substrate protein. In *Molecular chaperones*, G. H. Lorimer and T. O. Baldwin, Eds. Methods in Enzymology 290. Acad. Press, San Diego, Calif., 323–338. DOI=10.1016/S0076-6879(98)90029-5.
- [24] Byeon, I. J., Li, H., and Tsai, M. D. 2003. *Solution Structure of human Ki67 FHA Domain*.
- [25] Byeon, I. J., Yongkiettrakul, S., and Tsai, M. D. 2001. Solution structure of the yeast Rad53 FHA2 complexed with a phosphothreonine peptide pTXXL: comparison with the structures of FHA2-pYXL and FHA1-pTXXD complexes. *Journal of molecular biology* 314, 3, 577–588.
- [26] Byeon, I.-J., Yongkiettrakul, S., and Tsai, M.-D. 2001. *SOLUTION STRUCTURE OF THE FHA2 DOMAIN OF RAD53 COMPLEXED WITH A PHOSPHOTHREONYL PEPTIDE DERIVED FROM RAD9*.
- [27] Byeon, I.-J. L., Li, H., Song, H., Gronenborn, A. M., and Tsai, M.-D. 2005. Sequential phosphorylation and multisite interactions characterize specific target recognition by the FHA domain of Ki67. *Nat Struct Mol Biol* 12, 11, 987–993.
- [28] Carlomagno, T., Maurer, M., Sattler, M., Schwendinger, M. G., Glaser, S. J., and Griesinger, C. 1996. PLUSH TACS: Homonuclear planar TACS with two-band selective shaped pulses applied to C(alpha),C' transfer and C(beta),C(aromatic) correlations. *Journal of biomolecular NMR* 8, 2, 161–170.
- [29] Cavanagh, J. 2007. *Protein NMR spectroscopy. Principles and practice*. Academic Press, Amsterdam, Boston.

- [30] Cavanagh, J. and Rance, M. 1990. Sensitivity improvement in isotropic mixing (TOCSY) experiments. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* 88, 1, 72–85.
- [31] Cesareni, G. 2005. *Modular protein domains*. Wiley-VCH, Weinheim.
- [32] Chen, S.-h., Smolka, M. B., and Zhou, H. 2007. Mechanism of Dun1 Activation by Rad53 Phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 282, 2, 986–995.
- [33] Chen, X. B., Melchionna, R., Denis, C. M., Gaillard, P. H., Blasina, A., van de Weyer, I., Boddy, M. N., Russell, P., Vialard, J., and McGowan, C. H. 2001. Human Mus81-associated endonuclease cleaves Holliday junctions in vitro. *Molecular Cell* 8, 5, 1117–1127.
- [34] Cheng, C. W., Chow, A. K., Pang, R., Fok, E. W., Kwong, Y. L., and Tse, E. 2013. PIN1 inhibits apoptosis in hepatocellular carcinoma through modulation of the antiapoptotic function of survivin. *The American journal of pathology* 182, 3, 765–775.
- [35] Clowes, R., Boucher, W., Hardman, C., Domaille, P., and Laue, E. 1993. A 4D HCC(CO)NNH experiment for the correlation of aliphatic side-chain and backbone resonances in ¹³C/¹⁵N-labelled proteins. *J Biomol NMR* 3, 3, 349–354.
- [36] Clubb, R. T., Thanabal, V., and Wagner, G. 1992. A constant-time three-dimensional triple-resonance pulse scheme to correlate intrareidue ¹HN, ¹⁵N, and ¹³C' chemical shifts in ¹⁵N-¹³C-labelled proteins. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* 97, 1, 213–217.
- [37] Corbi-Verge, C. and Kim, P. M. 2016. Motif mediated protein-protein interactions as drug targets. *Cell communication and signaling : CCS* 14, 8.
- [38] Cornilescu, G., Delaglio, F., and Bax, A. 1999. Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *Journal of biomolecular NMR* 13, 3, 289–302.
- [39] Dartigalongue, C. and Raina, S. 1998. A new heat-shock gene, ppiD, encodes a peptidyl-prolyl isomerase required for folding of outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *The EMBO journal* 17, 14, 3968–3980.
- [40] Daum, S., Erdmann, F., Fischer, G., Feaux de Lacroix, B., Hessamian-Alinejad, A., Houben, S., Frank, W., and Braun, M. 2006. Aryl indanyl ketones: efficient inhibitors of the human peptidyl prolyl cis/trans isomerase Pin1. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 45, 44, 7454–7458.
- [41] Davis, A. L., Keeler, J., Laue, E. D., and Moskau, D. 1992. Experiments for recording pure-absorption heteronuclear correlation spectra using pulsed field gradients. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* 98, 1, 207–216.
- [42] Delano. 2002. The PyMOL Molecular Graphics System.
- [43] Deng, C.-X. and Wang, R.-H. 2003. Roles of BRCA1 in DNA damage repair: a link between development and cancer. *Hum. Mol. Genet.* 12, suppl 1, R113-R123.
- [44] Derome, A. E. and Williamson, M. P. 1990. Rapid-pulsing artifacts in double-quantum-filtered COSY. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* 88, 1, 177–185.
- [45] Devasahayam, G., Chaturvedi, V., and Hanes, S. D. 2002. The Ess1 prolyl isomerase is required for growth and morphogenetic switching in *Candida albicans*. *Genetics* 160, 1, 37–48.

- [46] Ding, Z., Lee, G.-I., Liang, X., Gallazzi, F., Arunima, A., and van Doren, S. R. 2005. PhosphoThr peptide binding globally rigidifies much of the FHA domain from Arabidopsis receptor kinase-associated protein phosphatase. *Biochemistry* 44, 30, 10119–10134.
- [47] Ding, Z., Wang, H., Liang, X., Morris, E. R., Gallazzi, F., Pandit, S., Skolnick, J., Walker, J. C., and van Doren, S. R. 2007. Phosphoprotein and phosphopeptide interactions with the FHA domain from Arabidopsis kinase-associated protein phosphatase. *Biochemistry* 46, 10, 2684–2696.
- [48] Driver, J. A., Zhou, X. Z., and Lu, K. P. 2014. Regulation of protein conformation by Pin1 offers novel disease mechanisms and therapeutic approaches in Alzheimer's disease. *Discovery medicine* 17, 92, 93–99.
- [49] Drouault, S., Anba, J., Bonneau, S., Bolotin, A., Ehrlich, S. D., and Renault, P. 2002. The Peptidyl-Prolyl Isomerase Motif Is Lacking in PmpA, the PrsA-Like Protein Involved in the Secretion Machinery of *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 8, 3932–3942.
- [50] Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J., and Barton, G. J. 2015. JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic acids research* 43, W1, W389-94.
- [51] Durocher, D., Henckel, J., Fersht, A. R., and Jackson, S. P. 1999. The FHA Domain Is a Modular Phosphopeptide Recognition Motif. *Molecular Cell* 4, 3, 387–394.
- [52] Durocher, D. and Jackson, S. P. 2002. The FHA domain. *FEBS Letters* 513, 1, 58–66.
- [53] Durocher, D. and Taylor, I. A. 2000. X-RAY STRUCTURE OF THE N-TERMINAL FHA DOMAIN FROM *S. CEREVISIAE* RAD53P IN COMPLEX WITH A PHOSPHOTHREONINE PEPTIDE AT 1.6 Å RESOLUTION.
- [54] Durocher, D., Taylor, I. A., Sarbassova, D., Haire, L. F., Westcott, S. L., Jackson, S. P., Smerdon, S. J., and Yaffe, M. B. 2000. The Molecular Basis of FHA Domain. Phosphopeptide Binding Specificity and Implications for Phospho-Dependent Signaling Mechanisms. *Molecular Cell* 6, 5, 1169–1182.
- [55] Ea, C. K., Sun, L., Inoue, J., and Chen, Z. J. 2004. TIFA activates I κ B kinase (IKK) by promoting oligomerization and ubiquitination of TRAF6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 43, 15318–15323.
- [56] Edlich, F., Weiwad, M., Wildemann, D., Jarczowski, F., Kilka, S., Moutty, M.-C., Jahreis, G., Lucke, C., Schmidt, W., Striggow, F., and Fischer, G. 2006. The specific FKBP38 inhibitor N-(N',N'-dimethylcarboxamidomethyl)cycloheximide has potent neuroprotective and neurotrophic properties in brain ischemia. *The Journal of biological chemistry* 281, 21, 14961–14970.
- [57] Eichinger, L., Pachebat, J. A., Glockner, G., Rajandream, M.-A., Sugang, R., Berriman, M. et al. 2005. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 435, 7038, 43–57.
- [58] Erben, E. D., Daum, S., and Téllez-Iñón, M. T. 2007. The *Trypanosoma cruzi* PIN1 gene encodes a parvulin peptidyl-prolyl cis/trans isomerase able to replace the essential ESS1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and biochemical parasitology* 153, 2, 186–193.
- [59] Erben, E. D., Nardelli, S. C., Jesus, T. C. de, Schenkman, S., and Tellez-Inon, M. T. 2013. Trypanosomatid pin1-type peptidyl-prolyl isomerase is cytosolic and not essential for cell proliferation. *The Journal of eukaryotic microbiology* 60, 1, 101–105.

- [60] Erben, E. D., Valguarnera, E., Nardelli, S., Chung, J., Daum, S., Potenza, M., Schenkman, S., and Tellez-Inon, M. T. 2010. Identification of an atypical peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from trypanosomatids. *Biochimica et biophysica acta* 1803, 9, 1028–1037.
- [61] Esnault, S., Braun, R. K., Shen, Z.-J., Xiang, Z., Heninger, E., Love, R. B., Sandor, M., and Malter, J. S. 2007. Pin1 modulates the type 1 immune response. *PLoS ONE* 2, 2, e226.
- [62] Fanghanel, J. and Fischer, G. 2004. Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 9, 3453–3478.
- [63] Fischer, G. 1984. *Nachweis einer Enzymkatalyse für die cis-trans-Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden*. Akad.-Verl, Berlin.
- [64] Fischer, G. and Bang, H. 1985. The refolding of urea-denatured ribonuclease A is catalyzed by peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 828, 1, 39–42.
- [65] Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., and Schmid, F. X. 1989. Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* 337, 6206, 476–478.
- [66] Fishman, R. A. 1997. Infections of the central nervous system, ed 2. Edited by W. Michael Scheld, Richard J. Whitley, and David T. Durack Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996 1064 pp, illustrated, \$199.00. *Ann Neurol.* 41, 6, 837.
- [67] Frevert, U., Movila, A., Nikolskaia, O. V., Raper, J., Mackey, Z. B., Abdulla, M., McKerrow, J., and Grab, D. J. 2012. Early invasion of brain parenchyma by African trypanosomes. *PLoS ONE* 7, 8, e43913.
- [68] Fujimori, F., Takahashi, K., Uchida, C., and Uchida, T. 1999. Mice lacking Pin1 develop normally, but are defective in entering cell cycle from G(0) arrest. *Biochemical and biophysical research communications* 265, 3, 658–663.
- [69] Fujiyama, S., Yanagida, M., Hayano, T., Miura, Y., Isobe, T., and Takahashi, N. 2002. Isolation and Proteomic Characterization of Human Parvulin-associating Preribosomal Ribonucleoprotein Complexes. *J. Biol. Chem.* 277, 26, 23773–23780.
- [70] Fujiyama-Nakamura, S., Yoshikawa, H., Homma, K., Hayano, T., Tsujimura-Takahashi, T., Izumikawa, K., Ishikawa, H., Miyazawa, N., Yanagida, M., Miura, Y., Shinkawa, T., Yamauchi, Y., Isobe, T., and Takahashi, N. 2009. Parvulin (Par14), a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, is a novel rRNA processing factor that evolved in the metazoan lineage. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 8, 7, 1552–1565.
- [71] Garnier, J., Gibrat, J.-F., and Robson, B. 1996. [32] GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. In *Computer methods for macromolecular sequence analysis*, R. F. Doolittle, Ed. Methods in Enzymology 266. Acad. Press, San Diego, Calif., 540–553. DOI=10.1016/S0076-6879(96)66034-0.
- [72] Garnier, J., Osguthorpe, D. J., and Robson, B. 1978. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *Journal of molecular biology* 120, 1, 97–120.
- [73] Gavini, N., Tungtur, S., and Pulakat, L. 2006. Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerase-Independent Functional NifH Mutant of *Azotobacter vinelandii*†. *Journal of bacteriology* 188, 16, 6020–6025.

- [74] Geourjon, C. and Deleage, G. 1995. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Computer applications in the biosciences : CABIOS* 11, 6, 681–684.
- [75] Glick, D. M. 1997. *Glossary of biochemistry and molecular biology*. Portland Press, London.
- [76] Goh, J. Y., Lai, C.-Y., Tan, L. C., Yang, D., He, C. Y., and Liou, Y.-C. 2010. Functional characterization of two novel parvulins in *Trypanosoma brucei*. *FEBS Letters* 584, 13, 2901–2908.
- [77] Golemis, E. 2002. *Protein-protein interactions. A molecular cloning manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- [78] Gothel, S. F. and Marahiel, M. A. 1999. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 55, 3, 423–436.
- [79] Grzesiek, S., Anglister, J., and Bax, A. 1993. Correlation of Backbone Amide and Aliphatic Side-Chain Resonances in ¹³C/¹⁵N-Enriched Proteins by Isotropic Mixing of ¹³C Magnetization. *Journal of Magnetic Resonance, Series B* 101, 1, 114–119.
- [80] Grzesiek, S. and Bax, A. 1993. Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly ¹³C/¹⁵N-enriched proteins. *Journal of biomolecular NMR* 3, 2, 185–204.
- [81] Guillemain, G., Ma, E., Mauger, S., Miron, S., Thai, R., Guerois, R., Ochsenbein, F., and Marsolier-Kergoat, M.-C. 2007. Mechanisms of checkpoint kinase Rad53 inactivation after a double-strand break in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 27, 9, 3378–3389.
- [82] Guntert, P. 2004. Automated NMR structure calculation with CYANA. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 278, 353–378.
- [83] Guntert, P. and Buchner, L. 2015. Combined automated NOE assignment and structure calculation with CYANA. *Journal of biomolecular NMR* 62, 4, 453–471.
- [84] Guntert, P., Mumenthaler, C., and Wuthrich, K. 1997. Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *Journal of molecular biology* 273, 1, 283–298.
- [85] Güntert, P., Braun, W., and Wüthrich, K. 1991. Efficient computation of three-dimensional protein structures in solution from nuclear magnetic resonance data using the program DIANA and the supporting programs CALIBA, HABAS and GLOMSA. *Journal of molecular biology* 217, 3, 517–530.
- [86] Guo, L., Wu, T., Hu, W., He, X., Sharma, S., Webster, P., Gimzewski, J. K., Zhou, X., Lux, R., and Shi, W. 2013. Phenotypic characterization of the foldase homologue PrsA in *Streptococcus mutans*. *Molecular oral microbiology* 28, 2.
- [87] Gupta, D. and Tuteja, N. 2011. Chaperones and foldases in endoplasmic reticulum stress signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior* 6, 2, 232–236.
- [88] Hammet, A., Pike, B. L., McNees, C. J., Conlan, L. A., Tennis, N., and Heierhorst, J. 2003. FHA domains as phospho-threonine binding modules in cell signaling. *IUBMB life* 55, 1, 23–27.
- [89] Handschumacher, R. E., Harding, M. W., Rice, J., Drugge, R. J., and Speicher, D. W. 1984. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science (New York, N.Y.)* 226, 4674, 544–547.

- [90] Hanes, S. D. 2014. The Ess1 prolyl isomerase: Traffic cop of the RNA polymerase II transcription. *Biochimica et biophysica acta* 1839, 4, 316–333.
- [91] Hanes, S. D., Shank, P. R., and Bostian, K. A. 1989. Sequence and mutational analysis of ESS1, a gene essential for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* 5, 1, 55–72.
- [92] Hani, J., Stumpf, G., and Domdey, H. 1995. PTF1 encodes an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae*, which shows strong homology with a new putative family of PPlases. *FEBS Letters* 365, 2-3, 198–202.
- [93] Harding, M. W., Galat, A., Uehling, D. E., and Schreiber, S. L. 1989. A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* 341, 6244, 758–760.
- [94] He, Z., Li, L., and Luan, S. 2004. Immunophilins and parvulins. Superfamily of peptidyl prolyl isomerases in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134, 4, 1248–1267.
- [95] Heikkinen, O., Seppala, R., Tossavainen, H., Heikkinen, S., Koskela, H., Permi, P., and Kilpeläinen, I. 2009. Solution structure of the parvulin-type PPlase domain of *Staphylococcus aureus* PrsA – Implications for the catalytic mechanism of parvulins. *BMC Struct Biol* 9, 1, 17.
- [96] Henderson, M. J., Munoz, M. A., Saunders, D. N., Clancy, J. L., Russell, A. J., Williams, B., Pappin, D., Khanna, K. K., Jackson, S. P., Sutherland, R. L., and Watts, C. K. W. 2006. EDD mediates DNA damage-induced activation of CHK2. *The Journal of biological chemistry* 281, 52, 39990–40000.
- [97] Herrmann, T., Güntert, P., and Wüthrich, K. 2002. Protein NMR Structure Determination with Automated NOE Assignment Using the New Software CANDID and the Torsion Angle Dynamics Algorithm DYANA. *Journal of molecular biology* 319, 1, 209–227.
- [98] Hofmann, K. and Bucher, P. 1995. The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors. *Trends in biochemical sciences* 20, 9, 347–349.
- [99] Holm, L. and Rosenstrom, P. 2010. Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic acids research* 38, Web Server issue, W545-9.
- [100] Hoppstock, L., Trusch, F., Lederer, C., van West, P., Koenneke, M., and Bayer, P. 2016. NmPin from the marine thaumarchaeote *Nitrosopumilus maritimus* is an active membrane associated prolyl isomerase. *BMC biology* 14, 1, 53.
- [101] Huang, H. K., Forsburg, S. L., John, U. P., O'Connell, M. J., and Hunter, T. 2001. Isolation and characterization of the Pin1/Ess1p homologue in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of cell science* 114, Pt 20, 3779–3788.
- [102] Hwang, T. L. and Shaka, A. J. 1995. Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients. *Journal of Magnetic Resonance, Series A* 112, 2, 275–279.
- [103] Jakob, R. P., Koch, J. R., Burmann, B. M., Schmidpeter, P. A., Hunkeler, M., Hiller, S., Schmid, F. X., and Maier, T. Dimeric Structure of the Bacterial Extracellular Foldase PrsA. *J. Biol. Chem.*, jbc.M114.622910. DOI=10.1074/jbc.M114.622910.
- [104] Jarymowycz, V. A. and Stone, M. J. 2006. Fast time scale dynamics of protein backbones: NMR relaxation methods, applications, and functional consequences. *Chemical reviews* 106, 5, 1624–1671.

- [105] Jin, Z. G., Melaragno, M. G., Liao, D. F., Yan, C., Haendeler, J., Suh, Y. A., Lambeth, J. D., and Berk, B. C. 2000. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. *Circulation research* 87, 9, 789–796.
- [106] Jiskoot, W. and Crommelin, D. J. A. 2005. *Methods for structural analysis of protein pharmaceuticals*. Biotechnology: pharmaceutical aspects 3. AAPS Press, Arlington, VA.
- [107] Jordens, J., Janssens, V., Longin, S., Stevens, I., Martens, E., Bultynck, G., Engelborghs, Y., Lescrinier, E., Waelkens, E., Goris, J., and van Hoof, C. 2006. The protein phosphatase 2A phosphatase activator is a novel peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase. *The Journal of biological chemistry* 281, 10, 6349–6357.
- [108] Jorgensen, W. L. and Gao, J. 1988. Cis-trans energy difference for the peptide bond in the gas phase and in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 13, 4212–4216.
- [109] Jousselin, A., Manzano, C., Biette, A., Reed, P., Pinho, M., Rosato, A., Kelley, W. L., and Renzoni, A. The *Staphylococcus aureus* chaperone PrsA is a new auxiliary factor of oxacillin resistance affecting Penicillin-binding protein 2A. *Antimicrob. Agents Chemother.*, AAC.02333-15. DOI=10.1128/AAC.02333-15.
- [110] Kang, C. B., Hong, Y., Dhe-Paganon, S., and Yoon, H. S. 2008. FKBP family proteins: immunophilins with versatile biological functions. *Neuro-Signals* 16, 4, 318–325.
- [111] Kay, L., Keifer, P., and Saarinen, T. 1992. Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 26, 10663–10665.
- [112] Kay, L. E., Xu, G. Y., Singer, A. U., Muhandiram, D. R., and Formankay, J. D. 1993. A Gradient-Enhanced HCCH-TOCSY Experiment for Recording Side-Chain ¹H and ¹³C Correlations in H₂O Samples of Proteins. *Journal of Magnetic Resonance, Series B* 101, 3, 333–337.
- [113] Kay, L. E., Xu, G. Y., and Yamazaki, T. 1994. Enhanced-Sensitivity Triple-Resonance Spectroscopy with Minimal H₂O Saturation. *Journal of Magnetic Resonance, Series A* 109, 1, 129–133.
- [114] Kennedy, P. G. 2004. Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. *Journal of Clinical Investigation* 113, 4, 496–504.
- [115] Kennedy, P. G. 2013. Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *The Lancet. Neurology* 12, 2, 186–194.
- [116] Kessler, D., Papatheodorou, P., Stratmann, T., Dian, E. A., Hartmann-Fatu, C., Rassow, J., Bayer, P., and Mueller, J. W. 2007. The DNA binding parvulin Par17 is targeted to the mitochondrial matrix by a recently evolved prepeptide uniquely present in Hominidae. *BMC biology* 5, 37.
- [117] Kim, M., Ahn, J. W., Song, K., Paek, K. H., and Pai, H. S. 2002. Forkhead-associated domains of the tobacco NtFHA1 transcription activator and the yeast Fhl1 forkhead transcription factor are functionally conserved. *The Journal of biological chemistry* 277, 41, 38781–38790.
- [118] Kleckner, I. R. and Foster, M. P. 2011. An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics. *Biochimica et biophysica acta* 1814, 8, 942–968.

- [119]Kofron, J. L., Kuzmic, P., Kishore, V., Colon-Bonilla, E., and Rich, D. H. 1991. Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl cis-trans isomerases by an improved spectrophotometric assay. *Biochemistry* 30, 25, 6127–6134.
- [120]Krieger, E., Nielsen, J. E., Spronk, C. A. E. M., and Vriend, G. 2006. Fast empirical pKa prediction by Ewald summation. *Journal of molecular graphics & modelling* 25, 4, 481–486.
- [121]Krishnan, N., Lam, T. T., Fritz, A., Rempinski, D., O'Loughlin, K., Minderman, H., Berezney, R., Marzluff, W. F., and Thapar, R. 2012. The prolyl isomerase Pin1 targets stem-loop binding protein (SLBP) to dissociate the SLBP-histone mRNA complex linking histone mRNA decay with SLBP ubiquitination. *Molecular and Cellular Biology* 32, 21, 4306–4322.
- [122]Kuhlewein, A., Voll, G., Hernandez Alvarez, B., Kessler, H., Fischer, G., Rahfeld, J.-U., and Gemmecker, G. 2004. Solution structure of Escherichia coli Par10: The prototypic member of the Parvulin family of peptidyl-prolyl cis/trans isomerases. *Protein science : a publication of the Protein Society* 13, 9, 2378–2387.
- [123]Kumeta, H., Ogura, K., Fujioka, Y., Tanuma, N., Kikuchi, K., and Inagaki, F. 2007. *FHA domain of NIPP1*.
- [124]La, D., Kong, M., Hoffman, W., Im Choi, Y., and Kihara, D. 2013. Predicting permanent and transient protein-protein interfaces. *Proteins* 81, 5, 805–818.
- [125]Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 5259, 680–685.
- [126]Lamond, A. I. and Spector, D. L. 2003. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 8, 605–612.
- [127]Landrieu, I., Veylder, L. de, Fruchart, J. S., Odaert, B., Casteels, P., Portetelle, D., van Montagu, M., Inze, D., and Lippens, G. 2000. The Arabidopsis thaliana PIN1At gene encodes a single-domain phosphorylation-dependent peptidyl prolyl cis/trans isomerase. *The Journal of biological chemistry* 275, 14, 10577–10581.
- [128]Landrieu, I., Wieruszeski, J. M., Wintjens, R., Inze, D., and Lippens, G. 2002. *Solution structure of Pin1At from Arabidopsis thaliana*.
- [129]Langousis, G. and Hill, K. L. 2014. Motility and more: the flagellum of Trypanosoma brucei. *Nature Reviews Microbiology* 12, 7, 505–518.
- [130]Lee, G.-I., Ding, Z., Walker, J. C., and van Doren, S. R. 2003. NMR structure of the forkhead-associated domain from the Arabidopsis receptor kinase-associated protein phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 20, 11261–11266.
- [131]Lee, H., Yuan, C., Hammet, A., Mahajan, A., Chen, E. S.-W., Wu, M.-R., Su, M.-I., Heierhorst, J., and Tsai, M.-D. 2008. Diphosphothreonine-specific interaction between an SQ/TQ cluster and an FHA domain in the Rad53-Dun1 kinase cascade. *Molecular Cell* 30, 6, 767–778.
- [132]Lee, T. H., Pastorino, L., and Lu, K. P. 2011. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Pin1 in ageing, cancer and Alzheimer disease 13, e21.
- [133]Lee, T. H., Tun-Kyi, A., Shi, R., Lim, J., Soohoo, C., Finn, G., Balastik, M., Pastorino, L., Wulf, G., Zhou, X. Z., and Lu, K. P. 2009. Essential role of Pin1 in the regulation of TRF1 stability and telomere maintenance. *Nature cell biology* 11, 1, 97–105.

- [134] Leroy, C., Lee, S. E., Vaze, M. B., Ochsenbein, F., Guerois, R., Haber, J. E., and Marsolier-Kergoat, M. C. 2003. PP2C phosphatases Ptc2 and Ptc3 are required for DNA checkpoint inactivation after a double-strand break. *Molecular Cell* 11, 3, 827–835.
- [135] Lescop, E., Schanda, P., and Brutscher, B. 2007. A set of BEST triple-resonance experiments for time-optimized protein resonance assignment. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* 187, 1, 163–169.
- [136] Leulliot, N., Vicentini, G., Jordens, J., Quevillon-Cheruel, S., Schiltz, M., Barford, D., van Tilbeurgh, H., and Goris, J. 2006. Crystal structure of the PP2A phosphatase activator: implications for its PP2A-specific PPlase activity. *Molecular Cell* 23, 3, 413–424.
- [137] Li, H., Byeon, I. J. L., Ju, Y., and Tsai, M. D. 2004. Structure of human Ki67 FHA domain and its binding to a phosphoprotein fragment from hNIFK reveal unique recognition sites and new views to the structural basis of FHA domain functions. *Journal of molecular biology* 335, 1, 371–381.
- [138] Li, J., Smith, G. P., and Walker, J. C. 1999. Kinase interaction domain of kinase-associated protein phosphatase, a phosphoprotein-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 14, 7821–7826.
- [139] Li, J., Williams, B. L., Haire, L. F., Goldberg, M., Wilker, E., Durocher, D., Yaffe, M. B., Jackson, S. P., and Smerdon, S. J. 2002. FHA domain from human Chk2 kinase in complex with a synthetic phosphopeptide.
- [140] Li, Z., Li, H., Devasahayam, G., Gemmill, T., Chaturvedi, V., Hanes, S. D., and van Roey, P. 2005. The structure of the *Candida albicans* Ess1 prolyl isomerase reveals a well-ordered linker that restricts domain mobility. *Biochemistry* 44, 16, 6180–6189.
- [141] Liang, X. and van Doren, S. R. 2008. Mechanistic insights into phosphoprotein-binding FHA domains. *Accounts of chemical research* 41, 8, 991–999.
- [142] Liao, H., Yuan, C., Su, M. I., Yongkiettrakul, S., Qin, D., Li, H., Byeon, I. J., Pei, D., and Tsai, M. D. 2000. Structure of the FHA1 domain of yeast Rad53 and identification of binding sites for both FHA1 and its target protein Rad9. *Journal of molecular biology* 304, 5, 941–951.
- [143] Lin, L. N. and Brandts, J. F. 1984. Involvement of prolines-114 and -117 in the slow refolding phase of ribonuclease A as determined by isomer-specific proteolysis. *Biochemistry* 23, 24, 5713–5723.
- [144] Lin, L. N. and Brandts, J. F. 1985. Isomer-specific proteolysis of model substrates: influence that the location of the proline residue exerts on cis/trans specificity. *Biochemistry* 24, 23, 6533–6538.
- [145] Liou, Y. C., Ryo, A., Huang, H. K., Lu, P. J., Bronson, R., Fujimori, F., Uchida, T., Hunter, T., and Lu, K. P. 2002. Loss of Pin1 function in the mouse causes phenotypes resembling cyclin D1-null phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 3, 1335–1340.
- [146] Liou, Y.-C., Sun, A., Ryo, A., Zhou, X. Z., Yu, Z.-X., Huang, H.-K., Uchida, T., Bronson, R., Bing, G., Li, X., Hunter, T., and Lu, K. P. 2003. Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration. *Nature* 424, 6948, 556–561.
- [147] Lippens, G., Landrieu, I., and Smet, C. 2007. Molecular mechanisms of the phospho-dependent prolyl cis/trans isomerase Pin1. *The FEBS journal* 274, 20, 5211–5222.

- [148]Liu, J., Farmer, J. D., JR, Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., and Schreiber, S. L. 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66, 4, 807–815.
- [149]Lodish, H. 2000. *Molecular cell biology*. Freeman, New York NY u.a.
- [150]Logan, T. M., Olejniczak, E. T., Xu, R. X., and Fesik, S. W. 1993. A general method for assigning NMR spectra of denatured proteins using 3D HC(CO)NH-TOCSY triple resonance experiments. *Journal of biomolecular NMR* 3, 2, 225–231.
- [151]Lu, K. P., Hanes, S. D., and Hunter, T. 1996. A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* 380, 6574, 544–547.
- [152]Lu, K. P. and Zhou, X. Z. 2007. The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 11, 904–916.
- [153]Lu, P. J., Zhou, X. Z., Shen, M., and Lu, K. P. 1999. Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science (New York, N.Y.)* 283, 5406, 1325–1328.
- [154]Lu, P.-J., Zhou, X. Z., Liou, Y.-C., Noel, J. P., and Lu, K. P. 2002. Critical Role of WW Domain Phosphorylation in Regulating Phosphoserine Binding Activity and Pin1 Function. *J. Biol. Chem.* 277, 4, 2381–2384.
- [155]Lu, Z. and Hunter, T. 2014. Prolyl isomerase Pin1 in cancer. *Cell research* 24, 9, 1033–1049.
- [156]Lufei, C. and Cao, X. 2009. Nuclear import of Pin1 is mediated by a novel sequence in the PPlase domain. *FEBS Letters* 583, 2, 271–276.
- [157]Lukas Hoppstock. 2016. *Studien zu der thaumarchaealen Prolyl-Isomerase NmPin aus Nitrosopumilus maritimus*.
- [158]Mahajan, A., Yuan, C., Lee, H., Chen, E. S.-W., Wu, P.-Y., and Tsai, M.-D. 2008. Structure and Function of the Phosphothreonine-Specific FHA Domain. *Sci. Signal.* 1, 51, re12-re12.
- [159]Mahajan, A., Yuan, C., Pike, B. L., Heierhorst, J., Chang, C.-F., and Tsai, M.-D. 2005. FHA domain-ligand interactions: importance of integrating chemical and biological approaches. *Journal of the American Chemical Society* 127, 42, 14572–14573.
- [160]Maleszka, R., Hanes, S. D., Hackett, R. L., Couet, H. G. de, and Miklos, G. L. 1996. The *Drosophila melanogaster dodo* (*dod*) gene, conserved in humans, is functionally interchangeable with the *ESS1* cell division gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 1, 447–451.
- [161]Malvy, D. and Chappuis, F. 2011. Sleeping sickness. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 17, 7, 986–995.
- [162]Matthews, K. R. 2005. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *Journal of cell science* 118, Pt 2, 283–290.
- [163]McCulloch, R. 2004. Antigenic variation in African trypanosomes: monitoring progress. *Trends in parasitology* 20, 3, 117–121.
- [164]Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., and Witman, George B. et al. 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science (New York, N.Y.)* 318, 5848, 245–250.

- [165] Metzner, M., Stoller, G., Rücknagel, K. P., Lu, K. P., Fischer, G., Luckner, M., and Küllertz, G. 2001. Functional Replacement of the Essential ESS1 in Yeast by the Plant Parvulin DIPar13. *J. Biol. Chem.* 276, 17, 13524–13529.
- [166] Montelione, G. T., Lyons, B. A., Emerson, S. D., and Tashiro, M. 1992. An efficient triple resonance experiment using carbon-13 isotropic mixing for determining sequence-specific resonance assignments of isotopically-enriched proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 27, 10974–10975.
- [167] Morris, E. R., Chevalier, D., and Walker, J. C. 2006. DAWDLE, a Forkhead-Associated Domain Gene, Regulates Multiple Aspects of Plant Development¹W. *Plant Physiology* 141, 3, 932–941.
- [168] Muecke, M. and Schmid, F. X. 1992. Enzymic catalysis of prolyl isomerization in an unfolding protein. *Biochemistry* 31, 34, 7848–7854.
- [169] Mueller, J. W. and Bayer, P. 2008. Small family with key contacts: par14 and par17 parvulin proteins, relatives of pin1, now emerge in biomedical research. *Perspectives in medicinal chemistry* 2, 11–20.
- [170] Mueller, J. W., Kessler, D., Neumann, D., Stratmann, T., Papatheodorou, P., Hartmann-Fatu, C., and Bayer, P. 2006. Characterization of novel elongated Parvulin isoforms that are ubiquitously expressed in human tissues and originate from alternative transcription initiation. *BMC molecular biology* 7, 9.
- [171] Mueller, J. W., Link, N. M., Matena, A., Hoppstock, L., Rüppel, A., Bayer, P., and Blankenfeldt, W. 2011. Crystallographic Proof for an Extended Hydrogen-Bonding Network in Small Prolyl Isomerases. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 50, 20096–20099.
- [172] Muhandiram, D. R. and Kay, L. E. 1994. Gradient-Enhanced Triple-Resonance Three-Dimensional NMR Experiments with Improved Sensitivity. *Journal of Magnetic Resonance, Series B* 103, 3, 203–216.
- [173] Neuhaus, D. and Williamson, M. P. 2000. *The nuclear Overhauser effect in structural and conformational analysis*. Methods in stereochemical analysis. Wiley-VCH, New York, NY.
- [174] Ngounou Wetie, A. G., Sokolowska, I., Woods, A. G., Roy, U., Loo, J. A., and Darie, C. C. 2013. Investigation of stable and transient protein-protein interactions: Past, present, and future. *Proteomics* 13, 3-4, 538–557.
- [175] Nigro, P., Pompilio, G., and Capogrossi, M. C. 2013. Cyclophilin A: a key player for human disease. *Cell death & disease* 4, e888.
- [176] O'Connell, N., Nichols, S. R., Heroes, E., Beullens, M., Bollen, M., Peti, W., and Page, R. 2012. The Molecular Basis for Substrate Specificity of the Nuclear NIPP1. PP1 Holoenzyme. *Structure* 20, 10, 1746–1756.
- [177] Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M. 2006. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127, 3, 635–648.
- [178] Osmani, A. H., McGuire, S. L., and Osmani, S. A. 1991. Parallel activation of the NIMA and p34cdc2 cell cycle-regulated protein kinases is required to initiate mitosis in *A. nidulans*. *Cell* 67, 2, 283–291.

- [179] Otieno, L. H., Darji, N., and Onyango, P. 1976. Development of Trypanosoma (Trypanozoon) brucei in Glossina morsitans inoculated into the tsetse haemocoel. *Acta tropica* 33, 2, 143–150.
- [180] Ou, W. B., Luo, W., Park, Y. D., and Zhou, H. M. 2001. Chaperone-like activity of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase during creatine kinase refolding. *Protein science : a publication of the Protein Society* 10, 11, 2346–2353.
- [181] Pallen, M., Chaudhuri, R., and Khan, A. 2002. Bacterial FHA domains: neglected players in the phospho-threonine signalling game? *Trends in microbiology* 10, 12, 556–563.
- [182] Palmer, A. G., Cavanagh, J., Wright, P. E., and Rance, M. 1991. Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* 93, 1, 151–170.
- [183] Pauling, L. 1960. *The nature of the chemical bond and the structure of molecules and crystals. An introduction to modern structural chemistry*. The George Fisher Baker non-resident lectureship in chemistry at Cornell University. Cornell Univ. Press, Ithaca NY.
- [184] Pennell, S., Westcott, S., Ortiz-Lombardia, M., Patel, D., Li, J., Nott, T. J., Mohammed, D., Buxton, R. S., Yaffe, M. B., Verma, C., and Smerdon, S. J. 2010. Structural and functional analysis of phosphothreonine-dependent FHA domain interactions. *Structure (London, England : 1993)* 18, 12, 1587–1595.
- [185] Perkins, J. R., Diboun, I., Dessailly, B. H., Lees, J. G., and Orengo, C. 2010. Transient protein-protein interactions: structural, functional, and network properties. *Structure (London, England : 1993)* 18, 10, 1233–1243.
- [186] Perrucci, G. L., Gowran, A., Zanobini, M., Capogrossi, M. C., Pompilio, G., and Nigro, P. 2015. Peptidyl-prolyl isomerases: a full cast of critical actors in cardiovascular diseases. *Cardiovascular research* 106, 3, 353–364.
- [187] Pervushin, K., Riek, R., Wider, G., and Wüthrich, K. 1997. Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 23, 12366–12371.
- [188] Pervushin, K., Riek, R., Wider, G., and Wüthrich, K. 1998. Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy (TROSY) for NMR Studies of Aromatic Spin Systems in ¹³C-Labeled Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 25, 6394–6400.
- [189] Pike, B. L., Yongkiettrakul, S., Tsai, M. D., and Heierhorst, J. 2003. Diverse but overlapping functions of the two forkhead-associated (FHA) domains in Rad53 checkpoint kinase activation. *The Journal of biological chemistry* 278, 33, 30421–30424.
- [190] Piotto, M., Saudek, V., and Sklenar, V. 1992. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *Journal of biomolecular NMR* 2, 6, 661–665.
- [191] Qiu, H., Zhang, X., Ni, W., Shi, W., Fan, H., Xu, J., Chen, Y., Ni, R., and Tao, T. 2016. Expression and Clinical Role of Cdc5L as a Novel Cell Cycle Protein in Hepatocellular Carcinoma. *Digestive diseases and sciences* 61, 3, 795–805.
- [192] Rahfeld, J. U., Schierhorn, A., Mann, K., and Fischer, G. 1994. A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from Escherichia coli. *FEBS Letters* 343, 1, 65–69.

- [193]Rahfeld, J.-U., Rücknagel, K. P., Schelbert, B., Ludwig, B., Hacker, J., Mann, K., and Fischer, G. 1994. Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl cis/trans isomerases Amino acid sequence and recombinant production of parvulin. *FEBS Letters* 352, 2, 180–184.
- [194]Ramakrishnan, P., Dickson, D. W., and Davies, P. 2003. Pin1 colocalization with phosphorylated tau in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Neurobiology of disease* 14, 2, 251–264.
- [195]Ranganathan, R., Lu, K. P., Hunter, T., and Noel, J. P. 1997. Structural and Functional Analysis of the Mitotic Rotamase Pin1 Suggests Substrate Recognition Is Phosphorylation Dependent. *Cell* 89, 6, 875–886.
- [196]Rassi, A. and Marin-Neto, J. A. 2010. Chagas disease. *The Lancet* 375, 9723, 1388–1402.
- [197]Reimer, T., Weiwad, M., Schierhorn, A., Ruecknagel, P. K., Rahfeld, J. U., Bayer, P., and Fischer, G. 2003. Phosphorylation of the N-terminal domain regulates subcellular localization and DNA binding properties of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase hPar14. *Journal of molecular biology* 330, 5, 955–966.
- [198]Rippmann, J. F., Hobbie, S., Daiber, C., Guilliard, B., Bauer, M., Birk, J., Nar, H., Garin-Chesa, P., Rettig, W. J., and Schnapp, A. 2000. Phosphorylation-dependent proline isomerization catalyzed by Pin1 is essential for tumor cell survival and entry into mitosis. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 11, 7, 409–416.
- [199]Rossi, P., Swapna, G. V. T., Huang, Y. J., Aramini, J. M., Anklin, C., Conover, K., Hamilton, K., Xiao, R., Acton, T. B., Ertekin, A., Everett, J. K., and Montelione, G. T. 2010. A microscale protein NMR sample screening pipeline. *Journal of biomolecular NMR* 46, 1, 11–22.
- [200]Rouviere, P. E. and Gross, C. A. 1996. SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes & development* 10, 24, 3170–3182.
- [201]Russell, R. B., Breed, J., and Barton, G. J. 1992. Conservation analysis and structure prediction of the SH2 family of phosphotyrosine binding domains. *FEBS Letters* 304, 1, 15–20.
- [202]Ryo, A., Nakamura, M., Wulf, G., Liou, Y. C., and Lu, K. P. 2001. Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta-catenin by inhibiting its interaction with APC. *Nature cell biology* 3, 9, 793–801.
- [203]Ryo, A., Suizu, F., Yoshida, Y., Perrem, K., Liou, Y.-C., Wulf, G., Rottapel, R., Yamaoka, S., and Lu, K. P. 2003. Regulation of NF- κ B Signaling by Pin1-Dependent Prolyl Isomerization and Ubiquitin-Mediated Proteolysis of p65/RelA. *Molecular Cell* 12, 6, 1413–1426.
- [204]Saningong, A. D. and Bayer, P. 2015. Human DNA-binding peptidyl-prolyl cis/trans isomerase Par14 is cell cycle dependently expressed and associates with chromatin in vivo. *BMC biochemistry* 16, 4.
- [205]Sarvas, M., Harwood, C. R., Bron, S., and van Dijl, J. M. 2004. Post-translocational folding of secretory proteins in Gram-positive bacteria. *Biochimica et biophysica acta* 1694, 1-3, 311–327.
- [206]Schanda, P. and Brutscher, B. 2005. Very fast two-dimensional NMR spectroscopy for real-time investigation of dynamic events in proteins on the time scale of seconds. *Journal of the American Chemical Society* 127, 22, 8014–8015.

- [207]Scherer, G., Kramer, M. L., Schutkowski, M., Reimer, U., and Fischer, G. 1998. Barriers to Rotation of Secondary Amide Peptide Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 22, 5568–5574.
- [208]Schleucher, J., Sattler, M., and Griesinger, C. 1993. Kohärenzselektion durch Gradienten ohne Empfindlichkeitsverlust; Anwendung auf 3D-HNCO-Experimente. *Angew. Chem.* 105, 10, 1518–1521.
- [209]Schleucher, J., Schwendinger, M., Sattler, M., Schmidt, P., Schedletzky, O., Glaser, S. J., Sorensen, O. W., and Griesinger, C. 1994. A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients. *Journal of biomolecular NMR* 4, 2, 301–306.
- [210]Schmidt, E. and Guntert, P. 2012. A new algorithm for reliable and general NMR resonance assignment. *Journal of the American Chemical Society* 134, 30, 12817–12829.
- [211]Schreiber, S. L. 1991. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science (New York, N.Y.)* 251, 4991, 283–287.
- [212]Schulte-Herbruggen, T. and Sorensen, O. W. 2000. Clean TROSY: compensation for relaxation-induced artifacts. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* 144, 1, 123–128.
- [213]Schwartz, M. F., Duong, J. K., Sun, Z., Morrow, J. S., Pradhan, D., and Stern, D. F. 2002. Rad9 Phosphorylation Sites Couple Rad53 to the *Saccharomyces cerevisiae* DNA Damage Checkpoint. *Molecular Cell* 9, 5, 1055–1065.
- [214]Sekerina, E., Rahfeld, J. U., Muller, J., Fanghanel, J., Rascher, C., Fischer, G., and Bayer, P. 2000. NMR solution structure of hPar14 reveals similarity to the peptidyl prolyl cis/trans isomerase domain of the mitotic regulator hPin1 but indicates a different functionality of the protein. *Journal of molecular biology* 301, 4, 1003–1017.
- [215]Seko, Y., Fujimura, T., Taka, H., Mineki, R., Murayama, K., and Nagai, R. 2004. Hypoxia followed by reoxygenation induces secretion of cyclophilin A from cultured rat cardiac myocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 317, 1, 162–168.
- [216]Sharma, V. K., Li, B., Khanna, A., Sehajpal, P. K., and Suthanthiran, M. 1994. Which way for drug-mediated immunosuppression? *Current Opinion in Immunology* 6, 5, 784–790.
- [217]Shaw, P. E. 2002. Peptidyl-prolyl isomerases. A new twist to transcription. *EMBO reports* 3, 6, 521–526.
- [218]Shen, M., Stukenberg, P. T., Kirschner, M. W., and Lu, K. P. 1998. The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins. *Genes Dev.* 12, 5, 706–720.
- [219]Shen, W., Du, R., Li, J., Luo, X., Zhao, S., Chang, A., Zhou, W., Gao, R., Luo, D., Wang, J., Hao, N., Liu, Y., Chen, Y., Luo, Y., Sun, P., Yang, S., Luo, N., and Xiang, R. 2016. TIFA suppresses hepatocellular carcinoma progression via MALT1-dependent and -independent signaling pathways. *Sig. Transduct. Target. Ther.* 1, 16013.
- [220]Shen, Y., Lange, O., Delaglio, F., Rossi, P., Aramini, J. M., Liu, G., Eletsky, A., Wu, Y., Singarapu, K. K., Lemak, A., Ignatchenko, A., Arrowsmith, C. H., Szyperski, T., Montelione, G. T., Baker, D., and Bax, A. 2008. Consistent blind protein structure generation from NMR chemical shift data. *PNAS* 105, 12, 4685–4690.

- [221] Shen, Y., Vernon, R., Baker, D., and Bax, A. De novo protein structure generation from incomplete chemical shift assignments. *J Biomol NMR* 43, 2, 63–78. DOI=10.1007/s10858-008-9288-5.
- [222] Sherry, B., Yarlett, N., Strupp, A., and Cerami, A. 1992. Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 8, 3511–3515.
- [223] Shiu, S. H. and Bleecker, A. B. 2001. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2001, 113, re22.
- [224] Siekierka, J. J., Hung, S. H., Poe, M., Lin, C. S., and Sigal, N. H. 1989. A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature* 341, 6244, 755–757.
- [225] Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J. D., and Higgins, D. G. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology* 7, 539.
- [226] Sklenar, V., Piotto, M., Leppik, R., and Saudek, V. 1993. Gradient-Tailored Water Suppression for 1H-15N HSQC Experiments Optimized to Retain Full Sensitivity. *Journal of Magnetic Resonance, Series A* 102, 2, 241–245.
- [227] Soltes, G. R., Schwalm, J., Ricci, D. P., and Silhavy, T. J. 2016. The Activity of Escherichia coli Chaperone SurA Is Regulated by Conformational Changes Involving a Parvulin Domain. *J. Bacteriol.* 198, 6, 921–929.
- [228] Songyang, Z., Shoelson, S. E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W. G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., and Lechleider, R. J. 1993. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72, 5, 767–778.
- [229] Sorrentino, G., Comel, A., Mantovani, F., and Del Sal, G. 2014. Regulation of mitochondrial apoptosis by Pin1 in cancer and neurodegeneration. *SI:Mitochondria, Apoptosis and Cancer* 19, Part A, 88–96.
- [230] Stoll, H., Dengjel, J., Nerz, C., and Gotz, F. 2005. Staphylococcus aureus deficient in lipidation of prelipoproteins is attenuated in growth and immune activation. *Infection and immunity* 73, 4, 2411–2423.
- [231] Stymest, K. H. and Klappa, P. 2008. The periplasmic peptidyl prolyl cis-trans isomerases PpiD and SurA have partially overlapping substrate specificities. *The FEBS journal* 275, 13, 3470–3479.
- [232] Sudol, M., Chen, H. I., Bougeret, C., Einbond, A., and Bork, P. 1995. Characterization of a novel protein-binding module — the WW domain. *FEBS Letters* 369, 1, 67–71.
- [233] Sueishi, M., Takagi, M., and Yoneda, Y. 2000. The forkhead-associated domain of Ki-67 antigen interacts with the novel kinesin-like protein Hklp2. *The Journal of biological chemistry* 275, 37, 28888–28892.
- [234] Sun, L., Wu, X., Peng, Y., Goh, J. Y., Liou, Y.-C., Lin, D., and Zhao, Y. 2012. Solution structural analysis of the single-domain parvulin TbPin1. *PLoS ONE* 7, 8, e43017.

- [235]Sun, Z., Hsiao, J., Fay, D. S., and Stern, D. F. 1998. Rad53 FHA domain associated with phosphorylated Rad9 in the DNA damage checkpoint. *Science (New York, N.Y.)* 281, 5374, 272–274.
- [236]Surmacz, T. A., Bayer, E., Rahfeld, J. U., Fischer, G., and 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. *Journal of molecular biology* 321, 2, 235–247.
- [237]Takagi, M., Sueishi, M., Saiwaki, T., Kametaka, A., and Yoneda, Y. 2001. A novel nucleolar protein, NIFK, interacts with the forkhead associated domain of Ki-67 antigen in mitosis. *The Journal of biological chemistry* 276, 27, 25386–25391.
- [238]Takahashi, N., Hayano, T., and Suzuki, M. 1989. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* 337, 6206, 473–475.
- [239]Terada, T., Shirouzu, M., Fukumori, Y., Fujimori, F., Ito, Y., Kigawa, T., Yokoyama, S., and Uchida, T. 2001. Solution structure of the human parvulin-like peptidyl prolyl cis/trans isomerase, hPar14. *Journal of molecular biology* 305, 4, 917–926.
- [240]Thiele, A., Krentzlin, K., Erdmann, F., Rauh, D., Hause, G., Zerweck, J., Kilka, S., Posel, S., Fischer, G., Schutkowski, M., and Weiwad, M. 2011. Parvulin 17 promotes microtubule assembly by its peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity. *Journal of molecular biology* 411, 4, 896–909.
- [241]Thon, G., Baltz, T., Giroud, C., and Eisen, H. 1990. Trypanosome variable surface glycoproteins. Composite genes and order of expression. *Genes & development* 4, 8, 1374–1383.
- [242]Tormo, A., Almiron, M., and Kolter, R. 1990. surA, an Escherichia coli gene essential for survival in stationary phase. *Journal of bacteriology* 172, 8, 4339–4347.
- [243]Tossavainen, H., Permi, P., Purhonen, S. L., Sarvas, M., Kilpelainen, I., and Seppala, R. 2006. NMR solution structure and characterization of substrate binding site of the PPIase domain of PrsA protein from Bacillus subtilis. *FEBS Letters* 580, 7, 1822–1826.
- [244]Trujillo, M., Budde, H., Piñeyro, M. D., Stehr, M., Robello, C., Flohé, L., and Radi, R. 2004. Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi Tryparedoxin Peroxidases Catalytically Detoxify Peroxynitrite via Oxidation of Fast Reacting Thiols. *J. Biol. Chem.* 279, 33, 34175–34182.
- [245]Uchida, T., Fujimori, F., Tradler, T., Fischer, G., and Rahfeld, J.-U. 1999. Identification and characterization of a 14 kDa human protein as a novel parvulin-like peptidyl prolyl cis / trans isomerase. *FEBS Letters* 446, 2-3, 278–282.
- [246]Uhrhammer, N., Bay, J. O., Gosse-Brun, S., Kwiatkowski, F., Rio, P., Daver, A., and Bignon, Y. J. 2000. Allelic imbalance at NBS1 is frequent in both proximal and distal colorectal carcinoma. *Oncology reports* 7, 2, 427–431.
- [247]Vallon, O. 2005. Chlamydomonas immunophilins and parvulins: survey and critical assessment of gene models. *Eukaryotic cell* 4, 2, 230–241.
- [248]Vitikainen, M., Lappalainen, I., Seppala, R., Antelmann, H., Boer, H., Taira, S., Savilahti, H., Hecker, M., Vihinen, M., Sarvas, M., and Kontinen, V. P. 2004. Structure-Function Analysis of PrsA Reveals Roles for the Parvulin-like and Flanking N- and C-terminal Domains in Protein Folding and Secretion in Bacillus subtilis. *Journal of Biological Chemistry* 279, 18, 19302–19314.

- [249] Vranken, W. F., Boucher, W., Stevens, T. J., Fogh, R. H., Pajon, A., Llinas, M., Ulrich, E. L., Markley, J. L., Ionides, J., and Laue, E. D. 2005. The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins* 59, 4, 687–696.
- [250] Vulsteke, V., Beullens, M., Boudrez, A., Keppens, S., van Eynde, A., Rider, M. H., Stalmans, W., and Bollen, M. 2004. Inhibition of Spliceosome Assembly by the Cell Cycle-regulated Protein Kinase MELK and Involvement of Splicing Factor NIPP1. *Journal of Biological Chemistry* 279, 10, 8642–8647.
- [251] Wagner, G. 1995. The importance of being floppy. *Nat Struct Mol Biol* 2, 4, 255–257.
- [252] Wagner, G., Neuhaus, D., Worgotter, E., Vasak, M., Kagi, J. H., and Wuthrich, K. 1986. Nuclear magnetic resonance identification of "half-turn" and 3(10)-helix secondary structure in rabbit liver metallothionein-2. *Journal of molecular biology* 187, 1, 131–135.
- [253] Wahlstrom, E., Vitikainen, M., Kontinen, V. P., and Sarvas, M. 2003. The extracytoplasmic folding factor PrsA is required for protein secretion only in the presence of the cell wall in *Bacillus subtilis*. *Microbiology (Reading, England)* 149, Pt 3, 569–577.
- [254] Wang, P. and Heitman, J. 2005. The cyclophilins. *Genome biology* 6, 7, 226.
- [255] Weininger, U., Jakob, R. P., Kovermann, M., Balbach, J., and Schmid, F. X. 2009. The prolyl isomerase domain of PpiD from *Escherichia coli* shows a parvulin fold but is devoid of catalytic activity. *Protein Science*, NA-NA.
- [256] Winkler, K. E., Swenson, K. I., Kornbluth, S., and Means, A. R. 2000. Requirement of the prolyl isomerase Pin1 for the replication checkpoint. *Science (New York, N.Y.)* 287, 5458, 1644–1647.
- [257] Wishart, D. S. and Sykes, B. D. 1994. The ¹³C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ¹³C chemical-shift data. *Journal of biomolecular NMR* 4, 2, 171–180.
- [258] Wishart, D. S., Sykes, B. D., and Richards, F. M. 1991. Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *Journal of molecular biology* 222, 2, 311–333.
- [259] Wishart, D. S., Sykes, B. D., and Richards, F. M. 1992. The chemical shift index. A fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy. *Biochemistry* 31, 6, 1647–1651.
- [260] Wittekind, M. and Mueller, L. 1993. HNCACB, a High-Sensitivity 3D NMR Experiment to Correlate Amide-Proton and Nitrogen Resonances with the Alpha- and Beta-Carbon Resonances in Proteins. *Journal of Magnetic Resonance, Series B* 101, 2, 201–205.
- [261] Wu, J., Lu, L.-Y., and Yu, X. 2010. The role of BRCA1 in DNA damage response. *Protein & cell* 1, 2, 117–123.
- [262] Wu, X., Wilcox, C. B., Devasahayam, G., Hackett, R. L., Arevalo-Rodriguez, M., Cardenas, M. E., Heitman, J., and Hanes, S. D. 2000. The Ess1 prolyl isomerase is linked to chromatin remodeling complexes and the general transcription machinery. *The EMBO journal* 19, 14, 3727–3738.
- [263] Wulf, G. M., Liou, Y.-C., Ryo, A., Lee, S. W., and Lu, K. P. 2002. Role of Pin1 in the regulation of p53 stability and p21 transactivation, and cell cycle checkpoints in response to DNA damage. *The Journal of biological chemistry* 277, 50, 47976–47979.

- [264]Wulf, G. M., Ryo, A., Wulf, G. G., Lee, S. W., Niu, T., Petkova, V., and Lu, K. P. 2001. Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1. *The EMBO journal* 20, 13, 3459–3472.
- [265]Wüthrich, K. 1986. *NMR of proteins and nucleic acids*. The George Fisher Baker non-resident lectureship in chemistry at Cornell University. Wiley, New York.
- [266]Xu, Q., Deller, M. C., Nielsen, T. K., Grant, J. C., Lesley, S. A., Elsliger, M.-A., Deacon, A. M., Wilson, I. A., and Kobe, B. 2014. Structural Insights into the Recognition of Phosphopeptide by the FHA Domain of Kanadaptin. *PLoS ONE* 9, 9, e107309.
- [267]Xu, X., Tsvetkov, L. M., and Stern, D. F. 2002. Chk2 activation and phosphorylation-dependent oligomerization. *Molecular and Cellular Biology* 22, 12, 4419–4432.
- [268]Xu, X., Wang, S., Hu, Y.-X., and McKay, D. B. 2007. The periplasmic bacterial molecular chaperone SurA adapts its structure to bind peptides in different conformations to assert a sequence preference for aromatic residues. *Journal of molecular biology* 373, 2, 367–381.
- [269]Xu, Y.-X., Hirose, Y., Zhou, X. Z., Lu, K. P., and Manley, J. L. 2003. Pin1 modulates the structure and function of human RNA polymerase II. *Genes Dev.* 17, 22, 2765–2776.
- [270]Yaffe, M. B., Schutkowski, M., Shen, M., Zhou, X. Z., Stukenberg, P. T., Rahfeld, J. U., Xu, J., Kuang, J., Kirschner, M. W., Fischer, G., Cantley, L. C., and Lu, K. P. 1997. Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science (New York, N.Y.)* 278, 5345, 1957–1960.
- [271]Yao, J. L., Kops, O., Lu, P. J., and Lu, K. P. 2001. Functional conservation of phosphorylation-specific prolyl isomerases in plants. *The Journal of biological chemistry* 276, 17, 13517–13523.
- [272]Yu, B., Bi, L., Zheng, B., Ji, L., Chevalier, D., Agarwal, M., Ramachandran, V., Li, W., Lagrange, T., Walker, J. C., and Chen, X. 2008. The FHA domain proteins DAWDLE in Arabidopsis and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 29, 10073–10078.
- [273]Yuan, C., Lee, H., Chang, C., Heierhorst, J., and Tsai, M. 2008. *NMR structure of yeast Dun1 FHA domain*.
- [274]Yuan, C., Yongkiettrakul, S., Byeon, I.-J., Zhou, S., and Tsai, M.-D. 2001. *REFINED NMR STRUCTURE OF THE FHA1 DOMAIN OF YEAST RAD53*.
- [275]Yuan, Y. A. and Machida, S. 2013. *Crystal structure of Arabidopsis DDL FHA domain*.
- [276]Zacchi, P., Gostissa, M., Uchida, T., Salvagno, C., Avolio, F., Volinia, S., Ronai, Z., Blandino, G., Schneider, C., and Del Sal, G. 2002. The prolyl isomerase Pin1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults. *Nature* 419, 6909, 853–857.
- [277]Zannini, L., Delia, D., and Buscemi, G. 2014. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *Journal of Molecular Cell Biology* 6, 6, 442–457.
- [278]Zhou, X. Z., Kops, O., Werner, A., Lu, P.-J., Shen, M., Stoller, G., Küllertz, G., Stark, M., Fischer, G., and Lu, K. P. 2000. Pin1-Dependent Prolyl Isomerization Regulates Dephosphorylation of Cdc25C and Tau Proteins. *Molecular Cell* 6, 4, 873–883.

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Peter Bayer bedanken. Peter herzlichen Dank für die Vergabe des interessanten Themas, das entgegengebrachte Vertrauen, dein Verständnis und immer gut gemeinten Rat. Danke auch für das Mitgestalten meiner beruflichen Zukunft, deine herzliche Art und die Freunde an der Strukturbiologie.

Liebe Frau Dr. AOR, an dich geht ein ganz ganz großes Dankeschön. Anja, danke dafür, dass du so eine positive und herzliche Persönlichkeit bist, dass du mir immer Mut gemacht hast, dass du dir immer Zeit für mich genommen hast (vor allem während meiner total stressfreien Schreibphasen), dass ich dich immer um Rat fragen durfte und dass du mir das *chain tracing* im Strukturbio-Praktikum gezeigt hast. Ach Anja, ich bin einfach froh, dich kennengelernt zu haben.

Liebe Christine, auch bei dir möchte ich mich bedanken. In erster Linie dafür, dass du meine Arbeit korrekturgelesen hast, aber auch für deinen Rat, das Aufmuntern und die tollen Entspannungsübungen. Danke auch dafür, dass du Zeit investiert hast, mir das Lesen von Pulsprogrammen beizubringen.

Franzi, dir möchte ich auch danken. Dafür, dass du dich mir anvertraut hattest, dass ich Teil deines Lebens sein durfte und natürlich für die kompetente und fachliche Unterstützung, die mir den Einstieg in die Doktorarbeit erleichtert haben.

Däno, herzlichen Dank dafür, dass ich dich immer anrufen durfte, dass du Zeit für facetime hattest, dass du nie aufgibst, dass wir zusammen schwimmen gehen, dass du Hinz und Kunz kennst und die besten Geschichten hast. Außerdem möchte ich dir im Voraus danken, dass du die Funktion von *LmPar* herausfinden wirst und ich somit auch endlich erfahre, was *TbPar* macht.

Höppstock, bei Dir und deiner besseren Hälfte, Parasito Adainaquila, möchte ich mich auch bedanken. Für den Kummerkasten, die tollen Storys und die netten Überraschungen, die ich in meiner Tasche auf dem Nachhauseweg entdeckte. Lukas, danke für deine fachliche Unterstützung bei den ganzen UV/Vis-Assays.

Mein liebes Jülchen, danke dass du so eine tolle Sitznachbarin warst. Julia, Danke auch für die netten Komplimente, das Mut machen die traurigen und lustigen Geschichten und deine tollen Labor-Tipps.

Jenny (JLo), danke, dass ich dich durch deine abenteuerlustigen Geschichten begleiten durfte. Danke für die spontanen Shopping-Ausflüge, die vielen Mittagspausen, das gemeinsame Seminar und die Mode-Tipps.

Bumms, danke, dass du den Befehl *bumms* fürs Prozessieren der 3D Spektren in Topspin implementiert hast. Danke für die langen Gespräche, nach denen du trotzdem nicht auf mich gehört hast und für die Hilfe beim Durchführen der Assays und deren Auswertung. Danke auch für den Service rund um YASARA.

Ludwig, auch bei dir möchte ich mich bedanken. Herzlichen Dank für die Unterstützung mit CYANA, die nervigen Software-Fragen und den Versuch, mir Linux und die Programmiersprache ans Herz zu legen.

André, Danke dafür, dass du Joshua vorbeibringst, immer positiv bist und für den Versuch, mich für DSA zu begeistern.

Mikeowski (Prof. Blüggel) und Marius danke für die Unterstützung und die amüsante Zeit während der Anfertigung dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön geht an das gesamte Bayer-Team (inkl. Ehemalige Mitarbeiter), Peter Binz, Tina Gerdes, Alma Rute, Elke Sprünken, Gila Schulte-Eickholt, Mina Morzorov, Irina Michin, Dr. Daniel Grum, Dr. Cristina Hartmann-Fatu für das nette Arbeitsklima, die Hilfsbereitschaft und die gemeinsame Zeit.

Ema, Danke dafür, dass du immer Zeit und Geduld hattest und mich unterstützt hast.

Niso und Elo, vielen Dank, dass ihr so positiv seid und mich immer aufgebaut habt. Danke für euer Vertrauen und eure Unterstützung.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Ein riesiges Dankeschön, dass Ihr mich immer unterstützt, dass ich immer auf Euch zählen kann und dass Ihr so viel Verständnis und Geduld aufbringt. Papa, Mama, Meli und Ani, danke für die zahlreichen und aufbauenden Gespräche. Ich bin froh, Euch alle zu haben.

Schatzo, zuletzt möchte ich mich bei dir bedanken. Das Dankeschön, welches kaum in Worte gefasst werden kann, geht vor allem für dein Verständnis und Vertrauen, deine Hilfe Entscheidungen zu treffen, für die bisher durchlebte Zeit und die Entlastung und Motivation. Danke dass du an mich geglaubt hast und mir die notwendige Zeit gegeben hast, alles abzuschließen. Danke, dass du mich durchs Leben begleitest.

10 Lebenslauf

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

11 Eidesstattliche Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des Parvulins 42 aus *Trypanosoma brucei*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Edisa Rehic befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____

Unterschrift eines Mitgliedes der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Unterschrift des Doktoranden

Erklärung:

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

Essen, den _____

Unterschrift des Doktoranden