

NMR-spektroskopische Untersuchungen der Protein-Ligand-Wechselwirkungen von FKBP38 und DnaK

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



im Dezember 2010

Katja Haupt

geb. am 24. November 1982 in Marienberg/Erzgebirge

1. Gutachter: PD Dr. C. Lücke
2. Gutachter: Prof. Dr. J. Balbach
3. Gutachter: Prof. Dr. B. Ludwig

Tag der Verteidigung: 03. Mai 2011

... für meine Eltern

Abkürzungsverzeichnis

Ac Acetylgruppe

ADP Adenosindiphosphat

ATP Adenosintriphosphat

BH Bcl-2 Homolog

CSI Index der chemischen Verschiebung (engl.: Chemical shift index)

CaM Calmodulin

CaN Calcineurin

$\Delta\delta$ Änderung der chemischen Verschiebung

ER endoplasmatisches Retikulum

E. coli *Escherichia coli*

FKBP FK506-bindendes Protein

G-Protein GTP-bindendes Protein

GDP Guanosindiphosphat

GTP Guanosintriphosphat

HCV Hepatitis C Virus

HSP Hitzeschockprotein

HSQC engl.: Heteronuclear single quantum coherence

K_d Bindekonstante

mTOR Ziel des Rapamycins im Säugetier (engl.: Mammalian target of rapamycin)

NAF Nukleotidaustauschfaktor

NBD Nukleotidbindedomäne

NF-AT nukleärer Transkriptionsfaktor aktivierter T-Lymphozyten

NMR Kernspinresonanz (engl.: Nuclear magnetic resonance)

NS5A nichtstrukturiertes Protein 5A des Hepatitis C Virus

PCS Scheinkontaktverschiebungen (engl.: Pseudocontact shifts)

P_i anorganisches Phosphat

PRE Erhöhung der paramagnetischen Relaxation (engl.: Paramagnetic relaxation enhancement)

Ras Rattensarcoma (engl.: Rat sarcoma)

Rheb Ras Homolog des Gehirns (engl.: Ras homolog enriched in brain)

ROESY engl.: Rotating frame Overhauser effect spectroscopy

SDS-PAGE Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl.: Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

SH2 Src-Homologie 2

SHH Sonic Hedgehog Homolog

SBD Substratbindedomäne

SSD Substratstabilisierungsdomäne

TOCSY engl.: Total correlated spectroscopy

TPR engl.: Tetratricopeptide repeat

TSC Tuberöse Sklerose Komplex

Y2H Hefe-Zwei-Hybrid (engl.: Yeast two-hybrid)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	i
Inhaltsverzeichnis	iii
1. Einleitung	1
1.1. Protein-Ligand-Interaktionen	1
1.1.1. Protein-Protein-Komplexe	2
1.1.1.1. Klassifizierung der Interaktionen	3
1.1.1.2. Charakterisierung der Interaktionsfläche	4
1.1.2. Protein-Peptid-Komplexe	6
1.2. Die FK506-bindenden Proteine	7
1.2.1. Struktur und Domänenaufbau	8
1.2.2. Physiologische Bedeutung humaner FKBP38	10
1.2.3. Humanes FKBP38 und seine Interaktionspartner	11
1.3. Die Hsp70-Proteinfamilie	14
1.3.1. Struktur und Domänenaufbau	15
1.3.1.1. Die ATPase-Domäne und die Nukleotidbindung	16
1.3.1.2. Die Substratbindedomäne und die Substratbindung	17
1.3.2. Prinzipien der Chaperonaktivität	17
1.4. Zielstellung	20
2. Materialien und Methoden	21
2.1. Präparative Methoden	21
2.2. Analytische Methoden	23
2.3. Molekularbiologische Methoden	24
2.4. NMR-Spektroskopie und Probenvorbereitung	25
2.4.1. Allgemeines zu den NMR-Experimenten und ihrer Auswertung	25
2.4.2. Titration von FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ mit Metallionen	25
2.4.2.1. Calciumtitration der FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ -Mutanten	25
2.4.2.2. Titration von ¹⁵ N-markiertem FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ mit verschiedenen Metallionen	26
2.4.2.3. Bestimmung der Bindekonstanten	27
2.4.2.4. Bestimmung der Lage des Terbiumions	28
2.4.3. FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ und die Interaktion mit Bcl-2 ¹¹⁹⁻¹³¹	28
2.4.3.1. Bindungsstudien von ¹⁵ N-markiertem FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ mit unmarkierten Bcl-2 ¹¹⁹⁻¹³¹ -Peptiden	29

Inhaltsverzeichnis

2.4.3.2.	Bindungsstudien von ^{15}N -markierten Bcl-2 ¹¹⁹⁻¹³¹ -Peptiden mit unmarkiertem FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³	30
2.4.4.	FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ und die Interaktion mit Bcl-2 ¹⁻²¹¹ -Varianten	31
2.4.5.	Resonanzzuordnung und Interaktionsstudien von DnaK ³⁸⁷⁻⁵⁵²	32
2.5.	Materialien und Chemikalien	32
3.	Ergebnisse und Diskussion	36
3.1.	Protein-Ligand-Interaktionen der PPIase-Domäne von FKBP38	36
3.1.1.	Charakterisierung des ladungssensitiven $\beta 5\text{-}\alpha 1$ -Loops	36
3.1.1.1.	Die Aspartate 92 und 94 bewirken die Ladungssensitivität	36
3.1.1.2.	Interaktion mit den diamagnetischen Metallionen K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} und La^{3+}	41
3.1.1.3.	Koordinierung eines Metallions am $\beta 5\text{-}\alpha 1$ -Loop	46
3.1.2.	Die Protein-Peptid-Interaktion zwischen FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ und dem Peptid Bcl-2 ¹¹⁹⁻¹³¹	47
3.1.2.1.	Strukturelle Charakterisierung des Bcl-2 ¹¹⁹⁻¹³¹ -Peptids	48
3.1.2.2.	Das Bcl-2 ¹¹⁹⁻¹³¹ -Peptid interagiert mit dem ladungssensitiven $\beta 5\text{-}\alpha 1$ -Loop	49
3.1.2.3.	Die Interaktion basiert auf einer elektrostatischen Wechselwirkung	51
3.1.3.	Die Protein-Protein-Interaktion zwischen FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ und Bcl-2 ¹⁻²¹¹	56
3.2.	Protein-Peptid-Interaktionen der Substratbindedomäne von DnaK	60
3.2.1.	Zuordnung der ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -Resonanzen von DnaK ³⁸⁷⁻⁵⁵²	61
3.2.2.	Interaktionen mit den Inhibitoren	61
3.2.3.	Vergleich zwischen dem DnaK-Substrat- und dem DnaK-Inhibitor-Komplex	64
4.	Zusammenfassung	67
	Literaturverzeichnis	69
	Abbildungsverzeichnis	vi
	Tabellenverzeichnis	viii
	Anhang	ix
	A. Abbildungen	ix
	B. Tabellen	xiii
	Publikationen und Tagungsbeiträge	xx
	Curriculum Vitæ	xxi
	Danksagung	xxii

Kapitel 1.

Einleitung

1.1. Protein-Ligand-Interaktionen

Ein Proteinligand bindet an einer spezifischen Region im Protein. Bedingung für eine Interaktion ist, dass sich Protein und Ligand in Größe, Form und Oberfläche gegenseitig ergänzen. Emil Fischer stellte 1894 die Templat-Theorie der Enzymspezifität, welche auch »Schlüssel-Schloss-Prinzip« genannt wird, aufgrund seiner Forschungen an zuckerspaltenden Enzymen auf [1]. Diese Theorie wurde erst 1958 durch die »Induced-Fit-Theorie« von Daniel Koshland erweitert [2]. Er kombinierte die von Fischer postulierte Annahme der komplementären Passform mit der Flexibilität durch eine Konformationsänderung des Proteins, die durch die Ligandbindung verursacht wird. Eine weitere Hypothese zur Protein-Ligand-Komplexbildung veröffentlichte Jacques Monod im Jahre 1965 [3]. Er postulierte, dass das unkomplexierte Protein in zahlreichen Konformationen vorliegt, auch in jener in der es letztendlich an seinen Liganden gebunden ist.

Der Erkennungsprozess umfasst dabei Faktoren, die eine stabile Assoziation sowohl begünstigen als auch erschweren können. Zu den begünstigenden Faktoren zählen der Entropieeffekt und nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen den Einzelmolekülen. Ein erschwerender Faktor ist der Entropieverlust durch die Einschränkung der Translations- und Rotationsfreiheit von Protein und Ligand. Ihre Affinität füreinander wird thermodynamisch über die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_d , auch Bindekonstante genannt, und die freie Dissoziationsenthalpie (ΔG_d) beschrieben. Beide Größen sind über die Gleichung 1.1 miteinander verbunden. Dabei stellt R die individuelle Gaskonstante und T die Temperatur dar.

$$\Delta G_d = -RT \cdot \ln K_d \quad (1.1)$$

Die Änderung der freien Enthalpie bedingt eine Änderung der Komplexbildungsenergie (ΔH_d) und/oder der Entropie (ΔS_d) im System der Einzelkomponenten (Proteinkomplex,

Monomere, Lösungsmittel) und wird mit der Gibbs-Helmholtz-Beziehung (Gleichung 1.2) beschrieben [4].

$$\Delta G_d = \Delta H_d - T \cdot \Delta S_d \quad (1.2)$$

Die nicht-kovalenten Wechselwirkungen leisten unterschiedliche energetische Beiträge zur Komplexbildung. So tragen elektrostatische Interaktionen typischerweise ca. 20 kcal/mol, Van-der-Waals-Kräfte hingegen nur wenige kcal/mol [5] zur Bildungsenergie bei. Dies darf aber nicht über die Anteile der einzelnen Wechselwirkungen hinwegtäuschen. Hydrophobe Interaktionen, die auf Van-der-Waals-Kräften beruhen, leisten den energetisch größten Beitrag zur Assoziation von Proteinen und größeren Liganden. Dies beruht jedoch nicht auf der Bindung der Einzelmoleküle, sondern auf der gleichzeitigen Freisetzung von Wassermolekülen von den Interaktionsflächen (»Entropieeffekt«). Hydrophobe Wechselwirkungen sind daher hauptsächlich für die Affinität eines Komplexes verantwortlich. Die Spezifität einer Interaktion wird über elektrostatisch und sterisch passgenaue Interaktionen zwischen Ligand und Protein vermittelt [6–8], die zusätzlich einen wichtigen Beitrag zur Bindungsenergie leisten. Sie werden als »Hot Spots« bezeichnet.

Das Zusammenspiel von Proteinen mit den verschiedensten Liganden ist unglaublich vielfältig. Proteine binden u. a. an Metallionen, Phosphat- und Sulfatgruppen, Nukleotide, Peptide, Lipide, Kohlenhydrate, Nukleinsäuren, Membranen, Makrolide oder andere Proteine. Interessanter Weise haben sich im Laufe der Evolution sehr oft Bindedomänen für spezifische Liganden entwickelt. Die Bindestellen befinden sich im Inneren der Proteine oder auf deren Oberfläche. Im Folgenden sollen die Interaktionen zwischen Proteinen untereinander und zwischen Proteinen und Peptiden näher charakterisiert werden.

1.1.1. Protein-Protein-Komplexe

Alle biochemischen Prozesse eines jeden Organismus werden auf molekularer Ebene geregelt. Den Protein-Protein-Interaktionen kommt dabei eine essentielle Rolle bei zellulären Prozessen wie z. B. Zellwachstum, Signaltransduktion, Genregulation und Immunantwort zu. Es gibt zahlreiche Möglichkeiten der Feinabstimmung solcher Interaktionen, um ein individuelles und angepasstes zelluläres Handeln zu ermöglichen. Einige Prinzipien hierfür sind die Regulierung durch kleinere Liganden, temporäre Veränderungen der Umgebung und die evolutionäre Entwicklung von Proteininteraktionsdomänen, wie beispielsweise die WW-, Src-Homologie 2 (SH2)- und Tetratricopeptide repeat (TPR)-Domänen.

Inkorrekte Protein-Protein-Interaktionen können im Organismus zu schwerwiegenden Erkrankungen wie z. B. Krebs, Infektionen oder neurodegenerativen Krankheiten führen. Die Aufklärung und das Verstehen von korrekten und fehlerhaften Protein-Protein-Wechselwirkungen auf molekularer bzw. atomarer Ebene kann einen wesentlichen Schritt zur Entwicklung neuer Therapien und Medikamente darstellen. Die Methoden der Wahl zur

hochaufgelösten Strukturaufklärung von Proteinen und ihren Komplexen sind die Röntgenstrukturanalyse und die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie).

Im Folgenden soll die Klassifizierung von Protein-Protein-Interaktionen erläutert und eine generelle Charakterisierung der Proteininteraktionsflächen gegeben werden.

1.1.1.1. Klassifizierung der Interaktionen

Eine Klassifizierung von Protein-Protein-Interaktionen kann nach den Kriterien der Funktionalität, Art der Oligomerisierung, Existenzzeit und Obligatorität erfolgen (Tabelle 1.1) [4, 9–11].

Tabelle 1.1.: Klassifizierung von Protein-Protein-Interaktionen.

Kriterium	Einteilung nach
Art der Oligomerisierung	Homooligomere (isologe oder heterologe Assoziation), Heterooligomere
Existenzzeit	transiente oder permanente Komplexe
Funktionalität	Antikörper-Antigen-Komplex, Enzym-Inhibitor-Komplex, Protein-Rezeptor-Komplex
Obligatorität	nichtobligatorische oder obligatorische Komplexe

Im Folgenden soll an zwei Beispielen gezeigt werden, wie eine Kombination aus verschiedenen Merkmalen die biologische Funktion eines Proteinkomplexes ermöglicht.

Das heterotrimere GTP-bindende Protein (G-Protein) besitzt eine Schlüsselfunktion in der Signaltransduktion. In seiner inaktiven komplexierten Form hat dessen α -Untereinheit ein GDP-Molekül gebunden und bildet ein Trimer mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit (Abbildung 4). Wird das gebundene Guanosindiphosphat (GDP) durch Guanosintriphosphat (GTP) ersetzt, dissoziiert der stark transiente und nichtobligatorische Komplex in die aktiven α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten, welche diverse Effektoren regulieren [12]. Der Transkriptionsregulator »P22 Arc Repressor« hingegen ist ein isologes Homodimer (Abbildung 1.2). Seine DNA-bindende Funktion ist mit einem antiparallelen β -Faltblattmotiv verbunden, welches nur im permanenten und obligatorischen Komplex gebildet wird [13].

Es existieren alle denkbaren Kombinationen der in Tabelle 1.1 genannten Merkmale. Diese können durch Variation der Umgebungsbedingungen optimal an ihre biologischen Aufgaben angepasst sein. In Unterabschnitt 1.1.1.2 wird beschrieben, wie ein solches Kontinuum an Eigenschaften möglich ist.

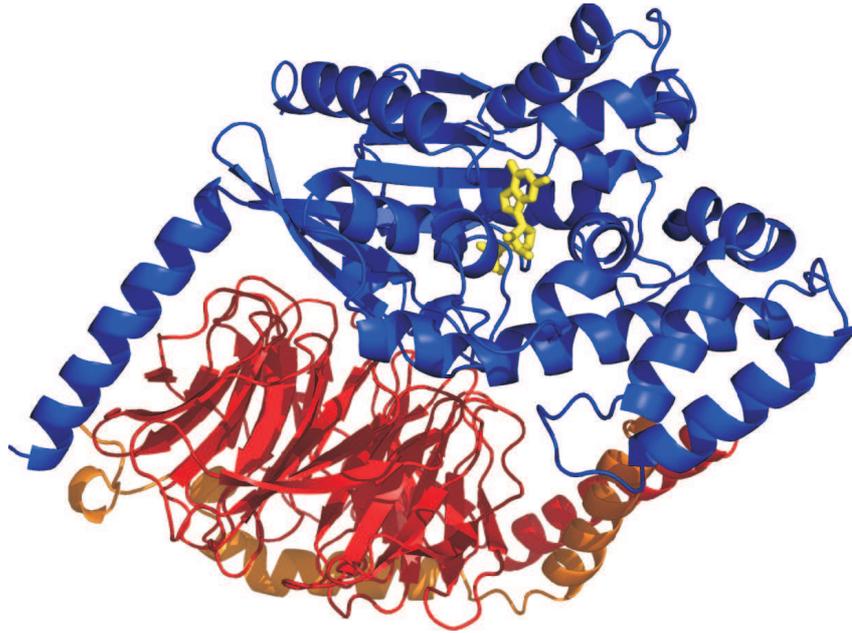


Abbildung 1.1.: Darstellung des G-Protein-Komplexes (PDB ID 1GOT), mit den Untereinheiten $G\alpha$ (blau) und $G\beta\gamma$ (rot, orange) sowie GDP (gelb).

1.1.1.2. Charakterisierung der Interaktionsfläche

Es gibt viele statistische Untersuchungen zur Charakterisierung chemischer und physikalischer Eigenschaften von Protein-Protein-Interaktionen [4, 11, 14–16]. Dabei wurden u. a. Aminosäurezusammensetzung, Hydrophobizität, Größe, Form, Wasserstoffbrückenbindungen und Sekundärstruktur der Interaktionsfläche, auch Interface genannt, verschiedener Komplexarten untersucht. Aus diesen Studien wurden diverse Prinzipien über die Eigenschaften des Interface abgeleitet.

Größe und Form: Die Größe des Interface variiert zwischen wenigen hundert und mehreren tausend \AA^2 , wobei sein Anteil an der Gesamtoberfläche mit dem Grad der Oligomerisierung steigt (Dimer 12 %, Trimer 17 %, Tetramer 21 %) [16]. Zusätzlich lässt sich zeigen, dass Homodimere ein größeres Interface als Heterodimere haben, und die Größe der Einzelmoleküle linear mit der Größe des Interface korrelieren [11]. Es gibt signifikante Unterschiede in der Form des Interface zwischen (obligatorischen, permanenten) Homomeren und (nichtobligatorischen, transienten) Heteromeren. In Heterokomplexen ist sie planarer und oft kreisförmig, in Homomeren hingegen zeigt sich eine kompliziertere, verzweigte Form.

Aminosäurezusammensetzung: In einer Studie von Jones et. al. [14] wurde die Aminosäurezusammensetzung von 32 Homodimeren untersucht. Es wurde das relative Auftreten jedes Aminosäuretyps im Interface im Vergleich zum Gesamtprotein und zu seiner Ober-

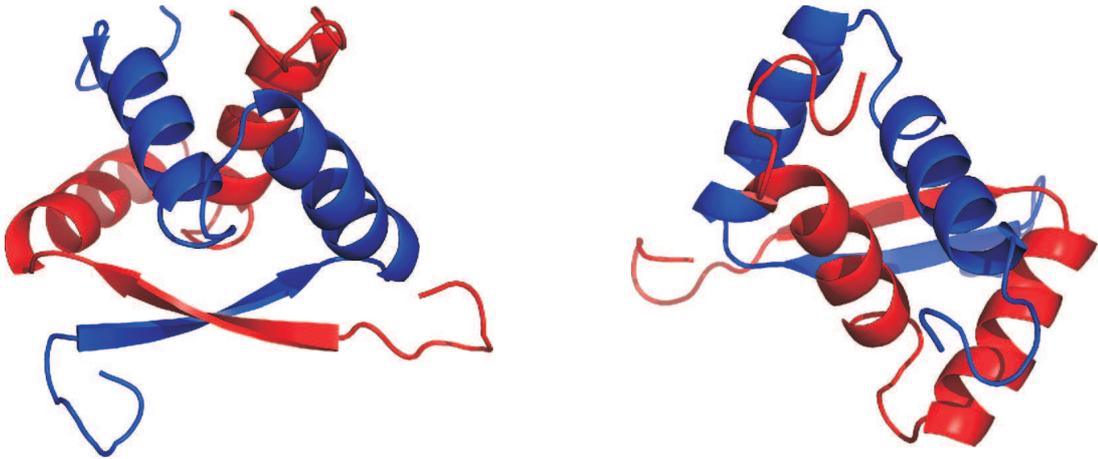


Abbildung 1.2.: Darstellung des P22 Arc Repressor Homodimers (PDB ID 1ARQ) aus zwei verschiedenen Perspektiven. Die beiden Monomere sind blau bzw. rot gefärbt.

fläche bestimmt. Polare und geladene Aminosäuren sind im Vergleich zum Gesamtprotein überrepräsentiert, hydrophobe unterrepräsentiert. In der Gegenüberstellung zur Proteinoberfläche sind hydrophobe Aminosäuren häufiger vertreten als geladene. Dies gilt ebenso für Heterokomplexe, auch wenn ihre Interaktionsflächen generell hydrophiler sind als die von Homokomplexen. Der Trend, dass das Interface hydrophiler als der Proteinkern, jedoch hydrophober als die Oberfläche ist, wurde in weiteren Studien bestätigt [11, 17].

Intermolekulare Wechselwirkungen: Dass hydrophobe Interaktionen die Affinität, und dass passgenaue hydrophile und hydrophobe Interaktionen als Hot Spots die Spezifität in einem Proteinkomplex vermitteln, wurde bereits in Abschnitt 1.1 diskutiert. Es gibt jedoch Unterschiede bei dem Anteil der hydrophilen Wechselwirkungen in den verschiedenen Komplexen. Die meisten Wasserstoffbrückenbindungen werden nach einer Untersuchung von Jones et. al. [11] in Enzym-Inhibitor-Komplexen und anderen Heterokomplexen gebildet, die wenigsten in Homokomplexen. Demnach besitzt die Kontaktfläche durchschnittlich 0,88 Wasserstoffbrückenbindungen pro 100 \AA^2 , wobei ein linearer Zusammenhang zwischen Interfacegröße und Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen besteht [14]. Salzbrücken kommen wesentlich seltener in Kontaktflächen vor. Eine Jones-Studie ermittelte in den 32 untersuchten Dimeren null bis fünf Salzbrücken pro Interaktion, wobei es keine Korrelation zur Interfacegröße gab [14]. Generell kann gesagt werden, dass sich der Anteil der genannten Wechselwirkungen in den verschiedenen Komplexen unterscheidet. In obligatorischen permanenten Komplexen haben hydrophobe Interaktionen eine größere Bedeutung und elektrostatische Wechselwirkungen sind wesentlich seltener als in nichtobligatorischen transienten Komplexen. Allen gemein ist jedoch das Vorhandensein sogenannter »Hot Spots«, welche sich durch passgenaue hydrophile (Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken) und hydrophobe Wechselwirkungen auszeichnen und somit einen überdurchschnittlich großen Anteil zur Komplexbildungsenergie leisten [7].

Sekundärstruktur: Der Konsens vieler Studien über die Sekundärstruktur in Kontaktflächen ergab, dass es keine Präferenz für eine bestimmte Struktur gibt [11, 14]. Es können alle Arten von Sekundärstrukturelementen auch in Kombination auftreten. Besonders häufig sind Helix-Helix- und Faltblatt-Faltblatt-Packungen sowie die Interaktionen zweier Loops, ggf. mit ihrer angrenzenden Sekundärstruktur, und die Interaktion eines gestreckten β -Faltblattstranges über ein β -Faltblattmotiv [18].

1.1.2. Protein-Peptid-Komplexe

Peptide und Proteine sind Oligo- bzw. Polymere von Aminosäuren, die durch Peptidbindungen miteinander verbunden sind. Die Anzahl der Aminosäuren entscheidet, ob es sich um ein Peptid oder ein Protein handelt. Dabei ist die Grenze fließend und wird unterschiedlich, zwischen 50 und 100 Resten, angegeben. Peptide können anhand der Anzahl ihrer Bausteine in Di-, Tri- etc. Oligo- oder Polypeptide klassifiziert werden. Sie liegen in linearer Kettenform oder zyklisch vor und können mit anderen Peptiden kovalent verbunden sein. Ihre biologische Bedeutung liegt u. a. in der Regulierung von Wachstums- und Regulationsprozessen des Organismus, wo sie als Hormone wirken. Weitere Funktionen nehmen Peptide als Antibiotika, Toxine und Insektizide ein [19].

Viele Peptide sind in ihrer unkomplexierten Form sehr flexibel und haben keine definierte Struktur («random coil») [20], so dass der durch die Interaktion entstehende entropische Verlust [21] über diverse Bindungsstrategien ausgeglichen werden muss. London *et al.* analysierten erstmals in größerem Umfang Protein-Peptid-Komplexe mithilfe einer eigens erstellten Datenbank [22]. Diese Ergebnisse wurden mit literaturbekannten Daten für Protein-Protein-Interaktionen verglichen. Bei Protein-Peptid-Wechselwirkungen ist die Größe der Flächen, die durch die Interaktionspartner bedeckt werden, ca. halb so groß ($512 \pm 177 \text{ \AA}^2$) wie bei Protein-Protein-Wechselwirkungen ($1151 \pm 605 \text{ \AA}^2$). Die relative Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen pro 100 \AA^2 ist jedoch mit $1,6 \pm 0,7$ (im Vergleich zu $1,0 \pm 0,6$) über 1,5mal mal so groß, wobei es deutliche Unterschiede gibt, ob es sich bei der Struktur des gebundenen Peptids um eine α -Helix ($0,8$ pro 100 \AA^2) oder ein β -Faltblatt ($2,4$ pro 100 \AA^2) handelt. Peptide, die als α -Helix komplexiert werden, haben meist eine hydrophobe Oberfläche und binden an hydrophobe Bereiche des Proteins. Wasserstoffbrücken werden zwar zur Stabilisierung der α -Helix ausgebildet, spielen jedoch bei der Interaktion mit dem Protein eine untergeordnete Rolle. Bindet ein Peptid an eine β -Faltblattstruktur eines Proteins, passt es sich häufig durch die Ausbildung einer eigenen β -Faltblattstruktur an, wobei ähnlich wie in einem Protein Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hauptketten ausgebildet werden. Sind Salzbrücken im Interface involviert, liefern sie energetisch einen wichtigen Beitrag zur Bindung und Spezifität der Interaktion. Ihre Dichte in Protein-Peptid-Interaktionsflächen ist vergleichbar mit denen in Protein-Protein-Interaktionsflächen ($0,2$ pro 100 \AA^2). An der Bindung des Peptids sind ähnlich wie bei Protein-Protein-Interaktionen «Hot Spots» beteiligt. In Peptiden, die bis zu elf Aminosäuren lang sind, ist jede dritte bis vierte Aminosäure in einen Hot Spot integriert. Sehr häufig vorkommende Aminosäuren sind dabei, wie in Proteinen [23], die aromatischen Reste sowie Isoleucin und Leucin.

Der Vergleich von Peptid-bindenden apo- und holo-Proteinen zeigte, dass sich in den meisten Fällen die Konformation des Proteins durch die Bindung des Peptids kaum verändert, was wiederum zu keinem größerem entropischen Verlust führt.

Peptide haben oft die Präferenz in einer Proteintasche zu binden. Dabei gibt es zwei Hauptstrategien. Circa die Hälfte der untersuchten Peptide binden mit einer ihrer Seitenketten in einer kleinen Tasche. Meist ist diese Tasche die einzig erreichbare an der Proteinoberfläche. Diese Komplexe haben eine relativ kleine Interaktionsfläche ($< 600 \text{ \AA}^2$) und werden oft mit α -helikalen Peptiden gebildet. Circa ein Viertel der analysierten Peptide binden dagegen in einer sehr großen Tasche. Die Interaktionsfläche ist hier größer (bis zu 1000 \AA^2) und meist sind Peptide mit β -Faltblattstruktur in diesen Komplexen involviert. Polyprolinpeptide passen meist aufgrund ihrer Konformation sterisch nicht in Proteintaschen. Ihr Vorteil liegt, im Vergleich zu anderen Peptiden, in einer geringeren Änderung der Entropie während der Komplexbildung, da sie bereits ungebunden eine definierte, energieärmere Struktur aufweisen, wie beispielsweise Polyprolin-Helices [24].

Es haben sich einige Strategien bewährt, die den Verlust der konformationellen Entropie durch die Bindung eines Peptids an ein Protein kompensieren können [22]. Ähnlich wie bei Protein-Protein-Interaktionen wird durch den Entropieeffekt ein Teil des entropischen Verlustes ausgeglichen. Zudem ist die Proteininteraktionsfläche im Gegensatz zum freien Peptid eher rigide und verändert sich strukturell nur wenig durch die Komplexbildung. Protein-Peptid-Komplexe haben eine sehr gute Packung und können durch die Bindung des Peptids sogar stabilisiert werden.

1.2. Die FK506-bindenden Proteine

Während der Proteinbiosynthese werden Peptidbindungen bevorzugt in der *trans*-Konformation gebildet. Diese Konformation ändert sich im gefalteten Protein in der Regel nicht. Als Ausnahme gelten hierbei die Xaa-Prolin-Peptidbindungen, wobei Xaa für eine beliebige Aminosäure steht. Prolin weist aufgrund seiner zyklischen Struktur eine unter den kanonischen Aminosäuren einzigartige Konformationalität auf, die neben der *trans*- auch die *cis*-Konformation stabilisiert. Circa 6% der Peptidyl-Prolyl-Bindungen in Proteinen liegen in der *cis*-Form vor [25]. Die Umwandlung der beiden energetisch ähnlichen Konformationszustände wird durch Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) (EC 5.2.1.8) katalysiert. Zu ihnen zählen die drei Proteinfamilien der Cyclophiline, Parvuline und FK506-bindenden Proteine (FKBP), welche untereinander keinerlei Sequenzhomologien aufweisen [26].

1.2.1. Struktur und Domänenaufbau

Allen FKBP, unabhängig von ihrer PPIase-Aktivität und FK506-Bindung, ist aufgrund von Sequenz- und Strukturhomologie die FKBP-Domäne gemein. Ein antiparalleles, meist fünfsträngiges und linkshändig verdrehtes β -Faltblattmotiv umhüllt eine α -Helix («halbes β -Fass») [27]. Die Aminosäuren für die FK506- und Substratbindung bilden dabei eine hydrophobe Tasche innerhalb dieses Fasses. Abbildung 1.3 zeigt den prototypischen Vertreter FKBP12 im Komplex mit dem Immunsuppressivum FK506 (PDB ID 1FKJ) [27]. Die stark konservierten Reste (Y27, F37, D38, V56, I57, Y83, I92, F100 nach Kay [26]), die entsprechend in allen aktiven und FK506-bindenden FKBP vorkommen, sind hervorgehoben.

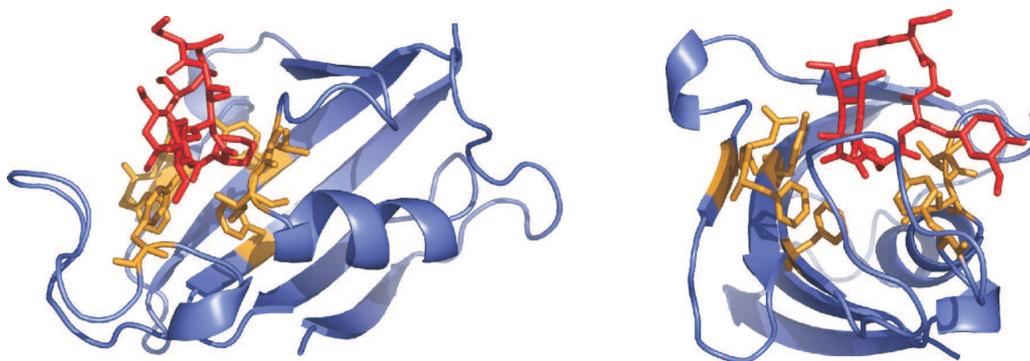


Abbildung 1.3.: Darstellung des FKBP12/FK506-Komplexes (PDB ID 1FKJ) aus zwei Perspektiven. Das Protein ist in Blau und der Ligand in Rot dargestellt. Die zur Bindung essentiellen und stark konservierten Aminosäuren sind orange hervorgehoben [26].

In dem inhärent inaktiven FKBP38 hingegen, das 50,5 % Sequenzhomologie zu FKBP12 aufweist, sind nur vier dieser Reste konserviert. Den größten strukturellen Unterschied findet man im β D-Strang. Hier befindet sich im FKBP38 eine kleine Ausbuchtung¹, im FKBP12 hingegen eine Schleife² [28]. Die Aminosäure H87 ist in der FKBP38-Domäne durch R127 substituiert und kann aufgrund der längeren Seitenkette und durch die Ausbildung von Salzbrücken mit E83 und/oder D94 den Zugang zur Bindetasche blockieren (Abbildung 1.4). Eine weitere strukturelle Abweichung zwischen den beiden PPIase-Domänen ist die Nettoladung an der Oberfläche, die sich um sechs Gesamtladungen unterscheidet (+2 bei FKBP12, -4 bei FKBP38³⁵⁻¹⁵³) [28]. Die fehlende PPIase-Aktivität bzw. FK506-Bindung von FKBP38 kann auf diesen genannten strukturellen Eigenschaften basieren, wird aber durch die Bindung von holo-Calmodulin (holo-CaM) induziert, was bezüglich der Aktivierung innerhalb der Familie der humanen FKBP einzigartig ist [29, 30].

Neben der FKBP-typischen Domäne, die in einem Protein ein oder mehrmals vorkommen kann, gibt es in Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen noch weitere Proteindomä-

¹Im Englischen und wissenschaftlichen Sprachgebrauch wird dieses Strukturmotiv als »Bulge« bezeichnet.

²Im Englischen und wissenschaftlichen Sprachgebrauch wird dieses Strukturmotiv als »Loop« bezeichnet.

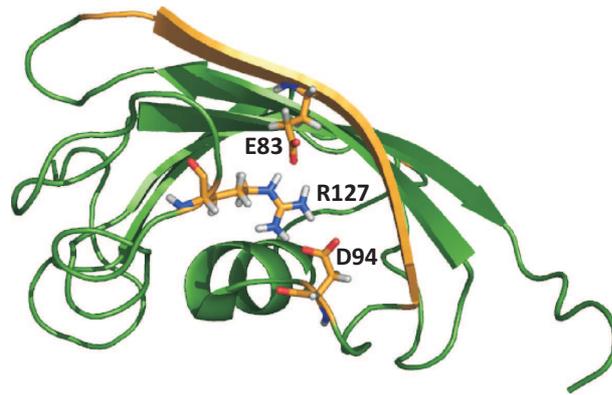


Abbildung 1.4.: Darstellung der PPlase-Domäne des FKBP38 (PDB ID 2F2D). Orange hervorgehoben sind Reste, die sich strukturell von FKBP12 unterscheiden. Das betrifft den β D-Strang sowie die Aminosäuren E83, D94 und R127, die über dem Eingang zur Bindetasche Salzbrücken ausbilden können und somit sterisch das Eindringen von Liganden verhindern.

nen. Dazu zählen Protein-Protein-Wechselwirkungsmotive wie TPR-Motive, Calmodulin-Bindestellen, EF-Hand-Motive und ER-Retentionssignalsequenzen. FKBP38 weist als einziges bekanntes Mitglied der FKBP-Familie eine glutamatereiche Region und einen Membrananker auf. Abbildung 1.5 zeigt eine Auswahl von Domänenstrukturen einiger FKBP.

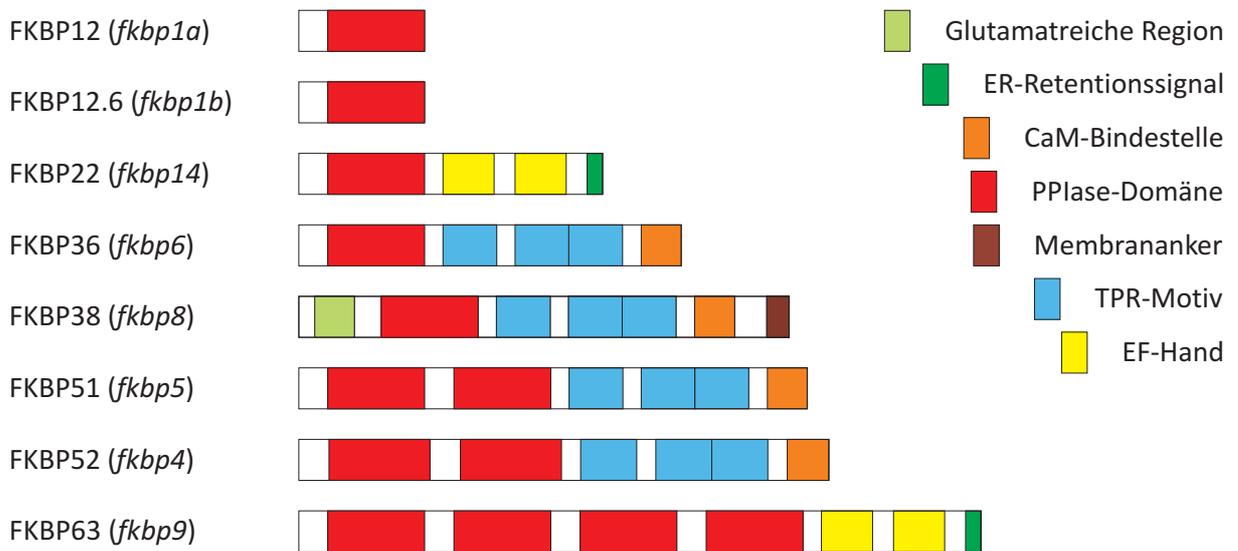


Abbildung 1.5.: Darstellung der Domänenstrukturen einiger FKBP. Neben der Proteinbezeichnung ist der Genname in Klammern notiert.

1.2.2. Physiologische Bedeutung humaner FKBP

FKBPs sind omnipräsent. Sie kommen in allen Organismen und dort wiederum in nahezu allen Geweben und den meisten Zellkompartimenten vor [26]. FKBP werden als Immunophiline bezeichnet, weil sie im Komplex mit dem immunsuppressiven Peptidmakrolid FK506 die Hemmung der T-Zell-Proliferation vermitteln. Nur der FK506/FKBP12-Komplex, nicht FKBP12 allein, inhibiert die holo-CaM-abhängige Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin (CaN). Der Komplex FK506/FKBP12/CaN übermittelt die immunsuppressive Wirkung von FK506, indem es potentielle Proteinsubstrate sterisch daran hindert, in das aktive Zentrum von CaN zu gelangen [31]. Dadurch wird die Dephosphorylierung verschiedener Substrate wie z. B. NF-AT, einem Transkriptionsfaktor, verhindert, die sonst zur Aktivierung und Proliferation von T-Zellen führen würde [32]. Ein wichtiger Teil der Immunantwort wird so unterbunden. Andere FKBP, die CaN inhibieren können, sind FKBP12.6 [33] und FKBP38 [34, 35]. Eine weitere Rolle als Immunophiline haben FKBP12 und FKBP38 in der Inhibierung der Kinase mTOR, welche die Proliferation von T-Zellen reguliert [36, 37]. Diesem Mechanismus liegt analog die Komplexierung der FKBP mit dem Immunsuppressivum Rapamycin zu Grunde.

Die Bindung immunsuppressiver Substanzen und ihrer Analoga an FKBP, die in erhöhtem Maße im Nervengewebe exprimiert werden [38], birgt großes Potenzial für die Entwicklung neuer Wirkstoffe und die Behandlung neurodegenerativer Krankheiten. Eine Umkehrung neurodegenerativer Prozesse und ein Schutz vor Apoptose konnten beispielsweise durch bestimmte FK506-Analoga in Tierversuchen erreicht werden [39, 40]. GPI-1046, ein nicht immunsuppressiver Immunophilin-Ligand, bindet an FKBP12 und zeigt ähnlich wie FK506 neuroregenerative und -protektive Effekte in Neuronenzelllinien und Nagetieren nach der Einwirkung bestimmter Gifte [41]. Mit GPI-1485, einer aus GPI-1046 entwickelten Substanz, wurden bereits erste positive Ergebnisse bei der Behandlung von Morbus Parkinson erzielt [42].

Einige FKBP weisen eine Chaperonaktivität auf, die sich durch die Erkennung und Stabilisierung von unvollständig gefalteten Proteinen auszeichnet. Diese durch FK506 oder Rapamycin nicht inhibierbare Aktivität scheint nicht von der PPIase-Aktivität abhängig zu sein. Sie wurde bei FKBP38 [43] und FKBP52 [44] mithilfe eines *in vitro* Citratsynthase-Assays entdeckt. Eine weitere Funktion von FKBP ist die Regulierung der Transkription von Genen mithilfe eines Steroidhormonrezeptor-Komplexes. Dieser besteht aus einem Hormonrezeptormolekül, einem Hsp90-Dimer und einem Protein mit TPR-Domäne, wie z. B. FKBP51 oder FKBP52. Beide FKBP besitzen je zwei PPIase-Domänen, wobei nur die N-terminale Domäne PPIase-aktiv und FK506-bindend ist, eine TPR-Domäne und eine CaM-Bindestelle (Abbildung 1.5) [45]. Durch die Bindung des entsprechenden Steroidhormons an den im Zytoplasma verankerten »Hormonrezeptor – Hsp90-Dimer – FKBP« Komplex gelangt dieser in den Nukleus und dissoziiert. Zwei Hormonrezeptoren bilden dann ein Dimer, welches die Transkription aktiviert.

Die Vielfalt der FKBP zeigt sich in ihren zahlreichen Funktionalitäten. Sie nehmen essentielle Rollen bei den verschiedensten biochemischen Prozessen ein. Dazu zählen u. a.

Immunantwort, Signaltransduktion, Transkription, Regulation des Zellzyklus, Proteinfaltung und -transport. Da FKBP38 und ihre Liganden an der Regulation der neuronalen Signaltransduktion beteiligt sind, kommt ihnen große Aufmerksamkeit bei der Entwicklung neuer Therapien für neurodegenerative Krankheiten, wie z. B. der Alzheimer- oder Parkinson-Krankheit, zu.

1.2.3. Humanes FKBP38 und seine Interaktionspartner

FKBP38, auch als FKBP8 bezeichnet, wurde 1995 von Lam *et al.* erstmals erwähnt [46]. Sie beschrieben die Isolierung der cDNA eines 38 kDa großen FKBP-Homolog mit einem Leucin-Zipper innerhalb des TPR-Motivs und einer putativen CaM-Bindestelle. Untersuchungen zur Lokalisierung von FKBP38 mittels seiner mRNA in verschiedenen Geweben ergaben, dass FKBP38 fast überall vorhanden ist. Mit Abstand am meisten mRNA wurde im Transkriptom des Gehirns gefunden. Die erste bekannte physiologische Funktion, die Regulierung des Zellwachstums, wurde 2003 von Rosner *et al.* diskutiert [47]. Die Überexpression der TSC-Proteine, welche als Tumorsuppressoren agieren, ist begleitet von einer Hochregulierung der FKBP38-Expression. Dies geht mit einer Verringerung der Zellgröße einher. Erweiterte Erkenntnisse zum *fkbp8*-Gen wurden 2004 von Nielsen *et al.* veröffentlicht [48]. Die genomische Organisation, eine zweite Isoform, die Lage des *fkbp8*-Gen auf dem Chromosom 19p12 und eine zusätzliche glutamatreiche Region am N-Terminus wurden beschrieben.

FKBP38 ist über diverse Signaltransduktionswege an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt. Als Antagonist des Proteins SHH (Sonic Hedgehog Homolog) reguliert es die embryonale Entwicklung von Nervenzellen. Bulgakov *et al.* konnten zeigen, dass das integrale Membranprotein FKBP38 für die Entwicklung des Neuralrohrs, welches eine Vorstufe des Rückenmarks und Gehirns bei der Embryonalentwicklung darstellt, sowie der Augen essentiell ist, und dass dessen Funktionsverlust zu einer Fehlentwicklung führt [49]. Ihre Ergebnisse wurden durch andere Studien bestätigt und erweitert. Finnell *et al.* untersuchten *fkbp8*-Knockout-Mäuse mit einem Spina bifida Phänotyp. Sie zeigten ein erweitertes posteriores Neuralrohr mit nur 25 bis 30 % der Normaldicke. Es wies eine veränderte Musterung und defekte Spinalganglionneuronen auf. Die Mäuse dieses Phänotyps waren nur einige Wochen lebensfähig. Wong *et al.* und Shirane *et al.* bringen die FKBP38-abhängige Regulierung der Apoptose ursächlich mit der Entwicklung des Neuralrohrs in Verbindung [50, 51].

Für FKBP38 sind verschiedene Protein-Protein-Interaktionen bekannt. Eine Übersicht über die Bindepartner der einzelnen Domänen, soweit bekannt, ist in Abbildung 1.6 zu sehen. Durch die Bindung von CaM an FKBP38 wird seine PPIase-Aktivität initiiert. Dabei bindet die C-terminale CaM-Domäne an die CaM-Bindestelle des FKBP38 und die N-terminale CaM-Domäne an die PPIase-Domäne [30]. Weitere Interaktionspartner von FKBP38 sind Calcineurin [34, 35], das 26S-Proteasom [52], Hsp90 [53, 54], PHD2

[55], HERG [56] und Bcl-xL [57]. Über die Wechselwirkung mit den Proteinen Rheb (Ras Homolog des Gehirns), NS5A (nichtstrukturiertes Protein 5A des Hepatitis C Virus) und Bcl-2 gibt es die meisten Veröffentlichungen und diese sollen hier näher vorgestellt werden.

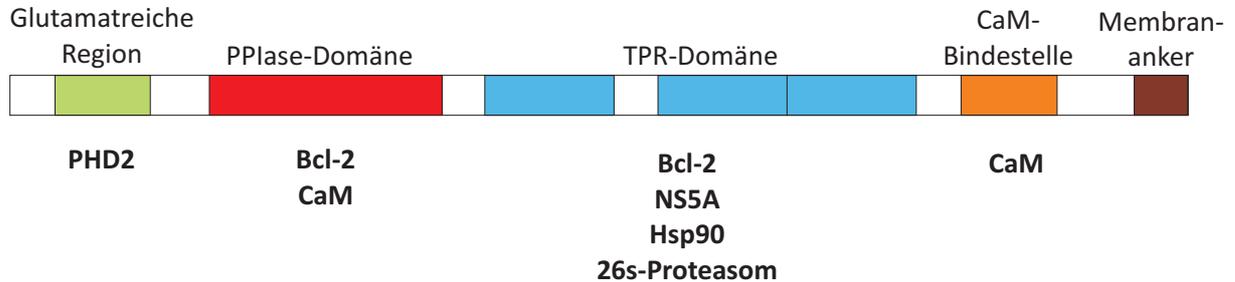


Abbildung 1.6.: Zusammenstellung literaturbekannter Interaktionspartner der FKBP38-Domänen.

Rheb/mTOR: Rheb ist eine Ras-verwandte GTPase. Als monomeres GTP-bindendes Protein übernimmt es die Funktion eines molekularen Schalters für zelluläre Prozesse. Die Grundlage für diese Schalterfunktion ist das Auftreten unterschiedlicher Konformationen durch die Bindung von GTP oder GDP [58]. Diese Nukleotid-gebundenen Zustände von Rheb werden hauptsächlich über den TSC1-TSC2-Komplex kontrolliert [59]. Die Aktivierung des Enzyms mTOR, das an zellulären Signalwegen der Proliferation und der Proteinsynthese beteiligt ist, erfolgt indirekt durch GTP-Rheb [60]. Als möglicher Vermittler zwischen Rheb und mTOR wurde FKBP38 identifiziert [37].

Die Interaktion der endogenen Proteine Rheb und FKBP38 aus HEK293-Zelllysat wurde zum einen mithilfe des Y2H-Systems und zum anderen anhand ihrer Co-Immunoprecipitation gezeigt. GDP-gebundenes und freies Rheb zeigten eine schwache Interaktion mit FKBP38, GTP-Rheb hingegen eine starke.

Eine Wechselwirkung von FKBP38 und mTOR im mTORC1-Multienzymkomplex, die durch die SwitchI-Effektor-Region von Rheb vermittelt wird [61], konnte ebenfalls gezeigt werden. Die Überexpression von FKBP38 in HEK293-Zellen führte zu einer Abnahme der Phosphorylierung verschiedener Zielproteine durch mTOR. Diese konnte jedoch durch eine gleichzeitige Überexpression von Rheb rückgängig gemacht werden. Die Aktivierung von mTORC1 durch Wachstumsfaktoren führte zu einer verminderten FKBP38-Bindung. Bai *et al.* vermuten daher, dass FKBP38 mTOR inhibiert und als Antagonist zu Rheb fungiert [37].

NS5A: NS5A ist eine membranständige Phosphatase der viralen Replikase des Hepatitis C Virus (HCV). NS5A besitzt mehrere Funktionen bei der viralen Replikation und Pathogenese, indem es z. B. die Funktionen der Wirtspoteine modifiziert [62]. Um Interaktionspartner zu finden, durchsuchten Okamoto *et al.* humane cDNA-Bibliotheken. Mithilfe des Y2H-Systems sowie ihrer Co-Immunoprecipitation konnte eine Wechselwirkung zwischen

den Proteinen nachgewiesen werden, die durch das TPR-Motiv im FKBP38 [63] und die BH-Domäne (Bcl-2 Homolog-Domäne) im NS5A vermittelt wird [64, 65]. Durch konfokale Mikroskopie wurde eine Co-Lokalisation von FKBP38 und NS5A in Mitochondrien und im ER nachgewiesen [64]. Die Bedeutung von FKBP38 für die HCV-RNA-Replikation wurde einerseits durch seine Herunterregulierung über siRNA in Huh7-Zellen gezeigt, welche zu einer drastischen Verringerung von NS5A führte. Andererseits bindet FKBP38 das Hitzeschockprotein Hsp90 an den RNA-Replikationsproteinkomplex. Erst durch die Interaktion von FKBP38 mit NS5A und Hsp90 kann sich dieser Komplex bilden [63].

Bcl-2: Bcl-2, welches im B-Zellen-Lymphom entdeckt wurde, ist der Prototyp der gleichnamigen Proteinfamilie, deren Mitglieder bei der Regulierung der Apoptose eine wichtige Rolle einnehmen. Zur Bcl-2-Familie zählen pro- (Bax, Bak) und antiapoptotische (Bcl-2, Bcl-xL) Vertreter. Sie bestehen aus maximal vier BH-Domänen in variabler Anzahl und Anordnung. Die Domänen im Bcl-2 sind vom N- zum C-Terminus wie folgt angeordnet: BH4, BH3, BH1, BH2, Membrananker. Zwischen der BH4- und BH3-Domäne befindet sich ein langer und unstrukturierter Loop, der aus ca. 60 Aminosäuren besteht. Shirane *et al.* waren die ersten, die eine Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen FKBP38 und Bcl-2 einerseits mithilfe des Y2H-Systems sowie andererseits mithilfe der Co-Immunopräzipitation von rekombinanten Protein aus *E. coli* bzw. endogenen Proteinen aus Säugetierzellen nachweisen konnten [34]. Zudem zeigten sie eine antiapoptotische Wirkung von FKBP38 in Zellexperimenten. Durch Deletionsmutanten wurde die Co-Lokalisation beider Proteine in der Mitochondrienmembran, die zentrale Bedeutung der PPIase-Domäne des FKBP38 für die Interaktion und die antiapoptotische Wirkung beider Proteine nachgewiesen [34]. Es wurde zudem diskutiert, dass FKBP38 für die Lokalisation von Bcl-2 in der Mitochondrienmembran essentiell ist.

Kang *et al.* untersuchten diese Interaktion mit dem Fokus auf Bcl-2 [66]. Die Wechselwirkung der rekombinanten Proteine aus *Escherichia coli* (*E. coli*) wurde mit Co-Immunopräzipitation nachgewiesen. Mithilfe von Bcl-2 Deletionsmutanten wurde gezeigt, dass der lange Loop zwischen BH4- und BH3-Domäne für die Interaktion essentiell ist. FKBP38 reguliert und verhindert aufgrund seiner Bindung an Bcl-2 die Phosphorylierung des Loops durch eine Serin/Threonin-Kinase. Phosphoryliertes Bcl-2 bindet nicht an FKBP38, aber an andere Proteine wie z. B. CaN [66]. Untersuchungen mit Krebszelllinien zeigten einen positiven Einfluß der Löslichkeit und Stabilität von Bcl-2 bei Co-Expression mit FKBP38 [43]. Eine Herunterregulierung von FKBP38 mittels siRNA bewirkte keine Abnahme der mRNA von Bcl-2, aber eine Abnahme von Bcl-2 auf der Proteinebene. Dies kann in einer Instabilität von Bcl-2 und dem daraus folgenden Abbau z. B. durch Caspase-3 begründet sein.

Edlich *et al.* wiesen eine Wechselwirkung mittels Co-Immunopräzipitation der rekombinanten Proteine aus *E. coli* bzw. endogenen Proteine aus SH-SY5Y-Zelllysat erst nach der Aktivierung von FKBP38 durch holo-CaM nach [29]. In SH-SY5Y- und HeLa-Zellen führte die Reduktion und Inaktivierung von FKBP38 durch RNAi bzw. durch die Inhibierung mit FKBP-Liganden (FK506, GP-1046, Rapamycin) zu einer Verringerung der

Apoptoserate. Diese Ergebnisse konnten in Versuchen mit einer Neuroblastomazelllinie und Ratten validiert werden [30].

Choi *et al.* beschrieben diese Protein-Protein-Wechselwirkung und ihre Auswirkung auf den Caspase-abhängigen Abbau von Bcl-2 sehr ausführlich [67]. In Zellexperimenten mit Huh7-Zellen wurde gezeigt, dass Bcl-2 von FKBP38 stabilisiert und akkumuliert wird. Co-Immunopräzipitationsexperimente von Deletionsmutanten der PPIase-, TPR- und CaM-Bindedomänen des FKBP38 mit Bcl-2 lassen vermuten, dass FKBP38 gleichzeitig mit der PPIase- und der TPR-Domäne an Bcl-2 bindet. Diese Aussage wird durch Versuche mit gleichzeitiger Transfektion von Bcl-2 und je einer der Deletionsmutanten in Huh7-Zellen gestützt. Es kam zu keiner Anreicherung von Bcl-2, wenn in der FKBP38-Mutante die PPIase- oder TPR-Domäne fehlte, jedoch zur Bcl-2-Akkumulation, wenn die FKBP38-Mutante ohne CaM-Bindedomäne transfiziert wurde. Eine Bedeutung dieser Interaktion sehen Choi *et al.* in einer sterischen Hinderung der proteolytischen Spaltung des flexiblen Bcl-2 Loops durch Caspase-3.

1.3. Die Hsp70-Proteinfamilie

Die Reaktion von Organismen oder Zellen auf schädliche Umwelteinflüsse, wie z. B. einem Hitzeschock, Chemikalien oder UV-Strahlung, ist mit der erhöhten Expression von Hitzeschockproteinen (HSP) verbunden [68]. Die ubiquitär vorkommenden und hoch konservierten HSPs werden nach ihrer molekularen Masse in Familien unterteilt. Zwar unterscheiden sich die Proteinfamilien strukturell, innerhalb einer Familie existieren jedoch signifikante Homologien [69]. Ein Beispiel ist die Hsp70-Proteinfamilie mit den prokaryotischen Vertretern DnaK, HscA und HscC sowie den eukaryotischen Vertretern Hsp70, Hsc70 und BiP. Die verschiedenen Hsp70-Proteine unterscheiden sich in ihrer Zelllokalisierung und Expression [70]. Einige der Hsp70-Homologe werden erst oder verstärkt durch die Einwirkung von Stress exprimiert. Diese haben die Funktion, stressinduzierte Zellschädigungen durch Abbau, Denaturierung und Agglomeration von Proteinen zu verhindern. Andere Hsp70-Homologe werden kontinuierlich exprimiert und sind an der regulären Aufrechterhaltung der zellulären Prozesse beteiligt. Eine Zusammenstellung der zellulären Prozesse und Aufgaben, in denen Hsp70-Proteine involviert sind, ist in Tabelle 1.2 gegeben. Diese Vielfalt an Funktionen ist durch zwei grundlegende Eigenschaften der Hsp70-Proteine möglich. Erstens können sie mit sehr vielen Substraten wechselwirken, und zweitens bilden sie mit den J-Domänenproteinen und den Nukleotidaustauschfaktoren eine funktionelle Einheit, die, je nachdem welches dieser Co-Chaperone mit Hsp70 interagiert, ein breites Spektrum an Funktionsdiversität ermöglicht [70].

Tabelle 1.2.: Zelluläre Prozesse und Funktionen an denen die Proteine der Hsp70-Familie beteiligt sind.

Zellulärer Prozess	Beschreibung der Hsp70-Funktion
Proteinfaltung	Als Chaperone sind sie an der <i>de novo</i> -Faltung von Proteinen und der Rückfaltung aggregierter und/oder fehlgefalteter Proteine beteiligt (Solubilisierung). Dabei unterscheidet man zwischen den »Holding-Prozessen« und den ATP-abhängigen »Folding-Prozessen«. Es wird vermutet, dass 10 bis 20 % aller Bakterienproteine <i>de novo</i> durch Hsp70-Chaperone gefaltet werden [71]. Selbst mutierte Proteine können durch diese aktive Faltung ihre Funktionalität erhalten [72].
Proteinentfaltung	Sie sind am Abbau defekter, fehlgefalteter bzw. nicht mehr benötigter Proteine involviert [73].
Abbau von Proteinkomplexen	Mechanistisch ist dieser Prozess der Proteinfaltung ähnlich [74].
Proteintransport	Sie sind an der Protein-Translokation vom Zytosol zum jeweiligen Zellkompartiment beteiligt. Dabei werden die Proteine während des Transports durch eine Membran in einem teilweise entfalteten Zustand stabilisiert [75].
Apoptose	Hsp70-Proteine wirken antiapoptotisch und sind an allen Phasen der Apoptose beteiligt [76–78].
Immunantwort	Sie sind direkte [79] und indirekte Aktivatoren [80] der Antigenpräsentierenden Zellen.

1.3.1. Struktur und Domänenaufbau

Hsp70-Proteine sind Multidomänenproteine. Sie bestehen aus einer ATPase-Domäne, einer Substratbindedomäne (SBD) und einer Substratstabilisierungsdomäne (SSD). Zwischen den ersten beiden Domänen befindet sich ein proteasesensitiver und flexibler Linker. Am C-Terminus tritt bei humanen Hsp70-Homologen das konservierte Tetrapeptidmotiv »EEVD« auf [74, 81–83]. Eine Darstellung der Hsp70-Strukturelemente ist in Abbildung 1.7 zu sehen.

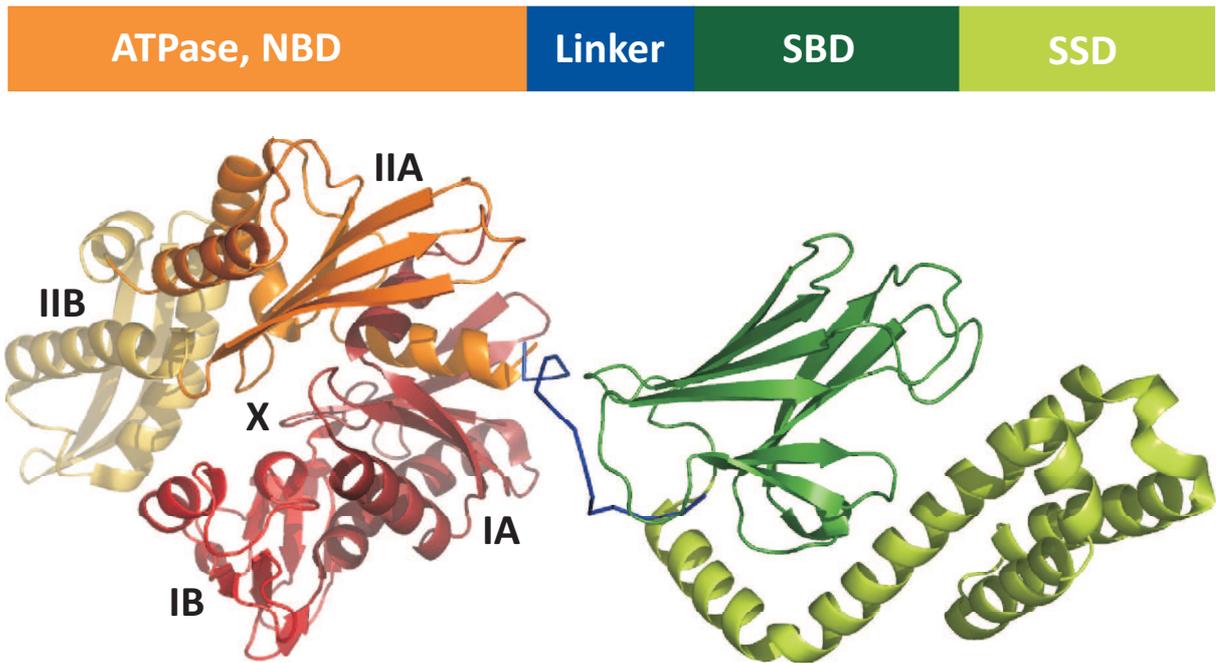


Abbildung 1.7.: Cartoondarstellung der Hsp70-Strukturelemente anhand der NMR-Struktur von *E. coli* DnaK¹⁻⁶⁰⁵ nach Bertelsen *et al.* (PDB ID 2KHO) [83]. Die ATPase-Domäne ist mit ihren vier Subdomänen in verschiedenen Gelb-, Orange- bzw. Rottönen abgebildet. Das »X« symbolisiert die Furche in der das Nukleotid gebunden wird. Der flexible Linker ist in Blau, die Substratbindedomäne in einem dunklen Grün und die Substratstabilisierungsdomäne in einem hellen Grün dargestellt.

1.3.1.1. Die ATPase-Domäne und die Nukleotidbindung

Die ca. 44 kDa große ATPase-Domäne, auch Nukleotidbindedomäne (NBD) genannt, besteht aus zwei globulären Einheiten in deren Mitte die Nukleotidbindestelle lokalisiert ist. Die Einheiten I und II sind jeweils aus zwei weiteren Untereinheiten A und B zusammengesetzt, so dass die ATPase-Domäne aus den vier Subdomänen IA, IB, IIA und IIB besteht (Abbildung 1.7). Die beiden A-Subdomänen haben untereinander eine identische Topologie ($\beta\beta\beta \dots$ (B-Subdomäne) $\dots \alpha\beta\alpha\beta\alpha\beta$), während die B-Subdomänen sich topologisch untereinander nicht ähnlich sind [84]. In der ATPase-Domäne wird Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) hydrolysiert, wodurch in der SBD ein Substratpeptid gebunden werden kann. Es wird aufgrund zahlreicher Röntgenstrukturen der Domäne vermutet, dass die Nukleotide ADP und ATP nahezu analog in der Furche zwischen den Subdomänen gebunden werden, und dass es bei allen Hsp70-Homologen einen gemeinsamen Hydrolysemechanismus gibt [73, 84, 85]. Bei der ATP-Bindung ist das Adenin in eine hydrophobe Bindetasche gepackt und ihr lösungsmittelzugänglicher Teil wird durch Wasserstoffbrückenbindungen über Wassermoleküle zu zwei benachbarten Argininen stabilisiert. Der Riboseteil wird ebenfalls durch Wasserstoffbrückenbindungen mit den Seitenketten eines Aspartats und eines Lysins komplexiert. Die Phosphatgruppen ragen in die Furche hinein und werden über Metallionen und Salzbrücken gebunden [85]. Die Sub-

domänen der ATPase-Domäne haben in Lösung eine durch Kipp- und Scherbewegungen hohe Flexibilität und Dynamik [86], deren Öffnungsfrequenz von dem gebundenen Nukleotid abhängt und in folgender Reihenfolge abnimmt: kein gebundenes Nukleotid, ADP, ADP und anorganisches Phosphat (P_i), ATP [74].

1.3.1.2. Die Substratbindedomäne und die Substratbindung

Der C-terminale Teil des Hsp70-Proteins besteht aus der SBD (ca. 15 kDa) und der SSD (ca. 10 kDa). Beide haben innerhalb der Hsp70-Proteinfamilie eine konservierte Struktur [74]. Die SBD besteht aus einer kompakten β -Sandwichstruktur an der sich C-terminal die α -Helices der SSD anfügen. Die Sandwichstruktur besteht aus zwei viersträngigen antiparallelen β -Faltblattelementen mit vier hervorstehenden Loops, die gegen zwei Helices der SSD gepackt sind. Die Substratbindung ist, basierend auf dem gut charakterisierten *E. coli* Hsp70-Homolog DnaK, wie folgt erklärt worden [87]. Sie findet im hydrophoben Kern des Proteins statt, der aus den Aminosäureresten der Faltblattstränge $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ und $\beta 4$ zusammengesetzt ist [87, 88]. Die Loops $L_{1,2}$ und $L_{4,5}$ stabilisieren den Protein-Peptid-Komplex doppelt: zum einen formen sie einen hydrophoben Bogen über dem Peptid; zum anderen werden mit der α -Helix B der SSD, die als Deckel über der SBD fungiert, Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet [88].

Zhu *et al.* charakterisierten die Wechselwirkung des Substratpeptids NRLLLTTG, im Folgenden als »NR-Peptid« bezeichnet [87]. Fünf Reste dieses Peptids interagieren mit der SBD. Das Rückgrat dieser Reste bildet Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Rückgrat einiger Loopreste im Protein aus. Dies vermittelt die gestreckte Konformation des NR-Peptids. Von seinen hydrophoben Seitenketten gehen Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit der Substratbindetasche aus. Eine zentrale Bedeutung nimmt das Leucin 4 im NR-Peptid ein, das komplett in der hydrophoben Tasche verborgen ist und somit eine Ankerfunktion besitzt. Die unmittelbar benachbarten Leucine sind teilweise dem Lösungsmittel zugänglich, weisen aber auch Kontakte zu anderen hydrophoben Resten der SBD auf. Das Oberflächenpotential in der Nähe der Tasche ist neutral bis negativ, wodurch die Präferenz der SBD für Substrate mit einem zentralen hydrophoben Bereich, der von basischen Resten flankiert wird, erklärt werden kann [89].

1.3.2. Prinzipien der Chaperonaktivität

Die Erkenntnisse über die Funktionsweise der Hsp70-Proteine basiert auf vielen Studien verschiedener Homologe, vor allem *E. coli* DnaK. Aufgrund der Sequenz- und Strukturähnlichkeit sowie vergleichbarer enzymatischer Aktivitäten wird davon ausgegangen, dass die Hsp70-Chaperone ähnliche Reaktionsmechanismen haben [74]. Die strukturelle Kopplung der Proteindomänen ist dabei von essentieller Bedeutung. Die Affinität und Kinetik der SBD für das peptidische Substrat ist von der Art der Nukleotidbindung in der ATPase-Domäne abhängig. In der ATP-gebundenen Form hat Hsp70 eine geringe Affinität zum

Kapitel 1. Einleitung

Substrat und eine hohe Austauschrate. Das ADP-gebundene Hsp70 weist hingegen eine hohe Affinität und eine geringe Austauschrate auf [90].

Der ATPase-Zyklus von Hsp70-Homologen kann in vier Reaktionsschritte unterteilt werden. Eine schematische Abfolge des Zyklus ist in Abbildung 1.8 dargestellt. Ausgangspunkt ist das ATP-gebundene Protein ohne Substrat. Das Substrat wird von einem J-Domänenprotein, einem Co-Chaperon, präsentiert. Die darauf folgende Assoziation des Substrates mit der Substratbindetasche führt zur ATP-Hydrolyse. Hierdurch ändert sich die Konformation der SSD, die sich nun als Deckel über der SBD befindet. Jetzt liegt die ADP-gebundene Form des Hsp70-Proteins mit einer hohen Affinität zum Substrat vor. Anschließend verursacht ein Nukleotidaustauschfaktor (NAF), ein weiteres Co-Chaperon, die Abgabe des ADP und erleichtert so die Neubindung von ATP. Es folgt die Öffnung der SBD durch eine konformationelle Änderung der SSD in den Anfangszustand. Die ATP-gebundene Konformation des Proteins mit einer geringen Affinität zum Substrat ist somit wieder erreicht, und der Zyklus kann von neuem beginnen. Ein Proteinsubstrat kann diesen Zyklus einmal oder mehrmals durchlaufen [70, 87].

Die Möglichkeit einer eigenständigen ATP-Hydrolyse ist bei Hsp70-Proteinen aufgrund der hohen Aktivierungsenergie kaum gegeben. Die Aktivität der Hsp70-Homologen wird daher durch verschiedene Co-Faktoren kontrolliert. Dies ist der Schlüssel für das breite Spektrum an Funktionen, die mit dem ATPase-Zyklus in Verbindung stehen [91, 92].

Co-Chaperone: Die »J-Domänenproteine«, auch Hsp40-Proteine genannt, sind eine heterogene Klasse von Enzymen, die alle eine ca. 70 Aminosäurereste lange J-Domäne besitzen, welche an Hsp70 bindet. Das bestuntersuchte Hsp40-Protein ist DnaJ aus dem Organismus *E. coli*. Es wird angenommen, dass DnaJ das DnaK-Substrat transient bindet, und dass DnaJ durch seine Wechselwirkung mit DnaK die ATP-Hydrolyse aktiviert [70].

Die »Nukleotidaustauschfaktoren« (GrpE in *E. coli*, Hsp110 und Hsp27 in Säugetieren) bewirken die Dissoziation des ADP von der ATPase-Domäne. Die molekulare Beschaffenheit der ATPase-Domäne erlaubt nun erneut eine rasche Bindung von ATP. Nukleotidaustauschfaktoren weisen trotz gleicher Wirkungsweisen unterschiedliche Strukturen und Mechanismen auf [74, 93]. In der Literatur wird in Verbindung mit Hsp70 und den genannten Co-Chaperonen oft von einer »Faltungsmaschinerie« gesprochen [90].

Der allosterische Kontrollmechanismus: Die Hsp70-Domänen regulieren sich gegenseitig über einen allosterischen Kontrollmechanismus. Dabei spielt der Linker zwischen der ATPase-Domäne und der SBD eine essentielle Rolle, indem er mit der ATPase-Domäne interagiert und somit die ATP-Hydrolyse initiiert [94, 95]. Ein konserviertes Prolin in der ATPase-Domäne wurde zudem als molekularer Schalter identifiziert, der über ein Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen mit der SBD in Verbindung steht. Je nach Zustand der ATPase-Domäne wird über das Prolin die geöffnete oder die geschlossene Konformation der SBD stabilisiert [96, 97].

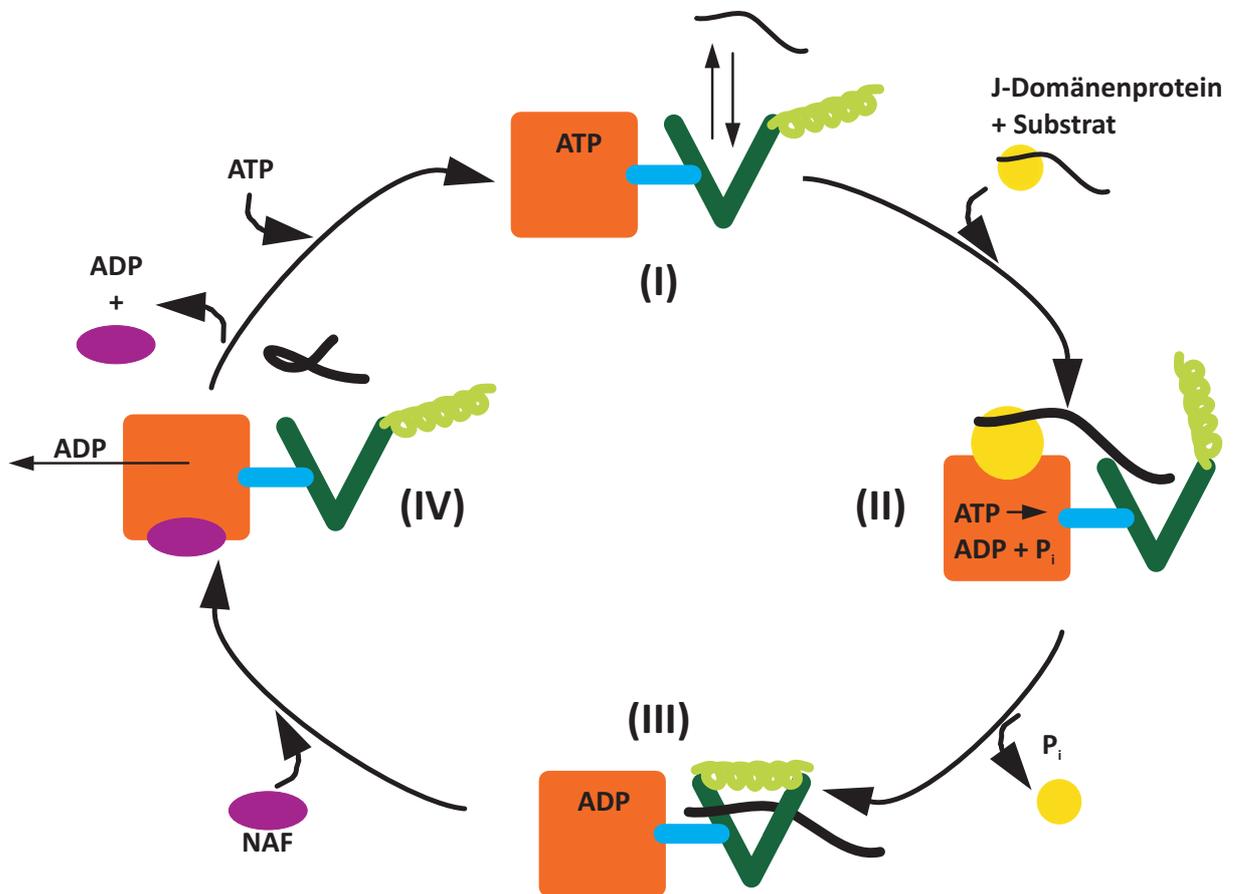


Abbildung 1.8.: Modell des ATPase-Zyklus von Hsp70. (Die Farben der Hsp70-Proteindomänen orientieren sich an denen in Abbildung 1.7.) (I) ATP ist in der ATPase-Domäne gebunden. Die SBD und SSD befinden sich relativ zueinander in einer geöffneten Position. Das Substrat kann nur mit geringer Affinität und hoher Austauschrate binden. (II) Die ATP-Hydrolyse wird durch ein substratpräsentierendes Co-Chaperon (J-Domänenprotein in Gelb) katalysiert. Das Substrat bindet dabei in der SBD. (III) Dies führt zum Schließen der SBD durch die SSD. Das Substrat ist nun mit hoher Affinität im ADP-assoziierten Hsp70 gebunden. (IV) Durch die Interaktion der ATPase-Domäne mit einem NAF (in Violett) bleibt ADP nicht mehr gebunden. Folgend öffnet sich die SBD durch die Umlagerung der SSD und das Substrat kann die SBD verlassen. Mit der Bindung von ATP beginnt der ATPase-Zyklus erneut.

1.4. Zielstellung

Zielstellung dieser Arbeit ist die Analyse und strukturelle Charakterisierung von Protein-Ligand-Interaktionen des FKBP38 sowie des DnaK mithilfe der hochaufgelösten NMR-Spektroskopie.

Das humane FKBP38 ist ein Multidomänenprotein, dessen katalytische Domäne eine Interaktion mit Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen eingehen kann [98]. Diese Wechselwirkung soll bezüglich der koordinierenden Aminosäuren, der Position des am Protein gebundenen Ions und der Affinität der Ionenbindung hinsichtlich der Ladung und Größe des Kations charakterisiert werden. Ziel ist es somit die physiologische Bedeutung dieser elektrostatischen Interaktion und die Position der Interaktionsstelle im Protein zu bestimmen.

Die Wechselwirkung zwischen FKBP38 und dem antiapoptotischen Protein Bcl-2 wurde bereits in mehreren Publikationen beschrieben. Ihre strukturellen Gegebenheiten sind jedoch bisher unbekannt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist daher die Charakterisierung der Interaktion zwischen Bcl-2 und der katalytischen Domäne des FKBP38 auf molekularer Ebene. Mittels heteronuklearer NMR-Experimente soll das Interface lokalisiert und die Eigenschaften der Wechselwirkung untersucht werden. Die hieraus abgeleiteten Erkenntnisse könnten als Grundlage für eine Regulierung der Apoptose genutzt werden, die mit der Interaktion zwischen FKBP38 und Bcl-2 in direktem Zusammenhang steht.

Die zunehmende Ausbildung von Resistenzen bei vielen Bakterien gegenüber zahlreichen Antibiotika erfordert die Entwicklung neuer Substanzen, die alternative Zellmechanismen stören. Die Inhibierung des für prokaryotische Zellen essentiellen Chaperons DnaK stellt einen vielversprechenden Ansatz für das oben genannte Problem dar. Mehrere Pyrrhocoricin-Derivate wurden im Vorfeld bereits erfolgreich auf ihre antibakteriellen und inhibitorischen Eigenschaften getestet. Diese Inhibitoren sollen nun bezüglich ihrer Interaktion mit der Substratbindedomäne und Substratstabilisierungsdomäne von DnaK charakterisiert werden. Mittels einer NMR-spektroskopischen Vergleichsstudie soll ihre Bindung auf molekularer Ebene beschrieben werden. Die hieraus erhaltenen Erkenntnisse könnten Grundlage für ein besseres Verständnis der antibakteriellen Effekte sein und die Basis für die Entwicklung noch effektiverer Inhibitoren darstellen.

Kapitel 2.

Materialien und Methoden

2.1. Präparative Methoden

Proteinexpression

Die Kultivierung in *E. coli* BL21 (DE3) erfolgte in LB-Medium mit dem Antibiotikum Kanamycin bei 37 °C für FKBP38³⁵⁻¹⁵³, die FKBP38³⁵⁻¹⁵³-Mutanten und CaM bzw. bei 30 °C für Bcl-2¹⁻²¹¹ und die Bcl-2¹⁻²¹¹-Mutanten. Um 1 l LB-Medium anzupflanzen, wurde 50 ml Übernachtskultur eingesetzt. Für ¹⁵N-markiertes Protein wurde das Medium »E. coli OD 2 N« verwendet. Die Lagerung des Zellpellets als Suspension in dem Puffer des jeweils ersten Aufreinigungsschrittes erfolgte bei -80 °C. Eine Ausnahme bildeten hierbei die Bcl-2¹⁻²¹¹-Varianten, welche ohne Imidazol im Puffer eingefroren wurden.

DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² wurde für die ¹⁵N- bzw. ¹³C/¹⁵N-Markierung in *E. coli* BL21(DE3) Zellen exprimiert. Die Kultivierung erfolgte in dem Minimalmedium nach Batey *et al.* [99] durch Dr. Markus Liebscher.

Zellaufschluss

Der Zellaufschluss für die nachfolgende Aufreinigung der Proteine erfolgte durch zweimaliges Durchlaufen des Zellpellets in einer French Press bei 1,5 Mbar. Anschließend wurden durch Ultrazentrifugation (35000 x g, 45 min, 4 °C) die löslichen von den unlöslichen Bestandteilen getrennt. Der Überstand wurde für die Proteinreinigung eingesetzt.

Reinigung der Proteine

Die Reinigungsstrategie für FKBP38³⁵⁻¹⁵³ und CaM war bereits etabliert bzw. wurde von FKBP38³⁵⁻¹⁵³ direkt auf die Mutanten übertragen und soll nur kurz beschrieben werden.

FKBP38³⁵⁻¹⁵³: Der Puffer für den ersten Aufreinigungsschritt war 10 mM MES (pH 6,5). Der Überstand wurde auf eine EMD-DEAE-650-Säule gegeben, und mit einem Gradienten von 0 bis 1 M NaCl eluiert und fraktioniert. Fraktionen, die das gewünschte Protein enthalten, wurden eingengt und auf eine Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/60 Superdex 200 pg) mit Standard 7 als Laufpuffer aufgetragen.

CaM: Der Puffer für den ersten Aufreinigungsschritt war 10 mM HEPES (pH 7,5). Der Überstand wurde auf eine EMD-DEAE-650-Säule gegeben und mit einem Gradienten von 0 bis 1 M NaCl eluiert und fraktioniert. Fraktionen mit CaM wurden gegen 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5) dialysiert und auf eine selbstgepackte Ni-NTA-Agarose-Säule geladen, mit 1 M NaCl gewaschen und mit einem Imidazolgradienten von 0 bis 0,5 M eluiert. Die CaM-enthaltenden Fraktionen wurden eingengt und auf eine Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/60 Superdex 200 pg) mit Standard 7 als Laufpuffer aufgetragen.

Bcl-2¹⁻²¹¹: Die Reinigungsstrategie für Bcl-2¹⁻²¹¹ wurde neu etabliert und konnte auf die Mutanten übertragen werden. Das His-getaggte Bcl-2¹⁻²¹¹ aus 2 l LB-Medium wurde über eine mit Ni-NTA-Agarose selbstgepackte Säule aufgereinigt. Folgende Schritte wurden hierbei durchgeführt; die Zahlen 1 bis 4 beziehen sich dabei auf die Reinigungsschritte (Abbildung 2.1):

- Nach dem Zellaufschluss lag das Protein unlöslich als Inclusion Bodies im Zellpellet und löslich im Überstand vor.
- 1. Auftragen des Proteins: Der Überstand nach der Ultrazentrifugation wurde auf einen pH-Wert von 8,7 eingestellt und lag in 70 mM Tris (0,5 M NaCl, 20 mM Imidazol) vor. In Abbildung 2.1 ist der Durchlauf zu sehen, in dem kein Bcl-2¹⁻²¹¹ mehr vorlag.
- 2. Herunterspülen von Verunreinigungen: Da Bcl-2 unspezifisch mit hydrophoben Proteinen interagiert, wurde dieser Reinigungsschritt durchgeführt. Dem Puffer wurden dazu 0,1 M Imidazol zugesetzt.
- 3. Pufferwechsel: Der Pufferwechsel erfolgte mithilfe eines Gradienten zu 50 mM HEPES (1 M NaCl, pH 8,2). Dabei eluierte kein Protein.
- 4. Elution: Die Elution des Imidazols erfolgte mit 50 mM EDTA, die des Proteins mit 120 mM EDTA in 50 mM HEPES (1 M NaCl, pH 8,2). In Abbildung 2.1 ist nur die

Proteinelution dargestellt. Der separate Elutionsschritt von Imidazol war notwendig, da sonst das Protein in Gegenwart dieser Imidazolkonzentration bei der folgenden Dialyse präzipitiert wäre.

Die Reinigungsschritte wurden mithilfe eines silbergefärbten SDS-Gels überprüft (Abbildung 2.1).

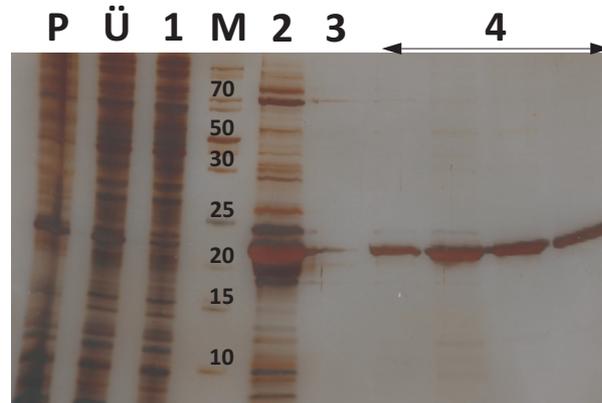


Abbildung 2.1.: SDS-Gel zur Aufreinigung von Bcl-2¹⁻²¹¹. Die entsprechenden Banden sind wie folgt beschriftet: P - Pellet, Ü - Überstand nach Ultrazentrifugation, M - Marker (Größenangabe der Markerbanden in kDa), 1 bis 4 - Aufreinigungsschritte.

DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵²: Das Protein wurde von Herrn Dr. Markus Liebscher vollständig präpariert. Nach der Reinigung mithilfe einer Ni-NTA-Agarose-Säule wurde der His-Tag durch Thrombin abgeschnitten und mittels eines weiteren Reinigungsschrittes mit einer Ni-NTA-Agarose-Säule vom Protein getrennt.

2.2. Analytische Methoden

SDS-PAGE

Die Analyse zur Reinheit von Proteinen erfolgte nach der Methode von Laemmli [100] durch SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese). Durch Coomassie-[101] und Silberfärbung [102] wurden die Proteinbanden im Gel nachgewiesen.

Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten spektroskopisch bei 280 nm nach dem Lambert-Beerschen Gesetz. Die Absorption einer Proteinlösung ist direkt proportional zu ihrer

Konzentration. Die Extinktionskoeffizienten der Proteine wurden nach Gill [103] unter Verwendung des Programmes »ProtParam tool« (www.expasy.ch) ermittelt.

2.3. Molekularbiologische Methoden

Von dem Protein FKBP38³⁵⁻¹⁵³ wurden durch Mutagenese folgende Varianten generiert.

- FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D92N
- FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D94N
- FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D100N
- FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D92N/D94N
- FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D94N/D100N

Die Mutagenesen erfolgten nach dem Prinzip des »QuikChange® Site-Directed Mutagenese Kit«. Die PCR-Produkte wurden vor der Transformation mit dem »High Pure® PCR Product Purification Kit« gereinigt. Informationen über die Mutageneseprimer und die verwendeten Template sind in Tabelle 2.1 zu finden.

Tabelle 2.1.: Mutageneseprimer und Template für die FKBP38³⁵⁻¹⁵³-Mutanten.

Primer ^a	Sequenz	Templat
D92N	GTGTTCACTCTGGGTAAGTGTGACGTCATCCAGG	FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³
D92N-antisense	CCTGGATGACGTCACAGTTACCCAGAGTGAACAC	FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³
D94N	GTTCACTCTGGGTGACTGTAACGTCATCCAGGC	FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³
D94N-antisense	GCCTGGATGACGTTACAGTCACCCAGAGTCAAC	FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³
D100N	GTCATCCAGGCCCTGAATCTCAGTGTCCCACTC	FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³
D100N-antisense	GAGTGGGACACTGAGATTCAGGGCCTGGATGAC	FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³
D92N/D94N	GCCTGGATGACGTTACAGTTACCCAGAGTGAACAC	FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ D92N
D92N/D94N-antisense	GCCTGGATGACGTTACAGTTACCCAGAGTGAACAC	FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ D92N
D94N/D100N	GTCATCCAGGCCCTGAATCTCAGTGTCCCACTC	FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ D94N
D94N/D100N-antisense	GAGTGGGACACTGAGATTCAGGGCCTGGATGAC	FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ D94N

^aDie Primer wurden bei der Firma MWG (Ebersberg) bestellt.

Die Bcl-2¹⁻²¹¹-Mutanten Bcl-2¹⁻²¹¹ R127Q, Bcl-2¹⁻²¹¹ R129Q und Bcl-2¹⁻²¹¹ R127Q/R129Q wurden von Dipl. Biochem. Miriam Linnert mithilfe der Methode »Overlap Extension PCR« [104] generiert.

2.4. NMR-Spektroskopie und Probenvorbereitung

2.4.1. Allgemeines zu den NMR-Experimenten und ihrer Auswertung

Alle NMR-Experimente, wenn nicht anders vermerkt, wurden an einem DRX500 Spektrometer mit einer Protonenresonanzfrequenz von 500,13 MHz aufgenommen, in dem ein 5 mm TXI Probenkopf mit XYZ-Gradientenspulen eingebaut war. Alle Proben enthielten 5 % D₂O.

Die Berechnung der Änderungen der chemischen Verschiebungswerte zwischen freiem (δ_{H_f}) und gebundenem Zustand (δ_{H_b}) ist für Protonen (1D ¹H-NMR-Spektren) in Gleichung 2.1 und für Amidgruppen (2D ¹H/¹⁵N-HSQC-Spektren) in Gleichung 2.2 angegeben [105].

$$\Delta\delta_H = |\delta_{H_f} - \delta_{H_b}| \quad (2.1)$$

$$\Delta\delta_{HN} = \sqrt{(\Delta\delta_H)^2 + \left(\frac{\Delta\delta_N}{6,5}\right)^2} = \sqrt{(\delta_{H_f} - \delta_{H_b})^2 + \left(\frac{\delta_{N_f} - \delta_{N_b}}{6,5}\right)^2} \quad (2.2)$$

2.4.2. Titration von FKBP38³⁵⁻¹⁵³ mit Metallionen

2.4.2.1. Calciumtitration der FKBP38³⁵⁻¹⁵³-Mutanten

Alle Mutanten (FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D92N, FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D94N, FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D92N/D94N, FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D100N, FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D94N/D100N) wurden nach der Aufreinigung (Abschnitt 2.1) während des Aufkonzentrierens mit einem Konzentrator (Ausschlußgröße von 5 kDa) abwechselnd je dreimal mit einer 0,5 mM EDTA-Lösung und dem Probenpuffer (10 mM MES, pH 6,8) gewaschen und danach gegen Probenpuffer dialysiert. Die verwendeten Konzentrationen der Protein- und Calciumstammlösungen sind der Tabelle 2.2 zu entnehmen. Gemessen wurde für jede Mutante eine Reihe von ¹H-Spektren mit den Protein/Calcium-Verhältnissen 1:0, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 und 1:20 bei einer Temperatur von 298 K.

Tabelle 2.2.: Konzentrationsangaben der Protein- und Calciumstammlösungen für die Calciumtitration der FKBP38³⁵⁻¹⁵³-Mutanten.

Mutante	$c_{\text{Mutante}} / \mu\text{M}$	$c_{\text{Ca}^{2+}} / \text{mM}$
FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ D92N	700	140
FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ D94N	600	240
FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ D100N	800	224
FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ D92N/D94N	650	65
FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ D94N/D100N	800	224

2.4.2.2. Titration von ¹⁵N-markiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³ mit verschiedenen Metallionen

Die aufkonzentrierten und gegen 10 mM MES-Puffer (pH 6,8) dialysierten ¹⁵N-markierten Proteinproben wurden mit Stammlösungen der Salze KCl, MgCl₂, CaCl₂, LaCl₃ bzw. TbCl₃ titriert. Zum Lösen der Salze für die Stammlösungen wurde der MES-Puffer benutzt. Konzentrationsangaben und Protein/Metallionen-Verhältnisse sind in Tabelle 2.3 zusammengestellt. Von den Proben jedes Titrationsschrittes wurde jeweils ein ¹H/¹⁵N-HSQC Spektrum bei 298 K aufgenommen. Zur Bestimmung der Bindekonstante wurde $\Delta\delta$ der Amidgruppen jener Reste herangezogen, die bei der Titration signifikante Resonanzverschiebungen aufwiesen. Dies betraf in allen Titrationen die Aminosäuren L90, D92, C93, D94, V95 und I96.

Tabelle 2.3.: Konzentrationsangaben der Protein- und Metallchloridstammlösungen für die Titration von ¹⁵N-markiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³.

Ion	$c_{\text{Protein}} / \mu\text{M}$	$c_{\text{Me}^{n+}} / \text{mM}$	Protein/Metallionen-Verhältnis
K ⁺	1000	3,6	1:0 1:1 1:5 1:10 1:20 1:40 1:80 1:160 1:240
Mg ²⁺	650	4,0	1:0 1:1 1:5 1:10 1:20 1:40 1:80 1:160
Ca ²⁺	450	2,3	1:0 1:0,8 1:3,8 1:6,8 1:15,8 1:33,8 1:69,8
La ³⁺	600	0,168	1:0 50:1 25:1 12,5:1 6,25:1 3:1 1:1 1:3 1:9
Tb ³⁺	400	0,017	1:0 50:1 25:1 12,5:1 6,25:1 3:1 1:1

Ein weiteres Untersuchungsziel bestand darin, $\Delta\delta$ von ¹⁵N-markiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³ nach der Zugabe von Ca²⁺ sowohl in salzfreiem als auch in salzhaltigem, Puffer zu vergleichen. Dazu wurden 400 μM ¹⁵N-markiertes FKBP38³⁵⁻¹⁵³ in 10 mM MES (pH 6,8) mit einer 1 mM Stammlösung CaCl₂ auf einen 18fachen Überschuss an Ca²⁺ titriert. Das gleiche Experiment wurde von Dr. Mitchell Maestre-Martínez mit 600 μM ¹⁵N-markiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³ in 10 mM MES (100 mM KCl, pH 6,8) durchgeführt. Vom unkomplexierten und komplexierten Protein wurde jeweils ein ¹H/¹⁵N-HSQC-Spektrum bei 298 K aufgenommen und $\Delta\delta$ berechnet. Die Auswertung dieser beiden Experimente befindet sich im Anhang (Abbildung A.1 auf Seite x).

2.4.2.3. Bestimmung der Bindekonstanten

Da es sich bei der Interaktion von ^{15}N -markiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³ mit Metallionen um einen schnellen Austausch handelt, wird er in Form von kontinuierlichen Änderungen der chemischen Verschiebungswerte ($\Delta\delta$) detektiert [106]. Die Bindekonstante K_d lässt sich in diesem Fall anhand von $\Delta\delta$ ermitteln. Gleichung 2.3 beschreibt die Änderung der chemischen Verschiebungswerte ($\Delta\delta$) als Produkt der chemischen Verschiebungsdifferenz zwischen gebundenem und freiem Zustand ($\delta_b - \delta_f$) und dem komplexierten Anteil PL des Proteins P_{ges} . Der zweite Faktor ($\frac{c_{\text{PL}}}{c_{\text{P}_{\text{ges}}}}$) wird mithilfe der Konzentration c beschrieben [107].

$$\Delta\delta = (\delta_b - \delta_f) \frac{c_{\text{PL}}}{c_{\text{P}_{\text{ges}}}} \quad (2.3)$$

Für einen Protein-Ligand-Komplex im Verhältnis eins zu eins gilt im chemischen Gleichgewicht die Beziehung 2.4 über das Massenwirkungsgesetz [107]. Die Gesamtkonzentration an Protein ($c_{\text{P}_{\text{ges}}}$) bzw. Ligand ($c_{\text{L}_{\text{ges}}}$) setzt sich aus der Konzentration der freien (c_{P} , c_{L}) und gebundenen Komponenten (c_{PL}) zusammen (Gleichungen 2.5 und 2.6).

$$K_d = \frac{c_{\text{P}} \cdot c_{\text{L}}}{c_{\text{PL}}} \quad (2.4)$$

$$c_{\text{P}_{\text{ges}}} = c_{\text{P}} + c_{\text{PL}} \quad (2.5)$$

$$c_{\text{L}_{\text{ges}}} = c_{\text{L}} + c_{\text{PL}} \quad (2.6)$$

Durch Substitution der Gleichungen 2.3, 2.5 und 2.6 in Gleichung 2.4 erhält man Gleichung 2.7 zur Bestimmung der Bindekonstante.

$$K_d = c_{\text{P}_{\text{ges}}} \left(\frac{\Delta\delta}{\delta_b - \delta_f} - 1 \right) + c_{\text{L}_{\text{ges}}} \left(\frac{\delta_b - \delta_f}{\Delta\delta} - 1 \right) \quad (2.7)$$

Die eingesetzte Protein- ($c_{\text{P}_{\text{ges}}}$) und Ligandkonzentration ($c_{\text{L}_{\text{ges}}}$) haben im Gleichgewichtszustand ein bestimmtes molares Verhältnis X , welches über die Beziehung 2.8 beschrieben wird. Damit gilt für die Berechnung des K_d die Gleichung 2.9.

$$c_{\text{L}_{\text{ges}}} = X \cdot c_{\text{P}_{\text{ges}}} \quad (2.8)$$

$$K_d = c_{P_{ges}} \left(\frac{\Delta\delta}{\delta_b - \delta_f} - 1 \right) + X \cdot c_{P_{ges}} \left(\frac{\delta_b - \delta_f}{\Delta\delta} - 1 \right) \quad (2.9)$$

Zur Bestimmung der Bindekonstante K_d wurden die unbekanntenen Größen $(\delta_b - \delta_f)$ und X in Gleichung 2.9 mit dem Programm »SigmaPlot 10.0« (Systat Software, San Jose, USA) durch Anpassen der Titrationsdaten an das Michaelis-Menten-Modell ermittelt. Von den berechneten K_d -Werten der einzelnen ausgewählten Reste wurde das arithmetische Mittel bestimmt und als finale Bindekonstante $\overline{K_d}$ angegeben (Tabelle B.1 auf Seite xiv) [108].

2.4.2.4. Bestimmung der Lage des Terbiumions

Es wurden Titrationsen der ^{15}N -markierten FKBP38³⁵⁻¹⁵³ Domäne mit Terbium- und Lanthanionen bei 298 K, wie in Tabelle 2.3 beschrieben, durchgeführt und bei jedem Titrations-schritt ein $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum aufgenommen. Zur Bestimmung der Lage des Ions im Protein wurden die paramagnetischen Effekte des Terbiumions genutzt. Dazu zählen Scheinkontaktverschiebungen (PCS) als qualitative Größe und die Linienverbreiterung der Signale aufgrund des PRE-Effekts (Paramagnetic relaxation enhancement) als quantitatives Maß zur Determinierung der relativen Ionenposition mittels NMR-Spektroskopie.

Um die rein paramagnetischen Auswirkungen auf die Signale zu erhalten, wurden die Ergebnisse der Titration mit diamagnetischen Lanthanionen als Vergleich herangezogen. Die Berechnung der Lage des Metallions führte Dr. Mitchell Maestre-Martínez mithilfe eines selbstgeschriebenen Matlab-Skriptes (Matlab 7.0.1, The MathWorks, Massachusetts, USA) durch. Dabei wurden die Koordinaten der FKBP38³⁵⁻¹⁵³-Röntgenstruktur (PDB ID 3EY6) und die PCS genutzt. Die Lage des Terbiumions wurde durch gleichzeitige Minimierung des Anisotropietensors und der Terbiumkoordinaten nach der Methode der kleinsten Quadrate berechnet [109]. Eine solche Berechnung erfolgte mit den Daten jedes Titrations-schrittes. Der Q-Faktor diente als Kriterium für die Übereinstimmung von experimentellen und ermittelten Daten. Der beste Q-Faktor wurde für die Berechnung der Terbiumkoordinaten im 1:1-Komplex erzielt. Dieser wird in Unterabschnitt 3.1.1.3 im Detail dargestellt und diskutiert.

2.4.3. FKBP38³⁵⁻¹⁵³ und die Interaktion mit Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹

Alle Peptide wurden freundlicherweise von Dr. Günther Jahreis synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Für diese Experimente wurde HEPES (10 mM, pH 7,5) als Puffer und eine Temperatur von 283 K gewählt. Die in Tabelle 2.4 aufgelisteten und teilweise auch ^{15}N -markierten Peptide wurden untersucht.

Für die Resonanz-zuordnung wurden von je einer 3 mM Probe NPep und NPep(R127/R129) folgende Spektren aufgenommen: $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC, TOCSY und ROESY.

Tabelle 2.4.: Bezeichnung und Sequenz der untersuchten Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹-Peptide.

Peptid	Bezeichnung	Sequenz
<i>unmarkiert</i>		
Bcl-2 ¹¹⁹⁻¹³¹	PepRR	LHLTPFTARGRFA-NH ₂
Bcl-2 ¹¹⁹⁻¹³¹ R127Q	PepQR	LHLTPFTAQGRFA-NH ₂
Bcl-2 ¹¹⁹⁻¹³¹ R129Q	PepRQ	LHLTPFTARGQFA-NH ₂
Bcl-2 ¹¹⁹⁻¹³¹ R127Q/R129Q	PepQQ	LHLTPFTAQQGQFA-NH ₂
<i>¹⁵N-markiert^a</i>		
Bcl-2 ¹¹⁹⁻¹³¹	NPep	LHLTPFTARGRFA-NH₂
Bcl-2 ¹¹⁹⁻¹³¹ (R127)	NPep(R127)	LHLTPFT ARGRFA -NH ₂
Bcl-2 ¹¹⁹⁻¹³¹ (R129)	NPep(R129)	LHLTPFT ARGRFA -NH ₂
Bcl-2 ¹¹⁹⁻¹³¹ (R127/R129)	NPep(R127/R129)	LHLTPFT ARGRFA -NH ₂

^a ¹⁵N-markierte Aminosäuren sind fett dargestellt.

Die Zuordnung der ¹H-, ¹³C- und ggf. ¹⁵N-Resonanzen ist im Anhang in der Tabelle B.2 zu finden. Für die Berechnung der Sekundärstruktur des Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹-Peptids wurde das Programm »CSI« (University of Alberta, Alberta, Kanada) genutzt [110].

Da FKBP38³⁵⁻¹⁵³ gegenüber Metallionen sehr empfindlich ist, wurde bei der Vorbereitung der folgenden Experimente genau darauf geachtet, dass alle Komponenten einer Versuchsreihe in dem selben Puffer vorlagen. Dies wurde durch mehrfache und gemeinsame Dialyse der Peptide und Proteine und durch das Lösen von Calciumchlorid in dem Dialysepuffer realisiert.

2.4.3.1. Bindungsstudien von ¹⁵N-markiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³ mit unmarkierten Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹-Peptiden

Um die Interaktion zwischen ¹⁵N-markiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³ und PepRR sowie den Einfluss von CaM auf diese Wechselwirkung zu untersuchen, wurden zwei Experimentreihen durchgeführt. Zu FKBP38³⁵⁻¹⁵³ wurden die aufgezählten Substanzen als Stammlösungen schrittweise zugegeben und jeweils ein ¹H/¹⁵N-HSQC-Spektrum aufgenommen.

- 1.Titration:
 - Vorlage: 0,6 mM FKBP38³⁵⁻¹⁵³
 - + 1,8 mM PepRR (im dreifachen Überschuss)
 - + 1,2 mM CaM (im zweifachen Überschuss)
 - + 4,6 mM CaCl₂ (zur Umwandlung von apo-CaM in holo-CaM)

- 2.Titration:
 - Vorlage: 0,6 mM FKBP38³⁵⁻¹⁵³
 - + 1,2 mM CaM (im zweifachen Überschuss)
 - + 1,8 mM PepRR (im dreifachen Überschuss)
 - + 4,6 mM CaCl₂ (zur Umwandlung von apo-CaM in holo-CaM)

Für die Experimente mit den Glutaminvarianten des Peptids PepRR (PepQR, PepRQ und PepQQ) wurde jeweils eine Probe mit ¹⁵N-markiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³ (400 µM) und einem dreifachen Überschuss an Peptid (1,2 mM) gemessen. Die Konzentrationen der Peptidstammlösungen lagen bei ca. 6,7 mM, während die Proteinstammlösung eine Konzentration von 1,7 mM aufwies.

2.4.3.2. Bindungsstudien von ¹⁵N-markierten Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹-Peptiden mit unmarkiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³

Von den folgenden Proben wurde je ein ¹H/¹⁵N-HSQC-Spektrum aufgenommen und die Änderungen der chemischen Verschiebungswerte im Vergleich zum jeweiligen unkomplexierten Peptid berechnet.

- Komplexe mit FKBP38³⁵⁻¹⁵³
 - 300 µM NPep + 300 µM FKBP38³⁵⁻¹⁵³ (1:1)
 - 300 µM NPep + 900 µM FKBP38³⁵⁻¹⁵³ (1:3)
 - 300 µM NPep(R127/R129) + 300 µM FKBP38³⁵⁻¹⁵³ (1:1)
 - 300 µM NPep(R127/R129) + 900 µM FKBP38³⁵⁻¹⁵³ (1:3)
- Komplexe mit FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D92N/D94N
 - 300 µM NPep + 900 µM FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D92N/D94N (1:3)
 - 300 µM NPep(R127/R129) + 900 µM FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D92N/D94N (1:3)

Die Ergebnisse der jeweiligen Experimente mit den Peptiden NPep und NPep(R127/R129) wurden zusammengefasst, als wären sie mit einem einzigen Peptid durchgeführt worden, welches im Folgenden als »NPep*« bezeichnet wird. Da die Reste A126, G127 und A131 in beiden Peptiden markiert waren, wurde das arithmetische Mittel der Verschiebungen aus beiden Experimenten berechnet und für NPep* angegeben.

Die weiteren Experimente mit NPep(R127), NPep(R129) und NPep(R127/R129) wurden an einem 800,23 MHz Spektrometer mit CP-TPI-Probenkopf durchgeführt. Es wurden ¹H/¹⁵N-HSQC-Spektren jeweils von den freien Peptiden (700 µM) und im Komplex mit einem dreifachen Überschuss an FKBP38³⁵⁻¹⁵³ (2,1 mM) aufgenommen.

2.4.4. FKBP38³⁵⁻¹⁵³ und die Interaktion mit Bcl-2¹⁻²¹¹-Varianten

Da der Bcl-2 Wildtyp [111] und auch das für die Interaktionsstudien verwendete Konstrukt ohne Membrananker (Bcl-2¹⁻²¹¹) eine geringe Löslichkeit besitzen, wurde das Puffersystem, welches in den Experimenten mit den Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹-Peptiden zum Einsatz kam, gewechselt. Im Folgenden wurde HEPES (50 mM, 100 mM NaCl, pH 8,2) als Puffer verwendet, in dem Bcl-2¹⁻²¹¹ bis zu 12 μ M aufkonzentriert werden konnte. Die einzelnen NMR-Proben wurden aus Stammlösungen zusammengestellt, die mehrfach im selben Puffer dialysiert wurden.

In der ersten Messreihe wurden die Effekte von Bcl-2¹⁻²¹¹ auf ¹⁵N-markiertes FKBP38³⁵⁻¹⁵³ analysiert. Um sicher zu sein, dass keine falsch positiven Effekte durch mehrfach geladene Kationen, z. B. aus Verunreinigung der Puffersalze, auftreten, wurde dem Puffer 1 mM EDTA zugesetzt. Gemessen wurde je ein ¹H/¹⁵N-HSQC-Spektrum der folgenden beiden Proben und die Änderung der chemischen Verschiebungswerte berechnet.

- 50 μ M ¹⁵N-markiertes FKBP38³⁵⁻¹⁵³ ($c_{\text{Stammlösung}} = 840 \mu\text{M}$)
- 50 μ M ¹⁵N-markiertes FKBP38³⁵⁻¹⁵³ + 10 μ M Bcl-2¹⁻²¹¹ ($c_{\text{Stammlösung}} = 12 \mu\text{M}$)

Die Probenvorbereitung für die Bindungsstudien von ¹⁵N-markierten FKBP38³⁵⁻¹⁵³ mit den Bcl-2¹⁻²¹¹-Mutanten (Bcl-2¹⁻²¹¹ R127Q, Bcl-2¹⁻²¹¹ R129Q, Bcl-2¹⁻²¹¹ R127Q/R129Q) erfolgte analog zum Protokoll der ersten Messreihe.

In einer zweiten Messreihe wurde der Einfluss von apo-CaM und holo-CaM auf diese Interaktion überprüft. Das vorher gegen EDTA-haltigen Puffer und bidestilliertes Wasser dialysierte CaM wurde lyophilisiert und als Feststoff der Probe zugegeben. Diese Probe wurde anschließend gegen EDTA-freien Messpuffer dialysiert. Gemessen wurde je ein ¹H/¹⁵N-HSQC-Spektrum der folgenden Proben.

- 100 μ M ¹⁵N-markiertes FKBP38³⁵⁻¹⁵³ ($c_{\text{Stammlösung}} = 1,7 \text{ mM}$)
- 50 μ M ¹⁵N-markiertes FKBP38³⁵⁻¹⁵³ + 10 μ M Bcl-2¹⁻²¹¹ ($c_{\text{Stammlösung}} = 11 \mu\text{M}$)
- 50 μ M ¹⁵N-markiertes FKBP38³⁵⁻¹⁵³ + 10 μ M Bcl-2¹⁻²¹¹ + 80 μ M apo-CaM
- 50 μ M ¹⁵N-markiertes FKBP38³⁵⁻¹⁵³ + 10 μ M Bcl-2¹⁻²¹¹ + 80 μ M apo-CaM + 265 μ M CaCl₂ (Zur vorletzten Probe wurde eine 29 mM konzentrierte Calciumchloridstamm-lösung zugegeben um holo-CaM zu erzeugen.)

Die Experimente wurden alle bei 283 K an einem 800,23 MHz Spektrometer mit CP-TPI-Probenkopf durchgeführt.

2.4.5. Resonanzzuordnung und Interaktionsstudien von DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵²

Alle DnaK-Proben wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Markus Liebscher zur Verfügung gestellt, und lagen in 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,0, 0,05 % Natriumazid) vor.

Die ¹H/¹⁵N-HSQC-Spektren von DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² mit und ohne Zugabe der Peptide aus Tabelle 2.5 wurden bei einer Konzentration von 600 µM aufgenommen. Die Peptide wurden immer im 1,5fachen Überschuss zugesetzt. Alle Messungen erfolgten bei 298 K. Für die Resonanzzuordnung von ¹³C/¹⁵N-DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² mit und ohne den Peptiden **1** bzw. **NR** wurden folgende Tripelresonanzexperimente mit einer 2 bis 3 mM Proteinprobe durchgeführt: HNCA und HNCACB. Die Zuordnung der ¹⁵N-, ¹H_N-, ¹³C_α- und ¹³C_β-Resonanzen von DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² wurde teilweise mithilfe einer in der Literatur beschriebenen NMR-spektroskopischen Charakterisierung eines ähnlichen DnaK-Konstrukts ohne Substrat erstellt [112] und ist im Anhang in Tabelle B.3 zu finden. Eine Übersicht der durchgeführten Experimente ist in Tabelle 2.5 gegeben.

Tabelle 2.5.: Zusammenstellung der NMR-Experimente verschiedener DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵²-Proben mit bzw. ohne Zusatz von Peptid, sowie die Angabe der jeweiligen Peptidsequenz.

Peptid	Peptidsequenz	Experimente
-	-	¹ H/ ¹⁵ N-HSQC, HNCA, HNCACB
1	Ac-VDKLYZLPRPT-NH ₂	¹ H/ ¹⁵ N-HSQC, HNCA, HNCACB
2	Ac-VDKLYZLPRPTPPRPIYNRN-NH ₂	¹ H/ ¹⁵ N-HSQC
3	Ac-KRVDKLYZLPRPT-NH ₂	¹ H/ ¹⁵ N-HSQC
1'	Ac-VDKGSYLPRPT-NH ₂	¹ H/ ¹⁵ N-HSQC
2'	Ac-VDKGSYLPRPTPPRPIYNRN-NH ₂	¹ H/ ¹⁵ N-HSQC
NR	Ac-NRLLLTG-NH ₂	¹ H/ ¹⁵ N-HSQC, HNCA, HNCACB

2.5. Materialien und Chemikalien

Alle Materialien und Chemikalien sind alphabetisch sortiert und in folgende Kategorien eingeteilt. Wurde ein Material bzw. eine Chemikalie aus Deutschland bezogen, ist nur der Stadtname ohne das Land angegeben.

- Chemikalien
- Chromatographiematerialien
- *E. coli*-Stämme
- Enzyme

- Geräte
- Kits
- Medien
- Peptide
- Plasmide
- Proteine
- Puffer
- Stammlösungen
- Standards

Chemikalien

Der Reinheitsgrad der Chemikalien war mindestens »pro analysis« und wurde, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (München) bezogen.

- Agar: AppliChem (Darmstadt)
- Deuteriumoxid, 99,9 %: VEB Berlin Chemie (Berlin)
- dNTP-Mix: Peqlab (Erlangen)
- Hefeextrakt: Invitrogen (Karlsruhe)
- HEPES: AppliChem (Darmstadt)
- IPTG: AppliChem (Darmstadt)
- Kanamycin: AppliChem (Darmstadt)
- Magnesiumsulfat: Invitrogen (Karlsruhe)
- Pepton: Fluka (Buchs, Schweiz)

Chromatographiematerialien

- Fractogel EMD-DEAE-650(M): Merck Eurolab (Darmstadt)
- HiLoad Superdex 75 HR 16/60: GE Healthcare (München)
- Ni-NTA Agarose: Quiagen (Hilden)

E. coli-Stämme

- BL21(DE3): Novagen (Madison, USA)
- DH5 α : Invitrogen (Karlsruhe)

Enzyme

- DpnI: New England Biolabs GmbH (Schalbach)
- Pfu DNA-Polymerase: Stratagene (La Jolla, USA)

Geräte

- Äkta FPLC: Amersham Pharmacia (Freiburg)
- Avance 800 NMR-Spektrometer: Bruker (Rheinstetten)
- CD-Spektrophotometer: Jasco (Gross-Umstadt)
- Chromatographiesystem: Amersham Pharmacia (Freiburg)
- DRX500 NMR-Spektrometer: Bruker (Rheinstetten)
- Elektrophoreseapparatur: Biometra (Göttingen)
- French® Press SLM: Aminco (Rochester, USA)
- Heraeus Biofuge Stratos Zentrifuge: Kendro (Hanau)
- Sorvall M120GX Ultrazentrifuge: Kendro (Hanau)
- Sorvall RC5B+ Zentrifuge: Kendro (Hanau)
- Trio-Thermocycler: IKA Werke (Staufen)
- TS Series Benchtop: Constant Systems Limited (Northants, UK)
- Unicryo MC2L-60.0C Lyophilisator: Progen Scientific (London, UK)

Kits

- *High Pure® PCR Product Purification*: Roche Diagnostics (Mannheim)
- *QIAprep® Spin Miniprep*: Quiagen (Hilden)
- *Quik Change Site Directed Mutagenesis®*: Stratagene (La Jolla, USA)

Die Kits wurden entsprechend der Herstellerangaben benutzt.

Medien

- E. coli OD 2 N: Silantes (München)
- LB-Medium: 10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl (Für LB-Agarplatten wurden 15 g/l Agar vor dem Autoklavieren zugegeben.)

Peptide

Alle Peptide wurden von Herrn PD Dr. Günther Jahreis (MPG, Halle) synthetisiert. Sie sind in den Tabellen 2.4 und 2.5 aufgelistet.

Plasmide

- pET28a: Novagen (Madison, USA)

Proteine

Die Sequenzen der verwendeten Proteine sind in Tabelle 2.6 dargestellt.

Tabelle 2.6.: Informationen zu den verwendeten Proteinkonstrukten.

Protein	Konstrukt und Bemerkungen
Bcl-2 ¹⁻²¹¹	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEF-Bcl-2 ¹⁻²¹¹ ; N-terminaler His-Tag mit Linker, kein Membrananker
CaM	CaM ¹⁻¹⁵⁰ -HHHHH; Volllängenprotein mit C-terminalem His-Tag
DnaK ³⁸⁷⁻⁵⁵²	GSHM-DnaK ³⁸⁷⁻⁵⁵² ; Substratbindedomäne mit Teil der α -helikalen Substratstabilisierungsdomäne
FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³	MR-FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ , Methionin und Arginin als Klonierungsartefakte, Nummerierung der Reste nach [28]

Puffer

- Standard 7 (10 mM HEPES, 150 mM KCl, 1,5 μ M MgCl₂, pH 7,8)

Stammlösungen

- IPTG: 1 M in Wasser, zugesetzt im Verhältnis 1:1000
- Kanamycin: 25 g/ml Kanamycinsulfat in Wasser, zugesetzt im Verhältnis 1:1000

Standards

- PageRuler™ Unstained Protein Ladder: Fermentas (St. Leon-Rot)

Kapitel 3.

Ergebnisse und Diskussion

3.1. Protein-Ligand-Interaktionen der PPIase-Domäne von FKBP38

3.1.1. Charakterisierung des ladungssensitiven $\beta 5$ - $\alpha 1$ -Loops

Dr. Mitchell Maestre-Martínez hat die PPIase-Domäne des FKBP38 während seiner Promotion bei verschiedenen Pufferbedingungen untersucht. Dabei stellte er fest, dass der $\beta 5$ - $\alpha 1$ -Loop, welcher die Aminosäuren L90 bis I96 umfasst, eine Wechselwirkung mit Calcium- als auch Magnesiumionen eingehen kann [98]. Es wurden in den ^1H -NMR-Spektren Titrationseffekte der Methylresonanzen von V95 und I96 bei Zugabe dieser Kationen beobachtet (Abbildungen 3.1A und 3.1B). Außerdem wurde gezeigt, dass ausschließlich die entsprechenden Proteinerückgrat-Resonanzen des Loops im $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum Titrationseffekte aufgrund einer Calciumzugabe aufwiesen (Abbildung 3.1C). Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte untersucht werden, welche Aminosäuren des $\beta 5$ - $\alpha 1$ -Loops diese Interaktionen vermitteln und wie stark der Einfluss diverser Metallionen ist.

3.1.1.1. Die Aspartate 92 und 94 bewirken die Ladungssensitivität

Der $\beta 5$ - $\alpha 1$ -Loop besteht aus den Resten L90, G91, D92, C93, D94, V95 und I96, von denen die negativ geladenen Seitenketten der beiden Aspartate für die Bindung von Kationen geeignet sind. Um zu überprüfen, ob die beiden Aspartate D92 und D94 gemeinsam die Metallinteraktion vermitteln, wurden die Mutanten FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D92N, FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D94N und FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D92N/D94N generiert (siehe Abschnitt 2.3). Als substituierte Aminosäure wurde Asparagin gewählt, da es in der Seitenkette anstelle der Carboxygruppe eine Carbonsäureamidgruppe besitzt und sich somit bei nahezu gleicher Größe nur aufgrund der fehlenden negativen Ladung von Aspartat unterscheidet. Die anfangs Calcium-freien Mutanten wurden mit einer Calciumchloridstammlösung zu einem

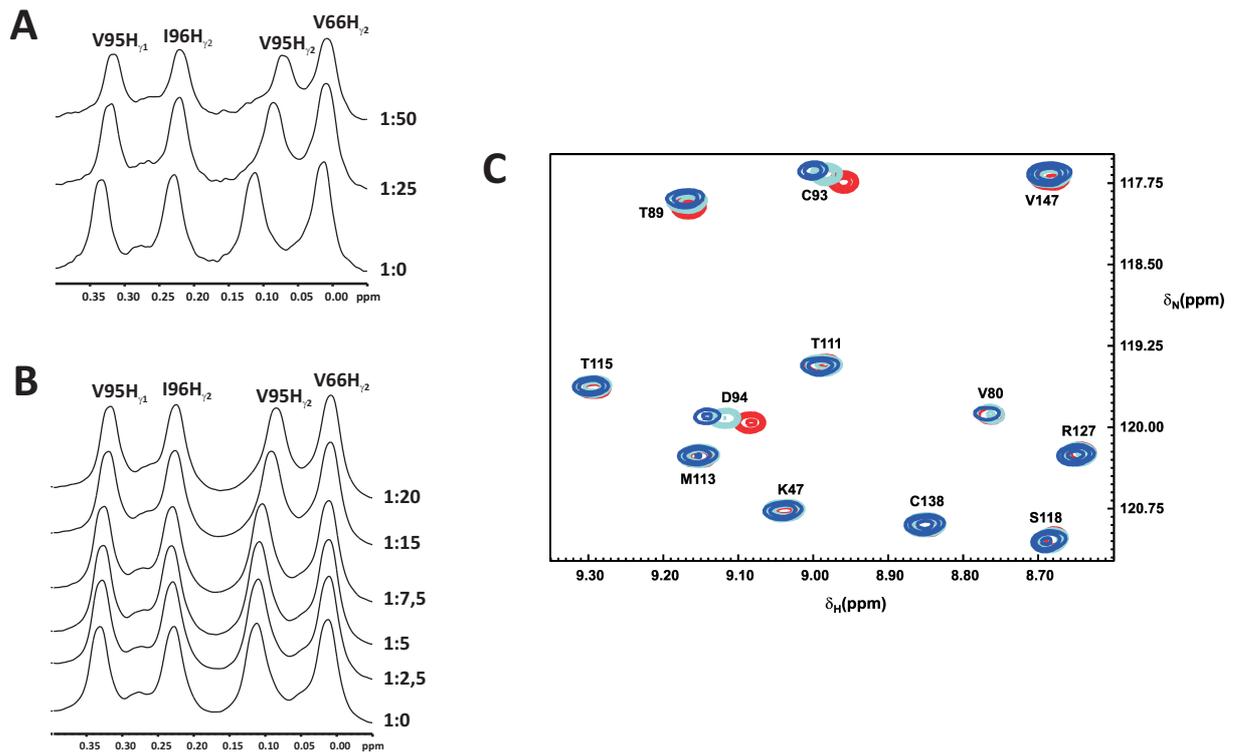


Abbildung 3.1.: Methylbereich des FKBP38³⁵⁻¹⁵³ aus den ¹H-NMR-Spektren einer (A) Mg²⁺- und (B) Ca²⁺-Titrationsserie. (C) Ausschnitt übereinandergelegter ¹H/¹⁵N-HSQC-Spektren, die FKBP38³⁵⁻¹⁵³ bei verschiedenen Protein/Ca²⁺-Verhältnissen zeigen (1:0 rot, 1:10 cyan, 1:20 blau). Alle Abbildungen wurden freundlicherweise von Dr. Mitchell Maestre-Martínez zur Verfügung gestellt [98]. (Die Abbildungen A und B wurden modifiziert.)

einfachen, 2-, 5-, 10- und 20fachen Überschuss titriert, wobei für jedes Protein/Calcium-Verhältnis ein ¹H-NMR-Spektrum aufgenommen wurde. Dass eine Interaktion mit diesen Kationen im ¹H-NMR-Spektrum anhand der V95- und I96-Methylresonanzen beobachtet werden kann, liegt an deren räumlicher Nähe zu den aromatischen Ringen von F88 und Y122. Die hieraus resultierende Hochfeldverschiebung zu ca. 0 ppm führt zu gut separierten Methylsignalen. Das ebenfalls hochfeldverschobene Methylresonanzsignal von V66H_{γ2} zeigt in keiner der durchgeführten Messreihen Ca²⁺-induzierte Effekte, da V66 nicht unmittelbar zur Interaktionsstelle benachbart ist. In Tabelle 3.1 sind die Änderungen der chemischen Verschiebungswerte der untersuchten Methylresonanzen für alle FKBP38³⁵⁻¹⁵³-Mutanten zusammengestellt. Die Methylgruppen von V95 zeigen in den Spektren der Mutanten FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D94N und FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D92N/D94N jeweils ein zweites Signal (Abbildung 3.2), was auf eine Konformationsänderung aufgrund des mutierten Restes N94 hindeutet.

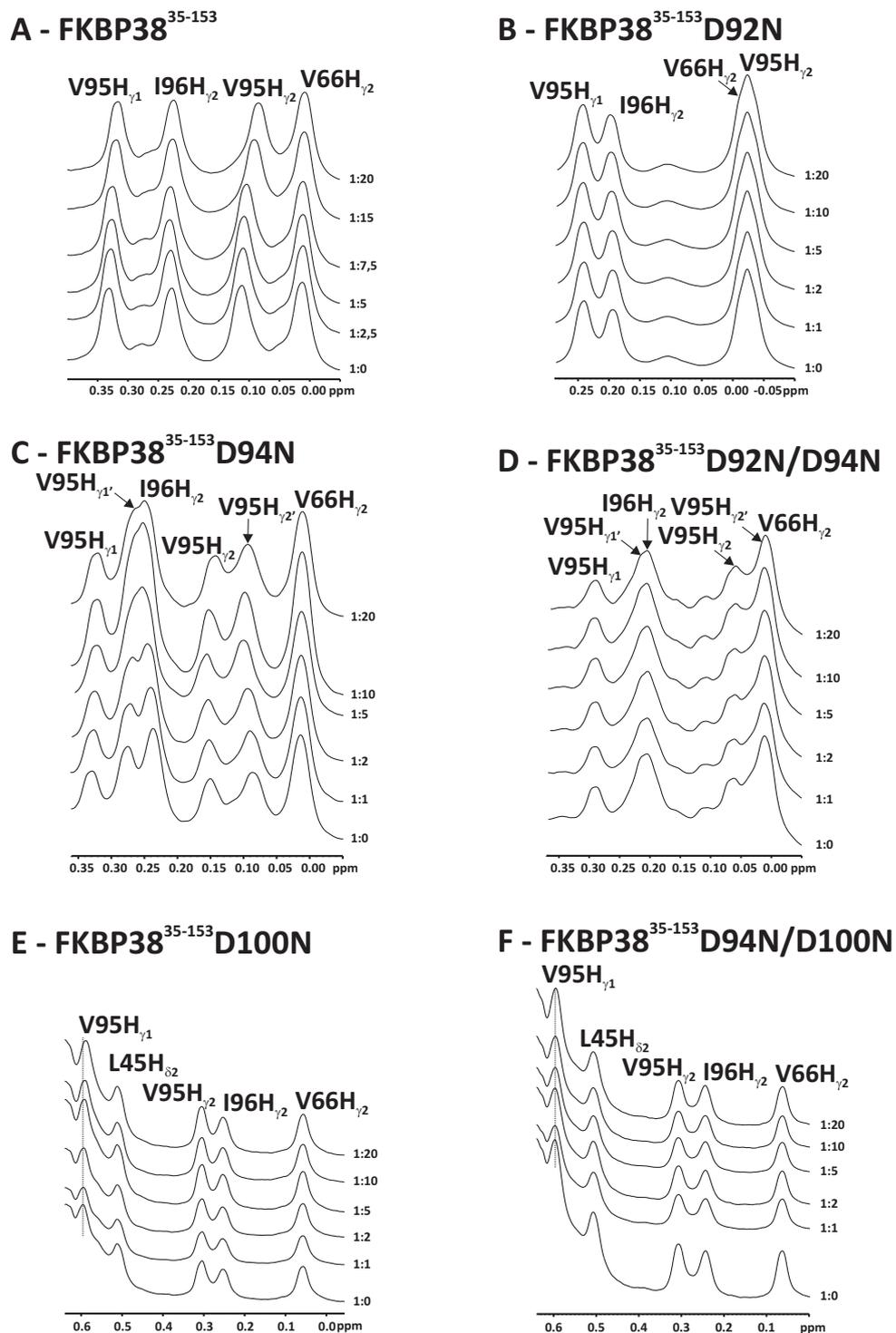


Abbildung 3.2.: ¹H-NMR-Spektren der Ca²⁺-Titrationen aller FKBP38³⁵⁻¹⁵³-Varianten mit (A, C, E) und ohne (B, D, F) chemischen Verschiebungseffekten. Zur Verdeutlichung der geringen Effekte bei FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D100N (E) im Vergleich zu FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D94N/D100N (F) ist jeweils eine gepunktete Linie bei der Methylresonanz V95H_{γ1} eingezeichnet. Abbildung A wurde freundlicherweise von Dr. Mitchell Maestre-Martínez zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3.1.: Zusammenstellung der chemischen Verschiebungsänderungen der V95- und I96-Methylresonanzen für jede FKBP38³⁵⁻¹⁵³-Variante nach Zugabe eines 20fachen Ca²⁺-Überschusses.

FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ -Variante	$\Delta\delta_{V95H_{\gamma 1}}$ / ppm	$\Delta\delta_{V95H_{\gamma 2}}$ / ppm	$\Delta\delta_{I96H_{\gamma 2}}$ / ppm
Wildtyp	0,018	0,039	0,006
D92N	0,000	0,001	0,002
D94N	0,007/0,011	0,006/0,008	0,013
D92N/D94N	0,001/0,002	0,001/0,002	0,001
D100N	0,006	0,001	0,001
D94N/D100N	0,002	0,001	0,001

Im Gegensatz zum FKBP38³⁵⁻¹⁵³-Wildtyp wies die Doppelmutante keine Titrationseffekte aufgrund der Calciumzugabe auf (Abbildung 3.2A und D), da die Methylsignale V95H _{γ 1}, V95H _{γ 2}, I96H _{γ 2} nicht signifikant verschoben wurden ($\Delta\delta \leq 0,002$ ppm), wie Tabelle 3.1 zu entnehmen ist. Die Interaktion mit Calcium wird demnach durch den Austausch beider Aspartate zu N92 und N94 komplett unterbunden. Um zu untersuchen, ob nur eines oder beide Aspartate für die Ca²⁺-Wechselwirkung verantwortlich sind, wurden zusätzlich die Einzelmutanten FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D92N und FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D94N generiert. Bei der Ca²⁺-Titration der FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D92N-Mutante gab es ebenfalls keine signifikanten chemischen Verschiebungseffekte ($\Delta\delta \leq 0,002$ ppm) in den ¹H-NMR-Spektren, im Gegensatz zur FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D94N-Mutante, die kleine Effekte ($\Delta\delta \approx 0,01$ ppm) zeigte (Abbildung 3.2B und C). Aspartat 92 ist somit als essentiell für die Interaktion mit Ca²⁺-Ionen zu betrachten, da bereits die Einzelmutante FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D92N keine Titrationseffekte in den ¹H-NMR-Spektren aufweist.

Die chemischen Verschiebungsänderungen in der FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D94N-Mutante deuten darauf hin, dass es neben D92 eventuell eine zu D94 alternative, zweite Koordinierungsstelle gibt. Hierbei könnte es sich um das benachbarte Aspartat 100 handeln (Abbildung 3.3). Um diese Theorie zu überprüfen, wurden die Mutanten FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D94N/D100N und FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D100N generiert und mit den gleichen Experimenten untersucht. Die Ca²⁺-Titration verursachte keine signifikanten chemischen Verschiebungen bei der Doppelmutante ($\Delta\delta \leq 0,002$ ppm), was darauf hindeutet, dass alle mit D92 möglichen Ca²⁺-Koordinierungskombinationen zu D92 ausgeschaltet worden sind. Bei der FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D100N-Mutante hingegen gab es Ca²⁺-induzierte Effekte, die jedoch kleiner als beim Wildtyp-Protein waren (Tabelle 3.1, Abbildung 3.2E und F). Dies deutet auf eine abgeschwächte Interaktion mit Calcium hin. Die Ursache hierfür kann in der Veränderung der Oberflächenladung in dieser Proteinregion und somit einer möglichen Umlagerung von proteininternen Wasserstoffbrückenbindungen oder Salzbrücken liegen, die nun die Ca²⁺-Koordination im β 5- α 1-Loop stören könnten.

Ein potentieller Kandidat, der die Ca²⁺-Interaktion derart beeinflussen könnte, ist Lysin 62. In den 20 Konformeren des FKBP38³⁵⁻¹⁵³-NMR-Strukturensembles von FKBP38³⁵⁻¹⁵³ (PDB ID 2F2D) bildet K62 elfmal eine Salzbrücke mit D92 und viermal mit D100 [28].

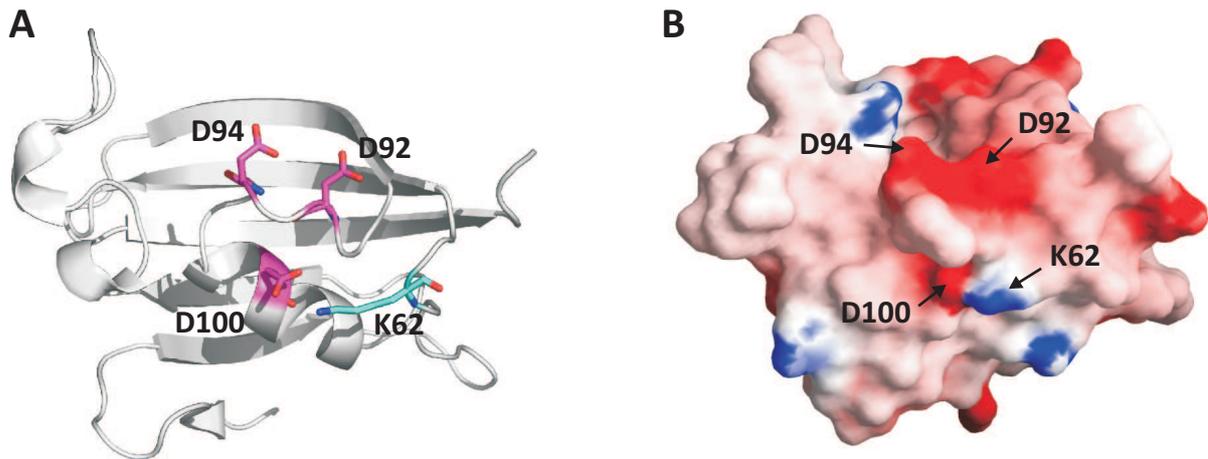


Abbildung 3.3.: (A) Cartoondarstellung von FKBP38³⁵⁻¹⁵³ (PDB ID 2F2D, Modell Nr. 7), in der die Reste K62, D92, D94 und D100 hervorgehoben sind. (B) Potentialoberfläche von FKBP38³⁵⁻¹⁵³ in der gleichen Orientierung. K62 und D100 bilden eine Salzbrücke in der durch die Aspartate überwiegend negativ geladenen Region des β 5- α 1-Loops.

Durch Zugabe von Ca^{2+} -Ionen zum Wildtyp-Protein und dessen Interaktion mit D92 wird die positive Ladung des K62 aufgrund der Bildung einer Salzbrücke mit D100 ausgeglichen. Abbildung 3.3 zeigt eine solche räumliche Anordnung der Reste D92, D94, D100 und K62, wobei die beiden letzteren eine Salzbrücke bilden. Die Darstellung der Potentialoberfläche des Proteins verdeutlicht zudem, dass keine anderen geladenen Reste in dieser Region vorhanden sind, mit denen K62 in dieser Weise interagieren könnte.

Somit ließe sich auch erklären, warum die Mutante FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D100N eine kleinere chemische Verschiebungsänderung bei der Ca^{2+} -Zugabe als der Wildtyp aufweist. Durch die Substitution der negativen Ladung von D100 bildet K62 wahrscheinlich mit D92 eine Salzbrücke. D92 kann somit entweder die Salzbrücke zu K62 ausbilden, oder mit D94 zusammen ein Ca^{2+} -Ion koordinieren. Beides gleichzeitig ist nicht möglich. Analog können somit die schwachen Titrationseffekte der Mutante FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D94N erklärt werden. In diesem Fall können die Reste der Ca^{2+} -Interaktionsstelle, d. h. D92 und D100, individuell auch Salzbrücken mit K62 ausbilden. Eine Zusammenstellung der möglichen Ca^{2+} -Koordinierung und der an einer potentiellen Salzbrücke beteiligten Reste ist für jede FKBP38³⁵⁻¹⁵³-Variante in Tabelle 3.2 dargestellt.

Diese Experimente haben somit gezeigt, dass im FKBP38³⁵⁻¹⁵³-Wildtyp die beiden Aspartate D92 und D94 die Ca^{2+} -Interaktion am Loop gemeinsam vermitteln. Dabei ist die zentrale Rolle von D92 hervorzuheben.

Tabelle 3.2.: Übersicht über die Ca^{2+} -Koordination und potentielle Salzbrücken bei den einzelnen FKBP38³⁵⁻¹⁵³-Varianten.

FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ -Variante	Ca^{2+} -Titration	Ca^{2+} -Koordination	Salzbrücke mit K62
Wildtyp	ja	D92 – D94	D100
D92N	nein	–	D100
D94N	ja, schwach	D92 – D100	D92, D100
D92N/D94N	nein	–	D100
D100N	ja, schwach	D92 – D94	D92
D94N/D100N	nein	–	D92

3.1.1.2. Interaktion mit den diamagnetischen Metallionen K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} und La^{3+}

Die initialen Titrationsversuche mit der FKBP38-Domäne und Magnesium bzw. Calcium ([113], Abbildung 3.1) ließen aufgrund der unterschiedlich großen chemischen Verschiebungseffekte vermuten, dass Ca^{2+} -Ionen eine höhere Affinität zu FKBP38³⁵⁻¹⁵³ haben als Mg^{2+} -Ionen. Um diesen Effekt und den Einfluss von Ionengröße und -ladung auf die elektrostatische Interaktion am $\beta 5$ - $\alpha 1$ -Loop näher zu untersuchen, wurden Titrationsversuche verschiedener Kationen mit ¹⁵N-markiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³ durchgeführt. Ausgewählt wurden die biologisch relevanten Ionen K^+ , Mg^{2+} und Ca^{2+} sowie das dreiwertige La^{3+} , welches, im Gegensatz zu Fe^{3+} oder Al^{3+} , bei den gewählten Pufferbedingungen und Konzentrationen gut löslich ist. ¹⁵N-markiertes FKBP38³⁵⁻¹⁵³ wurde mit allen Kationen bis zu einem für die Auswertung brauchbaren Kation/Protein-Verhältnis titriert. Sämtliche Titrations- und Konzentrationsangaben für das Protein und seine metallischen Liganden sind in Tabelle 2.3 auf Seite 26 zu finden.

Als Maß der Bindungsaffinität und deren Abhängigkeit von Ionengröße und -ladung wurde die Bindekonstante (K_d) der Interaktion zwischen ¹⁵N-markiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³ und den genannten Kationen ermittelt (Unterabschnitt 2.4.2.2). Hierzu wurde mithilfe der Änderungen der chemischen Verschiebungswerte ein K_d für jeden betroffenen Rest im Protein berechnet und arithmetisch gemittelt ($\overline{K_d}$) [108]. Zu den betroffenen Resten zählen L90, D92, C93, D94, V95 und I96, die in allen vier Titrationsversuchen die stärksten chemischen Verschiebungseffekte aufwiesen. G91 wurde in diese Auswertung nicht mit einbezogen, da es unter den Aufnahmebedingungen kein Signal im ¹H/¹⁵N-HSQC-Spektrum sondern nur im 1D-¹H-NMR-Spektrum zeigte. Abbildung 3.4 stellt die Änderungen der chemischen Verschiebungswerte für die einzelnen Proteinreste beim jeweils letzten Titrationsschritt der Kalium- und Lanthantitration dar, als die Sättigung durch den Liganden nahezu erreicht war. Trotz unterschiedlich großer chemischer Verschiebungseffekte beim Vergleich der Kation/Protein-Wechselwirkungen wird deutlich, dass analog zur Ca^{2+} -Titration (Abbildung 3.1) jeweils die Reste im $\beta 5$ - $\alpha 1$ -Loop am stärksten betroffen sind.

Interessanterweise zeigen bei der Lanthantitration auch der Rest K62 und das benachbarte Y61 jeweils einen deutlichen Verschiebungseffekt (Abbildung 3.4). Dieser ist in abgeschwächter Form auch bei der Calciumtitration zu beobachten [98]. Eine Umlagerung von intramolekularen Wechselwirkungen könnte hierfür die Ursache sein. Die Salzbrücke zwischen K62 und D92, welche in der NMR-Struktur (PBD ID 2F2D) vorrangig auftritt, wird durch die Metallionen-Titration gestört, da D92 nun zusammen mit D94 eines der Ionen koordiniert. Optional kann nun D100 bevorzugt eine Salzbrücke mit K62 ausbilden, wodurch die Verschiebungseffekte bei Y61 und K62 hervorgerufen werden. Letztere Effekte sind umso größer, je fester die Bindung zwischen Metallion und Protein bzw. je kleiner die jeweilige Bindekonstante ist (Tabelle 3.3).

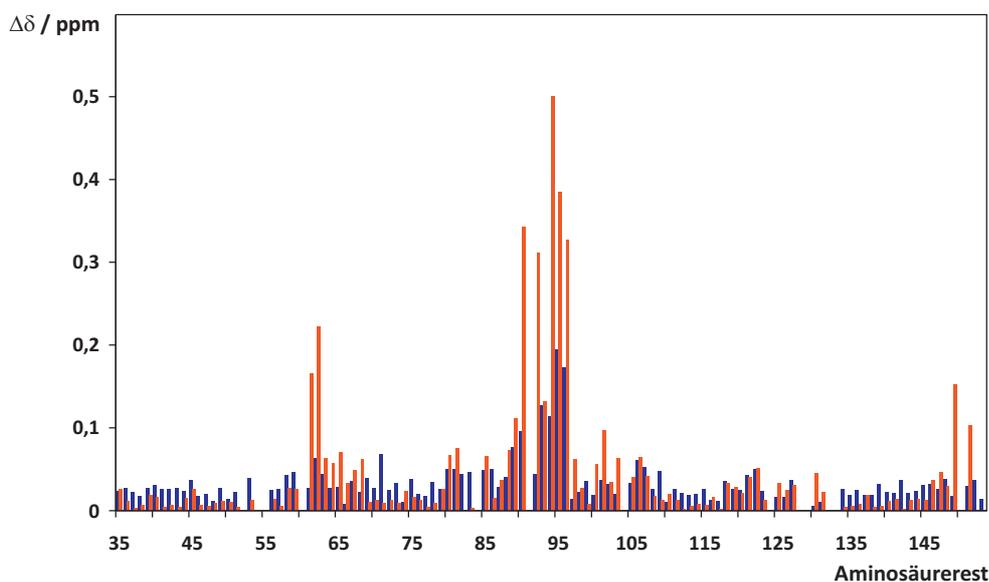


Abbildung 3.4.: Darstellung der Änderungen der chemischen Verschiebungswerte in ^{15}N -markiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³ nach dem letzten Titrationsschritt, als eine Sättigung durch die Zugabe von Kalium (blaue Balken, Protein/Kalium-Verhältnis: 1 zu 240) bzw. Lanthan (orangefarbene Balken, Protein/Lanthan-Verhältnis: 1 zu 9) nahezu erreicht war.

Die Titrationskurven der Reste L90 und D92 bis I96 sind für jedes Metallion in den Abbildungen 3.5 und 3.6 zu sehen. Beim Vergleich der einzelnen Diagramme in Abbildung 3.5 ist anzumerken, dass zum Erreichen der Sättigung abhängig vom Metallion deutlich unterschiedliche Kation/Protein-Verhältnisse erforderlich sind. Diese nehmen in folgender Reihenfolge der ionischen Liganden zu: La^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} . Dabei liegt die maximale Änderung der chemischen Verschiebung ($\Delta\delta_{\text{max}}$) bei der Lanthantitration vor. Etwa um die Hälfte kleiner ist $\Delta\delta_{\text{max}}$ bei den Magnesium- und Calciumtitrationen, die sich untereinander relativ ähnlich sind. Jedoch tritt eine Sättigung durch Calciumionen bei einem kleineren Kationen/Protein-Verhältnis ein als durch Magnesiumionen. Dies wird zudem in Abbildung 3.6 deutlich, da der Anstieg der Sättigungskurven der einzelnen Reste im Falle der Calciumtitration steiler ist. Bei der Titration mit K^{+} -Ionen tritt hingegen trotz des sehr hohen Ionenüberschusses keine deutliche Sättigung ein. Zudem ist $\Delta\delta_{\text{max}}$ im Vergleich zu den anderen Kationtitrationen sehr klein.

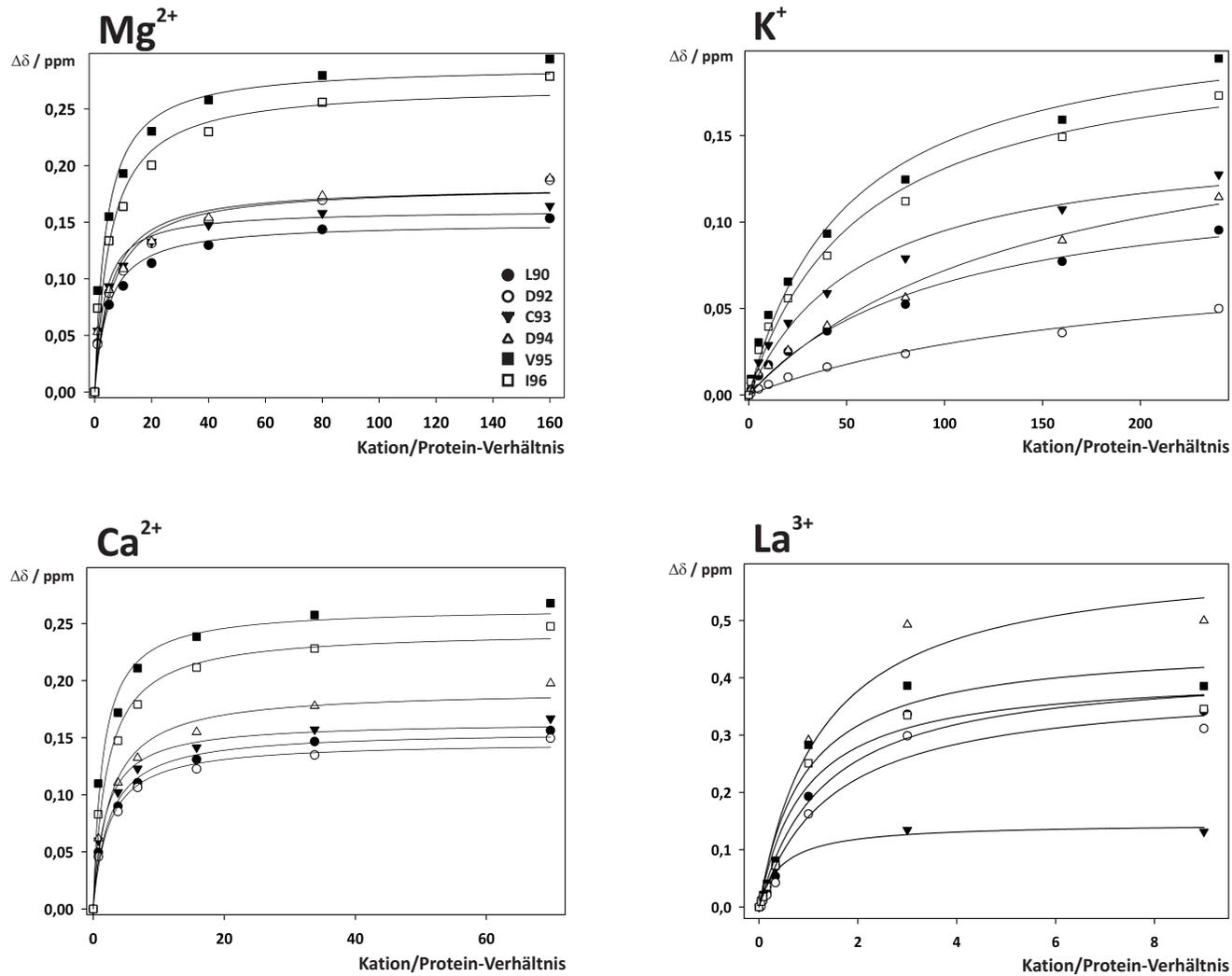


Abbildung 3.5.: Titrationskurven für die Reste L90, D92, C93, D94, V95 und I96 von ¹⁵N-markiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³. Dargestellt sind die Änderungen der chemischen Verschiebungswerte, die durch die Zugabe der Kationen Mg²⁺, K⁺, Ca²⁺ bzw. La³⁺ bei den angegebenen Kation/Protein-Verhältnissen erreicht wurden.

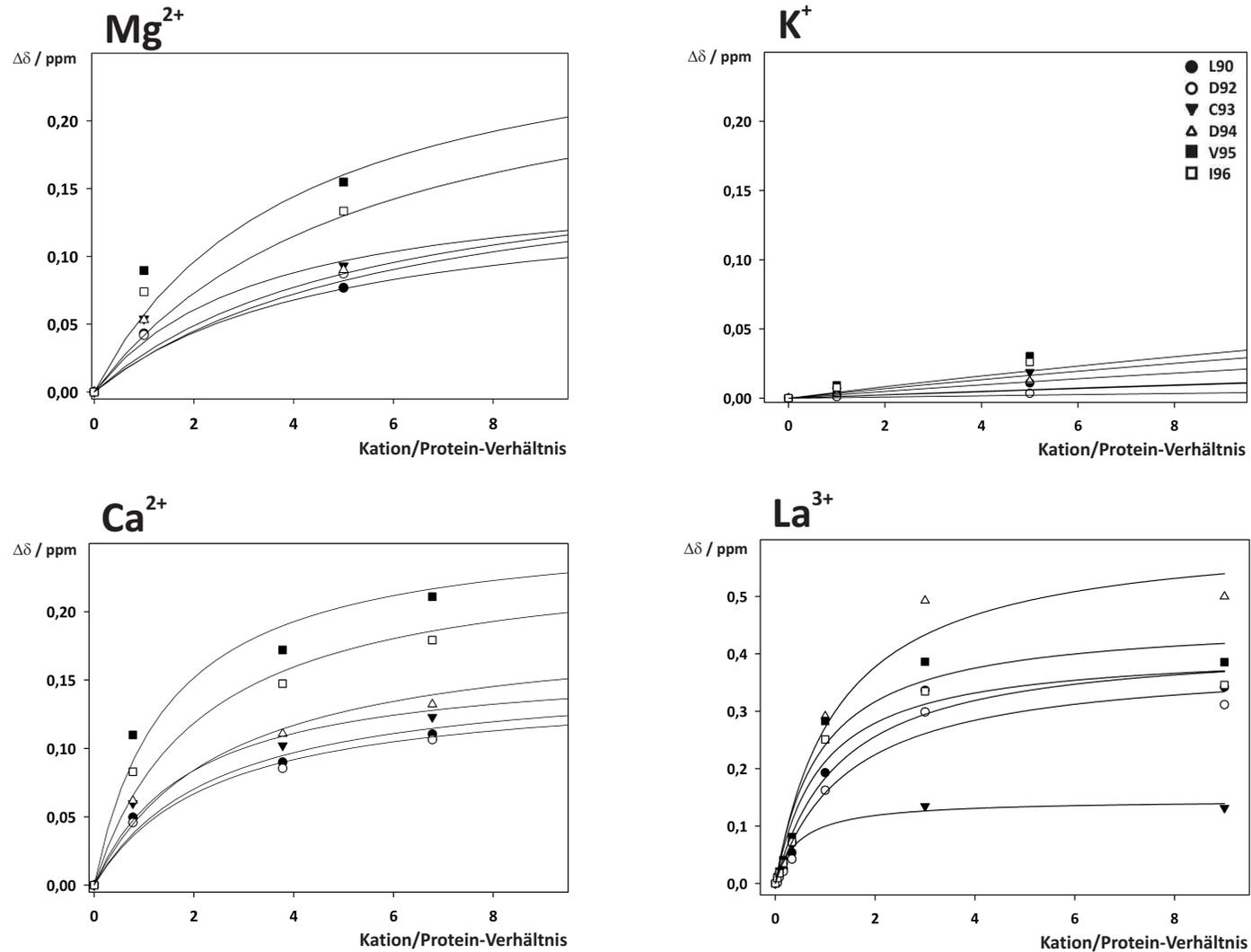


Abbildung 3.6.: Vergrößerungen der Titrationskurven aus Abbildung 3.5 für die Reste L90, D92, C93, D94, V95 und I96 von ¹⁵N-markiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³. Um die Ergebnisse optisch besser vergleichen zu können, ist hier die gleiche Einteilung der x- und y-Achsen gewählt (mit Ausnahme einer größeren Skalierung der y-Achse in der Lanthantitrationsgrafik).

Für die Reste im $\beta 5\text{-}\alpha 1$ -Loop ist der Kurvenverlauf, in Bezug auf den Anstieg, innerhalb der Titrationsreihen unterschiedlich. Somit ergab die Berechnung der Bindekonstante K_d unterschiedliche Werte für die einzelnen Reste. Ein Grund dafür liegt möglicherweise in verschiedenen Einflüssen, welche die Amidgruppen der betroffenen Reste während der Interaktion erfahren. Dazu können u. a. die elektrostatische Wechselwirkung der Kationen mit den Carboxylatgruppen der Aspartate 92 und 94 als auch eine hierdurch möglicherweise verursachte Konformationsänderung im Loop zählen.

Die Bindekonstante ($\overline{K_d}$) der Wechselwirkung mit dem einfach geladenen Kaliumion beträgt 100,5 mM und reflektiert die sehr schwache Interaktion mit FKBP38³⁵⁻¹⁵³. Die Titration mit zweifach geladenen Ionen führte zu deutlich kleineren Bindekonstanten: 1,96 mM für Magnesium und 0,66 mM für Calcium. Die fast dreifach kleinere Konstante der Calciuminteraktion gegenüber Magnesium beruht vermutlich auf dem größeren Ionenradius (Tabelle 3.3), der den Raum zwischen den beiden Aspartatseitenketten besser ausfüllt. Bei dem ähnlich großen Ionenradius des dreifach geladenen Lanthanions wurde ein $\overline{K_d}$ von 0,35 mM bestimmt, welcher deutlich kleiner ist als der des zweifach geladenen Calciumions. Die elektrostatische Interaktion am $\beta 5\text{-}\alpha 1$ -Loop des FKBP38³⁵⁻¹⁵³ wird somit durch die Größe und Ladung des kationischen Liganden beeinflusst. Dabei hat Ca^{2+} die größte Affinität der physiologisch relevanten Kationen zu FKBP38³⁵⁻¹⁵³.

Tabelle 3.3.: Gegenüberstellung von Ionengröße und $\overline{K_d}$ der zur Titration mit ¹⁵N-markiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³ eingesetzten Metallionen.

Kation	Ionenradius / pm	$\overline{K_d}$ / mM
K^+	138	100,5
Mg^{2+}	72	1,96
Ca^{2+}	100	0,66
La^{3+}	103	0,35

Zum ersten Mal konnte eine Interaktion von Kationen mit der katalytischen Domäne einer PPIase nachgewiesen werden. Diese wird von den Aspartaten 92 und 94 vermittelt, die generell in FKBP38-Homologen stark konserviert sind [113], was nahelegt, dass sie eine essentielle Rolle für die Funktion des Proteins haben. Von allen weiteren FKBP-Domänen, mit Ausnahme der zweiten PPIase-Domäne des FKBP51, ist ein solches Sequenzmotiv nicht bekannt.

Es wurden bisher verschiedene Interaktionspartner des FKBP38 identifiziert (siehe Unterabschnitt 1.2.3), von denen jedoch nur wenig oder gar nichts bezüglich der strukturellen Gegebenheiten der Protein-Protein-Wechselwirkung bekannt ist. Der gegenüber positiven Ladungen empfindliche $\beta 5\text{-}\alpha 1$ -Loop ist als potentielle Interaktionsfläche des Proteins anzusehen, wobei die Aspartate 92 und 94 als »Hot Spots« eine entscheidende Funktion zur Vermittlung der Spezifität einer Bindung haben könnten. Eine weitere mögliche Funktion des negativ geladenen $\beta 5\text{-}\alpha 1$ -Loops, der direkt neben dem Eingang zum aktiven Zentrum liegt (Abbildung 3.7), ist somit die Kontrolle über die Bindung von Substraten sowie Inhibitoren.

N-terminal zur katalytischen Domäne befindet sich eine glutamatreiche Region (Abbildung 1.5 auf Seite 9). Solche Regionen sind dafür bekannt, dass sie Calcium mit geringer Affinität (K_d ca. 10 mM) aber hoher Kapazität binden können [114]. Für die glutamatreiche Region von FKBP38 konnte auch eine Affinität zu Calcium in gleicher Größenordnung (2 bis 20 mM) nachgewiesen werden [113]. Da diese Region (FKBP38¹⁻³⁴) zudem sehr flexibel und ungefaltet ist [115, 116], könnte sie auch zusammen mit dem $\beta 5$ - $\alpha 1$ -Loop an einer Interaktion mit Calcium beteiligt sein.

3.1.1.3. Koordinierung eines Metallions am $\beta 5$ - $\alpha 1$ -Loop

Um die Position des Calciumions am $\beta 5$ - $\alpha 1$ -Loop zu ermitteln, wurde FKBP38³⁵⁻¹⁵³ in Calcium-haltigem Puffer kristallisiert und die Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse untersucht (PDB ID 3EY6) [113]. Diese Cokristallisation mit Ca^{2+} -Ionen funktionierte jedoch nicht. Stattdessen koordinierte ein positiv geladenes Arginin eines benachbarten Proteinmoleküls die beiden Aspartate D92 und D94 des $\beta 5$ - $\alpha 1$ -Loops. Um dennoch die Position von Calcium- bzw. anderen Metallionen relativ zum Loop zu ermitteln, wurde die Bindung des Terbiumions als Modellsystem für andere Kationen analysiert. Terbium gehört zu den Lanthanoiden, deren Kationen, mit Ausnahme von Lanthan, mindestens ein ungepaartes Elektron im f-Orbital besitzen, welches paramagnetische Effekte verursacht. Hierzu zählen PCS-¹ und PRE-Effekte².

Es wurden $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von ^{15}N -markiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³ bei verschiedenen Terbium- bzw. Lanthankonzentrationen aufgenommen und für jeden Titrationspunkt die Lage des Ions aufgrund der PCS berechnet. Das präziseste Ergebnis, welches hier näher diskutiert werden soll, lieferten die Daten des 1:1-Komplexes. Eine qualitative Analyse der Messungen erfolgte anhand der Linienverbreiterungen der Proteinrückgratsignale aufgrund des PRE-Effekts.

Bereits durch den ersten Titrationschritt, bei dem das Terbium im 50fachen Unterschuss zugegeben wurde, waren die Signale der Reste T89, D92, D94 und V95 aufgrund des PRE-Effekts so stark verbreitert, dass sie im Spektrum nicht mehr zu beobachten waren. Um die Linienverbreiterung der einzelnen Reste spezifischer zu beobachten, wurden Titrationsen durchgeführt, in denen das Terbium in noch größerem Unterschuss (400fach) vorlag bzw. Cer als Ligand eingesetzt wurde. Cer ist ein weiteres paramagnetisches Lanthanoid mit bedeutend kleinerem PRE-Effekt auf NMR-aktive Kerne. Diese Experimente erbrachten jedoch nicht die gewünschten Informationen. Im weiteren Verlauf der Terbiumtitration breitete sich der PRE-Effekt sphärisch um das Terbiumion aus. In Tabelle 3.4 sind diejenigen Reste notiert, deren Signale bei dem jeweiligen Protein/Terbium-Verhältnis nicht

¹»Scheinkontaktverschiebungen« (engl.: Pseudocontact shifts) entstehen durch die Kopplung eines Kerns mit ungepaarten Elektronen und verursachen eine Änderung der chemischen Verschiebung der Kernresonanz.

²Die »Erhöhung der paramagnetischen Relaxation« (engl.: Paramagnetic relaxation enhancement) führt zu einer Linienverbreiterung der Signale der betroffenen Kerne.

mehr zu detektieren waren. In Abbildung 3.7 ist der berechnete FKBP38³⁵⁻¹⁵³/Terbium-Komplex dargestellt.

Tabelle 3.4.: Übersicht über die FKBP38³⁵⁻¹⁵³-Reste, welche bei den angegebenen Protein/Terbium-Verhältnissen in den ¹H/¹⁵N-HSQC-Spektren aufgrund extremer Linienverbreiterung durch den PRE-Effekt nicht mehr detektierbar waren. Zusätzlich ist die Farbe, in der die jeweiligen Reste in Abbildung 3.7 dargestellt sind, angegeben.

Verhältnis	Farbe	Reste
50:1	dunkles Rot	T89, G91 ^a , D92, D94, V95
25:1	Rot	K62, G63, V66, F88, C93, G149, D151, L152, E153
12,5:1	dunkles Orange	V65, T67, V68, T78, V87, L90, I96, V147
6,25:1	Orange	V61, Q64, H69, L70, E85, L86, D100, L101, T145, A146
3:1	helles Orange	E35, Q71, T72, E83, Q97, Y122, E140, T142, K144, D148
1:1	helles Gelb	L37, I39, L40, G43, L45, R46, K47, K48, L50, V51, G53, G56, S58, R59, S73, E75, V80, Q81, E82, A98, L99, S102, V103, L105, M106, D107, V108, G109, T111, A112, M113, V114, T115, A116, D117, Y120, G123, R127, I131, L137, C138, L139, V141

^aDas H_N-Hauptkettensignal von G91 ist nicht im ¹H/¹⁵N-HSQC-Spektrum, jedoch gut separiert im ¹H-NMR-Spektrum sichtbar, wo es nach dem ersten Titrationsschritt nicht mehr detektierbar war.

Das Terbiumion befindet sich über dem β5-α1-Loop in unmittelbarer Nähe der Reste D92, D94 sowie T89 und V95. Die kürzesten Abstände zwischen dem Ion und den Carboxylatsauerstoffatomen des Aspartats 92 sind typisch für eine Salzbrücke (3,2 Å und 3,5 Å). Die Abstände zwischen Ion und den Carboxylatsauerstoffatomen von D94 sind deutlich größer (6,2 Å und 7,3 Å) und ähnlich denen zu T89 (5,9 Å zum Seitenkettensauerstoff; 6,6 Å zum Hauptkettensauerstoff). Es ist jedoch nicht davon auszugehen, dass T89 eine weitere Koordinationsstelle darstellt, da es in den Metalltitrationen keine signifikanten chemischen Verschiebungsänderungen zeigte. Zudem wurde eine mögliche Konformationsänderung durch die Kationeninteraktion bei der Berechnung der Lage des Terbiumions nicht berücksichtigt. Dies könnte die unterschiedlichen Abstände des Ions zu den Aspartatseitenketten von D92 und D94 erklären, welche wahrscheinlich in Anlehnung an die Experimente aus Unterabschnitt 3.1.1.1 das Ion koordinieren.

3.1.2. Die Protein-Peptid-Interaktion zwischen FKBP38³⁵⁻¹⁵³ und dem Peptid Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹

Die Interaktion zwischen dem antiapoptotischen Protein Bcl-2 und seinem Regulator FKBP38 wird in der Literatur ausführlich diskutiert (siehe Unterabschnitt 1.2.3). Edlich *et al.* berichteten u. a. eine CaM-Abhängigkeit dieser Wechselwirkung [29]. Um potentielle Interaktionsstellen zu identifizieren, wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Dr. Arndt

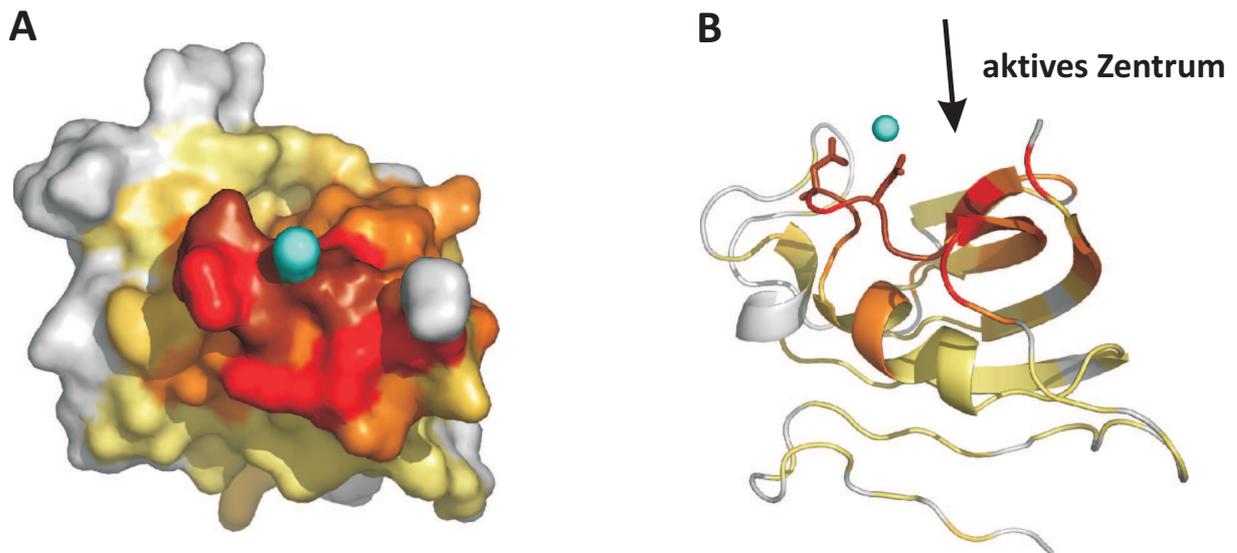


Abbildung 3.7.: Darstellung des berechneten FKBP38³⁵⁻¹⁵³/Terbium-Komplexes. Das Terbiumion ist in Cyan dargestellt; die Reste jener Signale, die eine Linienverbreiterung aufweisen, sind in einem dunklen Rot bis hin zu einem hellen Gelb dargestellt (je nachdem bei welchem Titrationschritt die Reste nicht mehr detektierbar waren, siehe Tabelle 3.4). Die in Weiß dargestellten Reste waren bis zum letzten Titrationschritt im Spektrum sichtbar oder generell nicht auswertbar, wie z. B. Proline. **(A)** Oberflächendarstellung des Komplexes. Zu erkennen ist, wie sich der PRE-Effekt sphärisch um das paramagnetische Ion ausbreitet. **(B)** Cartoondarstellung des Komplexes unter Berücksichtigung der Aspartate 92 und 94. Der β 5- α 1-Loop befindet sich direkt neben dem Eingang zum aktiven Zentrum, der durch einen Pfeil angedeutet ist.

Pechstein eine Bcl-2-Peptidbibliothek generiert. Die an einer Membran gebundenen Bcl-2-Peptide wurden auf die Ca^{2+} -CaM-abhängige Bindung von FKBP38-Volllängenprotein getestet [117]. Für jene Peptide, die potentielle Epitope repräsentierten, wurde desweiteren die Spezifität ihrer Bindung an FKBP38 geprüft. Letztendlich konnte das Peptid Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹ als Ca^{2+} -CaM-abhängig und spezifisch an das FKBP38-Volllängenprotein bindend identifiziert werden. Seine Interaktion mit der katalytischen Domäne von FKBP38 wird im Folgenden näher charakterisiert.

3.1.2.1. Strukturelle Charakterisierung des Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹-Peptids

Basierend auf der Resonanzzuordnung des Peptids, welche im Anhang (Tabelle B.2 auf Seite xv) zu finden ist, wurde zur Beschreibung seiner Sekundärstruktur für die H_{α} -, C_{α} - und C_{β} -Atome der Index der chemischen Verschiebung (CSI) bestimmt. Ist eine Aminosäure in ein bestimmtes Sekundärstrukturelement eingebunden, so liegen die Resonanzfrequenzen ihrer Atome, wie z. B. H_{α} -, C_{α} und C_{β} , in einem charakteristischen Bereich [110, 118]. Zu einer α -Helix oder einem β -Faltblattstrang gehörend gilt eine Aminosäure, wenn sie in einer Sequenz von mindestens drei aufeinanderfolgenden Resten liegt, die den gleichen Index (-1 oder +1) aufweist [110]. Ist der CSI-Wert »0« oder in weniger als drei

aufeinander folgenden Resten gleich, liegt eine Zufallsknäuelstruktur vor. Die berechneten CSI-Werte der H_{α} -, C_{α} - und C_{β} -Resonanzen des Peptids Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹ sind in Tabelle 3.5 zu finden. Sie weisen eindeutig darauf hin, dass das freie Peptid in wässriger Lösung keine definierte Struktur hat.

Tabelle 3.5.: CSI-Werte der H_{α} -, C_{α} - und C_{β} -Resonanzen von Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹ und ihre Zuordnung zu Sekundärstrukturelementen. Die Abkürzungen stehen für Zufallsknäuel- (c), α -Helix- (α) und β -Faltblattstruktur (β).

Rest	H_{α}	C_{α}	C_{β}
L119	0 c	0 c	0 c
H120	0 c	0 c	0 c
L121	+1 β	-1 β	0 c
T122	+1 β	-1 β	+1 β
P123	0 c	0 c	0 c
F124	0 c	0 c	0 c
T125	-1 α	+1 α	+1 β
A126	0 c	0 c	0 c
R127	0 c	0 c	0 c
G128	0 c	0 c	0 c
R129	-1 α	0 c	0 c
F130	0 c	0 c	0 c
A131	0 c	0 c	0 c

3.1.2.2. Das Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹-Peptid interagiert mit dem ladungssensitiven β 5- α 1-Loop

Die initialen Versuche mit dem Bcl-2-Peptid dienten der Überprüfung, ob die katalytische Domäne von FKBP38 an das gefundene Epitop aus der Peptidbibliothek bindet. Hierzu wurden zwei Experimentreihen durchgeführt, wobei zusätzlich der Einfluss von apo-CaM und holo-CaM untersucht werden sollte (siehe Unterabschnitt 2.4.3.1 auf Seite 29).

Die Titrationsunterschieden sich in der Reihenfolge der Zugabe von Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹ (PepRR) und apo-CaM zu ¹⁵N-markiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³. Als finaler Titrationschritt wurde jeweils ¹⁵N-markiertes FKBP38³⁵⁻¹⁵³ in Gegenwart von PepRR und holo-CaM gemessen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der ersten Titrationsreihe vorgestellt und mit der zweiten verglichen. Wenn Änderungen der chemischen Verschiebungswerte angegeben sind, beziehen sie sich auf den bei allen Resten im β 5- α 1-Loop beobachteten Maximalwert. Die Zugabe von PepRR zu ¹⁵N-markiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³ (erster Titrationschritt) führte im ¹H/¹⁵N-HSQC-Spektrum zu einer Änderung der chemischen Verschiebungswerte am β 5- α 1-Loop von bis zu 0,21 ppm. Durch Hinzufügen von apo-CaM (zweiter Titrationschritt) wurde dieser Verschiebungseffekt abgeschwächt, so dass $\Delta\delta_{\max}$ im Vergleich zum Ausgangsspektrum nur noch 0,04 ppm betrug (Abbildung 3.8). Dieses Ergebnis korreliert

mit der Änderung der chemischen Verschiebungswerte der zweiten Titration nach der Zugabe von apo-CaM und PepRR ($\Delta\delta_{\max} = 0,06$ ppm). Das Generieren von holo-CaM aufgrund einer Ca^{2+} -Zugabe erzeugte in beiden Titrations ähnlich große $\Delta\delta$ -Effekte wie nach der alleinigen Zugabe von PepRR. Die Betrachtung der Signalpositionen im $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum für die einzelnen Reste des $\beta 5$ - $\alpha 1$ -Loops verdeutlicht dies und ist exemplarisch in Abbildung 3.9 anhand des Amidsignals von C93 dargestellt.

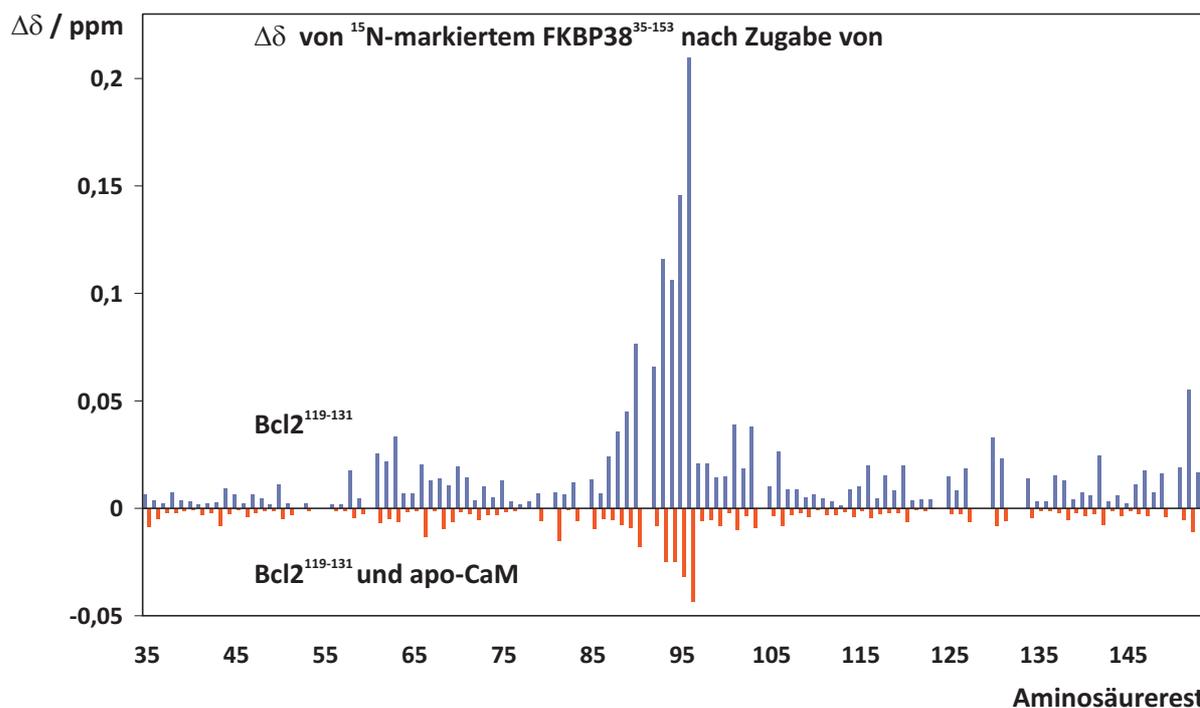


Abbildung 3.8.: Vergleichende Darstellung der Änderungen der chemischen Verschiebungswerte ($\Delta\delta$) in ^{15}N -markiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³ nach Zugabe eines dreifachen Überschusses von Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹ (blaue Balken) sowie der nachfolgenden Zugabe eines zweifachen Überschusses an apo-CaM (orangefarbene Balken), jeweils im Vergleich zum unkomplexierten Protein. Deutliche Änderungen von $\Delta\delta$ treten hauptsächlich im Bereich des $\beta 5$ - $\alpha 1$ -Loops auf. Sie sind deutlich stärker, wenn das Peptid ohne CaM zugegeben wird.

Die deutlichen Verschiebungseffekte, welche die Zugabe von PepRR erzeugt, werden durch apo-CaM abgeschwächt. Dieses Ergebnis ist durch eine Komplexbildung des PepRR mit apo-CaM erklärbar, wodurch die Interaktion des Peptids mit FKBP38³⁵⁻¹⁵³ verhindert wird. Apo-CaM, welches an der Oberfläche seiner beiden Domänen mehrere negativ geladene Reste für die Calciumbindung besitzt [119], scheint mit den Argininen im PepRR elektrostatisch zu interagieren. Diese Vermutung wird durch die Tatsache bestärkt, dass das Peptid, welches durch das nach der entsprechenden Ca^{2+} -Zugabe entstandene holo-CaM wahrscheinlich nicht mehr komplexiert wird, für die Interaktion mit FKBP38³⁵⁻¹⁵³ wieder zur Verfügung steht. Deshalb treten in Gegenwart von holo-CaM erneut ähnlich große Effekte am $\beta 5$ - $\alpha 1$ -Loop auf wie nach der alleinigen Zugabe des Peptids. Die essentielle Rolle des CaM als Co-Faktor für die Interaktion von FKBP38³⁵⁻¹⁵³ mit Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹

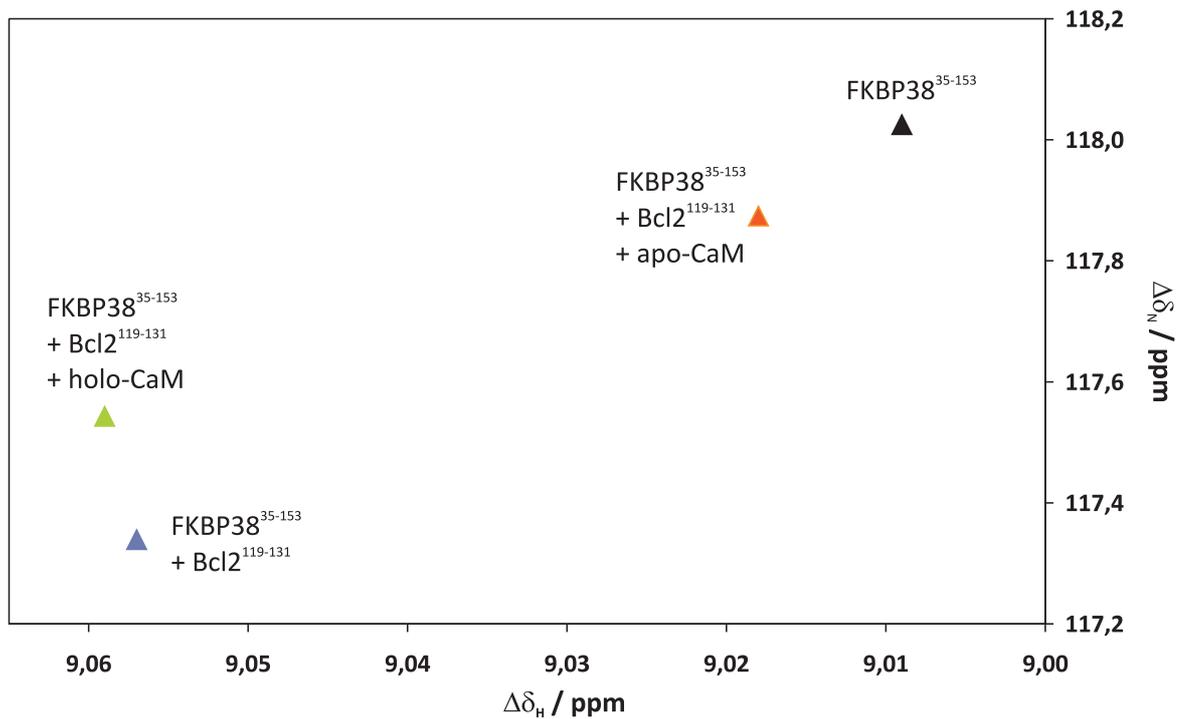


Abbildung 3.9.: Die Lage des C93-Amidsignals im $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von FKBP38³⁵⁻¹⁵³ nach schrittweiser Zugabe von Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹, apo-CaM sowie Calcium (zur Generierung von holo-CaM). Durch die Zugabe von Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹ kommt es zu einer deutlichen Verschiebung des Signals, welches nach der apo-CaM-Zugabe signifikant abnimmt und durch die Zugabe von Calcium näherungsweise wiederhergestellt wird.

konnten diese Experimente daher nicht bestätigen. CaM verhindert unter Umständen sogar diese Wechselwirkung, da es in seiner apo-Form selbst mit dem Peptid interagiert. Ein Grund für dieses im Vergleich zu den Experimenten mit der Bcl-2-Peptidbibliothek widersprüchliche Ergebnis, kann das Verwenden unterschiedlicher FKBP38-Konstrukte sein. Zudem waren die Peptide der Bibliothek C-terminal an eine Matrix gebunden und nicht, wie in den NMR-Proben, uneingeschränkt zugänglich und beweglich.

3.1.2.3. Die Interaktion basiert auf einer elektrostatischen Wechselwirkung

Da das Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹-Peptid mit dem ladungssensitiven $\beta 5$ - $\alpha 1$ -Loop von FKBP38³⁵⁻¹⁵³ interagiert, lag die Vermutung nahe, dass eine oder beide der positiv geladenen Seitenketten von R127 und R129 für diese Wechselwirkung mit verantwortlich sein könnten. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden drei weitere Peptide synthetisiert, in denen eines bzw. beide Arginine durch Glutamin ersetzt wurden. Die Substitution mit Glutamin wurde trotz seiner kleineren Seitenkette gewählt, da solche Mutationen auch in Proteinen auftreten und dadurch ihre Interaktionen zu diversen Liganden signifikant abgeschwächt werden [120, 121]. Untersucht wurden die Änderungen der chemischen Verschiebungs-

Kapitel 3. Ergebnisse und Diskussion

werte in ^{15}N -markiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³ nach Zugabe eines dreifachen Überschusses der Peptide PepRQ, PepQR bzw. PepQQ. In Abbildung 3.10 sind die Ergebnisse dieser drei »mutierten« Peptide zusammen mit dem »Wildtyp«-Peptid PepRR dargestellt. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass das Fehlen beider Arginine die Interaktion nahezu komplett unterbindet. Der Austausch eines einzelnen Arginins führt hingegen zu einer Schwächung der Wechselwirkung, wobei im Fall der R127Q-Variante (PepQR) die Interaktion etwas mehr geschwächt wird als im Fall der R129Q-Variante (PepRQ).

Die Präsenz beider Arginine im Peptid PepRR, welches dadurch zwei positive Ladungen besitzt, führte zu chemischen Verschiebungsänderungen, die größer waren als die Summe der einzelnen Verschiebungen, die von PepQR und PepRQ mit jeweils nur einer positiv geladenen Seitenkette verursacht wurden. Im unstrukturierten Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹ sind somit vermutlich beide Arginine an der elektrostatischen Interaktion mit FKBP38³⁵⁻¹⁵³ direkt beteiligt.

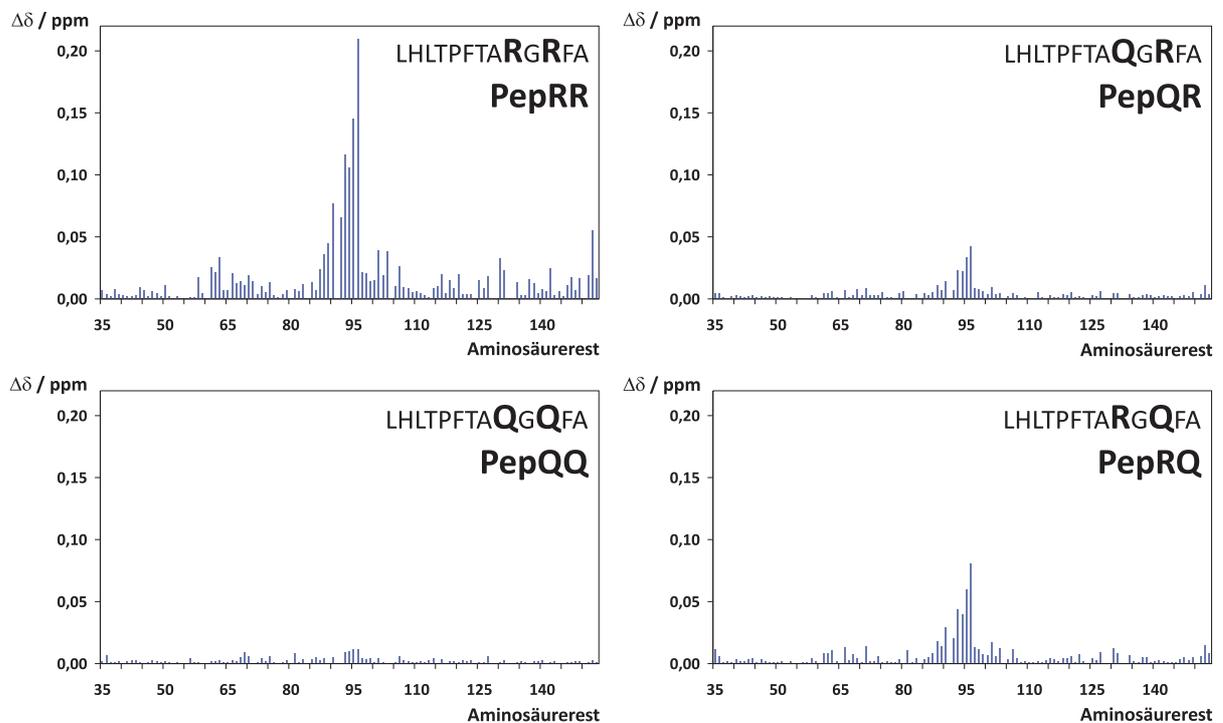
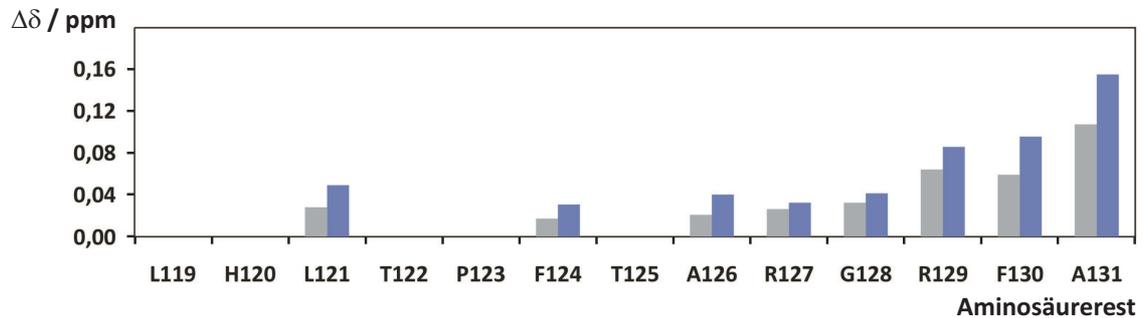


Abbildung 3.10.: Änderungen der chemischen Verschiebungswerte, die durch die Zugabe der Peptide PepRR, PepQQ, PepQR bzw. PepRQ in ^{15}N -markiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³ verursacht wurden. Dabei weist PepRR die größten Effekte auf, PepQQ hingegen keine. Die Peptide PepQR und PepRQ haben in der Summe einen kleineren Einfluss auf das Protein als PepRR.

Um die Wechselwirkung seitens des Peptids zu beobachten und zu charakterisieren, wurde PepRR teilweise mit ^{15}N -markierten Aminosäuren hergestellt (NPep). Es wurde im Verlauf der Experimente notwendig, ein zweites teilweise ^{15}N -markiertes Peptid zu synthetisieren (NPep(R127/R129)). Die Ergebnisse von NPep und NPep(R127/R129) werden hier zur Vereinfachung zusammengefasst und im Folgenden behandelt, als ob sie von einem

einziges Peptid (»NPep*«) stammen.

A - NPep* mit FKBP38³⁵⁻¹⁵³ im Verhältnis 1:1 (grau) und 1:3 (blau)



B - NPep* mit FKBP38³⁵⁻¹⁵³ (blau) und FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D92N/D94N (orange), Verhältnis jeweils 1:3

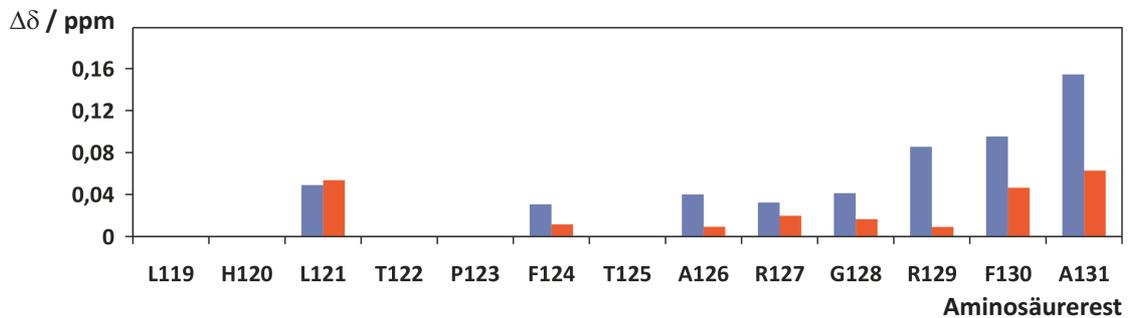


Abbildung 3.11.: Änderungen der chemischen Verschiebungswerte von NPep* (**A**) aufgrund der Zugabe von FKBP38³⁵⁻¹⁵³ bei zwei verschiedenen Peptid/Protein-Verhältnissen und (**B**) im Vergleich zu FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D92N/D94N. Bei der Doppelmutante nimmt der $\Delta\delta$ -Wert der meisten Signale, insbesondere von R129, deutlich ab.

Untersucht wurde die Wechselwirkung von NPep* mit FKBP38³⁵⁻¹⁵³ und der Doppelmutante FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D92N/D94N, die im Gegensatz zum Wildtyp keine Interaktion mit Ca²⁺-Ionen eingeht und sich somit bezüglich des ladungssensitiven Loops von FKBP38³⁵⁻¹⁵³ unterscheidet (siehe Unterabschnitt 3.1.1.1). In Abbildung 3.11 sind die Ergebnisse der Messungen zusammengefasst. An den Verschiebungen der Signale der ¹⁵N-markierten Reste im ¹H/¹⁵N-HSQC-Spektrum ist deutlich erkennbar, dass sich die Effekte der Interaktion zwischen NPep* und FKBP38³⁵⁻¹⁵³ über die gesamte Peptidsequenz erstrecken (Abbildung 3.11, Abbildung 3.12A). Die stärksten Verschiebungen sind allerdings am C-Terminus zu beobachten und werden bis zur Aminosäure A126 schwächer (siehe Abbildung 3.11A). Der Vergleich zu den Messungen mit der Doppelmutante FKBP38³⁵⁻¹⁵³ D92N/D94N ist sehr aussagekräftig (siehe Abbildung 3.11B), da ihre Interaktion mit dem Peptid generell schwächer ist. Die Änderung der chemischen Verschiebungswerte der Reste F124 und A126 bis A131 wird um durchschnittlich 60 % kleiner, wobei sie bei R129 überdurchschnittlich stark um 90 % abnimmt. Dies lässt auf eine elektrostatische Interaktion dieser Argininseitenkette des Peptids mit FKBP38³⁵⁻¹⁵³ schließen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass auch die Seitenkette von R127 an der Interaktion beteiligt sein könnte. Das N-terminale Ende des Peptids scheint hingegen von den Mutationen im Protein

unbeeinflusst zu sein, da das dort befindliche L121 in beiden Messungen ähnlich starke Effekte zeigte, die eventuell auf eine zusätzliche hydrophobe Wechselwirkung des Peptids mit FKBP38³⁵⁻¹⁵³ hinweisen. Sicher ist jedenfalls, dass der ladungssensitive Loop der katalytischen Domäne von FKBP38 mit Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹ interagiert, und dass dabei die Seitenketten von D92 und/oder D94 elektrostatisch mit einer oder beiden Argininseitenketten des Peptids wechselwirken.

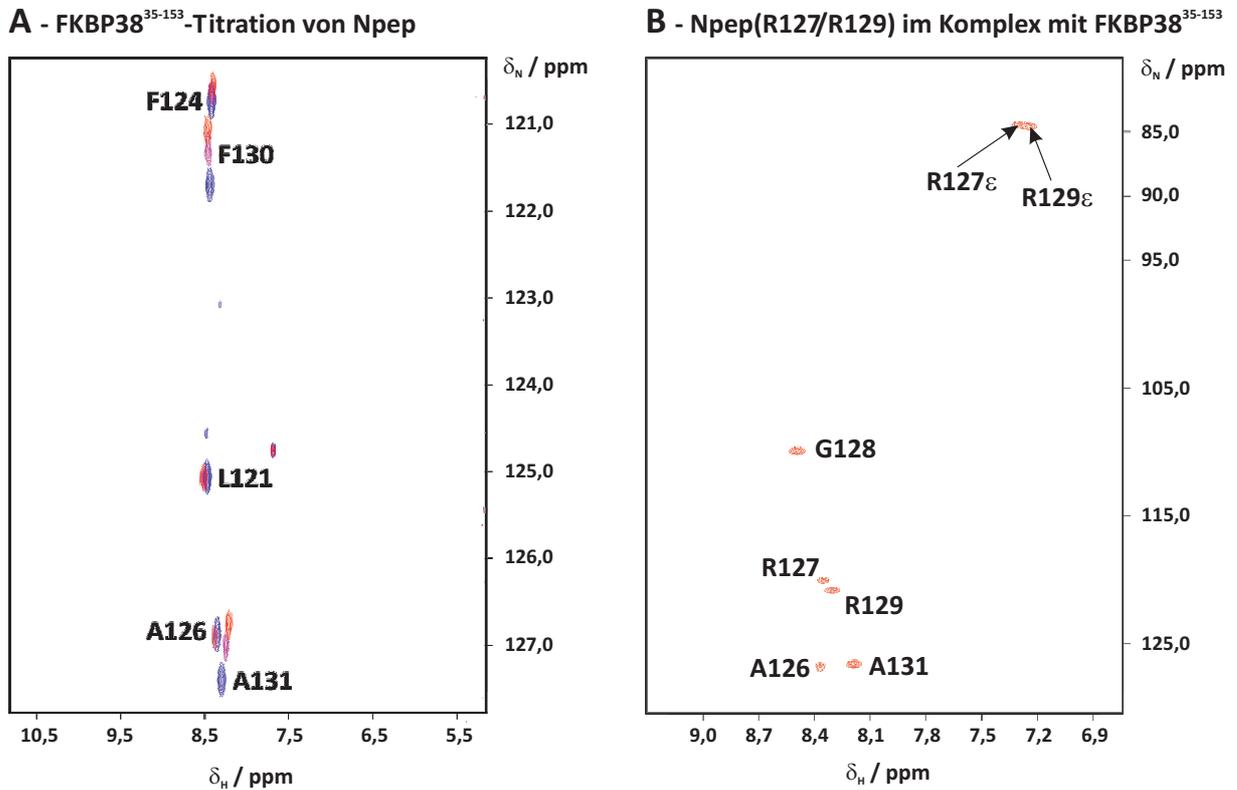


Abbildung 3.12.: Unterschiedlich skalierte Ausschnitte aus den ¹H/¹⁵N-HSQC-Spektren der teilweise ¹⁵N-markierten Peptide. **(A)** Übereinandergelegte Spektren des ¹⁵N-markierten Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹-Peptids (Npep) im unkomplexierten (blaue Signale) und mit FKBP38³⁵⁻¹⁵³ im komplexierten Zustand (einfacher Proteinüberschuss: violett-farbene Signale, dreifacher Proteinüberschuss: rote Signale). **(B)** Spektrum von Npep(R127/R129) mit dreifachem Überschuss an FKBP38³⁵⁻¹⁵³. Nur im komplexierten Zustand sind aufgrund des verlangsamten Protonenaustausches die H_ε-Signale der Argininseitenketten detektierbar.

Um aufzuklären, welches der beiden Arginine für die Wechselwirkung mit FKBP38 entscheidend ist, wurde die Messung mit einer konzentrierteren Probe bei höherem Magnetfeld (800,23 MHz) wiederholt. Ziel dabei war es, herauszufinden, ob die H_ε-Amidsignale des Peptids aufgrund eines möglicherweise im komplexierten Zustand verlangsamten Austausches detektiert werden können. Damit die Resonanzen der Seitenkettenamidsignale den Argininen eindeutig zugeordnet werden konnten, wurden zusätzliche Peptide hergestellt, in denen jeweils nur eines der beiden Arginine ¹⁵N-markiert war (Npep(R127), Npep(R129)), und im Komplex mit FKBP38³⁵⁻¹⁵³ gemessen.

Jedoch zeigten im Komplex mit FKBP38³⁵⁻¹⁵³ die N_εH-Gruppen beider Argininseitenketten aufgrund eines langsameren Protonenaustausches je ein Signal (Abbildung 3.12), sodass voraussichtlich beide Arginine direkt an der Interaktion beteiligt sind und keine eindeutige Aussage getroffen werden konnte, welcher der beiden Reste wichtiger für die Interaktion ist.

Hieraus wird deutlich, dass das Peptid Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹ zwar näherungsweise die Bindung von Bcl-2 an die katalytischen Domäne von FKBP38 wiedergibt, man damit jedoch in der Fragestellung welches Arginin zur elektrostatischen Wechselwirkung beiträgt, keine eindeutige Aussage treffen kann. Dies liegt wahrscheinlich an den unterschiedlichen Sekundärstrukturen von Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹ und der entsprechenden Sequenz im Volllängenprotein. Während das Peptid Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹ in Lösung keine geordnete Struktur ausweist, bilden die Reste L119 bis A131 im Protein teilweise einen Loop und teilweise eine α -helikale Struktur (Abbildung 3.13). Außerdem weisen die Seitenketten der Arginine 127 und 129 im Protein, wo sie in die α -Helix 4 eingebunden sind, in entgegengesetzte Richtungen, so dass ihre Guanidiniumgruppen einen Abstand von ca. 15 Å haben. Somit ist es unwahrscheinlich, dass sie mit beiden Aspartaten im β 5- α 1-Loop von FKBP38³⁵⁻¹⁵³ gleichzeitig interagieren. Im Peptid hingegen kann der Abstand zwischen den Argininseitenketten deutlich kleiner sein und damit auch eine simultane Interaktion beider Argininreste mit den Aspartaten 92 und 94 des FKBP38³⁵⁻¹⁵³ ermöglichen.

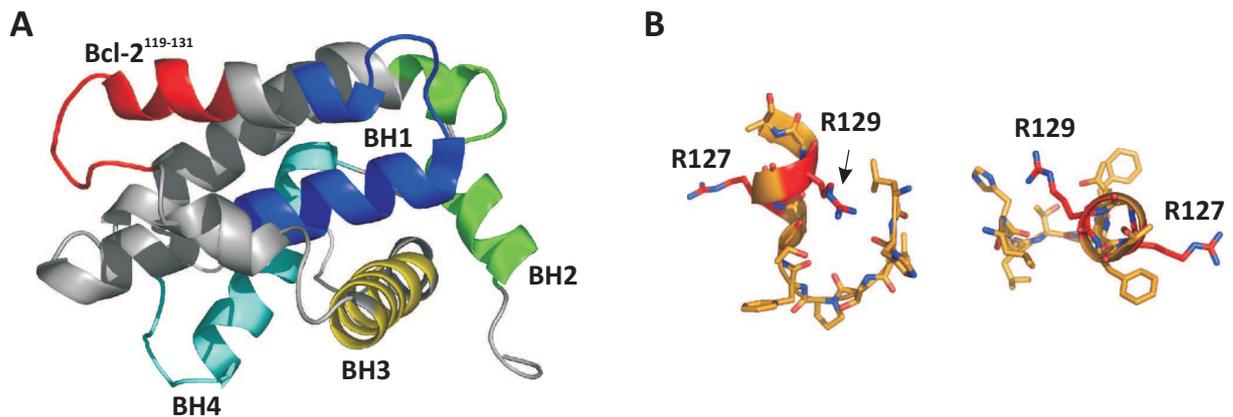


Abbildung 3.13.: (A) Cartoondarstellung der NMR-Struktur von Bcl-2 (PDB ID 1GJH) nach Petros *et al.* [122]. Farblich hervorgehoben sind die vier BH-Domänen und das Segment, welches das Peptid Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹ repräsentiert. Die Reste L119 bis A131 befinden sich zwischen der BH3- und BH1-Domäne. (B) Darstellung der Cartoonstruktur einschließlich der Aminosäureseiten- und Aminosäurehauptketten des Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹-Segments im Protein aus zwei unterschiedlichen Perspektiven. Auffällig ist, dass die Seitenketten der beiden Arginine voneinander weg zeigen, da sie in eine α -Helix eingebunden sind.

3.1.3. Die Protein-Protein-Interaktion zwischen FKBP38³⁵⁻¹⁵³ und Bcl-2¹⁻²¹¹

Mithilfe von Interaktionsstudien zwischen Bcl-2¹⁻²¹¹ und der katalytischen Domäne des FKBP38 sollten folgende Punkte validiert bzw. weiter analysiert werden, die in den vorangegangenen Experimenten mit dem Protein-Peptid-Modell gefunden wurden bzw. unzureichend aufgeklärt werden konnten.

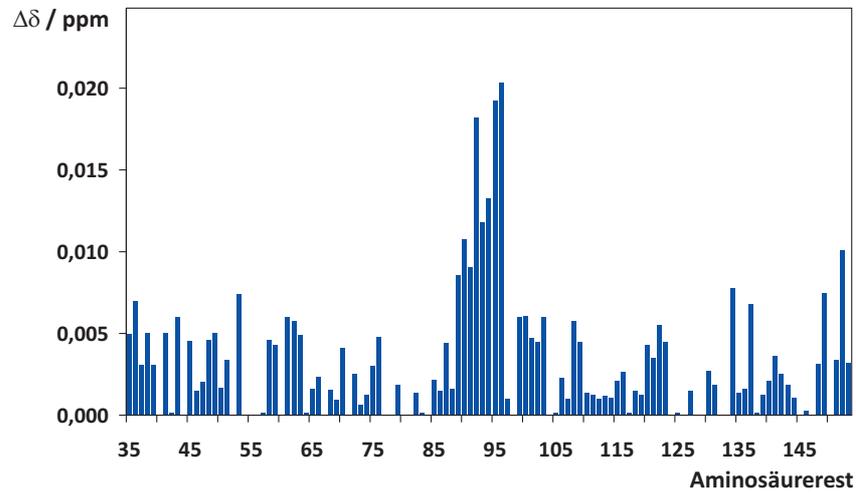
- Interagiert der $\beta 5$ - $\alpha 1$ -Loop von FKBP38³⁵⁻¹⁵³ auch mit dem Bcl-2-Protein?
- Welches Arginin im Bcl-2 (R127 oder R129) vermittelt die elektrostatische Interaktion?
- Hat CaM einen Einfluss auf diese Wechselwirkung?

Ähnlich wie in den Experimenten mit dem Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹-Peptid wurden von ¹⁵N-markiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³ mit und ohne Ligand ¹H/¹⁵N-HSQC-Spektren aufgenommen und die Änderungen der chemischen Verschiebungswerte analysiert. Das dabei verwendete Bcl-2-Konstrukt Bcl-2¹⁻²¹¹ besitzt jedoch trotz des fehlenden Membranankers nur eine geringe Löslichkeit (ca. 10 μ M), sodass in der Probe des Proteinkomplexes das Bcl-2¹⁻²¹¹ im fünf-fachen Unterschuss vorlag.

Die Berechnung der $\Delta\delta$ -Werte der einzelnen Reste im Vergleich zum unkomplexierten ¹⁵N-markierten FKBP38³⁵⁻¹⁵³ zeigte erneut, dass analog zu den Untersuchungen mit den Bcl-2-Peptiden die Verschiebungseffekte hauptsächlich am $\beta 5$ - $\alpha 1$ -Loop auftreten (siehe Abbildung 3.14A). Die $\Delta\delta$ -Werte der Reste des $\beta 5$ - $\alpha 1$ -Loops sind mit einem Mittelwert von 0,015 ppm relativ klein, jedoch signifikant größer als der $\Delta\delta$ -Durchschnittswert von 0,004 ppm. Bei dieser Betrachtung muss außerdem berücksichtigt werden, dass der Ligand im Unterschuss und nicht, wie normalerweise üblich, im Überschuss vorlag. Der hohe Salzgehalt im Puffer (100 mM NaCl) schwächt zudem die elektrostatische Wechselwirkung am $\beta 5$ - $\alpha 1$ -Loop, wie ein Vergleich der Änderungen der chemischen Verschiebungswerte bei Calciumzugabe in salzfreiem bzw. salzhaltigem Puffer zeigte (Abbildung A.1 auf Seite x).

Da die Verschiebungseffekte im ¹⁵N-markierten FKBP38³⁵⁻¹⁵³ durch die Zugabe des Bcl-2-Proteins und des Bcl-2-Peptids vergleichbar sind, ist anzunehmen, dass das Bcl-2-Segment mit den Resten L119 bis A131 an der Protein-Protein-Interaktion unmittelbar beteiligt ist. In dieser Sequenz befinden sich die Arginine 127 und 129, von denen jedoch aufgrund der räumlichen Anordnung nur eines als Gegenpol des negativ geladenen $\beta 5$ - $\alpha 1$ -Loops im FKBP38 fungieren dürfte (siehe Abbildung 3.13 auf Seite 55). Um die Rolle der einzelnen Arginine zu untersuchen, wurden die Bcl-2¹⁻²¹¹-Mutanten Bcl-2¹⁻²¹¹ R127Q, Bcl-2¹⁻²¹¹ R129Q und Bcl-2¹⁻²¹¹ R127Q/R129Q generiert. Die Durchführung der Experimente zur Komplexbildung der einzelnen Bcl-2-Varianten mit ¹⁵N-markiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³ erfolgte analog zum oben genannten Experiment.

A - ^{15}N -markiertes FKBP38³⁵⁻¹⁵³ im Komplex mit Bcl-2¹⁻²¹¹ (Wildtyp)



B - ^{15}N -markiertes FKBP38³⁵⁻¹⁵³ im Komplex mit Bcl-2¹⁻²¹¹ R127Q/R129Q

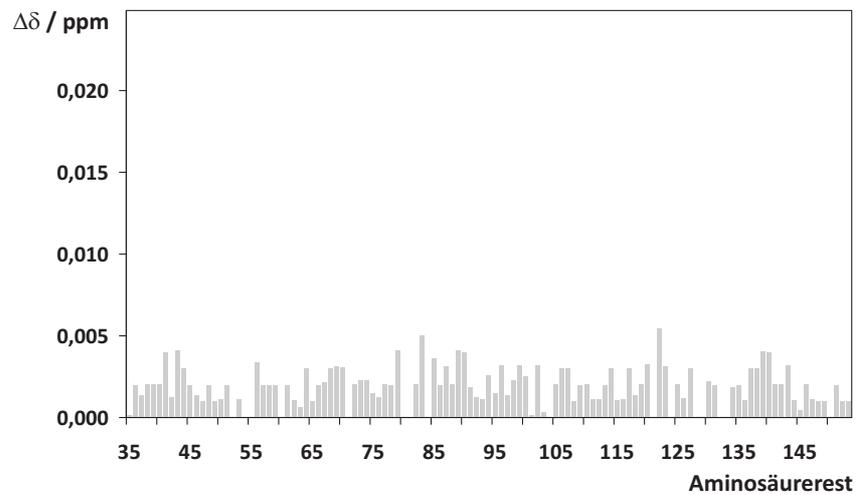


Abbildung 3.14.: Änderungen der chemischen Verschiebungswerte im ^{15}N -markierten FKBP38³⁵⁻¹⁵³ aufgrund der Zugabe eines fünffachen Unterschusses an (A) Bcl-2¹⁻²¹¹ bzw. (B) Bcl-2¹⁻²¹¹ R127Q/R129Q. Nur der Bcl-2-Wildtyp als Ligand verursacht im $\beta 5$ - $\alpha 1$ -Loop-Bereich des ^{15}N -markierten FKBP38³⁵⁻¹⁵³ deutliche Verschiebungseffekte, durch die Bcl-2¹⁻²¹¹ R127Q/R129Q-Mutante werden hingegen keine nennenswerten Änderungen hervorgerufen.

Die Änderungen der chemischen Verschiebungswerte der einzelnen FKBP38-Reste zeigten, dass es jeweils zu unterschiedlich großen Verschiebungseffekten kommt. Dabei verursachte die Doppelmutante Bcl-2¹⁻²¹¹ R127Q/R129Q als Ligand keine nennenswerten Effekte (siehe Abbildung 3.14B). Die Mutation beider Arginine im Bcl-2-Segment L119 bis A131 hat somit die vollständige Unterbindung der elektrostatischen Interaktion mit dem β 5- α 1-Loop des FKBP38 zur Folge.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Einzelmutanten Bcl-2¹⁻²¹¹ R127Q und Bcl-2¹⁻²¹¹ R129Q unterschiedlich starke Effekte auf die β 5- α 1-Loop-Reste relativ zur Doppelmutante haben (Abbildung 3.15). Durch die R129Q-Mutation wurden die chemischen Verschiebungsänderungen stärker geschwächt als durch die R127Q-Mutation. Somit ist R129Q aller Wahrscheinlichkeit nach jener Rest, der die elektrostatische Wechselwirkung zu FKBP38³⁵⁻¹⁵³ vermittelt. Dennoch ist R127 für die Interaktion anscheinend nicht ganz unbedeutend, da seine Substitution ebenfalls zu einer Abschwächung der Effekte im Vergleich zum Wildtyp-Protein führt (Abbildung 3.15). Möglicherweise ist R127 am Protein-Protein-Erkennungsprozess beteiligt oder beeinflusst mit seiner positiv geladenen Seitenkette andere Wechselwirkungen der Interaktion zwischen FKBP38³⁵⁻¹⁵³ und Bcl-2¹⁻²¹¹.

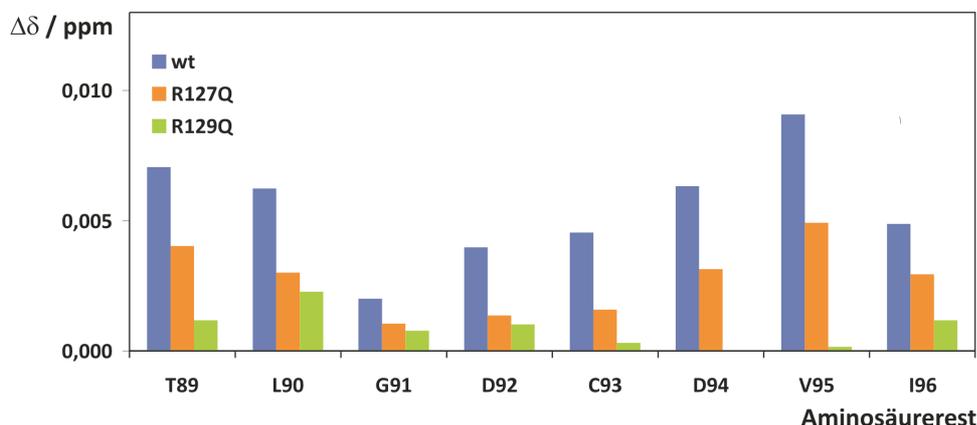


Abbildung 3.15.: Änderungen der chemischen Verschiebungswerte der β 5- α 1-Loop-Reste sowie T89 in ¹⁵N-markiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³ durch die Zugabe von Bcl-2¹⁻²¹¹, Bcl-2¹⁻²¹¹ R127Q und Bcl-2¹⁻²¹¹ R129Q.

Als nächstes Experiment wurde der Einfluss von CaM auf den FKBP38³⁵⁻¹⁵³/Bcl-2¹⁻²¹¹-Komplex untersucht. Hierzu wurden die Änderungen der chemischen Verschiebungswerte bestimmt, welche die Zugabe von apo- bzw. holo-CaM zum ¹⁵N-markierten FKBP38³⁵⁻¹⁵³/Bcl-2¹⁻²¹¹-Komplex verursachte. Als Referenz diente dabei die Messung des ¹⁵N-markierten FKBP38³⁵⁻¹⁵³/Bcl-2¹⁻²¹¹-Komplexes. Weder die Zugabe von apo- noch von holo-CaM führte zu signifikanten Veränderungen der chemischen Verschiebungswerte im ¹⁵N-markierten FKBP38³⁵⁻¹⁵³. Exemplarisch sind in Abbildung 3.16 die chemischen Verschiebungsänderungen dargestellt, welche durch die Zugabe von apo-CaM verursacht wurden. Da keine signifikanten Effekte zu beobachten sind, kann daraus abgeleitet werden, dass die Interaktion zwischen FKBP38³⁵⁻¹⁵³ und Bcl-2¹⁻²¹¹ unabhängig von einer CaM-Präsenz ist.

Die Ergebnisse der vorangegangenen FKBP38³⁵⁻¹⁵³/Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹-Bindungsstudie können also im Wesentlichen auf die Interaktion zwischen den Proteinen übertragen werden. Hierzu

zählen die Beteiligung des $\beta 5$ - $\alpha 1$ -Loops an der Wechselwirkung sowie ihre Unabhängigkeit von holo-CaM. Das Resultat, dass die Protein-Peptid-Interaktion, im Gegensatz zur Protein-Protein-Interaktion, apo-CaM abhängig ist, kann aufgrund der unterschiedlichen Sekundärstruktur von Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹ im Vergleich zum entsprechenden Segment im Bcl-2¹⁻²¹¹ erklärt werden. Diese Abhängigkeit von apo-CaM hat daher wahrscheinlich keine Bedeutung für die Interaktion der Proteine und ist als ein Artefakt der Protein-Peptid-Bindungsstudie zu betrachten.

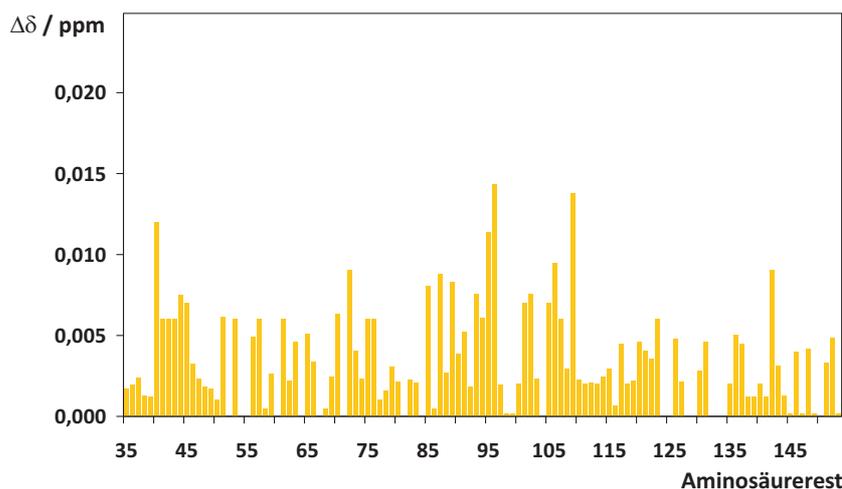


Abbildung 3.16.: Änderungen der chemischen Verschiebungswerte im ¹⁵N-markierten FKBP38³⁵⁻¹⁵³ des FKBP38³⁵⁻¹⁵³/Bcl-2¹⁻²¹¹-Komplexes vor und nach Zugabe von apo-CaM. Die Skalierung der y-Achse entspricht der in Abbildung 3.14. Es sind jedoch in diesem Fall keine signifikanten Effekte zu beobachten.

Wie in Unterabschnitt 1.2.3 beschrieben, gibt es bereits mehrere Veröffentlichungen zur Interaktion zwischen FKBP38 und Bcl-2. Die Nachweismethoden dafür beschränkten sich zum größten Teil auf das Y2H-System, Co-Immunopräzipitationen, Experimente mit diversen Zelllinien und das Binden des Interaktionspartners an Affinitätsäulen mit getaggtem Proteinpendant. Informationen über die Bindestellen im FKBP38 und Bcl-2 wurden bis jetzt meist über Deletionsmutanten, bei denen ganze Proteindomänen fehlten, gewonnen. Als Interaktionsstellen im FKBP38 wurden die katalytische Domäne [30, 34, 67] und die TPR-Domäne [67] identifiziert; im Bcl-2-Protein der flexible Loop [67] und die BH4-Domäne [123].

Die in dieser Arbeit bestimmten Interaktionsstellen des Protein-Proteinkomplexes aus FKBP38³⁵⁻¹⁵³ (katalytische Domäne) und Bcl-2¹⁻²¹¹ wurden mit Methoden bestimmt, die eine genauere Lokalisierung des Interface ermöglichen. Das Bcl-2-Peptid konnte mithilfe der Analyse einer membrangebundenen Bcl-2-Peptidbibliothek ermittelt werden. Durch die NMR-spektroskopische Bestimmung der Änderungen der chemischen Verschiebungswerte wurde eine Interaktion des Peptids sowie auch des Bcl-2-Proteins mit der katalytischen Domäne von FKBP38 bestätigt. Für die Ausbildung dieses Protein-Protein-Komplexes ist eine elektrostatische Interaktion ausschlaggebend, die vom Arginin 129 im Bcl-2 und auf der Gegenseite von den Aspartaten 92 und 94 des ladungssensitiven $\beta 5$ - $\alpha 1$ -Loops im FKBP38 als »Hot Spots« ausgeht.

3.2. Protein-Peptid-Interaktionen der Substratbindedomäne von DnaK

Die fortlaufende Bildung von Resistenzen vieler Bakterienstämme gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika macht eine ständige Entwicklung neuer antibakterieller Substanzen notwendig. Ein Ansatzpunkt ist hierbei die Inhibierung der *de novo*-Proteinfaltung. Das essentielle Chaperon DnaK ist an der Faltung von ca. 10 bis 20% aller Proteine in *E. coli*-Bakterien beteiligt [71]. Die Inhibierung seiner Chaperonaktivität könnte somit der Schlüssel zur Entwicklung völlig neuer antibakterieller Substanzklassen sein. Dies stellt jedoch eine große Herausforderung dar, da sowohl die ATPase-Domäne als auch die Substratbindedomäne (SBD) von DnaK strukturell derart beschaffen sind, dass mithilfe der entsprechenden Co-Chaperone stets ein schneller Austausch der Liganden möglich ist.

Zu den antibakteriellen Peptiden zählt das natürlich vorkommende 20mer Pyrrhocoricin [124]. Dieses proteasestabile Peptid inhibiert die Chaperonaktivität von DnaK [125]. Als besonders wichtig für seine antibakterielle Wirkung wurden die Aminosäurereste Asparat 2, Lysin 3 sowie Tyrosin 6 bis Prolin 10 in der N-terminalen Hälfte von Pyrrhocoricin identifiziert [126]. Um die Affinität von Pyrrhocoricin für DnaK noch weiter zu verbessern, wurde eine matrixgebundene Peptidbibliothek mit den zwölf N-terminalen Pyrrhocoricinresten generiert, in der systematisch die Reste 4 bis 6 durch kanonische und nicht-kanonische Reste substituiert waren [127]. Die Matrix wurde mit DnaK inkubiert und dessen Bindung an die matrixgebundenen Peptide mittels Co-Immunopräzipitation nachgewiesen. Das Peptid mit dem Sequenzmotiv »L4 - Y5 - Z6«³ zeigte die beste Bindung an DnaK. Basierend auf diesen Erkenntnissen konnten weitere Pyrrhocoricin-ähnliche Peptide mit dem Motiv »L4 - Y5 - Z6« generiert werden, die gegenüber dem Wildtyp verbesserte inhibitorische Eigenschaften aufwiesen [127]. Die Bindung an die SBD von DnaK konnte im Vergleich zum »Wildtyp«-Pyrrhocoricin um das bis zu 270fache gesteigert werden. Auch die APIase⁴ und die Chaperonaktivität⁵ von DnaK konnten signifikant inhibiert werden. Die Inhibitoren zeigten außerdem eine verbesserte antibakterielle Aktivität gegenüber zwei *E. coli*-Stämmen [127].

³Mit »Z« wird hier die nicht-kanonische Aminosäure Cyclohexylalanin bezeichnet.

⁴Ein Enzym, welches die *cis/trans*-Isomerisierung einer sekundären Amid-Peptidbindung katalysiert, wird als APIase bezeichnet [128].

⁵Die Proteine DnaK, DnaJ und GrpE assistieren bei der Rückfaltung von entfalteter Luciferase [129]. Das wird in einem Test zur Bestimmung dieser Aktivität genutzt, in dem die Chaperon-inhibierende Wirkung von Substanzen untersucht wird.

In diesem Kontext sollte nun die Bindung der peptidischen Inhibitoren **1**, **2**, **3**, **1'**, **2'** sowie des Substratpeptids **NR** an DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² auf der Strukturebene untersucht und verglichen werden. Die Peptide sind in Tabelle 3.6, unter Berücksichtigung ihrer im Vergleich zu Pyrrhocoricin unterschiedlichen Sequenzabschnitte, aufgelistet. Das Konstrukt DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² umfasst die SBD sowie den Teil der Substratstabilisierungsdomäne (SSD), der bei einer Substratbindung mit der SBD interagiert und dabei wie eine Art Deckel über ihr lokalisiert ist (Unterabschnitt 1.3.1 auf Seite 15).

Tabelle 3.6.: Zusammenstellung der im Komplex mit DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² untersuchten Peptide. Um die Sequenzunterschiede zwischen den einzelnen Inhibitoren bzw. dem Substratpeptid relativ zur Pyrrhocoricinsequenz besser erkennen zu können, wurden einige Reste farbig hervorgehoben. Das blau gefärbte Leucin hat eine besondere Rolle bei der Bindung an die SBD des DnaK.

Peptid	Peptidsequenz	Bemerkung
Pyrrhocoricin	VDKGSYLPRPTPPRPIYNRN	
1	Ac-VDKLYZLPRPT-NH ₂	Substituierte Reste sind rot hervorgehoben.
2	Ac-VDKLYZLPRPTPPRPIYNRN-NH ₂	
3	Ac-KRVDKLYZLPRPT-NH ₂	
1'	Ac-VDKGSYLPRPT-NH ₂	Referenzpeptid zu 1 bzw. 2
2'	Ac-VDKGSYLPRPTPPRPIYNRN-NH ₂	
NR	Ac-NRLLLTG-NH ₂	Substratpeptid nach Zhu <i>et al.</i> [87]

3.2.1. Zuordnung der ¹H-, ¹³C- und ¹⁵N-Resonanzen von DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵²

Um die ¹H- und ¹⁵N-Resonanzen in den ¹H/¹⁵N-HSQC-Spektren von ¹⁵N-markiertem DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² mit und ohne Peptid zuordnen zu können, wurden HNCA- und HNCACB-Spektren von DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² sowie DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² im Komplex mit den Peptiden **1** und **NR** aufgenommen und ausgewertet. Das beschriftete ¹H/¹⁵N-HSQC-Spektrum von DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² sowie die ¹H-, ¹³C- und ¹⁵N-Resonanzzuordnungen sind im Anhang auf den Seiten xvi, xi bzw. xii zu finden.

3.2.2. Interaktionen mit den Inhibitoren

Die untersuchten Inhibitoren unterscheiden sich hinsichtlich der Anzahl ihrer Reste und der Teilsequenz »GSY« bzw. »LYZ«. Wie bereits in Abschnitt 3.2 erwähnt, wurde die

N-terminale Hälfte von Pyrrolicin als essentiell für die antibakterielle Eigenschaft des Peptids identifiziert [126]. Das Peptid **1'** entspricht dieser N-terminalen Hälfte ebenso wie das Peptid **1**, welches jedoch das optimierte Bindemotiv »LYZ« statt der Wildtyp-Sequenz »GSY« enthält. Die Peptide **2'** und **2** entsprechen der gesamten Pyrrolicin-Sequenz, wobei letzteres wieder das Bindemotiv »LYZ« aufweist. Peptid **3** besitzt gegenüber Peptid **1** am N-Terminus zusätzlich die beiden positiv geladenen Reste K1 und R2, welche die Membranpermeabilität verbessern. Alle diese Peptide binden an das DnaK-Volllängenprotein und inhibieren dessen APIase- und ATPase-Aktivität [127].

Die Peptide **1'** und **2'** verursachten keine Änderungen der chemischen Verschiebungswerte im $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von ^{15}N -markiertem DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵². Stellvertretend hierfür sind die Verschiebungseffekte der Wechselwirkung des Proteins mit Peptid **1'** in Abbildung 3.17A dargestellt. Dieses anfangs überraschende Ergebnis kann durch die Tatsache erklärt werden, dass das verwendete DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵²-Konstrukt in einer selbstassoziierten Form vorliegt [130], in der die eigene α -Helix B als Ligand in der SBD gebunden ist und durch die Peptide **1'** und **2'** nicht verdrängt werden kann. Dieser Effekt tritt hier auf, da in DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² die α -helikale SSD nicht vollständig vorhanden ist. Im Volllängenprotein hingegen wird die α -Helix B vermutlich durch die anderen α -Helices der SSD stabilisiert und somit eine Selbstassoziation verhindert.

Die Peptide **1**, **2** und **3** hingegen verursachten durch ihre Zugabe deutliche Änderungen der chemischen Verschiebungswerte in den $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von ^{15}N -markiertem DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵². Dabei sind Teile der SBD und SSD beteiligt (Abbildung 3.17B). Das Verteilungsmuster der Signale in den $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren der drei jeweiligen DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵²-Peptid-Komplexe sieht sehr ähnlich aus. Somit sind auch die Änderungen der chemischen Verschiebungswerte im Vergleich zum selbstassoziierten DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² für jeden Rest vergleichbar groß (Abbildung 3.17C). Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass das Bindemotiv »LYZ« in den inhibitorischen Peptiden **1**, **2** und **3** im Vergleich zu dem ursprünglichen Pyrrolicinmotif »GSY« zu einer affineren Bindung in der SBD beiträgt. Die Aminosäuren, die in der SBD binden, sind bei allen drei Peptiden **1**, **2** und **3** identisch. Die zusätzlichen N- und C-terminalen Reste in den Peptiden **2** und **3** hingegen sind an der Bindung nicht direkt beteiligt. Abbildung 3.18 gibt anhand der DnaK-Struktur von Bertelson *et al.* [83] eine Vorstellung, welche Reste aufgrund der Komplexbildung mit Peptid **1** chemische Verschiebungen aufweisen, und wo sie im Protein lokalisiert sind.

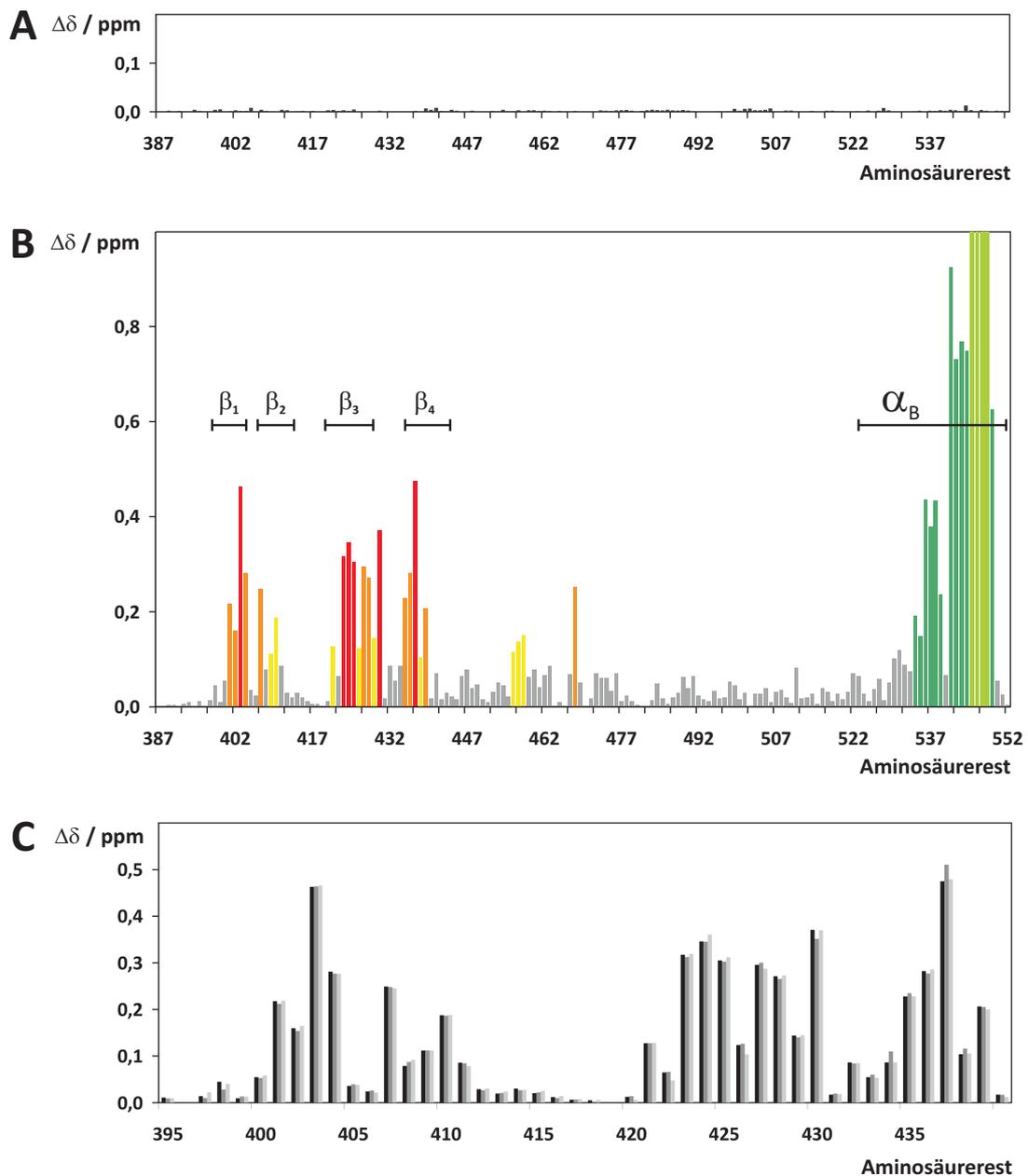


Abbildung 3.17.: Darstellung der Verschiebungseffekte in ^{15}N -markiertem DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵², die durch die Peptide **1'**, **1**, **2** und **3** verursacht wurden. **(A)** Nach der Zugabe von Peptid **1'** zu DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² konnten keine signifikanten Änderungen der chemischen Verschiebungswerte detektiert werden. Das gleiche Ergebnis wurde mit Peptid **2'** erzielt. **(B)** Die Zugabe von Peptid **1** zu DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² verursachte signifikante chemische Verschiebungseffekte bei bestimmten Resten der SBD (β_1 bis β_4) und SSD (α_B). Die Farbgebung der Balken bezieht sich auf die Abbildung 3.18. **(C)** Parallele Darstellung der chemischen Verschiebungsänderungen, die durch Zugabe der Peptide **1** (schwarze Balken), **2** (dunkelgraue Balken) und **3** (hellgraue Balken) in DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² verursacht wurden. Zur übersichtlicheren Darstellung ist nur der Bereich der SBD mit den Resten 395 bis 440 gezeigt. Unabhängig vom eingesetzten Peptid ist $\Delta\delta$ bei allen DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵²-Resten vergleichbar groß.

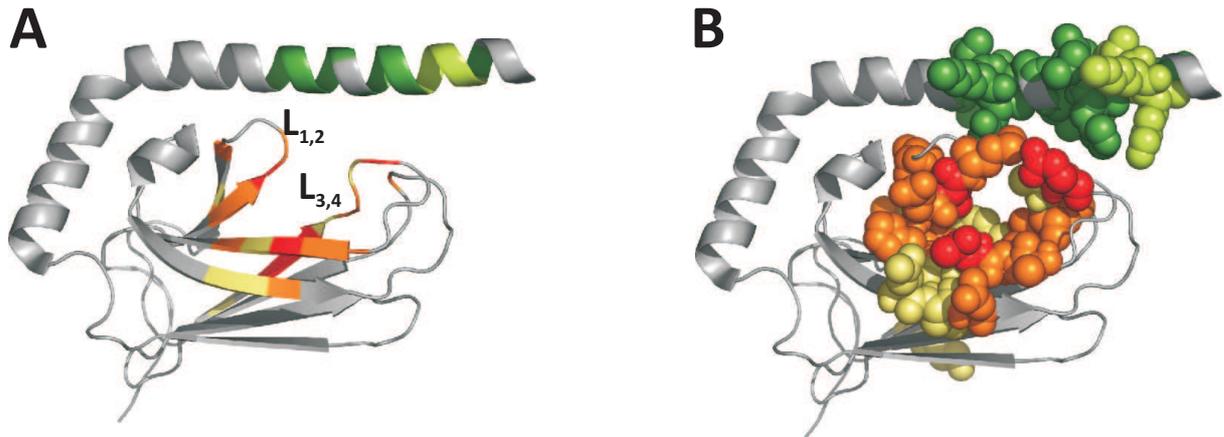


Abbildung 3.18.: Darstellung der DnaK-Reste 387 bis 552 der NMR-Struktur von DnaK¹⁻⁶⁰⁵ (PDB ID 2KHO) [83] unter Berücksichtigung der Änderungen der chemischen Verschiebungswerte aufgrund der Zugabe von Peptid **1**. Die rot, orange und gelb gefärbten Bereiche repräsentieren Reste der SBD in Abhängigkeit von $\Delta\delta$ (rot $\geq 0,3$ ppm; $0,3 \text{ ppm} > \text{orange} \geq 0,2$ ppm; $0,2 \text{ ppm} > \text{gelb} > 0,1$ ppm). Die grün gefärbten Bereiche gehören alle zur SSD und markieren die Reste mit $\Delta\delta \geq 0,1$ ppm (dunkleres Grün) bzw. Reste, die nach der Zugabe von Peptid **1** nicht mehr detektierbar waren (helles Grün). **(A)** In der Cartoondarstellung ist zu erkennen, dass besonders die Faltblattstränge β_1 , β_3 und β_4 sowie die Loops L_{1,2} und L_{3,4} durch die Peptidzugabe betroffen sind. Die SSD ist wie ein Deckel über der SBD lokalisiert. **(B)** Alle gefärbten Reste sind in der Kalottendarstellung abgebildet. Deutlich ist ein Tunnel in der SBD zu sehen, in dem in dieser NMR-Struktur das Substratpeptid NRLLLTG an DnaK¹⁻⁶⁰⁵ gebunden ist.

3.2.3. Vergleich zwischen dem DnaK-Substrat- und dem DnaK-Inhibitor-Komplex

Die Funktionalität von DnaK legt nahe, dass seine Substratbindedomäne mit zahlreichen peptidischen Substraten interagieren kann (siehe Tabelle 1.2 auf Seite 15). In Untersuchungen von DnaK mit dem Substratpeptid »NRLLLTG« (**NR**) wurde diese Wechselwirkung genauer charakterisiert und Struktureigenschaften der SBD und SSD mit der Interaktion des Peptids in Verbindung gebracht (Unterabschnitt 1.3.1.2 auf Seite 17). Um die Unterschiede zwischen den Inhibitoren **1**, **2** und **3** sowie dem Substratpeptid **NR** zu untersuchen, wurde ein ¹H/¹⁵N-HSQC-Spektrum des ¹⁵N-markierten DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵²/**NR**-Komplexes aufgenommen und analog zu den Messungen in Unterabschnitt 3.2.2 die Änderungen der chemischen Verschiebungswerte bestimmt (Abbildung 3.19). Da DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² mit den Peptiden **1**, **2** und **3** aufgrund der sehr ähnlichen $\Delta\delta$ -Werte jedes Restes vermutlich homologe Komplexstrukturen bildet, soll diese Interaktion im Folgenden am Beispiel des DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵²/**1**-Komplexes dargestellt und diskutiert werden.

Die Peptide **1** und **NR** interagieren auf eine sehr ähnliche Weise mit den beiden Proteindomänen von DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵². Beide bewirken Verschiebungseffekte in den Faltblattsträngen

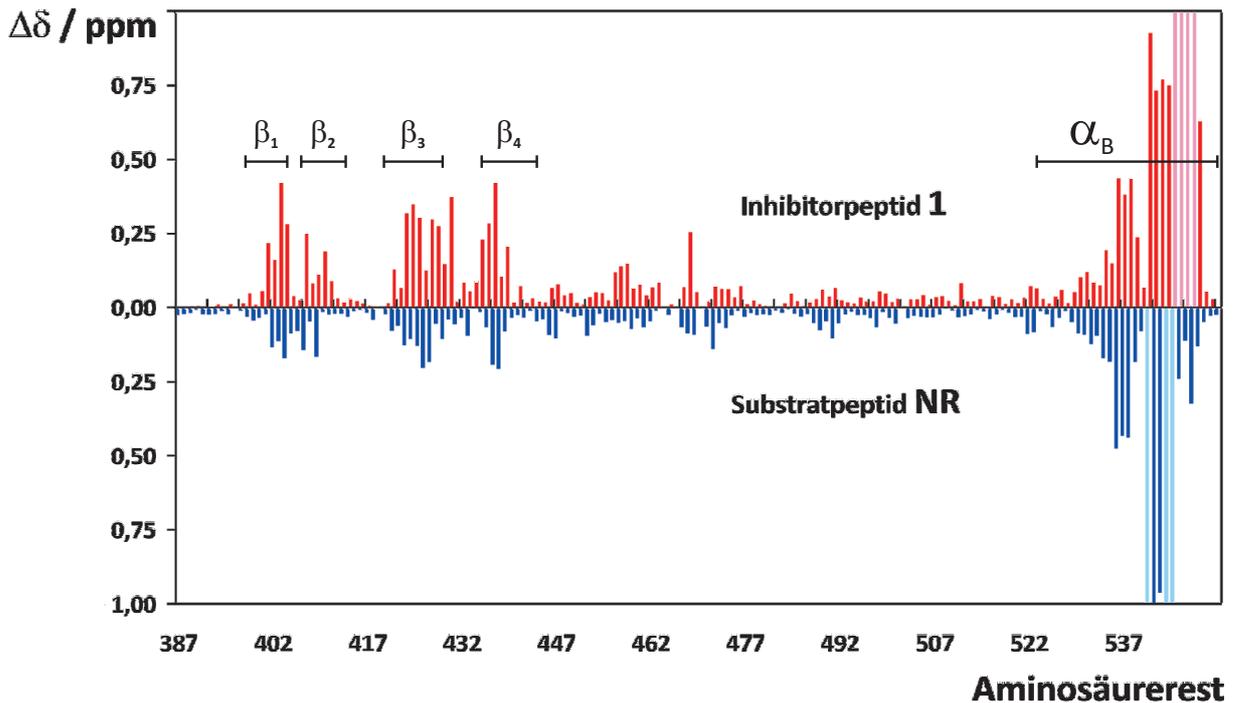


Abbildung 3.19.: Vergleichende Darstellung der Änderungen der chemischen Verschiebungswerte von ^{15}N -markiertem DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² aufgrund der Zugabe der Peptide **1** (rote Balken) bzw. **NR** (blaue Balken). Es wurden jeweils die gleichen Proteinregionen beeinflusst. Die Angabe der β -Faltblattstränge der SBD verdeutlicht, in welchem Bereich die Peptide binden. Das Inhibitorpeptid weist größere $\Delta\delta$ -Werte als das Substratpeptid auf. In der SSD (α_B) sind die chemischen Verschiebungseffekte jedoch ähnlich groß. Die rosafarbenen und hellblauen Balken repräsentieren die entsprechenden Reste, die im Komplex aufgrund von extremer Linienverbreiterung kein Signal zeigten.

β_1 bis β_4 sowie den Loops $L_{1,2}$ und $L_{3,4}$ der SBD (Abbildung 3.19). Für das Peptid **NR** war dies bereits bekannt [87, 88]. Vermutlich bindet das Leucin 7 von Peptid **1**, analog zu Leucin 4 im Peptid **NR**, in der hydrophoben Tasche der SBD und verankert den Liganden (Abbildung 3.20). In Tabelle 3.6 ist dieser essentielle Leucinrest in allen Peptidsequenzen blau dargestellt. Zusätzlich bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hauptketten des Peptids und des Proteins aus. Peptid **1** bindet stärker an die SBD als Peptid **NR**. Dies wird auch aufgrund der ca. doppelt so großen chemischen Verschiebungswerte deutlich und validiert den geringen K_d -Wert von Peptid **1** ($0,005 \mu\text{M}$) gegenüber dem K_d -Wert von Peptid **NR** ($0,01 \mu\text{M}$) aus dem fluoreszenzbasierten Kompetitionsexperiment mit DnaK-Volllängenprotein [127]. Diese stärkere Bindung, welche die verbesserten antibakterielle Eigenschaften erklären könnte, ist auf das gegenüber Pyrrhocoricin veränderte Bindemotiv »LYZ« zurückzuführen. Es unterscheidet sich zu »GSY« in Pyrrhocoricin und zu »NRL« im Peptid **NR** durch seine deutlich höhere Hydrophobizität und durch sein größeres Volumen, welches wahrscheinlich den Raum in der SBD-Tasche besser ausfüllt und somit zu einer affineren Bindung führt.

Zudem zeigt die SSD ebenfalls starke Veränderungen der chemischen Verschiebungswerte durch die Zugabe der Peptide **1** und **NR**. Die Auswirkung der Komplexbildung scheint

im Falle der SSD für beide Peptide ähnlich zu sein, da die Änderungen der chemischen Verschiebungswerte nahezu gleich groß sind. Hierbei setzt sich $\Delta\delta$ jeweils aus zwei unterschiedlichen Komponenten zusammen, die vermutlich durch beide Peptide verursacht werden. Erstens muss das Peptid die selbstassoziierte α -Helix B aus der SBD verdrängen, und zweitens interagiert diese Helix dann mit den Loops $L_{1,2}$ und $L_{3,4}$ und verhindert so eine Dissoziation des Protein/Peptid-Komplexes. Die α -Helix B hat somit zwar keinen direkten Kontakt zum Liganden in der SBD, wird aber durch ihre Verdrängung aus der SBD und der anschließenden Bindung der Peptide **1** und **NR** anscheinend in gleicher Weise beeinflusst.

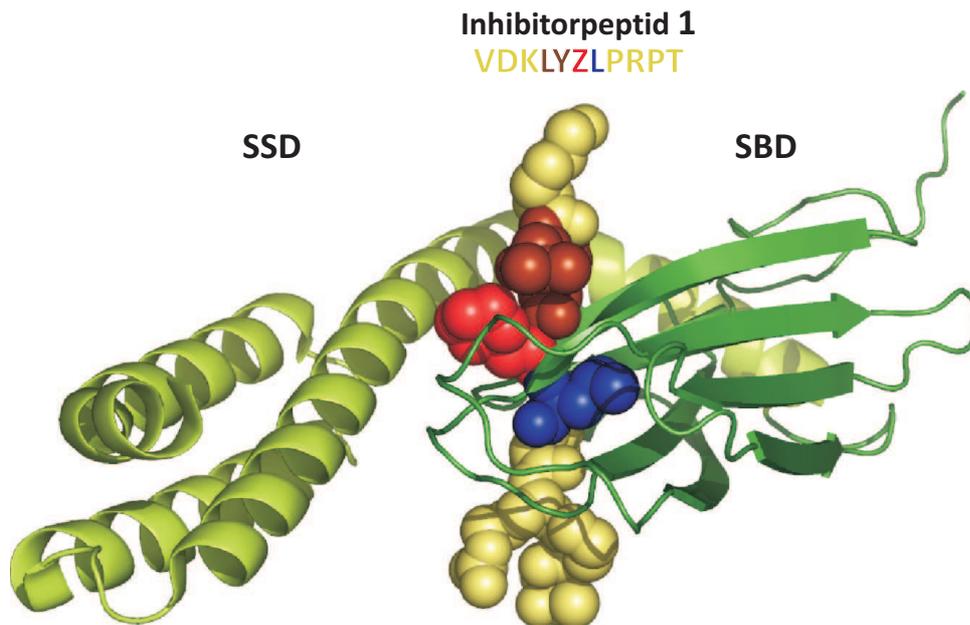


Abbildung 3.20.: Röntgenstruktur des DnaK³⁸⁹⁻⁶⁰⁷/1-Komplexes (PDB ID 3DPO) [131]. Das Protein ist in der Cartoondarstellung (dunkelgrün - SBD, hellgrün - SSD), das Peptid als Kalottenmodell dargestellt. Das zentrale Leucin (blau) ragt in die SBD hinein. Die Reste des verbesserten Bindemotivs sind in braun (LY) bzw. rot (Z) dargestellt.

Diese aufgrund der Analogien zum DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵²/NR-Komplex aufgestellten Hypothesen wurden durch die Röntgenstruktur des DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵²/1-Komplexes [131], welche im Zusammenhang mit diesem Projekt entstand, bestätigt. Das Inhibitorpeptid **1** bindet demnach analog zu **NR** in einer gestreckten Konformation in der SBD des DnaK. Aufgrund der NMR-Daten kann somit abgeleitet werden, dass dies auch für die Komplexe mit den Inhibitoren **2** und **3** zutrifft. Diese Erkenntnisse über die Bindung der Peptide **1**, **2**, **3** sowie **NR** an DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² spiegeln mehrere der in Unterabschnitt 1.1.2 beschriebenen Strategien von β -Faltblatt-basierten Protein-Peptid-Komplexen wider. Hierzu zählen die Einlagerung in eine kleine Proteintasche mit einer Aminosäureseitenkette als »Hot Spot« der Interaktion, die Präferenz des Proteins für Liganden mit hydrophoben Resten sowie die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen vor allem zwischen den Hauptketten [22].

Kapitel 4.

Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertationsschrift beschreibt Ergebnisse von Protein-Ligand-Studien an FKBP38 sowie DnaK.

Untersucht wurde die katalytische Domäne von FKBP38 (FKBP38³⁵⁻¹⁵³) bezüglich ihrer Interaktion mit verschiedenen Metallionen sowie dem antiapoptotischen Protein Bcl-2. Die folgenden Ergebnisse wurden hierbei erhalten:

- Die katalytische Domäne von FKBP38 interagiert mit positiv geladenen Ionen. Als Ursache hierfür wurden die beiden Aspartate 92 und 94 im $\beta 5$ - $\alpha 1$ -Loop identifiziert.
- Die Titration von FKBP38³⁵⁻¹⁵³ mit verschiedenen Metallionen (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} und La^{3+}) zeigte, dass die Bindungsaffinität von der Ladung und Ionengröße abhängt. Dabei zeigte Ca^{2+} die kleinste Bindekonstante ($K_d = 0,66$ mM) der untersuchten physiologisch relevanten Ionen. Es handelt sich hierbei um eine Bindung mit relativ geringer Affinität.
- Ein berechnetes Strukturmodell des FKBP38³⁵⁻¹⁵³-Komplexes mit Tb^{3+} hat gezeigt, dass das Metallion in unmittelbarer Nähe der Seitenketten von D92 und D94 lokalisiert ist.
- Im Vorfeld wurde mithilfe einer Bcl-2-Peptidbibliothek das Peptid Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹ als potentielle Bcl-2-Interaktionsstelle zu FKBP38 identifiziert [117]. Basierend auf dieser Sequenz wurden mehrere teilweise ¹⁵N-markierte Peptide synthetisiert, die alle hinsichtlich ihrer ¹H, ¹³C und ¹⁵N-Resonanzen NMR-spektroskopisch charakterisiert wurden.
- Das Peptid Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹ interagiert mit dem ladungssensitiven $\beta 5$ - $\alpha 1$ -Loop des Proteins FKBP38³⁵⁻¹⁵³. Diese Wechselwirkung wird durch apo-Calmodulin (apo-CaM) geschwächt und ist unabhängig von holo-CaM.
- Die Arginine 127 und 129 des Peptids Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹ sind beide direkt an der Wechselwirkung mit FKBP38³⁵⁻¹⁵³ beteiligt. Damit handelt es sich bei der Interaktion

Kapitel 4. Zusammenfassung

zwischen dem Peptid Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹ und dem β 5- α 1-Loop von FKBP38³⁵⁻¹⁵³ um eine elektrostatische Wechselwirkung.

- Anschließend wurden Interaktionsstudien zwischen den Proteinen FKBP38³⁵⁻¹⁵³ und Bcl-2¹⁻²¹¹ durchgeführt. Dabei bestätigte sich, dass tatsächlich der ladungssensitive Loop von FKBP38 mit Bcl-2 wechselwirkt.
- Im Gegensatz zur Protein-Peptid-Interaktion ist anscheinend nur das Arginin 129 für diese elektrostatische Wechselwirkung entscheidend. Außerdem ist die FKBP38³⁵⁻¹⁵³/Bcl-2¹⁻²¹¹-Wechselwirkung vermutlich weder durch apo- noch durch holo-CaM beeinflusst.
- Die Unterschiede in der Interaktion von FKBP38³⁵⁻¹⁵³ mit Bcl-2¹¹⁹⁻¹³¹ bzw. Bcl-2¹⁻²¹¹ sind möglicherweise Artefakte aufgrund der unterschiedlichen Struktur des Peptids im Vergleich zum entsprechenden Segment im Protein.

Das antibakterielle Peptid Pyrrhocoricin wurde mithilfe einer Peptidbibliothek in Bezug auf seine Bindung an das prokaryotischen Hsp70-Homolog DnaK optimiert. Die neu entwickelten Inhibitoren (**1**, **2** und **3**) mit neuem Bindemotiv (»LYZ« statt »GSY«) wurden hinsichtlich ihrer Bindung an das Konstrukt DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² untersucht, welches aus der Substratbindedomäne (SBD) und einem Teil der Substratstabilisierungsdomäne (SSD) besteht. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- Die ¹H_N-, ¹³C _{α} -, ¹³C _{β} - und ¹⁵N-Resonanzen von DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² im unkomplexierten Zustand sowie im Komplex mit den Peptiden **1** bzw. **NR** wurden jeweils zugeordnet.
- Die Referenzpeptide **1'** und **2'** mit der Pyrrhocoricinteilsequenz »GSY« binden nicht an DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵², da sie eine im DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵²-Konstrukt selbstassoziierte α -Helix nicht verdrängen können.
- Die Peptide **1**, **2** und **3** binden auf eine ähnliche Weise an die SBD von DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵².
- Die Veränderungen der DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵²-Resonanzen aufgrund der Komplexierung mit Peptid **1** wurden mit denen der Komplexierung mit dem Substratpeptid **NR** verglichen. Beide Peptide werden in einer homologen Weise gebunden. Die Faltblattstränge β_1 , β_2 , β_3 und β_4 sowie die Loops L_{1,2} und L_{3,4} sind in dieser Interaktion involviert, wobei das Peptid **1**, welches ca. doppelt so große Verschiebungseffekte aufweist, stärker an die SBD bindet als das Peptid **NR**. Die Effekte in der SSD sind hingegen ähnlich groß, da sie nicht durch direkten Ligandenkontakt sondern durch eine Konformationsänderung, die in beiden Fällen vergleichbar ist, hervorgerufen werden.
- Die verbesserte Affinität der Peptide **1**, **2** und **3** ist auf das Bindemotiv »LYZ« zurückzuführen, welches aufgrund seiner Hydrophobizität und seines größeren Volumens mit DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² ein verbessertes Interface bildet.

Literaturverzeichnis

- [1] FISCHER, E.: *Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme*. Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft zu Berlin, 27:2985–2993, 1894.
- [2] KOSHLAND, D. E.: *Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 44:98–104, 1958.
- [3] MONOD, J., J. WYMAN und J. P. CHANGEUX: *On the nature of allosteric transitions - a plausible model*. J. Mol. Biol., 12(1):88–118, 1965.
- [4] JANIN, J.: *Principles of protein-protein recognition from structure to thermodynamics*. Biochimie, 77(7-8):497–505, 1995.
- [5] VISSER, H.: *Protein interaction*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1992.
- [6] BOGAN, A. A. und K. S. THORN: *Anatomy of hot spots in protein interfaces*. J. Mol. Biol., 280(1):1–9, 1998.
- [7] MOREIRA, I. S., P. A. FERNANDES und M. J. RAMOS: *Hot spots - a review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues*. Proteins, 68(4):803–12, 2007.
- [8] DALL'ACQUA, W., E. R. GOLDMAN, E. EISENSTEIN und R. A. MARIUZZA: *A mutational analysis of the binding of two different proteins to the same antibody*. Biochemistry, 35(30):9667–76, 1996.
- [9] NOOREN, I. M. und J. M. THORNTON: *Diversity of protein-protein interactions*. EMBO J., 22(14):3486–92, 2003.
- [10] JONES, S. und J. M. THORNTON: *Analysis and classification of protein-protein interactions from a structural perspective*. In: KLEANTHOUS, C.: *Frontiers in Molecular Biology. Protein-protein recognition* (Band 31). Oxford University Press, New York:33-59, 2000.
- [11] JONES, S. und J. M. THORNTON: *Principles of protein-protein interactions*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 93(1):13–20, 1996.

Literaturverzeichnis

- [12] HAMM, H. E.: *The many faces of G protein signaling*. J. Biol. Chem., 273(2):669–72, 1998.
- [13] BREG, J. N., J. H. J. VANOPHEUSDEN, M. J. M. BURGERING, R. BOELENS und R. KAPTEIN: *Structure of Arc repressor in solution - evidence for a family of β -sheet DNA-binding proteins*. Nature, 346(6284):586–589, 1990.
- [14] JONES, S. und J. M. THORNTON: *Protein-protein interactions: a review of protein dimer structures*. Prog. Biophys. Mol. Biol., 63(1):31–65, 1995.
- [15] BAN, Y. E. A., H. EDELSBRUNNER und J. RUDOLPH: *Interface surfaces for protein-protein complexes*. J. Am. Chem. Soc., 53(3):361–378, 2006.
- [16] ARGOS, P.: *An investigation of protein subunit and domain interfaces*. Protein Eng., 2(2):101–13, 1988.
- [17] LO CONTE, L., C. CHOTHIA und J. JANIN: *The atomic structure of protein-protein recognition sites*. J. Mol. Biol., 285(5):2177–98, 1999.
- [18] MILLER, S.: *The structure of interfaces between subunits of dimeric and tetrameric proteins*. Protein Eng., 3(2):77–83, 1989.
- [19] JAKUBKE, H.-D.: *Peptide*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg:41-96, 1996.
- [20] HO, B. K. und K. A. DILL: *Folding very short peptides using molecular dynamics*. PLoS Comput. Biol., 2(4):e27, 2006.
- [21] KILLIAN, B. J., J. Y. KRAVITZ, S. SOMANI, P. DASGUPTA, Y. P. PANG und M. K. GILSON: *Configurational entropy in protein-peptide binding: computational study of Tsg101 ubiquitin E2 variant domain with an HIV-derived PTAP nonapeptide*. J. Mol. Biol., 389(2):315–35, 2009.
- [22] LONDON, N., D. MOVSHOVITZ-ATTIAS und O. SCHUELER-FURMAN: *The structural basis of peptide-protein binding strategies*. Structure, 18(2):188–99, 2010.
- [23] GLASER, F., D. M. STEINBERG, I. A. VAKSER und N. BEN-TAL: *Residue frequencies and pairing preferences at protein-protein interfaces*. Proteins, 43(2):89–102, 2001.
- [24] UNAL, E. B., A. GURSOY und B. ERMAN: *Conformational energies and entropies of peptides, and the peptide-protein binding problem*. Phys. Biol., 6(3):036014, 2009.
- [25] FISCHER, S., S. MICHNICK und M. KARPLUS: *A mechanism for rotamase catalysis by the FK506 binding protein (FKBP)*. Biochemistry, 32(50):13830–7, 1993.

- [26] KAY, J. E.: *Structure-function relationships in the FK506-binding protein (FKBP) family of peptidylprolyl cis-trans isomerases*. Biochem. J., 314 (Pt 2):361–85, 1996.
- [27] WILSON, K. P., M. M. YAMASHITA, M. D. SINTCHAK, S. H. ROTSTEIN, M. A. MURCKO, J. BOGER, J. A. THOMSON, M. J. FITZGIBBON, J. R. BLACK und M. A. NAVIA: *Comparative X-ray structures of the major binding protein for the immunosuppressant FK506 (tacrolimus) in unliganded form and in complex with FK506 and rapamycin*. Acta Crystallogr., Sect. D, 51(4):511–521, 1995.
- [28] MAESTRE-MARTÍNEZ, M., F. EDLICH, F. JARCZOWSKI, M. WEIWAD, G. FISCHER und C. LÜCKE: *Solution structure of the FK506-binding domain of human FKBP38*. J. Biomol. NMR, 34(3):197–202, 2006.
- [29] EDLICH, F., M. WEIWAD, F. ERDMANN, J. FANGHÄNEL, F. JARCZOWSKI, J. U. RAHFELD und G. FISCHER: *Bcl-2 regulator FKBP38 is activated by Ca²⁺/calmodulin*. EMBO J., 24(14):2688–99, 2005.
- [30] EDLICH, F., M. MAESTRE-MARTÍNEZ, F. JARCZOWSKI, M. WEIWAD, M. C. MOUTTY, M. MALEŠEVIĆ, G. JAHREIS, G. FISCHER und C. LÜCKE: *A novel calmodulin-Ca²⁺ target recognition activates the Bcl-2 regulator FKBP38*. J. Biol. Chem., 282(50):36496–504, 2007.
- [31] LIU, J., JR. J. D. FARMER, W. S. LANE, J. FRIEDMAN, I. WEISSMAN und S. L. SCHREIBER: *Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes*. Cell, 66(4):807–15, 1991.
- [32] GRIFFITH, J. P., J. L. KIM, E. E. KIM, M. D. SINTCHAK, J. A. THOMSON, M. J. FITZGIBBON, M. A. FLEMING, P. R. CARON, K. HSIAO und M. A. NAVIA: *X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex*. Cell, 82(3):507–22, 1995.
- [33] LAM, E., M. M. MARTIN, A. P. TIMERMAN, C. SABERS, S. FLEISCHER, T. LUKAS, R. T. ABRAHAM, S. J. O’KEEFE, E. A. O’NEILL und G. J. WIEDERRECHT: *A novel FK506 binding protein can mediate the immunosuppressive effects of FK506 and is associated with the cardiac ryanodine receptor*. J. Biol. Chem., 270(44):26511–22, 1995.
- [34] SHIRANE, M. und K. I. NAKAYAMA: *Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis*. Nat. Cell Biol., 5(1):28–37, 2003.
- [35] WEIWAD, M., F. EDLICH, F. ERDMANN, F. JARCZOWSKI, S. KILKA, M. DORN, A. PECHSTEIN und G. FISCHER: *A reassessment of the inhibitory capacity of human FKBP38 on calcineurin*. FEBS Lett., 579(7):1591–6, 2005.

Literaturverzeichnis

- [36] LOEWITH, R., E. JACINTO, S. WULLSCHLEGER, A. LORBERG, J. L. CRESPO, D. BONENFANT, W. OPPLIGER, P. JENOE und M. N. HALL: *Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control*. Mol. Cell, 10(3):457–68, 2002.
- [37] BAI, X., D. MA, A. LIU, X. SHEN, Q. J. WANG, Y. LIU und Y. JIANG: *Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38*. Science, 318(5852):977–80, 2007.
- [38] DAWSON, T. M., J. P. STEINER, W. E. LYONS, M. FOTUHI, M. BLUE und S. H. SNYDER: *The immunophilins, FK506 binding protein and cyclophilin, are discretely localized in the brain: relationship to calcineurin*. Neuroscience, 62(2):569–80, 1994.
- [39] POULTER, M. O., K. B. PAYNE und J. P. STEINER: *Neuroimmunophilins: a novel drug therapy for the reversal of neurodegenerative disease?* Neuroscience, 128(1):1–6, 2004.
- [40] PONG, K. und M. M. ZALESKA: *Therapeutic implications for immunophilin ligands in the treatment of neurodegenerative diseases*. Curr. Drug Targets, 2(6):349–56, 2003.
- [41] GUO, X., V. L. DAWSON und T. M. DAWSON: *Neuroimmunophilin ligands exert neuroregeneration and neuroprotection in midbrain dopaminergic neurons*. Eur. J. Neurosci., 13(9):1683–93, 2001.
- [42] WU, Y. Q., D. E. WILKINSON, D. LIMBURG, J. H. LI, H. SAUER, D. ROSS, S. LIANG, D. SPICER, H. VALENTINE, M. FULLER, H. GUO, P. HOWORTH, R. SONI, Y. CHEN, J. P. STEINER und G. S. HAMILTON: *Synthesis of ketone analogues of prolyl and pipecolyl ester FKBP12 ligands*. J. Med. Chem., 45(16):3558–68, 2002.
- [43] KANG, C. B., L. FENG, J. CHIA und H. S. YOON: *Molecular characterization of FK-506 binding protein 38 and its potential regulatory role on the anti-apoptotic protein Bcl-2*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 337(1):30–8, 2005.
- [44] BREIMAN, A. und I. CAMUS: *The involvement of mammalian and plant FK506-binding proteins (FKBPs) in development*. Transgenic Res., 11(4):321–35, 2002.
- [45] PRATT, W. B., M. D. GALIGNIANA, J. M. HARRELL und D. B. DEFranco: *Role of Hsp90 and the Hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement*. Cell. Signal., 16(8):857–72, 2004.
- [46] LAM, E., M. MARTIN und G. WIEDERRECHT: *Isolation of a cDNA encoding a novel human FK506-binding protein homolog containing leucine zipper and tetratri-copeptide repeat motifs*. Gene, 160(2):297–302, 1995.

- [47] ROSNER, M., K. HOFER, M. KUBISTA und M. HENGSTSCHLÄGER: *Cell size regulation by the human TSC tumor suppressor proteins depends on PI3K and FKBP38*. *Oncogene*, 22(31):4786–98, 2003.
- [48] NIELSEN, J. V., C. MITCHELMORE, K. M. PEDERSEN, K. M. KJÆ RULFF, B. FINSEN und N. A. JENSEN: *Fkbp8: novel isoforms, genomic organization, and characterization of a forebrain promoter in transgenic mice*. *Genomics*, 83(1):181–92, 2004.
- [49] BULGAKOV, O. V., J. T. EGGENSCHWILER, D. H. HONG, K. V. ANDERSON und T. LI: *FKBP8 is a negative regulator of mouse sonic hedgehog signaling in neural tissues*. *Development*, 131(9):2149–59, 2004.
- [50] WONG, R. L., B. J. WLODARCZYK, K. S. MIN, M. L. SCOTT, S. KARTIKO, W. YU, M. Y. MERRIWEATHER, P. VOGEL, B. P. ZAMBROWICZ und R. H. FINNELL: *Mouse Fkbp8 activity is required to inhibit cell death and establish dorsoventral patterning in the posterior neural tube*. *Hum. Mol. Genet.*, 17(4):587–601, 2008.
- [51] SHIRANE, M., M. OGAWA, J. MOTOYAMA und K. I. NAKAYAMA: *Regulation of apoptosis and neurite extension by FKBP38 is required for neural tube formation in the mouse*. *Genes Cells*, 13(6):635–51, 2008.
- [52] NAKAGAWA, T., M. SHIRANE, S. IEMURA, T. NATSUME und K. I. NAKAYAMA: *Anchoring of the 26S proteasome to the organellar membrane by FKBP38*. *Genes Cells*, 12(6):709–19, 2007.
- [53] EDLICH, F., F. ERDMANN, F. JARCZOWSKI, M. C. MOUTTY, M. WEIWAD und G. FISCHER: *The Bcl-2 regulator FKBP38-calmodulin-Ca²⁺ is inhibited by Hsp90*. *J. Biol. Chem.*, 282(21):15341–8, 2007.
- [54] ERDMANN, F., F. JARCZOWSKI, M. WEIWAD, G. FISCHER und F. EDLICH: *Hsp90-mediated inhibition of FKBP38 regulates apoptosis in neuroblastoma cells*. *FEBS Lett.*, 581(29):5709–14, 2007.
- [55] BARTH, S., J. NESPER, P. A. HASGALL, R. WIRTHNER, K. J. NYTKO, F. EDLICH, D. M. KATSCHINSKI, D. P. STIEHL, R. H. WENGER und G. CAMENISCH: *The peptidyl prolyl cis/trans isomerase FKBP38 determines hypoxia-inducible transcription factor prolyl-4-hydroxylase PHD2 protein stability*. *Mol. Cell. Biol.*, 27(10):3758–68, 2007.
- [56] WALKER, V. E., R. ATANASIU, H. LAM und A. SHRIER: *Co-chaperone FKBP38 promotes HERG trafficking*. *J. Biol. Chem.*, 282(32):23509–16, 2007.

Literaturverzeichnis

- [57] CHEN, Y., P. STERNBERG und J. CAI: *Characterization of a Bcl-xL-interacting protein FKBP8 and its splice variant in human RPE cells*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 49(4):1721–7, 2008.
- [58] ASPURIA, P. J. und F. TAMANOI: *The Rheb family of GTP-binding proteins*. Cell. Signal., 16(10):1105–12, 2004.
- [59] GARAMI, A., F. J. ZWARTKRUIS, T. NOBUKUNI, M. JOAQUIN, M. ROCCIO, H. STOCKER, S. C. KOZMA, E. HAFEN, J. L. BOS und G. THOMAS: *Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2*. Mol. Cell, 11(6):1457–66, 2003.
- [60] AVRUCH, J., K. HARA, Y. LIN, M. LIU, X. LONG, S. ORTIZ-VEGA und K. YONEZAWA: *Insulin and amino-acid regulation of mTOR signaling and kinase activity through the Rheb GTPase*. Oncogene, 25(48):6361–72, 2006.
- [61] MA, D., X. BAI, S. GUO und Y. JIANG: *The switch I region of Rheb is critical for its interaction with FKBP38*. J. Biol. Chem., 283(38):25963–70, 2008.
- [62] MACDONALD, A. und M. HARRIS: *Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein*. J. Gen. Virol., 85(Pt 9):2485–502, 2004.
- [63] OKAMOTO, T., Y. NISHIMURA, T. ICHIMURA, K. SUZUKI, T. MIYAMURA, T. SUZUKI, K. MORIISHI und Y. MATSUURA: *Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90*. EMBO J., 25(20):5015–25, 2006.
- [64] WANG, J., W. TONG, X. ZHANG, L. CHEN, Z. YI, T. PAN, Y. HU, L. XIANG und Z. YUAN: *Hepatitis C virus non-structural protein NS5A interacts with FKBP38 and inhibits apoptosis in Huh7 hepatoma cells*. FEBS Lett., 580(18):4392–400, 2006.
- [65] OKAMOTO, T., H. OMORI, Y. KANAME, T. ABE, Y. NISHIMURA, T. SUZUKI, T. MIYAMURA, T. YOSHIMORI, K. MORIISHI und Y. MATSUURA: *A single-amino-acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication*. J. Virol., 82(7):3480–9, 2008.
- [66] KANG, C. B., J. TAI, J. CHIA und H. S. YOON: *The flexible loop of Bcl-2 is required for molecular interaction with immunosuppressant FK-506 binding protein 38 (FKBP38)*. FEBS Lett., 579(6):1469–76, 2005.
- [67] CHOI, B. H., L. FENG und H. S. YOON: *FKBP38 protects Bcl-2 from caspase-dependent degradation*. J. Biol. Chem., 285(13):9770–9, 2010.
- [68] WAGNER, M., I. HERMANN, F. BITTINGER und C. J. KIRKPATRICK: *Induction of stress proteins in human endothelial cells by heavy metal ions and heat shock*. Am. J. Physiol., 277(5 Pt 1):L1026–33, 1999.

- [69] JAVID, B., P. A. MACARY und P. J. LEHNER: *Structure and function: heat shock proteins and adaptive immunity*. J. Immunol., 179(4):2035–40, 2007.
- [70] SHARMA, D. und D. C. MASISON: *Hsp70 structure, function, regulation and influence on yeast prions*. Protein Pept. Lett., 16(6):571–81, 2009.
- [71] HARTL, F. U. und M. HAYER-HARTL: *Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein*. Science, 295(5561):1852–8, 2002.
- [72] GAIDDON, C., M. LOKSHIN, J. AHN, T. ZHANG und C. PRIVES: *A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain*. Mol. Cell. Biol., 21(5):1874–87, 2001.
- [73] WISNIEWSKA, M., T. KARLBERG, L. LEHTIÖ, I. JOHANSSON, T. KOTENYOVA, M. MOCHE und H. SCHÜLER: *Crystal structures of the ATPase domains of four human Hsp70 isoforms: HSPA1L/Hsp70-hom, HSPA2/Hsp70-2, HSPA6/Hsp70B', and HSPA5/BiP/GRP78*. PLoS One, 5(1):e8625, 2010.
- [74] ERBSE, A., M. P. MAYER und B. BUKAU: *Mechanism of substrate recognition by Hsp70 chaperones*. Biochem. Soc. Trans., 32(Pt 4):617–21, 2004.
- [75] RYAN, M. T. und N. PFANNER: *Hsp70 proteins in protein translocation*. Adv. Prot. Chem., 59:223–42, 2002.
- [76] SCHEFF, G., C. W. STEINER, M. GRÖGER, S. WINKLER, W. GRANINGER, J. SMOLEN, Q. XU und G. STEINER: *Activation of Fas inhibits heat-induced activation of HSF1 and up-regulation of Hsp70*. FASEB J., 13(8):833–42, 1999.
- [77] MAO, H., F. LI, K. RUCHALSKI, D. D. MOSSER, J. H. SCHWARTZ, Y. WANG und S. C. BORKAN: *Hsp72 inhibits focal adhesion kinase degradation in ATP-depleted renal epithelial cells*. J. Biol. Chem., 278(20):18214–20, 2003.
- [78] RAVAGNAN, L., S. GURBUXANI, S. A. SUSIN, C. MAISSE, E. DAUGAS, N. ZAMZAMI, T. MAK, M. JÄÄTTELÄ, J. M. PENNINGER, C. GARRIDO und G. KROEMER: *Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor*. Nat. Cell Biol., 3(9):839–43, 2001.
- [79] WANG, R., J. T. KOVALCHIN, P. MUHLENKAMP und R. Y. CHANDAWARKAR: *Exogenous heat shock protein 70 binds macrophage lipid raft microdomain and stimulates phagocytosis, processing, and MHC-II presentation of antigens*. Blood, 107(4):1636–42, 2006.
- [80] CASTELLI, C., L. RIVOLTINI, F. RINI, F. BELLI, A. TESTORI, M. MAIO, V. MAZZAFERRO, J. COPPA, P. K. SRIVASTAVA und G. PARMIANI: *Heat shock proteins:*

Literaturverzeichnis

- biological functions and clinical application as personalized vaccines for human cancer.* Cancer Immunol. Immunother., 53(3):227–33, 2004.
- [81] FEIGE, U. und B. S. POLLA: *Hsp70 – a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications.* Experientia, 50(11-12):979–86, 1994.
- [82] CARRIGAN, P. E., L. A. SIKKINK, D. F. SMITH und M. RAMIREZ-ALVARADO: *Domain:domain interactions within Hop, the Hsp70/Hsp90 organizing protein, are required for protein stability and structure.* Protein Sci., 15(3):522–32, 2006.
- [83] BERTELSEN, E. B., L. CHANG, J. E. GESTWICKI und E. R. ZUIDERWEG: *Solution conformation of wild-type E. coli Hsp70 (DnaK) chaperone complexed with ADP and substrate.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 106(21):8471–6, 2009.
- [84] FLAHERTY, K. M., C. DELUCA-FLAHERTY und D. B. MCKAY: *Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein.* Nature, 346(6285):623–8, 1990.
- [85] SRIRAM, M., J. OSIPIUK, B. FREEMAN, R. MORIMOTO und A. JOACHIMIAK: *Human Hsp70 molecular chaperone binds two calcium ions within the ATPase domain.* Structure, 5(3):403–14, 1997.
- [86] ZHANG, Y. und E. R. ZUIDERWEG: *The 70-kDa heat shock protein chaperone nucleotide-binding domain in solution unveiled as a molecular machine that can reorient its functional subdomains.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 101(28):10272–7, 2004.
- [87] ZHU, X., X. ZHAO, W. F. BURKHOLDER, A. GRAGEROV, C. M. OGATA, M. E. GOTTESMAN und W. A. HENDRICKSON: *Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK.* Science, 272(5268):1606–14, 1996.
- [88] PELLECCIA, M., D. L. MONTGOMERY, S. Y. STEVENS, C. W. VANDER KOOI, H. P. FENG, L. M. GIERASCH und E. R. ZUIDERWEG: *Structural insights into substrate binding by the molecular chaperone DnaK.* Nat. Struct. Mol. Biol., 7(4):298–303, 2000.
- [89] RÜDIGER, S., L. GERMEROOTH, J. SCHNEIDER-MERGENER und B. BUKAU: *Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries.* EMBO J., 16(7):1501–7, 1997.
- [90] GENEVAUX, P., C. GEORGOPOULOS und W. L. KELLEY: *The Hsp70 chaperone machines of Escherichia coli: a paradigm for the repartition of chaperone functions.* Mol. Microbiol., 66(4):840–57, 2007.

Literaturverzeichnis

- [91] BREHMER, D., S. RÜDIGER, C. S. GASSLER, D. KLOSTERMEIER, L. PACKSCHIES, J. REINSTEIN, M. P. MAYER und B. BUKAU: *Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange*. Nat. Struct. Mol. Biol., 8(5):427–32, 2001.
- [92] TZANKOV, S., M. J. WONG, K. SHI, C. NASSIF und J. C. YOUNG: *Functional divergence between co-chaperones of Hsc70*. J. Biol. Chem., 283(40):27100–9, 2008.
- [93] YOUNG, J. C.: *Mechanisms of the Hsp70 chaperone system*. Biochem. Cell Biol., 88(2):291–300, 2010.
- [94] VOGEL, M., M. P. MAYER und B. BUKAU: *Allosteric regulation of Hsp70 chaperones involves a conserved interdomain linker*. J. Biol. Chem., 281(50):38705–11, 2006.
- [95] JIANG, J., K. PRASAD, E. M. LAFER und R. SOUSA: *Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone*. Mol. Cell, 20(4):513–24, 2005.
- [96] VOGEL, M., B. BUKAU und M. P. MAYER: *Allosteric regulation of Hsp70 chaperones by a proline switch*. Mol. Cell, 21(3):359–67, 2006.
- [97] BHATTACHARYA, A., A. V. KUROCHKIN, G. N. YIP, Y. ZHANG, E. B. BERTELSEN und E. R. ZUIDERWEG: *Allostery in Hsp70 chaperones is transduced by subdomain rotations*. J. Mol. Biol., 388(3):475–90, 2009.
- [98] MAESTRE-MARTÍNEZ, M.: *Structural study of human FKBP38 and its interaction with calmodulin by NMR and computational methods*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2008.
- [99] BATEY, R. T., M. INADA, E. KUJAWINSKI, J. D. PUGLISI und J. R. WILLIAMSON: *Preparation of isotopically labeled ribonucleotides for multidimensional NMR spectroscopy of RNA*. Nucleic Acids Res., 20(17):4515–23, 1992.
- [100] LAEMMLI, U. K.: *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 227(5259):680–5, 1970.
- [101] HEUKESHOVEN, J. und R. DERNICK: *Increased sensitivity for Coomassie staining of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using PhastSystem development unit*. Electrophoresis, 9(1):60–1, 1988.
- [102] HEUKESHOVEN, J. und R. DERNICK: *Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem development unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels*. Electrophoresis, 9(1):28–32, 1988.

Literaturverzeichnis

- [103] GILL, S. C. und P. H. VON HIPPEL: *Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data*. Anal. Biochem., 182(2):319–26, 1989.
- [104] HO, S. N., H. D. HUNT, R. M. HORTON, J. K. PULLEN und L. R. PEASE: *Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction*. Gene, 77(1):51–9, 1989.
- [105] MULDER, F. A., D. SCHIPPER, R. BOTT und R. BOELEN: *Altered flexibility in the substrate-binding site of related native and engineered high-alkaline Bacillus subtilisins*. J. Mol. Biol., 292(1):111–23, 1999.
- [106] ZERBE, O.: *BioNMR in drug research*, Band 16. Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
- [107] KIM, K. M., C. D. GIEDT, G. BASAÑEZ, J. W. O'NEILL, J. J. HILL, Y. H. HAN, S. P. TZUNG, J. ZIMMERBERG, D. M. HOCKENBERY und K. Y. ZHANG: *Biophysical characterization of recombinant human Bcl-2 and its interactions with an inhibitory ligand, antimycin A*. Biochemistry, 40(16):4911–22, 2001.
- [108] ODA, Y., H. NAKAMURA, S. KANAYA und M. IKEHARA: *Binding of metal ions to E. coli RNase HI observed by ^1H - ^{15}N heteronuclear 2D NMR*. J. Biomol. NMR, 1(3):247–55, 1991.
- [109] BERTINI, I., C. LUCHINAT und G. PARIGI: *Magnetic susceptibility in paramagnetic NMR*. Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., 40(3):249–273, 2002.
- [110] WISHART, D. S. und B. D. SYKES: *The ^{13}C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ^{13}C chemical-shift data*. J. Biomol. NMR, 4(2):171–80, 1994.
- [111] SCHENDEL, S. L., Z. XIE, M. O. MONTAL, S. MATSUYAMA, M. MONTAL und J. C. REED: *Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 94(10):5113–8, 1997.
- [112] SWAIN, J. F., E. G. SCHULZ und L. M. GIERASCH: *Direct comparison of a stable isolated Hsp70 substrate-binding domain in the empty and substrate-bound states*. J. Biol. Chem., 281(3):1605–11, 2006.
- [113] MAESTRE-MARTÍNEZ, M., K. HAUPT, F. EDLICH, P. NEUMANN, C. PARTHIER, M. T. STUBBS, G. FISCHER und C. LÜCKE: *A charge-sensitive loop in the FKBP38 catalytic domain modulates Bcl-2 binding*. J. Mol. Recognit., DOI: 10.1002/jmr.1020, 2011.
- [114] HABER-POHLMEIER, S., K. ABARCA-HEIDEMANN, H. G. KÖRSCHEN, H. K. DHIMAN, J. HEBERLE, H. SCHWALBE, J. KLEIN-SEETHARAMAN, U. B. KAUPP

- und A. POHLMEIER: *Binding of Ca²⁺ to glutamic acid-rich polypeptides from the rod outer segment*. *Biophys. J.*, 92(9):3207–14, 2007.
- [115] BATRA-SAFFERLING, R., K. ABARCA-HEIDEMANN, H. G. KÖRSCHEN, C. TZIATZIOS, M. STOLDT, I. BUDYAK, D. WILLBOLD, H. SCHWALBE, J. KLEIN-SEETHARAMAN und U. B. KAUPP: *Glutamic acid-rich proteins of rod photoreceptors are natively unfolded*. *J. Biol. Chem.*, 281(3):1449–60, 2006.
- [116] KANG, C. B., H. YE, S. VIVEKANANDAN, B. SIMON, M. SATTLER und H. S. YOON: *Backbone ¹H, ¹³C, and ¹⁵N resonance assignments of the N-terminal domain of FKBP38 (FKBP38NTD)*. *J. Biomol. NMR*, 36 Suppl 1:37, 2006.
- [117] PECHSTEIN, A.: *Untersuchungen der Interaktion zwischen hFKBP38 und dem anti-apoptotischen Protein Bcl-2*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2004.
- [118] WISHART, D. S., B. D. SYKES und F. M. RICHARDS: *The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy*. *Biochemistry*, 31(6):1647–51, 1992.
- [119] KUBONIWA, H., N. TJANDRA, S. GRZESIEK, H. REN, C. B. KLEE und A. BAX: *Solution structure of calcium-free calmodulin*. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2(9):768–76, 1995.
- [120] GANDRILLE, S., M. AIACH, D. A. LANE, D. VIDAUD, P. MOLHO-SABATIER, R. CASO, P. DE MOERLOOSE, J. N. FIESSINGER und E. CLAUSER: *Important role of arginine 129 in heparin-binding site of antithrombin III. Identification of a novel mutation arginine 129 to glutamine*. *J. Biol. Chem.*, 265(31):18997–9001, 1990.
- [121] GOWARD, C. R., J. MILLER, D. J. NICHOLLS, L. I. IRONS, M. D. SCAWEN, R. O'BRIEN und B. Z. CHOWDHRY: *A single amino acid mutation enhances the thermal stability of Escherichia coli malate dehydrogenase*. *Eur. J. Biochem.*, 224(1):249–55, 1994.
- [122] PETROS, A. M., A. MEDEK, D. G. NETTESHEIM, D. H. KIM, H. S. YOON, K. SWIFT, E. D. MATAYOSHI, T. OLTERSDORF und S. W. FESIK: *Solution structure of the antiapoptotic protein Bcl-2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98(6):3012–7, 2001.
- [123] PORTIER, B. P. und G. TAGLIALATELA: *Bcl-2 localized at the nuclear compartment induces apoptosis after transient overexpression*. *J. Biol. Chem.*, 281(52):40493–502, 2006.

Literaturverzeichnis

- [124] OTVOS, L. JR.: *Antibacterial peptides isolated from insects*. J. Pept. Sci., 6(10):497–511, 2000.
- [125] KRAGOL, G., S. LOVAS, G. VARADI, B. A. CONDIE, R. HOFFMANN und L. JR. OTVOS: *The antibacterial peptide pyrrocoricin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding*. Biochemistry, 40(10):3016–26, 2001.
- [126] KRAGOL, G., R. HOFFMANN, M. A. CHATTERGOON, S. LOVAS, M. CUDIC, P. BULET, B. A. CONDIE, K. J. ROSENGREN, L. J. MONTANER und L. JR. OTVOS: *Identification of crucial residues for the antibacterial activity of the proline-rich peptide, pyrrocoricin*. Eur. J. Biochem., 269(17):4226–37, 2002.
- [127] LIEBSCHER, M., K. HAUPT, C. YU, G. JAHREIS, C. LÜCKE und C. SCHIENE-FISCHER: *Rational design of novel peptidic DnaK ligands*. ChemBioChem, 11(12):1727–37, 2010.
- [128] SCHIENE-FISCHER, C., J. HABAZETTL, F. X. SCHMID und G. FISCHER: *The Hsp70 chaperone DnaK is a secondary amide peptide bond cis-trans isomerase*. Nat. Struct. Mol. Biol., 9(6):419–24, 2002.
- [129] SZABO, A., T. LANGER, H. SCHRÖDER, J. FLANAGAN, B. BUKAU und F. U. HARTL: *The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the Escherichia coli Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91(22):10345–9, 1994.
- [130] WANG, H., A. V. KUROCHKIN, Y. PANG, W. HU, G. C. FLYNN und E. R. ZUIDERWEG: *NMR solution structure of the 21kDa chaperone protein DnaK substrate binding domain: a preview of chaperone-protein interaction*. Biochemistry, 37(22):7929–40, 1998.
- [131] LIEBSCHER, M. und A. ROUJEINIKOVA: *Allosteric coupling between the lid and interdomain linker in DnaK revealed by inhibitor binding studies*. J. Bacteriol., 191(5):1456–62, 2009.

Abbildungsverzeichnis

1.1.	Darstellung des G-Protein-Komplexes.	4
1.2.	Darstellung des P22 Arc Repressors.	5
1.3.	Darstellung des FKBP12/FK506-Komplexes.	8
1.4.	Darstellung der PPIase-Domäne des FKBP38.	9
1.5.	Darstellung der Domänenstrukturen einiger FKBP38s.	9
1.6.	Interaktionspartner der FKBP38-Domänen.	12
1.7.	Die Hsp70-Strukturelemente.	16
1.8.	Der ATPase-Zyklus von Hsp70.	19
2.1.	SDS-Gel zur Aufreinigung von Bcl-2 ¹⁻²¹¹	23
3.1.	Ca ²⁺ - sowie Mg ²⁺ -Titrationskurven von FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³	37
3.2.	Ca ²⁺ -Titrationskurven aller FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ -Varianten.	38
3.3.	Darstellung der FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ -Struktur: die Reste K62, D92, D94, D100 und die Potentialoberfläche.	40
3.4.	Titration von FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ mit K ⁺ und La ³⁺	42
3.5.	Salztitrationskurven der β5-α1-Loop-Reste.	43
3.6.	Salztitrationskurven der β5-α1-Loop-Reste (gleiche Achseneinteilung).	44
3.7.	Darstellung des FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ /Terbium-Komplexes.	48
3.8.	Interaktion zwischen ¹⁵ N-markiertem FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ und Bcl-2 ¹¹⁹⁻¹³¹	50
3.9.	Veränderung des C93-Amidsignals.	51
3.10.	Interaktion zwischen ¹⁵ N-markiertem FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ und Peptidvarianten.	52
3.11.	Wechselwirkung zwischen NPep* und FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ bzw. FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ D92N/D94N.	53
3.12.	¹ H/ ¹⁵ N-HSQC-Spektren der teilweise ¹⁵ N-markierten Peptide.	54
3.13.	Darstellung der Bcl-2-Struktur.	55
3.14.	Wechselwirkung zwischen ¹⁵ N-markiertem FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ und Bcl-2 ¹⁻²¹¹ bzw. Bcl-2 ¹⁻²¹¹ R127Q/R129Q.	57
3.15.	Interaktion zwischen ¹⁵ N-markiertem FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ (T89 bis I96) und den Bcl-2-Varianten.	58
3.16.	Einfluss von apo-CaM auf den FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ -Bcl-2 ¹⁻²¹¹ -Komplex.	59
3.17.	Interaktion von DnaK ³⁸⁷⁻⁵⁵² mit den Peptiden 1' , 1 , 2 und 3	63
3.18.	Darstellung der DnaK ³⁸⁷⁻⁵⁵² -Struktur.	64
3.19.	Vergleich der Interaktion zwischen ¹⁵ N-markiertem DnaK ³⁸⁷⁻⁵⁵² und den Peptiden 1 bzw. NR	65
3.20.	Röntgenstruktur des DnaK-Peptid 1 -Komplexes.	66
A.1.	Einfluss von Ca ²⁺ auf FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ in salzfreiem und salzhaltigem Puffer.	x

Abbildungsverzeichnis

A.2.	$^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von DnaK ³⁸⁷⁻⁵⁵²	xi
A.3.	$^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von DnaK ³⁸⁷⁻⁵⁵² (zentraler Bereich).	xii

Tabellenverzeichnis

1.1. Klassifizierung von Protein-Protein-Interaktionen.	3
1.2. Funktionen der Hsp70-Proteinfamilie.	15
2.1. Mutageneseprimer und Template für die FKBP38-Mutanten.	24
2.2. Ca^{2+} -Titration der FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ -Mutanten.	26
2.3. Salztitrations des ¹⁵ N-markierten FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³	26
2.4. Liste der untersuchten Bcl-2 ¹¹⁹⁻¹³¹ -Peptide.	29
2.5. Zusammenstellung der NMR-Experimente mit DnaK ³⁸⁷⁻⁵⁵²	32
2.6. Informationen zu den verwendeten Proteinkonstrukten.	35
3.1. Einfluss von Ca^{2+} auf die V95 - und I96-Methylresonanzen der FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ - Varianten.	39
3.2. Ca^{2+} -Koordination und Salzbrückenausbildung der FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ -Varianten.	41
3.3. Gegenüberstellung von Ionengröße und $\overline{K_d}$	45
3.4. Einfluss der Terbiumzugabe auf die FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³ -Reste.	47
3.5. CSI des Bcl-2 ¹¹⁹⁻¹³¹ -Peptids.	49
3.6. Zusammenstellung der im Komplex mit DnaK ³⁸⁷⁻⁵⁵² untersuchten Peptide.	61
B.1. Ergebnisse der Salztitrations des FKBP38 ³⁵⁻¹⁵³	xiv
B.2. Resonanzzuordnung des Bcl-2 ¹¹⁹⁻¹³¹ -Peptids.	xv
B.3. Resonanzzuordnung des DnaK ³⁸⁷⁻⁵⁵²	xvi

Anhang A.

Abbildungen

Anhang A. Abbildungen

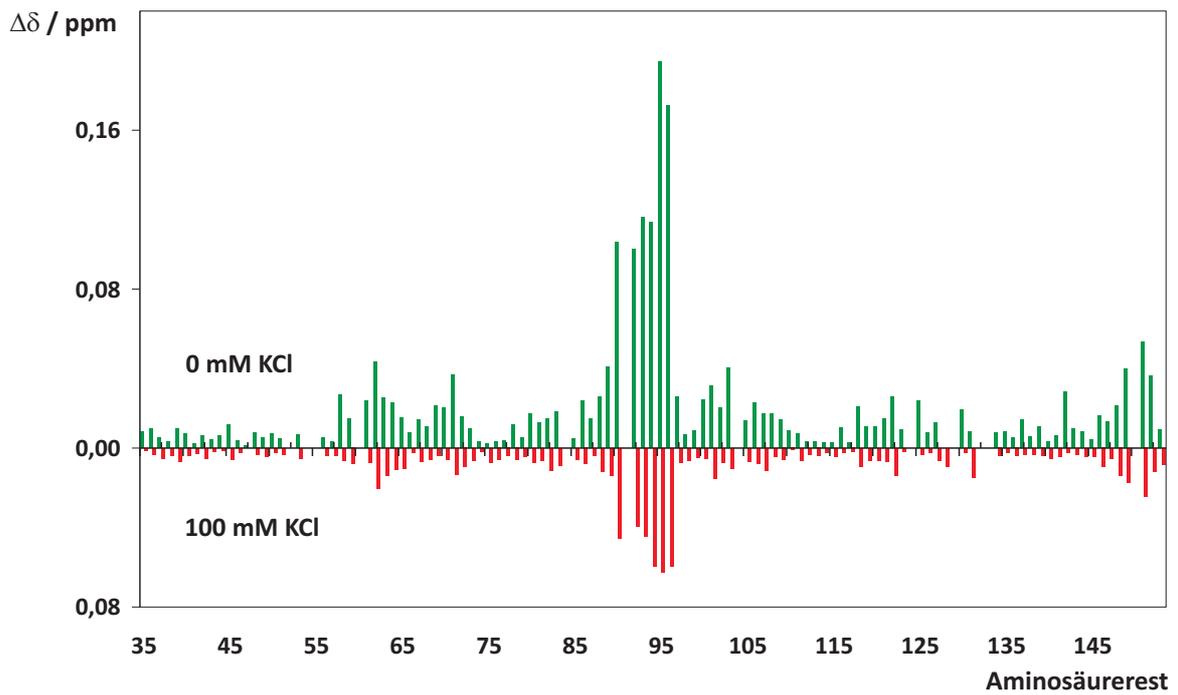


Abbildung A.1.: Änderung der chemischen Verschiebungswerte in ^{15}N -markiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³ aufgrund der Zugabe eines 18fachen Ca^{2+} -Überschusses in salzfreiem (10 mM MES, pH 6,8; grüne Balken) bzw. salzhaltigem Puffer (10 mM MES, 100 mM KCl, pH 6,8; rote Balken).

Anhang A. Abbildungen

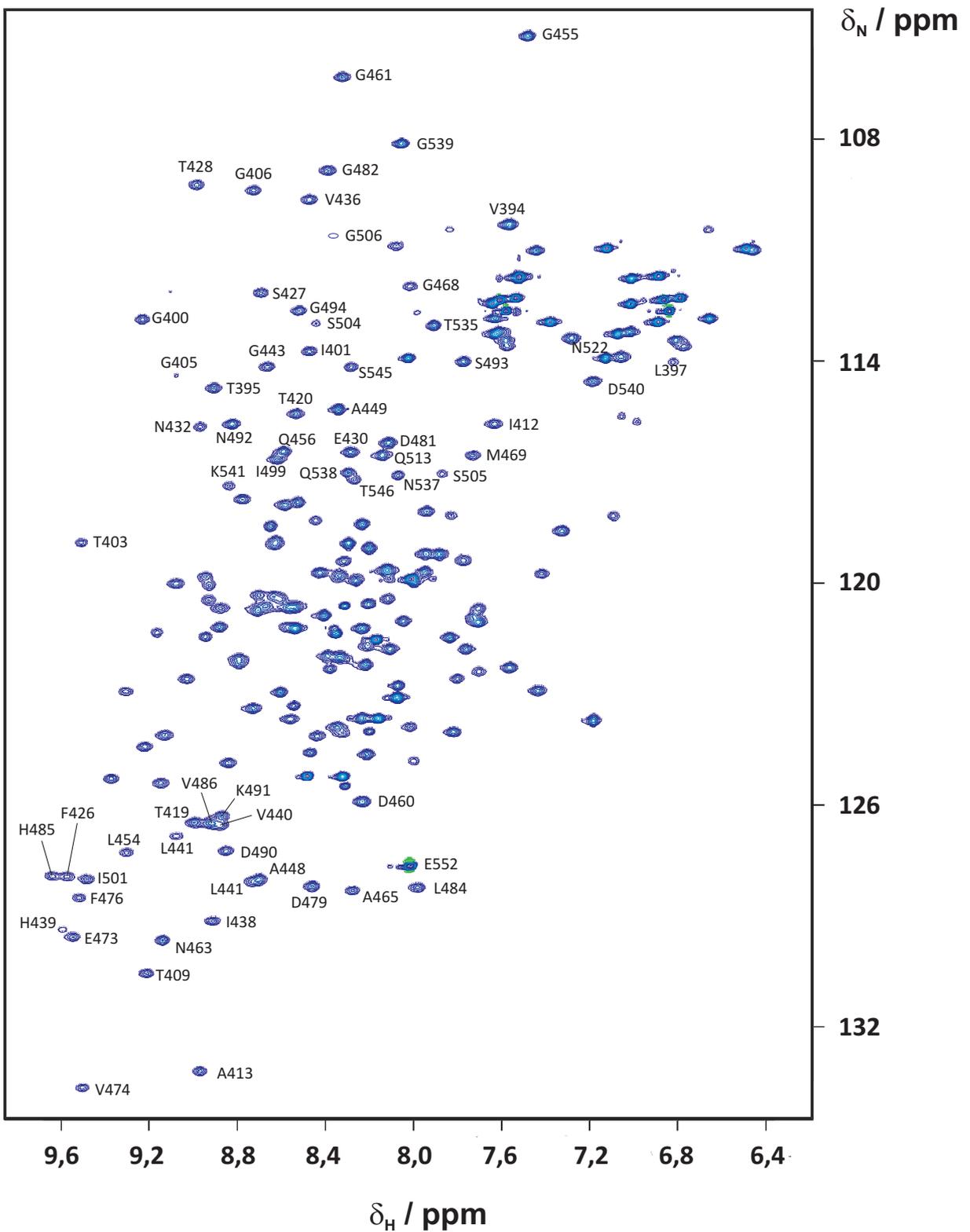


Abbildung A.2.: $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² in 20 mM Phosphatpuffer (0,05 %, pH 7,0) mit Beschriftung der zum Proteinerückgrat gehörenden Signale. Die Beschriftung des zentralen Bereiches ist in Abbildung A.3 gegeben.

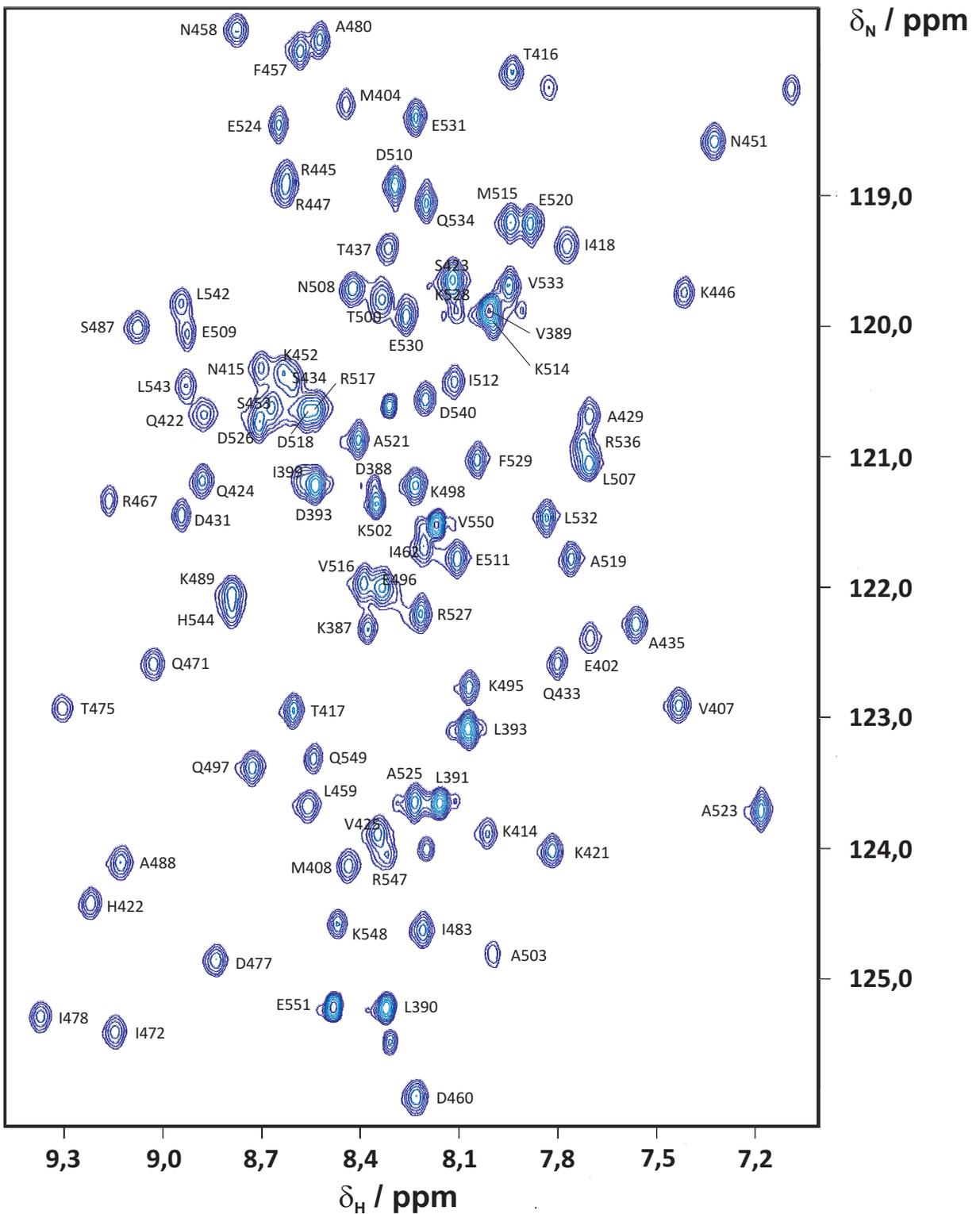


Abbildung A.3.: Zentraler Bereich des $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums von DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² in 20 mM Phosphatpuffer (0,05 %, pH 7,0) mit Beschriftung der Signale.

Anhang B.

Tabellen

Anhang B. Tabellen

Tabelle B.1.: Zusammenfassung der berechneten Größen ($\overline{K_d}$, X , K_d , $(\delta_b - \delta_f)$) der Titrationsen von ^{15}N -markiertem FKBP38³⁵⁻¹⁵³ mit K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} und La^{3+} -Ionen.

	L90	D92	C93	D94	V95	I96
$\overline{K_d} (\text{K}^+) = 100,4 \pm 58,0 \text{ mM}$						
X	99,12	192,28	58,38	147,46	50,93	57,48
$(\delta_b - \delta_f) / \text{ppm}$	0,13	0,09	0,15	0,18	0,22	0,21
K_d / mM	98,62	191,78	57,88	146,96	50,43	56,98
$\overline{K_d} (\text{Mg}^{2+}) = 1,96 \pm 0,47 \text{ mM}$						
X	4,80	6,09	3,30	5,47	3,99	5,42
$(\delta_b - \delta_f) / \text{ppm}$	0,15	0,18	0,16	0,18	0,29	0,27
K_d / mM	1,94	2,52	1,26	2,24	1,57	2,21
$\overline{K_d} (\text{Ca}^{2+}) = 0,66 \pm 0,30 \text{ mM}$						
X	2,44	2,39	0,86	2,56	1,48	2,11
$(\delta_b - \delta_f) / \text{ppm}$	0,16	0,15	0,16	0,19	0,26	0,24
K_d / mM	0,87	0,85	0,16	0,93	0,44	0,73
$\overline{K_d} (\text{La}^{3+}) = 0,35 \pm 0,18 \text{ mM}$						
X	1,30	1,47	0,31	1,26	0,91	0,86
$(\delta_b - \delta_f) / \text{ppm}$	0,42	0,39	0,17	0,62	0,46	0,39
K_d / mM	0,48	0,58	0,11	0,46	0,24	0,21

Anhang B. Tabellen

Tabelle B.2.: Zuordnung der ^{15}N -, ^1H - und ^{13}C -Resonanzen des Bcl-2 $^{119-131}$ -Peptids in 10 mM HEPES (pH 7,0) bei 283 K. Alle Werte sind in ppm angegeben.

Rest	N	H _N	H _α	H _β	andere H	C _α	C _β	andere C
L119			3,71	1,54/1,51	H _γ 1,55 H _δ 0,91/0,90	55,2	44,4	C _γ 26,8 C _δ 24,8/24,1
H120			4,69	3,08/3,02	H _{δ2} 6,96 H _{ε1} 7,71	56,3	31,3	C _{δ2} 119,6 C _{ε1} 138,8
L121	125,1	8,48	4,42	1,63/1,54	H _γ 1,55 H _δ 0,93/0,86	54,9	42,5	C _γ 26,8 C _δ 24,8/23,4
T122			4,6	4,2	H _{γ2} 1,24	59,7	69,7	C _{γ2} 21,4
P123 ^a			4,37	2,24/1,76	H _γ 1,95 H _δ 3,83/3,68	63,4	32,1	C _γ 27,4 C _δ 51,1
F124	120,7	8,42	4,61	3,1	H _δ 7,25 H _ε 7,30 H _ζ 7,34	58,2	39,5	C _δ 131,8 C _ε 129,9 C _ζ 131,5
T125		8,01	4,24	4,14	H _{γ2} 1,18	67,7	70,1	C _{γ2} 21,6
A126	126,9	8,36	4,25	1,41		52,6	19,1	
R127	120,3	8,36	4,31	1,87/1,78	H _γ 1,67/1,64 H _δ 3,19	56,3	30,8	C _γ 27,1 C _δ 43,3
G128	110,1	8,47	3,93			45,2		
R129	120,9	8,26	4,23	1,66	H _γ 1,42 H _δ 3,11	56,4	30,7	C _γ 26,9 C _δ 43,3
F130	121,7	8,44	4,65	3,18/3,04	H _δ 7,27 H _ε 7,30 H _ζ 7,35	57,5	39,5	C _δ 131,9 C _ε 129,9 C _ζ 131,5
A131	127,4	8,3	4,23	1,35		52,4	19,4	

^aDer P123-Rest liegt in der *trans*-Konformation vor.

Anhang B. Tabellen

Tabelle B.3.: Zuordnung der ^{15}N -, $^1\text{H}_\text{N}$ -, $^{13}\text{C}_\alpha$ - und $^{13}\text{C}_\beta$ -Resonanzen von DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² sowie DnaK³⁸⁷⁻⁵⁵² im Komplex mit **1** bzw. **NR** in 20 mM Phosphatpuffer (0,05 %, pH 7,0) bei 298 K. Alle Werte sind in ppm angegeben, nz - nicht zugeordnet.

Rest	DnaK				DnaK-1				DnaK-NR			
	N	H _N	C _α	C _β	N	H _N	C _α	C _β	N	H _N	C _α	C _β
K387	122,2	8,3	56,4	33,1	122,2	8,4	56,4	nz	122,2	8,4	56,6	33,1
D388	121,2	8,3	54,5	41,1	121,3	8,3	54,7	nz	121,2	8,3	54,8	41,2
V389	119,8	8,0	62,4	32,8	119,8	8,0	62,5	nz	119,8	8,0	62,7	32,7
L390	125,3	8,3	55,1	42,2	126,2	8,4	56,0	42,4	125,2	8,3	55,1	42,3
L391	123,7	8,1	54,8	42,2	123,4	8,2	54,9	42,6	123,6	8,1	54,9	42,2
L392	123,1	8,0	54,7	42,8	123,1	8,1	54,8	42,8	123,0	8,0	54,9	42,9
D393	121,2	8,5	54,4	41,1	121,5	8,6	54,6	41,0	121,1	8,5	54,6	41,2
V394	110,3	7,5	57,7	36,6	110,2	7,5	57,8	36,6	110,2	7,5	57,7	36,6
T395	114,7	8,9	58,5	69,0	115,0	8,9	59,0	69,2	114,6	8,9	59,1	69,2
P396	-	-	nz	nz	-	-	nz	nz	-	-	nz	nz
L397	113,8	7,0	52,5	49,2	113,8	7,0	52,6	49,3	113,9	7,0	52,6	nz
S398	125,5	11,6	60,3	62,7	125,4	11,5	60,7	62,9	125,5	11,6	60,7	62,9
L399	121,2	8,5	52,5	47,7	121,1	8,5	52,6	47,7	121,1	8,5	52,6	47,8
G400	112,8	9,2	46,5	-	112,7	9,2	46,5	-	112,7	9,2	46,6	-
I401	113,6	8,4	57,7	42,5	115,0	8,4	57,9	43,1	113,7	8,5	57,8	42,7
E402	122,4	7,7	55,5	30,9	123,3	7,7	55,5	30,6	122,4	7,5	55,3	31,0
T403	118,8	8,5	60,3	71,0	116,3	9,3	60,2	71,2	118,7	9,4	60,9	71,3
M404	118,3	8,4	57,9	33,2	118,3	8,4	57,4	33,0	117,8	8,6	56,6	33,7
G405	114,4	9,1	44,6	-	113,8	9,1	44,8	-	114,8	9,1	44,5	-
G406	109,3	8,7	46,4	-	109,0	8,7	46,4	-	109,7	8,7	46,4	-
V407	122,8	7,4	60,9	35,2	122,8	7,4	61,2	35,2	122,2	7,5	61,1	35,0
M408	124,1	8,4	55,8	33,2	123,8	8,3	55,5	33,5	123,8	8,4	55,4	33,4
T409	130,5	8,2	62,5	68,9	130,4	9,2	62,9	69,1	131,5	9,2	62,7	69,5
T410	126,4	9,0	65,9	68,9	126,3	9,0	66,0	69,2	126,5	8,9	66,0	69,2
L411	126,8	9,0	56,4	43,7	126,8	9,1	56,6	43,8	126,9	9,0	56,6	43,5
I412	115,7	7,6	59,9	40,7	115,7	7,6	60,1	40,7	115,6	7,6	60,1	40,6
A413	133,2	8,9	52,6	19,6	133,1	8,9	52,7	19,5	133,1	8,9	52,7	19,5
K414	123,8	8,0	57,7	32,5	123,8	8,0	57,8	32,5	123,8	8,0	57,8	32,5
N415	120,2	8,7	54,3	37,2	120,2	8,7	54,7	37,1	120,4	8,7	54,7	37,1
T416	118,0	7,9	63,9	69,2	118,0	7,9	64,0	69,5	117,9	7,9	64,0	69,5
T417	122,9	8,6	63,7	69,4	123,1	8,6	64,0	69,7	122,9	8,6	63,9	69,8
I418	119,5	7,7	58,1	39,0	119,5	7,7	58,4	39,0	119,3	7,7	58,4	39,0
P419	-	-	nz	nz	-	-	nz	nz	-	-	nz	nz
T420	115,4	8,5	62,1	68,6	115,3	8,5	62,1	68,7	115,3	8,5	62,3	68,7
K421	124,0	7,7	55,4	35,8	124,1	7,8	55,4	35,8	123,7	7,8	55,4	36,0
H422	124,3	9,2	56,0	35,3	124,2	9,2	56,2	35,0	124,2	9,2	56,6	35,6
S423	119,6	8,1	56,6	66,7	121,7	8,1	56,7	66,9	119,8	8,0	56,8	66,7
Q424	121,1	8,9	54,7	34,1	123,0	9,0	54,8	34,2	121,9	8,9	55,2	33,0
V425	123,8	8,3	62,6	32,4	125,7	8,4	63,0	32,5	124,5	8,4	62,7	32,5
F426	127,9	9,5	56,5	43,5	127,9	9,5	56,7	43,5	127,6	9,4	57,0	43,8

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Anhang B. Tabellen

(Fortsetzung der Tabelle B.3 von der vorherigen Seite)

Rest	DnaK				DnaK-1				DnaK-NR			
	N	H _N	C _α	C _β	N	H _N	C _α	C _β	N	H _N	C _α	C _β
S427	112,1	8,7	55,4	64,4	112,1	8,7	55,5	64,6	112,4	8,5	55,4	64,2
T428	109,1	9,0	59,8	68,8	109,1	9,0	60,0	69,2	109,3	9,0	59,9	69,1
A429	120,7	7,7	53,3	21,7	120,6	7,6	53,3	21,6	121,0	7,6	53,8	21,5
E430	116,4	8,3	53,9	33,5	116,9	8,6	54,1	33,4	116,2	8,3	54,1	33,3
D431	121,4	8,9	55,4	40,9	121,5	8,9	55,5	40,9	121,5	9,0	55,5	40,9
N432	115,7	8,9	55,4	36,4	115,7	9,0	55,4	36,4	8,9	40,9	55,4	36,4
Q433	122,6	7,8	57,4	30,1	122,3	7,8	57,5	29,8	122,7	7,7	57,5	30,4
S434	120,4	8,6	59,0	64,8	120,8	8,5	59,1	65,0	120,4	8,6	59,2	65,1
A435	122,2	7,5	50,8	23,8	122,4	7,5	50,9	23,7	122,4	7,5	50,8	23,6
V436	109,5	9,5	58,9	35,3	110,8	8,6	58,3	35,1	109,3	8,4	59,0	35,1
T437	119,5	8,3	62,0	70,3	118,1	7,8	61,2	71,1	119,6	8,5	62,3	69,7
I438	129,1	8,9	58,3	34,1	128,8	8,8	59,0	34,3	130,2	9,0	58,8	34,0
H439	129,3	9,6	52,4	30,5	129,2	9,5	52,4	30,5	129,6	9,5	52,6	30,6
V440	126,5	8,8	63,1	32,0	126,5	8,9	63,4	31,8	126,3	8,8	63,3	31,9
L441	128,1	8,7	53,0	48,3	128,1	8,7	53,1	48,2	128,1	8,7	53,1	48,2
Q442	120,6	8,8	53,2	34,2	120,6	8,9	53,3	34,2	120,6	8,9	53,3	34,2
G443	114,1	8,6	44,3	-	114,1	8,6	44,3	-	114,1	8,6	44,3	-
E444	110,7	8,0	53,5	31,1	110,8	8,0	53,8	31,1	110,8	8,1	53,8	30,9
R445	118,8	8,6	53,0	27,9	118,8	8,6	53,0	27,9	118,9	8,6	53,0	27,8
K446	119,8	7,4	56,5	33,3	119,7	7,4	56,7	33,3	120,0	7,5	57,0	33,3
R447	118,8	8,6	55,5	29,3	119,1	8,7	55,7	29,3	119,3	8,7	55,6	29,4
A448	127,9	8,7	56,2	18,3	128,0	8,7	56,6	18,2	128,0	8,7	56,6	18,2
A449	115,2	8,3	53,6	18,8	115,2	8,3	53,9	18,6	115,2	8,3	53,9	18,6
D450	114,5	7,2	54,4	41,3	114,5	7,2	54,5	41,3	114,5	7,1	54,6	41,3
N451	118,6	7,3	52,2	41,8	118,5	7,3	52,4	41,8	7,3	52,4	52,4	41,8
K452	120,5	8,6	56,0	33,9	120,3	8,6	56,1	33,9	120,8	8,6	56,0	34,0
S453	120,5	8,6	57,9	62,0	120,6	8,7	58,4	62,1	120,7	8,7	58,7	62,0
L454	127,2	9,3	54,5	43,2	127,1	9,2	54,7	43,3	127,2	9,3	54,7	43,2
G455	105,2	7,4	45,0	-	105,0	7,4	45,2	-	105,1	7,5	45,2	-
Q456	116,4	8,6	54,6	33,1	116,9	8,6	54,8	33,0	116,4	8,5	54,7	33,0
F457	117,9	8,6	56,2	40,4	118,4	8,5	56,3	40,5	117,8	8,6	56,5	40,4
N458	117,6	8,7	51,2	40,9	116,7	8,7	51,2	40,6	117,9	8,7	51,6	41,3
L459	123,6	8,5	54,6	44,3	123,2	8,5	54,7	44,8	123,9	8,5	54,7	44,5
D460	125,8	8,2	52,2	43,2	125,9	8,2	52,1	42,9	125,8	8,2	52,2	43,0
G461	106,2	8,3	46,2	-	106,0	8,3	46,2	-	106,0	8,2	46,2	-
I462	121,6	8,2	61,5	37,7	121,6	8,2	61,6	37,9	121,9	8,2	61,7	37,9
N463	129,6	9,1	52,4	37,7	129,9	9,1	52,5	37,7	129,7	9,1	52,5	37,7
P464	-	-	nz	nz	-	-	nz	nz	-	-	nz	nz
A465	128,3	8,2	50,7	19,9	128,2	8,2	50,8	19,8	128,2	8,2	50,7	19,9
P466	-	-	nz	nz	-	-	nz	nz	-	-	nz	nz
R467	121,2	9,1	56,1	29,8	121,3	9,1	56,4	30,0	121,5	9,2	56,4	30,0
G468	111,9	8,0	46,2	-	111,3	7,7	46,5	-	111,6	8,0	46,2	-
M469	116,5	7,7	56,9	30,4	116,4	7,7	57,0	30,3	116,9	7,7	57,0	30,3

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Anhang B. Tabellen

(Fortsetzung der Tabelle B.3 von der vorherigen Seite)

Rest	DnaK				DnaK-1				DnaK-NR			
	N	H _N	C _α	C _β	N	H _N	C _α	C _β	N	H _N	C _α	C _β
P470	-	-	nz	nz	-	-	nz	nz	-	-	nz	nz
Q471	122,6	9,0	54,7	31,2	122,5	9,0	54,9	31,1	122,1	9,0	55,2	31,2
I472	125,5	9,1	58,3	37,7	125,3	9,1	58,5	37,9	125,2	9,0	58,5	38,0
E473	129,6	9,5	56,3	32,3	129,6	9,5	56,4	32,2	129,6	9,5	56,1	32,3
V474	133,4	9,5	61,6	33,2	133,5	9,5	61,6	33,2	133,4	9,5	61,5	33,5
T475	122,9	9,3	61,6	70,8	122,8	9,3	61,7	71,1	122,8	9,3	61,7	71,1
F476	128,5	9,5	55,3	40,9	128,4	8,5	55,3	41,0	128,4	9,5	55,4	41,0
D477	124,8	8,8	53,0	44,6	124,7	8,8	53,1	44,6	124,8	8,8	53,1	44,6
I478	125,3	9,3	60,1	39,9	125,4	9,3	60,4	39,9	125,1	9,3	60,3	39,8
D479	128,1	8,4	53,0	42,5	128,1	8,4	53,1	42,6	128,1	8,4	53,0	42,5
A480	117,8	8,5	54,4	18,6	117,7	8,5	54,6	18,5	117,6	8,5	54,6	18,5
D481	116,2	8,1	54,2	41,6	111,1	8,1	54,4	41,6	116,1	8,1	54,5	41,7
G482	108,8	8,4	45,5	-	108,8	8,4	45,6	-	108,8	8,4	45,6	-
I483	124,6	8,2	61,5	35,5	124,4	8,2	61,6	35,5	124,5	8,2	61,5	35,6
L484	128,2	7,9	53,6	43,5	128,4	8,0	53,8	43,5	128,1	7,9	53,8	43,7
H485	127,9	9,6	54,6	30,8	127,6	9,6	54,6	30,3	127,9	9,6	54,7	31,1
V486	126,5	8,9	60,8	33,6	126,3	8,9	61,1	33,6	126,3	8,9	61,1	33,5
S487	120,0	9,0	55,8	66,5	120,0	9,0	56,2	66,7	119,9	9,1	56,1	66,7
A488	124,1	9,1	50,4	22,9	124,0	9,1	50,5	22,9	124,1	9,1	50,5	22,9
K489	122,0	8,8	53,8	37,7	121,9	8,8	54,1	37,6	121,9	8,8	54,1	37,6
D490	127,2	8,8	53,1	41,5	127,2	8,8	53,1	41,5	127,1	8,8	53,0	41,5
K491	126,2	8,9	59,0	32,0	126,1	8,8	59,2	31,9	125,9	8,8	59,1	31,8
N492	115,7	8,8	55,6	39,9	115,7	8,8	55,8	39,9	115,7	8,8	55,8	39,9
S493	113,9	7,7	59,0	65,0	114,0	7,7	59,2	65,2	114,0	7,8	59,2	65,2
G494	112,6	8,5	45,6	-	112,5	8,5	45,7	-	112,6	8,5	45,7	-
K495	122,8	8,0	57,7	32,8	122,8	8,1	57,8	32,8	122,8	8,1	57,9	32,8
E496	121,9	8,3	54,4	34,8	122,3	8,3	54,5	34,7	122,1	8,3	54,5	34,7
Q497	123,4	8,7	54,4	33,4	123,1	8,7	54,6	33,1	123,4	8,7	54,6	34,7
K498	121,2	8,2	54,7	36,6	121,0	8,2	54,9	36,6	121,4	8,2	54,9	36,5
I499	116,6	8,6	60,5	42,6	116,3	8,6	60,8	42,7	116,6	8,6	60,8	42,6
T500	119,6	8,3	62,0	70,7	119,8	8,3	62,2	70,9	119,6	8,3	62,2	71,1
I501	128,1	9,5	59,8	41,1	128,0	9,4	59,9	41,1	127,9	9,4	59,9	41,2
K502	121,2	8,3	56,6	nz	121,3	8,3	56,3	nz	119,5	7,9	56,6	32,0
A503	124,8	8,0	53,8	18,9	124,7	8,0	54,1	18,9	124,8	8,0	54,1	18,8
S504	112,9	8,4	59,3	63,1	112,9	8,4	59,3	63,3	112,9	8,4	59,3	63,3
S505	117,0	7,8	59,0	63,5	117,0	7,9	59,1	63,7	117,0	7,9	59,1	63,7
G506	110,7	8,4	45,7	-	110,6	8,4	45,7	-	110,8	8,4	45,8	-
L507	121,0	7,7	54,7	43,4	121,0	7,7	54,7	43,4	120,9	7,7	54,7	43,4
N508	119,7	8,4	51,8	39,8	119,8	8,5	52,0	39,8	119,6	8,4	52,0	39,7
E509	120,0	8,9	60,2	29,8	120,0	8,9	60,7	29,8	120,0	8,9	60,5	29,8
D510	118,9	8,3	57,4	40,4	118,9	8,3	57,4	40,4	119,1	8,3	57,3	40,5
E511	121,7	8,1	59,1	30,2	121,7	8,1	59,2	30,2	121,7	8,1	59,2	30,2
I512	120,4	8,1	66,0	38,6	120,5	8,1	66,0	38,7	120,4	8,1	66,0	38,7

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Anhang B. Tabellen

(Fortsetzung der Tabelle B.3 von der vorherigen Seite)

Rest	DnaK				DnaK-1				DnaK-NR			
	N	H _N	C _α	C _β	N	H _N	C _α	C _β	N	H _N	C _α	C _β
Q513	116,6	8,1	58,8	28,1	116,7	8,1	59,0	28,1	116,6	8,1	59,0	28,1
K514	119,8	7,9	60,0	33,1	120,0	7,9	60,0	32,5	120,0	8,0	59,9	32,6
M515	119,2	7,9	59,2	32,0	119,2	7,9	59,4	32,4	119,2	7,9	59,4	32,2
V516	121,9	8,4	67,2	31,9	121,8	8,4	67,5	32,1	121,8	8,3	67,4	32,3
R517	120,6	8,5	59,3	30,1	120,6	8,5	59,4	30,1	120,6	8,5	59,3	30,0
D518	120,6	8,5	57,3	41,5	120,6	8,5	57,3	41,5	120,6	8,5	57,2	41,5
A519	121,8	7,7	55,3	19,2	121,8	7,8	55,3	19,0	121,7	7,7	55,3	19,0
E520	119,2	7,9	59,3	29,7	119,1	7,9	59,4	29,7	119,2	7,9	59,3	29,7
A521	120,7	8,4	54,4	18,7	120,9	8,4	54,9	18,6	121,0	8,4	54,8	18,6
N522	113,3	7,2	53,2	40,2	113,3	7,3	53,3	40,2	113,6	7,3	53,3	40,0
A523	123,7	7,2	56,6	18,9	123,6	7,2	56,8	18,9	123,6	7,2	56,6	18,8
E524	118,3	8,6	59,6	29,1	118,4	8,6	59,6	29,0	118,4	8,6	59,5	29,0
A525	123,6	8,2	55,2	18,2	123,6	8,2	55,0	18,2	123,6	8,2	55,0	18,2
D526	120,6	8,7	57,5	39,6	120,5	8,7	57,5	39,6	120,5	8,6	57,3	39,6
R527	122,1	8,2	59,6	29,9	122,0	8,1	59,5	30,0	122,1	8,1	59,4	30,3
K528	119,7	8,1	59,2	32,0	119,6	8,1	59,3	31,9	119,6	8,1	59,2	32,0
F529	120,9	8,0	61,1	38,8	120,9	8,1	61,3	38,7	120,8	8,0	61,2	38,7
E530	119,9	8,2	59,8	30,3	119,5	8,1	59,4	30,0	119,6	8,2	59,7	30,0
E531	118,3	8,2	59,3	30,0	118,4	8,2	59,4	29,9	118,8	8,1	59,2	30,0
L532	121,4	7,8	57,9	41,8	121,3	7,8	58,0	41,8	121,8	7,9	57,6	41,8
V533	119,6	7,9	66,4	32,0	119,6	7,9	66,4	32,1	119,2	7,9	65,6	32,2
Q534	119,0	8,2	58,3	28,2	118,9	8,2	58,5	28,1	119,1	8,0	58,3	28,4
T535	113,0	7,9	64,8	69,3	112,9	7,9	65,0	69,6	113,9	8,0	64,8	69,5
R536	120,9	7,7	57,7	30,6	122,4	8,1	57,5	30,2	122,6	8,1	57,9	30,2
N537	117,0	8,0	53,7	38,7	118,6	8,3	54,2	38,7	118,6	8,4	54,2	38,5
Q538	116,9	8,3	56,2	28,4	119,6	8,1	56,8	29,5	119,5	8,1	56,8	29,2
G539	108,0	8,0	45,3	-	108,0	8,0	45,6	-	108,4	8,2	45,7	-
D540	120,5	8,2	54,1	42,1	120,5	8,2	54,8	41,2	120,8	8,2	54,9	41,1
H541	117,4	8,8	56,5	28,5	120,6	8,1	56,7	30,6	119,8	8,3	57,2	30,4
L542	199,9	8,9	53,6	43,3	119,6	9,0	56,7	nz	121,7	7,9	55,8	42,0
L543	120,1	8,9	53,5	44,0	119,5	8,2	55,5	nz	121,4	7,9	55,7	42,0
H544	122,2	8,8	55,3	32,8	124,1	7,8	57,0	30,5	nz	nz	nz	nz
S545	114,1	8,2	57,1	64,3	nz	nz	nz	nz	nz	nz	nz	nz
T546	117,1	8,2	61,5	69,7	nz	nz	nz	nz	115,7	8,2	62,3	69,9
R547	124,0	8,3	55,9	30,9	nz	nz	nz	nz	123,6	8,2	56,5	30,7
K548	124,3	8,4	56,1	33,2	nz	nz	nz	nz	123,4	8,4	56,7	33,1
Q549	123,3	8,5	55,9	29,5	122,4	8,1	59,6	nz	122,5	8,5	56,4	29,6
V550	121,4	8,1	62,3	33,0	120,7	8,2	62,2	32,9	121,2	8,1	62,5	33,0
E551	125,3	8,5	56,3	30,4	125,7	8,6	56,6	30,3	125,0	8,5	56,7	30,4
E552	127,7	8,0	58,0	31,2	127,8	8,0	58,2	31,3	127,6	8,0	58,2	31,2

Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bzw. werden in den folgenden Artikeln veröffentlicht.

MAESTRE-MARTÍNEZ M., HAUPT K., EDLICH F., JAHREIS G., JARCZOWSKI F., ERDMANN F., FISCHER G., LÜCKE C.; *New structural aspects of FKBP38 activation*; Biological Chemistry; 391(10): 1157-67, 2010

MAESTRE-MARTÍNEZ M., HAUPT K.¹, EDLICH F., NEUMANN P., PARTHIER C., STUBBS M. T., FISCHER G., LÜCKE C.; *A charge-sensitive loop in the FKBP38 catalytic domain modulates Bcl-2 binding*; Journal of Molecular Recognition; *im Druck*, 2011 (DOI: 10.1002/jmr.1020)

LIEBSCHER M., HAUPT K., YU C., JAHREIS G., LÜCKE C., SCHIENE-FISCHER C.; *Rational design of novel peptidic DnaK ligands*; ChemBioChem; 11(12): 1727-37, 2010

HAUPT K., EDLICH F., LINNERT M., MAESTRE-MARTÍNEZ M., FISCHER G., LÜCKE C.; *A transient complex between the catalytic domain of FKBP38 and Bcl-2*; *in Vorbereitung*

Tagungsbeiträge

Posterpräsentation zur »Euromar 2009«: Haupt K., Liebscher M., Yu C., Jahreis G., Lücke C., Schiene-Fischer C.; *Distinct targeting of DnaK with novel peptidic antibiotics*

Posterpräsentation zur »Euromar 2010 und 17. ISMAR«: Haupt K., Edlich F., Maestre-Martínez M., Fischer G., Lücke C.; *A charge-sensitive loop in the catalytic domain of FKBP38 modulates binding to Bcl-2*

¹Gleichberechtigter Erstautor

Curriculum Vitæ

Persönliche Daten

Name	Katja Haupt, geb. Heydenreich
Geburtsdatum	24. November 1982
Geburtsort	Marienberg
Nationalität	Deutsch
Familienstatus	Verheiratet

Bildungsweg

Apr. 2007 - Dez. 2010	Promotion zum Dr. rer. nat. , Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung (Halle/Saale) Thema: NMR-spektroskopische Untersuchungen der Protein-Ligand-Wechselwirkungen von FKBP38 und DnaK (AG NMR-Spektroskopie, PD Dr. Christian Lücke)
Jan. 2007	Diplom Naturwissenschaftler
Apr. 2006 - Jan. 2007	Diplomarbeit , Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Thema: Isolierung von Endotoxinen aus <i>E. coli</i> und Charakterisierung von Abbauprodukten nach enzymatischer Hydrolyse mittels LC/MS (Institut für Pharmazie, AG Aufarbeitung biotechnischer Produkte, Prof. Dr. Markus Pietzsch)
Okt. 2001 - Jan. 2007	Studium »Angewandte Naturwissenschaft« , Technische Universität Bergakademie Freiberg Vertiefungsrichtung: Naturwissenschaftliche Grundlagen der Biotechnologie
Juni 2001	Abitur , Gymnasium Olbernhau

Danksagung

Ein herzlicher Dank gilt all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei PD Dr. Christian Lücke bedanken, der mir seit dem ersten Tag mit Rat und Tat zur Seite stand. Vielen Dank für Deine sehr gute Betreuung, Deine Unterstützung und Hilfe bei meiner Arbeit und auch Deiner Unnachgiebigkeit in vielen Dingen.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Gunter Fischer für die Finanzierung meiner Stelle und das hervorragende wissenschaftliche Umfeld an der »Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung«.

Einen besonderen Dank möchte ich Frau Monika Seidel aussprechen. Monika, vielen Dank für die Hilfe am Spektrometer, aber vielmehr für Deine aufmunternden Worte, Deinen Beistand in schwierigen Momenten und unsere Freundschaft.

Ein Dank gilt Dr. Mitchell Maestre-Martínez und Dr. Frank Edlich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und ihre Ergebnisse im FKBP38-Projekt, auf denen ich aufbauen konnte.

Bei PD Dr. Günther Jahreis möchte ich mich für die zuverlässige Synthese der zahlreichen Peptide bedanken, die eine sehr wichtige Rolle in meiner Arbeit einnehmen.

Für die erfolgreiche und lehrreiche Zusammenarbeit im DnaK-Projekt möchte ich mich bei Dr. Cordelia Schiene-Fischer und Dr. Markus Liebscher bedanken.

Bei Prof. Dr. Jochen Balbach und Prof. Dr. Christian Griesinger möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, so unkompliziert an »ihren« NMR-Spektrometern messen zu können. In diesem Zusammenhang danke ich ebenso Michael Kovermann.

Bei Miriam Linnert möchte ich mich ganz herzlich für Ihre Zusammenarbeit bedanken. Danke für Deine so wertvolle Hilfe im Labor, unserer Kameradschaft und das Teilen von »Freud und Leid«.

Dr. Angelika Schierhorn danke ich für die wichtigen und informativen massenspektrometrischen Untersuchungen.

Anhang B. Tabellen

Bei Naomi Barak, Stephanie Pösel, Dr. Franziska Jarczowski, Melanie Kirchner, Suzanne Roß, Barbara Korge und allen anderen Mitarbeitern der Forschungsstelle möchte ich mich für ihre Hilfe und Zusammenarbeit während meiner Promotionszeit bedanken.

Meinen lieben Eltern, meiner Familie und meinen Freunden möchte ich für ihren Rückhalt danken, und dass sie an meiner Seite sind.

Meinem Joachim danke ich für seine bedingungslose Unterstützung in den letzten Jahren, seinen Glauben und seine Hoffnung, aber vor allem, dass es ein »Wir« gibt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Ich versichere weiterhin, dass alle wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet sind.

Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität vorgelegt.

Halle (Saale), den 02. Dezember 2010

Katja Haupt