

**Charakterisierung von *AtFKBP42* und weiteren Peptidyl-Prolyl-
cis/trans-Isomerasen aus *Arabidopsis thaliana***

Dissertation

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

vorgelegt an der Mathematischen-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Thilo Kamphausen

geb. am 31. Oktober 1972 in Essen (Nordrhein-Westfalen)

Halle / Saale, Juni 2002 (verteidigt am 16. Oktober 2002)

- Gutachter: 1: Herr Prof. Dr. G. Fischer
Max-Planck-Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“, Halle
- 2: Herr Prof. Dr. J. Buchner
Technische Universität München, Institut für Org. Chemie und Biochemie
- 3: Frau Prof. Dr. U. Bonas
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Genetik

Inhaltsverzeichnis:

1	EINLEITUNG	1
1.1	Faltungshelferproteine	3
1.1.1	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerasen	3
1.1.2	Multidomänen-PPIasen	4
1.1.3	PPIasen in Pflanzen	5
1.2	Steroidhormonrezeptoren	10
1.2.1	Steroidhormonrezeptoren in Säugern	11
1.2.2	Steroidhormonrezeptoren in Pflanzen	13
1.3	Ziele der Arbeit	16
2	MATERIAL	17
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	17
2.1.2	Enzyme und Antikörper	18
2.1.3	Chromatographiematerialien	18
2.1.4	Reagenzienzusammenstellungen (<i>Kits</i>)	18
2.1.5	Standards	19
2.1.6	<i>E. coli</i> -Stämme	19
2.1.7	Plasmide	19
2.1.8	PCR-Primer	20
2.1.9	Puffer, Medien und Stammlösungen (für die Molekularbiologie)	21
2.1.10	Geräte	22
3	METHODEN	23
3.1	Molekularbiologische Methoden	23
3.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	23
3.1.2	Agarosegelelektrophorese	23
3.1.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	23
3.1.4	Quantifizierung von DNA	24
3.1.5	Enzymatische Modifikation von DNA	24
3.1.6	Transformation	25
3.2	Arbeiten mit <i>Arabidopsis</i>	25
3.2.1	Kultivierung von <i>Arabidopsis</i>	25
3.2.2	Oberflächensterilisation von <i>Arabidopsis</i> -Samen	26
3.2.3	Präparation von <i>Arabidopsis</i> -Plasmamembranen	26
3.2.4	Elektronenmikroskopie	27
3.2.5	Identifikation von <i>Arabidopsis</i> -T-DNA-Insertionslinien	27

3.3	Präparative Methoden	29
3.3.1	Zellaufschluss für die Proteinreinigung	29
3.3.2	Proteinreinigung	30
3.3.3	Dialyse und Proteinkonzentrierung	31
3.4	Analytische Methoden	31
3.4.1	SDS-PAGE	31
3.4.2	Western-Blot	31
3.4.3	Proteinbestimmung	31
3.4.4	Quervernetzung von Proteinen	32
3.4.5	Calmodulin-Präzipitation	32
3.4.6	Analytische Gelfiltration	33
3.4.7	Analytische Ultrazentrifugation	33
3.4.8	Isothermale-Titrationskalorimetrie	33
3.4.9	CD-Spektroskopie	34
3.5	Aktivitäts-Tests	34
3.5.1	PPIase-Aktivitäts-Tests	34
3.5.2	Citratsynthase-Tests	35
3.6	Computergestützte Analysen	35
3.6.1	Internet basierte Programme	35
3.6.2	Lokal installierte Programme	36
4	ERGEBNISSE	37
4.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>-Genomanalyse	37
4.1.1	Datenbankanalyse der <i>Arabidopsis thaliana</i> -Cyclophiline	37
4.1.2	Datenbankanalyse der <i>Arabidopsis thaliana</i> -FKBP	41
4.1.3	Datenbankanalyse der <i>Arabidopsis thaliana</i> -Parvuline	43
4.2	Identifikation von <i>At</i>FKBP T-DNA-Insertionslinien	44
4.3	Klonierungen	48
4.4	Charakterisierung von <i>At</i>FKBP12	49
4.4.1	Proteinreinigung	49
4.4.2	Eigenschaften	49
4.5	Charakterisierung von GST-<i>At</i>FKBP62	51
4.5.1	Proteinreinigung	51
4.5.2	PPIase-Aktivität	51
4.6	Charakterisierung von <i>At</i>Par15	53
4.6.1	Proteinreinigung	53
4.6.2	Eigenschaften	53
4.7	Sequenzanalyse von <i>At</i>FKBP42	54
4.7.1	<i>At</i> FKBP42 homologe Proteine	57
4.7.2	Modellierung der dreidimensionalen Struktur von FKBP-Domänen	58

4.8	Proteinreinigung von <i>AtFKBP42</i> und <i>AtHsp90</i>	60
4.8.1	Reinigung von <i>AtFKBP42</i>	60
4.8.2	Reinigung von <i>AtFKBP42</i> ¹⁻¹⁸⁰ und <i>AtFKBP42</i> ¹⁻³³⁹	60
4.8.3	Reinigung von <i>AtFKBP42</i> Proteinvarianten	61
4.8.4	Reinigung von <i>AtHsp90.1</i> ⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰	61
4.9	Charakterisierung von <i>AtFKBP42</i>	62
4.9.1	Strukturmerkmale	62
4.9.2	PPIase-Aktivität	64
4.9.3	Citratsynthase-Aggregationstest	67
4.9.4	Zelluläre Lokalisation	68
4.10	Proteininteraktion von <i>AtFKBP42</i>	71
4.10.1	Analytische Ultrazentrifugation	71
4.10.2	Bindung an Calmodulin	71
4.10.3	Bindung an <i>AtHsp90</i>	73
5	DISKUSSION	75
5.1.1	PPIasen in <i>Arabidopsis</i>	75
5.1.2	Identifikation von <i>AtFKBP</i> Insertionslinien	77
5.1.3	Charakterisierung von <i>AtFKBP12</i> , <i>AtFKBP62</i> und <i>AtPar15</i>	78
5.1.4	<i>AtFKBP42</i>	81
5.1.5	Ausblick	88
6	ZUSAMMENFASSUNG	89
7	LITERATURVERZEICHNIS	92
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	107
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	109
10	ANHANG	110

1 Einleitung

Das Wildkraut *Arabidopsis thaliana* (deutsch: Ackerschmalwand) ist eine schnell wachsende Pflanze, die innerhalb von sechs Wochen einen vollständigen Generationszyklus durchlaufen kann. Dieser kurze Generationszyklus und eine durchschnittliche Höhe von ca. 20 cm machen *Arabidopsis* zu einem bevorzugten Modellorganismus für die klassische Genetik und Biochemie der höheren Pflanzen [Meinke *et al.*, 1998]. Die vollständige Genomsequenz der fünf *Arabidopsis* Chromosomen ist bekannt und setzt sich aus 125 Megabasenpaaren (Mb) zusammen [The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000]. Die Zahl der kodierenden Gene wird mit ca. 26.000 angegeben und liegt damit in einer Größenordnung mit der des humanen Genoms [The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000; de Jong *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001]. *Arabidopsis* ist in die Familie der *Brassicaceae* eingeordnet und steht in enger Verwandtschaft zu Nutzpflanzen wie Raps oder Kohl.

Ein prinzipieller Ansatz der modernen Molekularbiologie, die zelluläre Funktion einzelner Gene festzustellen, besteht darin, die Auswirkungen des Funktionsverlusts eines Gens zu untersuchen. Eine Basis dieser Untersuchungen bei *Arabidopsis* sind frei zugängliche Sammlungen von Mutantenlinien, die über ungerichtete Mutagenese erzeugt wurden und nicht eingehend charakterisiert sind. Nach erfolgreicher Identifikation eines Gens lassen sich durch das Studium des Phänotyps der Mutante stichhaltige Aussagen zur Funktion des Gens im zellulären Kontext machen [Page & Grossniklaus, 2002].

Mutantenlinien in *Arabidopsis* mit einem Gendefekt in der Biosynthese oder Signaltransduktion von Brassinosteroidhormonen (BR) sind in ihrem Wuchs deutlich kleiner als Wildtyp-Pflanzen. Die kleinsten Pflanzen einzelner Mutantenlinien sind nur einen Zentimeter groß. Mutanten im BR-Biosyntheseweg können dadurch identifiziert werden, dass die exogene Applikation von Brassinolid (BL), dem Endprodukt der BR-Biosynthese, den Zwergwuchs komplementiert [Clouse & Sasse, 1998].

Eine besonders auffällige Mutante besitzt neben einem reduzierten Wuchs ein weiteres Merkmal: sämtliche Organe zeigen entlang ihrer Achse ein ungerichtetes Wachstum. Aufgrund dieses Erscheinungsbildes wird die Mutante als *twisted dwarf1* (*twd1*) bezeichnet (Abbildung 1). Die *twd1*-Pflanzen zeigen gegenüber einer exogenen Applikation des Phytosteroidhormons BL keine Veränderung im äußeren Erscheinungsbild. Ein Rezeptor für BL ist in *Arabidopsis* bekannt und

die entsprechende BL-insensitive Mutante (*bri1*) ist molekular charakterisiert [Clouse *et al.*, 1996].

Kreuzungen von *twd1*- und BL-Biosynthesemutanten zeigen phänotypisch das Bild der BL-Rezeptormutante *bri1*. Die exogene Applikation von BL führt ebenfalls nicht mehr zur Kompensation des BR-Biosynthesedefekts, was darauf schließen lässt, dass *twd1* in der BR-Bindung oder Signaltransduktion eine Rolle spielt [Schulz *et al.*, 2001].

Das *TWD1*-Gen codiert eine Sequenz von 365 Aminosäuren (AS) mit einer molekularen Masse (MM) von 41.805,5 Dalton (Da). Die Analyse des *TWD1*-Gens zeigt den Aufbau des entsprechenden Proteins aus einer FKBP-Domäne und einer Tetratrikopeptid (TPR)-Domäne. Die FK506 bindenden Proteine (FKBP) stellen eine Familie der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) dar und zählen zu der Gruppe von Faltungshelferproteinen.

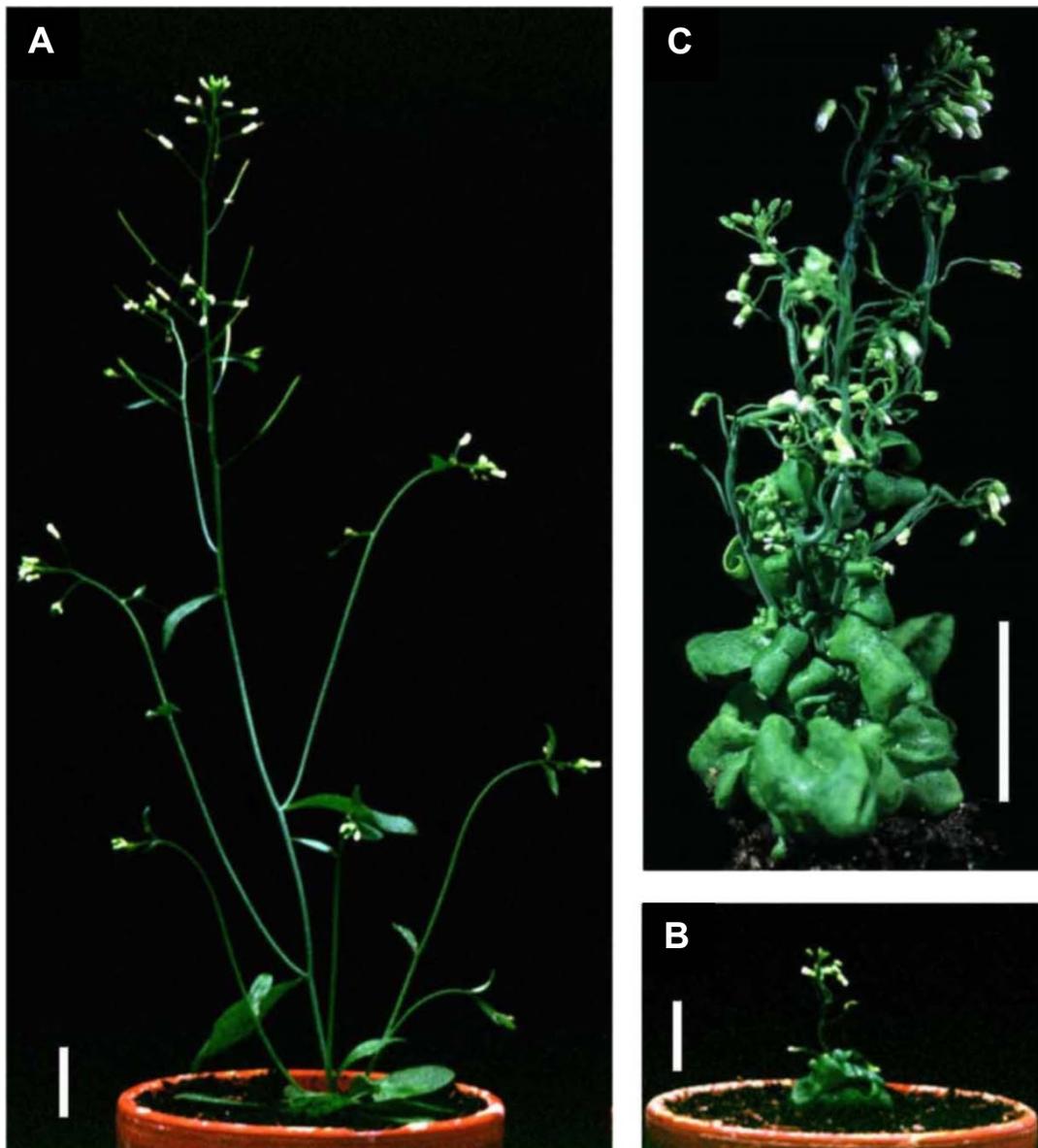


Abbildung 1 (vorherige Seite): *Arabidopsis* Pflanzen A) Wildtyp, B) und C) *twd1*-Mutante. A) und B) stellen Pflanzen im gleichen Entwicklungsstadium dar. C) Vergrößerte Darstellung einer *twd1*-Pflanze, die deutlich das desorientierte Wachstum zeigt. Die weißen Balken entsprechen 1cm. (Fotos mit freundlicher Genehmigung von Dr. Burkhard Schulz, MDL Köln)

1.1 Faltungshelferproteine

An den 70S Ribosomen der Pro- und 80S Ribosomen der Eukaryoten wird von der DNA transkribierte mRNA translatiert. Die resultierenden Polypeptidketten falten *in vitro* spontan in eine dreidimensionale Struktur, die unterschiedlichste Funktionen erfüllen kann [Anfinsen, 1973; Eaton *et al.*, 2000].

In Säugern, Pflanzen und einzelligen Organismen wurden Proteine identifiziert, die die Proteinfaltung beschleunigen oder die zu faltende Polypeptidkette neu strukturieren können [Boston *et al.*, 1996; Schiene & Fischer, 2000]. Hierzu zählen die Chaperone und Proteindisulfid-isomerasen, die nachfolgend nur kurz erwähnt werden, sowie die PPIasen.

Chaperone erfüllen grundlegende Aufgaben in der Proteinfaltung. Sie unterstützen die *de novo* Proteinbiosynthese [Hartl, 1996; Frydman, 2001] und schützen Proteine vor Aggregation, indem sie die kinetische Konkurrenz zwischen korrekter Faltung und Aggregation beeinflussen. Weiterhin können Chaperone bereits aggregierte Proteine in einen biologisch aktiven Zustand zurückführen [Ben-Zvi & Goloubinoff, 2001].

Proteindisulfidisomerasen (PDI, EC: 5.3.4.1) beschleunigen die Proteinfaltung durch Bildung, Isomerisierung oder Reduktion von Disulfidbrücken in einer Polypeptidkette. Diese Reaktionen erfolgen in einem energieabhängigen Prozess im Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Zelle, der durch das Glutathion-Redox-System vermittelt wird. Die PDI verfügen zusätzlich über eine Chaperonfunktion. [Ferrari & Söling, 1999; Freedman *et al.*, 2002].

1.1.1 Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen

PPIasen (EC: 5.2.1.8) katalysieren die Umwandlung zwischen *cis*- und *trans*-Konformationen der Peptidyl-Prolylbindung [Fischer *et al.*, 1984b; Schmid, 1993]. Derzeit sind drei Familien von PPIasen identifiziert: Cyclophiline (Cyp), FK506 bindende Proteine (FKBP) und Parvuline (Par) [Ivery, 2000]. Die immunsuppressiven Substanzen CyclosporinA (CsA) und FK506 inhibieren mit hoher Affinität selektiv Cyclophiline bzw. FKBP. FKBP werden außerdem durch Rapamycin

gehemmt. Die PPIase-Aktivitäten von *EcPar10* aus *Escherichia coli* und hPin1 (hPar18) des Menschen werden durch Juglon, einen Naturstoff aus der Walnuss, inhibiert [Hennig *et al.*, 1998].

PPIasen sind ubiquitär verbreitet und evolutionär hoch konserviert, was in speziesübergreifenden Analysen der Genfamilien [Galat, 1999; Galat, 2000] und vielen umfassenden Übersichtsartikeln belegt wird [Hemenway, 1993; Fischer, 1994; Luan, 1998; Göthel & Marahiel, 1999; Maruyama & Furutani, 2000; Vener, 2001].

Das humane Cyclophilin18 mit einer MM von 18 kDa, das hFKBP12 mit 12 kDa und das *EcPar10* mit 10 kDa stellen die Prototypen der einzelnen PPIase-Familien dar. Sie beinhalten gleichzeitig die minimale Konsensussequenz für die entsprechende katalytische PPIase-Domäne. Homologe Enzyme zu hCyp18 und hFKBP12 sind sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten vertreten [Fischer *et al.*, 1989; Harding *et al.*, 1989; Siekierka *et al.*, 1989; Göthel & Marahiel, 1999]. *EcPar10* ist mit 92 Aminosäuren (AS) bzw. 10,2 kDa eines der kleinsten bekannten Enzyme und kann aus *E. coli* isoliert werden [Rahfeld *et al.*, 1994]. Der kleinste humane Vertreter der Parvuline ist hPar14 mit 131 AS (13,7 kDa) [Uchida *et al.*, 1999].

1.1.2 Multidomänen-PPIasen

Neben den Eindomänen-PPIasen gibt es Vertreter aller drei Familien, die mehrere PPIase-Domänen und/oder zusätzliche Domänen oder Motive besitzen. Innerhalb der Cyclophiline und FKBP sind Vertreter beschrieben, die eine TPR-Domäne, bestehend aus drei TPR-Motiven in charakteristischer Anordnung, als C-terminale Erweiterung enthalten. Sie können durch die Präzipitation verschiedener Steroidhormonrezeptor-(SHR)-Komplexe copräzipitiert werden. Die humanen Vertreter werden entsprechend ihrer MM als hCyp40, hFKBP51 und hFKBP52 bezeichnet [Callebaut *et al.*, 1992; Peattie *et al.*, 1992; Kieffer *et al.*, 1993; Ratajczak *et al.*, 1993].

Hinzu kommen weitere PPIasen mit zusätzlichen Domänen, die z.B. über eine EF-Hand Ca^{2+} binden können (FKBP23) oder ein Erkennungsmotiv für RNA (Cyp33) oder DNA (*DmFKBP46*) enthalten [Alnemri *et al.*, 1994; Mi *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1998].

Der prokaryotische, ribosomenassoziierte Trigger-Faktor ist aus einer zentralen FKBP-Domäne und zwei weiteren Domänen aufgebaut [Zarnt *et al.*, 1997]. In der Familie der Parvuline gibt es eine Unterfamilie, deren Vertreter aus einer N-terminalen WW-Domäne und einer Parvulin-Domäne zusammengesetzt sind [Hani *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1996]. Die WW-Domänen vermitteln Protein – Protein Wechselwirkungen mit prolinreichen Regionen [Lu *et al.*, 1999].

1.1.3 PPIasen in Pflanzen

Nach der Charakterisierung von Rinder-Cyp18 [Fischer *et al.*, 1989] und Rinder- bzw. hFKBP12 [Harding *et al.*, 1989; Siekierka *et al.*, 1989] wurden erste Untersuchungen publiziert, die PPIasen in Pflanzen beschreiben.

Cyclophiline: Die heterologe Expression von *LeCyp18* (*Lycopersicon esculentum*, Tomate) führt in *E. coli* zu einer Erhöhung der durch CsA inhibierbaren PPIase-Aktivität (Tabelle 1, Seite 7) [Gasser *et al.*, 1990]. Mais (*Zea mays*) *ZmCyp18* ist in allen Pflanzenorganen gering exprimiert, wird durch Gabe von Salicylsäure in der Pflanze aber erhöht [Marivet *et al.*, 1995].

Neben dem im Cytosol lokalisierten Cyp18 sind PPIasen auch in anderen Zellkompartimenten nachweisbar. In Chloroplasten und Mitochondrien der Erbse (*Pisum sativum*) kann die jeweils gezeigte PPIase-Aktivität partiell durch CyclosporinA und FK506 gehemmt werden [Breiman *et al.*, 1992]. Ebenfalls aus Chloroplasten kann das Cyclophilin TLP40 (*SoCyp50*) aus Spinat (*Spinacia oleracea*) isoliert werden, das an der Regulation einer colokalisierten Proteinphosphatase 2A homologen Phosphatase beteiligt ist [Fulgosi *et al.*, 1998; Vener *et al.*, 1999].

Mit Hilfe von CyclosporinA-Affinitätschromatographie können aus den Blätter- oder Wurzelhomogenaten der Bohne (*Vicia faba*) zwei Cyclophiline (18 und 21 kDa) isoliert werden [Luan *et al.*, 1993; 1994a]. Die Expression von *VfCyp21* ist lichtreguliert und nur in den Blättern der Bohne nachweisbar. Die Inhibitionskonstante (K_i) für *VfCyp21* und CsA beträgt 3,9 nM [Luan *et al.*, 1994b]. In den Geleitzellen der Spaltöffnungen ist der Gehalt der mRNA für cytosolisches *VfCyp18* erhöht. Dies wird auf einen verstärkten Proteinumsatz in den Geleitzellen zurückgeführt [Kinoshita & Shimazaki, 1999].

In verschiedenen Pflanzenarten wird die zelluläre Konzentration von Cyclophilinen durch Stresseinwirkung verändert. Der Cyclophilin-mRNA-Gehalt von Bohnen und Mais kann durch Quecksilber, hohe Salzkonzentrationen oder die Infektion der Pflanzen mit Pathogenen erhöht werden [Marivet *et al.*, 1992; Marivet *et al.*, 1994; Marivet *et al.*, 1995]. Auch in dem pharmakologisch bedeutenden Wollhaarigen Fingerhut (*Digitalis lanata*) sind Cyclophiline mit einer MM von 18,0 kDa und 18,1 kDa nachweisbar, deren zelluläre Konzentration von exogenen Stressfaktoren erhöht wird, die aber nicht vor Kältestress schützen [Küllertz *et al.*, 1999]. Die mRNA Verteilung eines Cyclophilins aus der Gelben Lupine (*Lupinus luteus*) zeigt besonders in den Wurzeln eine Erhöhung bei Anwesenheit des Bakteriums *Bradyrhizobium sp. (lupinus)*, das in Symbiose mit der Pflanze leben kann [Nuc *et al.*, 2001]. Auch der mRNA Gehalt von *CaCyp18* aus Pfeffer (*Capsicum annum*) steigt durch Pathogeninfektion oder abiotischen Stress deutlich an [Kong *et al.*, 2001].

Galat findet in seinen Untersuchungen zur Cyclophilin-Familie in *Arabidopsis* acht Cyclophilin-Gene [Galat, 1999], von denen mehrere näher charakterisiert sind. Zwei cytosolische 18,4 kDa *AtCyp* (*AtCyp18* und *AtCyp18-2*), werden in unterschiedlichen Organen und zeitlich differentiell exprimiert. Die Regulation erfolgt entwicklungsbedingt [Saito *et al.*, 1995; 1999b]. Die Aminosäuresequenz von *AtCyp18* ist zu 72,1% mit der von hCyp18 identisch [Hayman & Miernyk, 1994]. Das größere *AtCyp28* wird in das Chloroplasten-Stroma importiert. Dieser Import von *AtCyp28* kann durch CsA nicht inhibiert werden [Lippuner *et al.*, 1994]. *AtCyp18* und *AtCyp28* interagieren beide mit den VirD2 und VirE2 Proteinen aus *Agrobacterium tumefaciens*, einem pflanzenpathogenen Bakterium. Hieraus wird eine Beteiligung der Cyclophiline an der Pathogeninfektion und dem während dieses Vorgangs stattfindenden DNA-Transfer abgeleitet. Die Proteininteraktion zwischen den Vir-Proteinen und den Cyclophilinen wird *in vitro* durch CsA aufgehoben [Deng *et al.*, 1998]. Durch die Interaktion mit dem GNOM-Protein, das Homologie zu dem Hefe-Sec7p-Protein aufweist, ist *AtCyp22* (Cyp5) an der Koordination der Zell-Polarität des *Arabidopsis*-Embryo beteiligt [Grebe *et al.*, 2000]. *AtCyp22-2* (Roc7) wird, verglichen mit *AtCyp18*, in allen Geweben stärker exprimiert und interagiert mit der *Arabidopsis*-Proteinphosphatase 2A [Jackson & Söll, 1999]. Untersuchungen von Pflanzen mit *AtCyp40* Gendeletion zeigen einen Zusammenhang zwischen *AtCyp40* und der Regulation der vegetativen Wachstumsphase juveniler Rosettenblätter von *Arabidopsis* [Berardini *et al.*, 2001].

Protein	Substrat	k_{cat}/K_m [$M^{-1}s^{-1}$]	Bemerkung
<i>LeCyp18</i>	Es wurde die Erhöhung der CsA inhibierbaren PPIase-Aktivität in <i>E. coli</i> durch heterologe Expression von <i>LeCyp18</i> festgestellt [Gasser <i>et al.</i> , 1990].		
<i>DiCyp18</i>	Suc-AFPF-pNA Suc-AAPF-pNA Suc-ALPF-pNA Suc-AVPF-pNA Suc-AKPF-pNA Suc-AGPF-pNA	Die Veränderung der PPIase-Aktivitäten unter Stressbedingungen wurden untersucht und mit hCyp18 verglichen [Küllertz <i>et al.</i> , 1999].	
<i>DiCyp18.1</i>			
<i>ZmCyp18</i> (cytosolisch)	Suc-AAPF-pNA	$11,0 \cdot 10^6$	[Sheldon & Venis, 1996]
<i>ZmCyp18-2</i> (microsomal)	Suc-AAPF-pNA	$25,0 \cdot 10^6$	[Sheldon & Venis, 1996]
<i>VfCyp21</i>	Die Substratspezifität von <i>VfCyp21</i> wurde über das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten der katalysierten zu den unkatalysierten Reaktionen bestimmt. Das günstigste Verhältnis der verglichenen Substrate hatte Suc-AAPF-pNA [Luan <i>et al.</i> , 1994b].		
<i>AtCyp22</i>	Suc-AAPF-pNA	$5,7 \cdot 10^6$	[Grebe <i>et al.</i> , 2000]
<i>AtCyp28</i>	Suc-AAPF-pNA	PPIase-Aktivität unabhängiger Chloroplastenimport wurde untersucht. Die Geschwindigkeitskonstanten der gemessenen Reaktionen wurden bestimmt [Lippuner <i>et al.</i> , 1994].	
<i>SoCyp50</i>	Suc-AAPF-pNA	$1,6 \cdot 10^6$	[Fulgosi <i>et al.</i> , 1998]

Tabelle 1: Übersicht der publizierten PPIase-Aktivitäten von Pflanzen-Cyclophilinen. Die exakten Bedingungen der Messungen sind im jeweiligen Methodenteil der zitierten Publikationen beschrieben. Die Aminosäuren der Substrate sind im Einbuchstabencode angegeben. Ac- = Acetyl; Suc- = Succinyl-; pNA = para-Nitroanilid. *At* = *A. thaliana*; *Di* = *D. lanata*; *Le* = *L. esculentum*; *So* = *S. oleracea*; *Vf* = *V. faba*; *Zm* = *Z. mays*.

FKBP: FK506 bindende Proteine sind in verschiedenen Pflanzen beschrieben. Die publizierten PPIase-Aktivitäten der Pflanzen-FKBP sind in Tabelle 2 (Seite 9) zusammengefasst.

Einen Unterschied in der Aminosäuresequenz des *VfFKBP12* zu hFKBP12 stellt ein zweiter Cystein-Rest des *VfFKBP12* dar. Es wird diskutiert, dass dies zu der Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke führen kann [Xu *et al.*, 1998]. Im Gegensatz zu hFKBP12 ist eine PPIase-Aktivität von *VfFKBP12* nicht nachgewiesen. Obwohl *VfFKBP12* FK506 bindet, kann kein stabiler Komplex aus *VfFKBP12*, FK506 und Calcineurin nachgewiesen werden [Xu *et al.*, 1998].

Neben FKBP12 sind auch höhermolekulare Pflanzen-FKBP charakterisiert. Durch FK506-Affinitätschromatographie können aus Blätter- oder Wurzelhomogenaten von *V. faba* fünf verschiedene FKBP (12, 13, 18, 25 und 55 kDa) isoliert werden [Luan *et al.*, 1993; 1994a]. Die

aus Mais und Weizen (*Triticum aestivum*) isolierten FKBP (66, 73 und 77 kDa) gleichen sich in ihrem Grundaufbau. Sie bestehen aus drei FKBP-Domänen und einer C-terminalen TPR-Domäne. Es schließt sich eine Calmodulin(CaM)-Bindungsstelle an [Blecher *et al.*, 1996; Hueros *et al.*, 1998; Kurek *et al.*, 1999]. Das *TaFKBP73* kommt in Weizensamen, aber nicht in adulten, grünen Blättern vor [Aviezer *et al.*, 1998]. Ein C-terminal um 138 AS verkürztes *TaFKBP73*-Konstrukt bindet im Gegensatz zu vollständigem *TaFKBP73* kein CaM [Kurek *et al.*, 2002]. Die basale Expression von *TaFKBP77* wird durch Hitzestress erhöht [Kurek *et al.*, 1999]. *TaFKBP73* und *TaFKBP77* sind als Teil eines Hsp90 Heterokomplexes in Weizenkeim-Lysat isoliert und nachgewiesen. Dieser Hsp90 Heterokomplex gleicht dem der humanen SHR-Komplexe [Reddy *et al.*, 1998]. Während die Überexpression des vollständigen *TaFKBP73* in Reispflanzen zu keiner Beeinträchtigung der Fertilität führt, entwickeln sich durch die Überexpression des verkürzten Proteins männlich-sterile Pflanzen [Kurek *et al.*, 2002].

In einem Übersichtsartikel aus dem Jahr 2001 werden insgesamt 17 unterschiedliche *Arabidopsis*-FKBP genannt und in ihrem Domänenaufbau verglichen [Harrar *et al.*, 2001].

Aufgrund der Homologie von *AtFKBP12* zu *VjFKBP12* wird die Schlussfolgerung gezogen, dass auch *AtFKBP12* FK506 binden kann, aber der Komplex aus *AtFKBP12*, FK506 und Calcineurin nicht zustande kommt [Xu *et al.*, 1998]. Ein Hinweis auf FK506-Bindung ist die Interaktion zwischen *AtFKBP12* und *AtFIP37* (= *AtFKBP12 interacting protein37*), die durch FK506 aufgehoben werden kann. *AtFIP37* zeigt Homologie zu dem Säugerprotein FAP48 (= *FKBP12 associated protein48*) [Faure *et al.*, 1998a]. Die zwei Proteine *AtFKBP16* (*AtFKBP15-1*) und *AtFKBP18* (*AtFKBP15-2*) sind im Endoplasmatischen Retikulum (ER) von *Arabidopsis*-Zellen lokalisiert. Sie werden zu einer Unterfamilie von Pflanzen-FKBP gezählt, deren nächstes humanes Verwandtes das ebenfalls im ER nachzuweisen hFKBP13 ist [Luan *et al.*, 1996].

Die Untersuchung von mRNA aus verschiedenen *Arabidopsis*-Gewebe zeigt, dass auch hier Vertreter der Multidomänen-FKBP mit TPR-Domäne nachgewiesen werden können. *AtFKBP62* (ROF1) ist aus drei FKBP-Domänen und einer TPR-Domäne aufgebaut. Die Menge nachweisbarer *AtFKBP62*-mRNA in den Pflanzen steigt durch Salzstress oder Verletzung der Pflanze an [Vucich & Gasser, 1996]. Ein weiteres *AtFKBP* mit TPR-Domäne ist *AtFKBP72* (*Pasticcino1* = *Pas1*). Die Pflanzen der *pasticcino1*-Null-Mutanten zeigen eine veränderte Zelldifferenzierung, die zu kleineren Pflanzen und veränderten Samen führt [Faure *et al.*, 1998b; Vittorioso *et al.*, 1998]. *AtFKBP72* ist kernlokalisiert und zeigt geringe PPIase-Aktivität [Carol *et al.*, 2001].

Bei der systematischen Untersuchung von 170 Proteinen des mitochondrialen *Arabidopsis* Proteoms mittels 2D-Gelelektrophorese und anschließender Massenspektrometrie fehlt der Nachweis einer PPIase [Millar *et al.*, 2001]. Durch Untersuchung des Thylakoid Lumen mit der gleichen Methode können drei Cyclophiline und fünf FKBP nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wird eine Gesamtzahl von 22 *At*FKBP genannt [Schubert *et al.*, 2002].

Protein	Substrat	k_{cat}/K_m [$M^{-1}s^{-1}$]	Bemerkung
<i>Vf</i> FKBP15	Die Substratspezifität von <i>Vf</i> FKBP15 wurde über das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten der katalysierten zu den unkatalysierten Reaktionen bestimmt. Das günstigste Verhältnis der verglichenen Substrate hatte Suc-ALPF-pNA [Luan <i>et al.</i> , 1996].		
<i>Zm</i> FKBP66	Suc-ALPF-pNA Suc-AFPF-pNA Suc-AAPF-pNA	$0,37 \cdot 10^6$ $0,29 \cdot 10^6$ $0,05 \cdot 10^6$	[Hueros <i>et al.</i> , 1998]
<i>At</i> FKBP72	Suc-ALPF-pNA	$0,015 \cdot 10^6$	[Carol <i>et al.</i> , 2001]
<i>Ta</i> FKBP73	Suc-ALPF-pNA	$0,25 \cdot 10^6$	[Blecher <i>et al.</i> , 1996]

Tabelle 2: Übersicht der publizierten PPIase-Aktivitäten von Pflanzen-FKBP. Die exakten Bedingungen der Messungen sind im jeweiligen Methodenteil der zitierten Publikationen beschrieben. Die Aminosäuren der Substrate sind im Einbuchstabencode angegeben. Ac- = Acetyl; Suc- = Succinyl-; pNA = para-Nitroanilid. *At* = *A. thaliana*; *Ta* = *T. aestivum*; *Vf* = *V. faba*; *Zm* = *Z. mays*.

Parvuline: Die aus *Digitalis* und Apfel (*Malus domestica*) isolierten *Dl*Par13 bzw. *Md*Pin1 zeigen PPIase-Aktivität (Tabelle 3) und eine Substratspezifität ähnlich der des hPin1 (hPar18) und dessen Homologen. Beiden Enzymen fehlt die für hPin1 charakteristische WW-Domäne [Metzner *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 2001].

Das *Dl*Par13-Homologe aus der *Arabidopsis*-Parvulin-Familie zeigt ebenfalls eine mit hPin1 vergleichbare Substratspezifität [Landrieu *et al.*, 2000a; Landrieu *et al.*, 2000b] und kann das essentielle, zu hPin1 homologe, Hefeprotein Ess1/PTF1 funktionell ersetzen [Yao *et al.*, 2001].

Protein	Substrat	k_{cat}/K_m [$M^{-1}s^{-1}$]	Bemerkung
<i>AtPar13</i>	Ac-WFYpSPRLR	Die Beschleunigung der Isomerisierung wurde durch NMR-Untersuchungen festgestellt [Landrieu <i>et al.</i> , 2000a].	
	Suc-AEPF-pNA Ac-AApSPF-pNA	$1,8 \cdot 10^6$ $2,7 \cdot 10^6$	[Yao <i>et al.</i> , 2001]
<i>MdPar13</i>	Suc-AEPF-pNA Ac-AApSPF-pNA	$1,6 \cdot 10^6$ $3,1 \cdot 10^6$	[Yao <i>et al.</i> , 2001]
<i>DlPar13</i>	Ac-ApSPY-pNA AApSPF-pNA	$15,9 \cdot 10^6$ $7,3 \cdot 10^6$	Es wurden k_{cat}/K_m -Werte für weitere Substrate gemessen [Metzner <i>et al.</i> , 2001].

Tabelle 3: Übersicht der publizierten PPIase-Aktivitäten von Pflanzen-Parvulinen. Die exakten Bedingungen der Messungen sind im jeweiligen Methodenteil der zitierten Publikationen beschrieben. Die Aminosäuren der Substrate sind im Einbuchstabencode angegeben. pS = seitenkettenphosphoryliertes Serin; Ac- = Acetyl; Suc- = Succinyl-; pNA = para-Nitroanilid. *At* = *A. thaliana*; *Dl* = *D. lanata*; *Md* = *M. domestica*.

1.2 Steroidhormonrezeptoren

Als Steroidhormonrezeptoren (SHR) werden verschiedene Proteine zusammengefasst, die alle in der Lage sind, selektiv eines von verschiedenen Steroidhormonen mit hoher Affinität zu binden. Steroidhormone sind in Säugern, Pflanzen und Insekten nachweisbar [Baulieu *et al.*, 1975; Grove *et al.*, 1979]. Die Grundstruktur leitet sich von den Triterpenen ab und besteht aus einem Vierringsystem, das durch unterschiedliche Modifikationen zu den einzelnen Steroidhormonen umgewandelt wird (Abbildung 2).

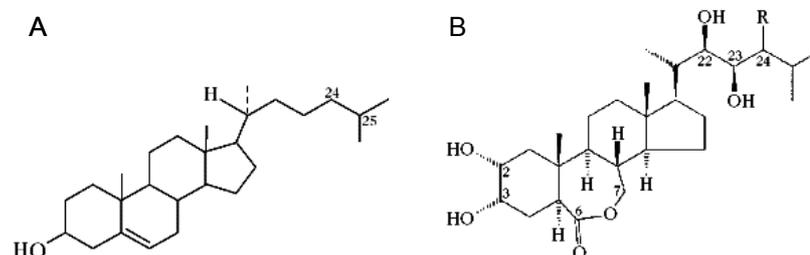


Abbildung 2: Strukturformeln von A: Cholesterin, dem Grundbaustein der Steroidhormone in Säugern; B: Brassinolid (R = CH₃), dem wirksamsten Steroidhormon in *Arabidopsis*.

In Säugern gibt es mehrere wirksame Steroidhormone und die entsprechenden Rezeptoren. Neben dem Glucocorticoid-Rezeptor (GR) sind z.B. die SHR der Sexualhormone Östrogen (Östrogen-Rezeptor = ÖR) und Progesteron (Progesteron-Rezeptor = PR) näher untersucht. Die Wirkung der einzelnen Hormone auf den Organismus ist unterschiedlich. Über die Gluco- und Mineralocorticoide werden z.B. der Glucose- und Mineralhaushalt des Menschen reguliert. Die Sexualhormone steuern in einem Gegenspiel die körperliche Entwicklung, haben aber auch Einfluss auf die Neuronalentwicklung [Levy *et al.*, 1996].

Bei den Säugern lassen sich die unterschiedlichen Rezeptoren für Steroidhormone in zwei große Gruppen einteilen: lösliche SHR und membrangebundene mSHR [Pratt & Toft, 1997; Borski, 2000]. mSHR sind für Aldosteron, Östrogen und Progesteron nachgewiesen oder kloniert [Spach & Streeten, 1964; Falkenstein *et al.*, 1996; Haseroth *et al.*, 1999; Flores-Delgado *et al.*, 2001].

In *Arabidopsis* ist nach heutigem Wissensstand nur ein einziger SHR bekannt, der membrangebunden ist [Friedrichsen & Chory, 2001]. Das wirksamste Phytosteroidhormon BL (Abbildung 2B) ist isoliert und charakterisiert [Grove *et al.*, 1979].

1.2.1 Steroidhormonrezeptoren in Säugern

Gemeinsam ist der Gruppe von löslichen SHR der prinzipielle Reifungsprozess des Steroid-bindungsfähigen SHR-Komplexes (SHR-Apokomplex) durch einen Chaperonzyklus, der im Cytosol der Zellen abläuft. An diesem Prozess sind neben dem SHR mehrere Proteine beteiligt. Zu diesen Proteinen zählen Hsp90, Hsp70, p23, p60, Hop und Hip sowie eine von verschiedenen PPIasen [Pratt, 1998; Richter & Buchner, 2001]. Auch die Beteiligung von Hsp40 und der Proteinphosphatase PP5 ist gezeigt [Silverstein *et al.*, 1997; Morishima *et al.*, 2000; Hernandez *et al.*, 2002]. Die Funktion der einzelnen Proteine in diesem Zyklus kann bisher nicht eindeutig zugeordnet werden [Richter & Buchner, 2001]. Hsp90 ist ein Multidomänenprotein mit ATPase-Funktion, die in der N-terminalen Domäne des Proteins lokalisiert ist. Die C-terminale Domäne des Hsp90 bindet TPR-Domänen [Pearl & Prodromou, 2000; Richter & Buchner, 2001]. Die am SHR-Komplex beteiligte PPIase ist Cyclophilin40, FKBP51 oder FKBP52 und aus mindestens einer PPIase- und einer TPR-Domäne aufgebaut [Schiene-Fischer & Yu, 2001]. Über die TPR-bindende Domäne von Hsp90 wird die PPIase in den SHR-Apokomplex integriert [Owens-Grillo *et al.*, 1996a; Young *et al.*, 1998]. In Abhängigkeit der individuellen Typen des SHR-Komplexes geschieht dies mit unterschiedlicher Präferenz, z.B. bindet FKBP51 bevorzugt an den PR [Nair *et al.*, 1997; Barent *et al.*, 1998].

Der SHR-Apokomplex besteht aus einem SHR-Molekül, zwei Hsp90-, zwei p23-Molekülen und einer der genannten PPIasen [Richter & Buchner, 2001]. Ob ein oder zwei Moleküle der PPIase

gebunden sind, wird unterschiedlich diskutiert, da es für beide Aussagen experimentelle Belege gibt, die aber mit unterschiedlichen Methoden erzielt wurden [Silverstein *et al.*, 1999; Pirkel & Buchner, 2001]. Nach der Bindung des entsprechenden Steroids wandert der aktivierte SHR in der Zellkern [DeFranco *et al.*, 1998; Pratt *et al.*, 1999]. Für FKBP52-gebundenen GR ist dies über eine Bindung an Dynein gezeigt [Galigniana *et al.*, 2001]. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass am GR gebundenes FKBP51 sofort nach der Bindung des Steroidhormons durch FKBP52 ersetzt wird und ab diesem Zeitpunkt auch Dynein copräzipitiert werden kann [Davies *et al.*, 2002]. Im Kern bindet ein SHR-Dimer an die DNA und reguliert die Genexpression. Bis diese SHR-vermittelte Genexpression *in vitro* zu beobachten ist, vergehen bis zu mehreren Stunden [Munck *et al.*, 1972; Rousseau, 1984].

Die Effekte der aktivierten mSHR sind im Gegensatz zu den direkt die Genexpression regulierenden SHR schon nach Minuten nachweisbar [Russell *et al.*, 2000] und können nicht durch Transkription oder Translation hemmende Wirkstoffe beeinflusst werden. Die Wirkung der mSHR wird auch, weil sie nicht direkt in die Genexpression eingreift, als schnelle, nichtgenomische Steroidwirkung bezeichnet [Borski, 2000; Falkenstein *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2000].

Die cDNA des membrangebundenen PR (mPR) kann aus Schweinemuskeln isoliert werden. Das codierte Protein hat ein N-terminal lokalisiertes, einfach membrandurchspannendes Motiv und eine vorhergesagte MM von 22 kDa [Falkenstein *et al.*, 1996]. Der mPR aus Schweineleberzellen bindet Progesteron und liegt als Homodimer in der Membran vor [Falkenstein *et al.*, 2001]. Eine Beteiligung weiterer Proteine an einem mSHR-Komplex ist nicht bekannt.

Die Signaltransduktion über die unterschiedlichen mSHR scheint auf differenten Mechanismen zu beruhen. In kernlosen Hunde-Erythrocyten kann durch die Gabe des Mineralocorticoids Aldosteron eine Veränderung des Natriumhaushalts ausgelöst werden [Spach & Streeten, 1964]. Bei der Untersuchung von gentechnisch veränderten Mäusen, denen der lösliche Mineralocorticoid-Rezeptor fehlt, ist nach der Stimulation mit Aldosteron ein erhöhter Gehalt von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) nachweisbar [Haseroth *et al.*, 1999]. Mit Östrogen stimulierte Myofibroblasten aus Lungengewebe zeigen dagegen die verstärkte Phosphorylierung der Proteine Raf1 und ERK1/2-MAP-Kinase [Flores-Delgado *et al.*, 2001].

1.2.2 Steroidhormonrezeptoren in Pflanzen

Das Arabidopsis-Genom codiert keinen löslichen SHR [The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000]. Durch die Analyse von BL-insensitiven Mutanten gelang die Identifikation eines membrangebundenen SHR. Der Phänotyp der zugehörigen *brl1*-Mutantenlinie ist durch einen sehr kleinen Wuchs charakterisiert und unempfindlich gegenüber der exogenem Applikation von BL [Clouse *et al.*, 1996]. Die Pflanzen akkumulieren BL und die späten Produkte der BR-Biosynthese, wie z.B. Castasteron [Noguchi *et al.*, 1999]. Eine *Leucine-Rich-Repeat*-(LRR)-Rezeptorkinase ist an der BL-vermittelten Signaltransduktion beteiligt [Ecker, 1997; Li & Chory, 1997]. Die Gendeletion der Rezeptorkinase (BRI1) ist direkt verantwortlich für den *brl1*-Phänotyp [Friedrichsen *et al.*, 2000]. Der Grundaufbau von BRI1 besteht nach Abspaltung eines Signalpeptids aus der extrazellulären LRR-Domäne mit 25 einzelnen LRR und einer Insertion von 70 AS zwischen LRR 21 und 22, die charakteristisch für BRI1 ist. C-terminal wird die Plasmamembran von einem Transmembransegment durchspannt, dem eine cytosolische Serin/Threonin-Kinase-Domäne folgt (Abbildung 3) [Li & Chory, 1997]. Im *Arabidopsis*-Genom sind mehr als 170 Gene identifiziert, die für BRI1-ähnliche LRR-Rezeptorkinasen ohne die Insertion codieren [McCarty & Chory, 2000]. Die Analyse von BRI1 Punktmutanten der 70 AS Insertion zeigt, dass diese entscheidend für die Bindung von BR ist [Noguchi *et al.*, 1999; Friedrichsen *et al.*, 2000; Müssig & Altmann, 2001].

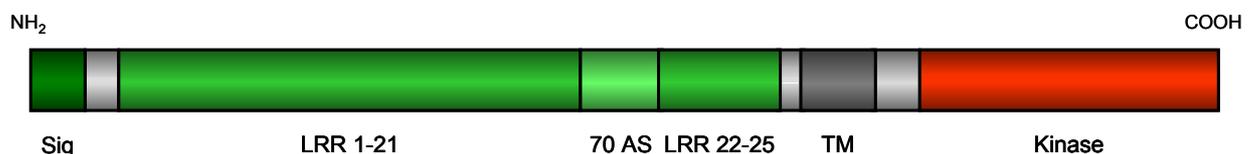


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der BRI1-Rezeptoren aus *Arabidopsis* und Reis. Sig = Signalsequenz für den Export aus der Zelle; LRR = *Leucine-Rich-Repeat*; 70 AS = 70 Aminosäuren Insertion; TM = Transmembran-Domäne; Kinase = Ser/Thr Kinase-Domäne; nach Friedrichsen und Chory [2001].

Durch die Analyse von BL-sensitiven Mutanten mit Zwergwuchs als Phänotyp können die Biosynthesewege des BL aufgeklärt werden [Müßig & Altmann, 1999; Bishop & Yokota, 2001]. Nach der Synthese gelangt BL aus der Zelle. Die exogene Stimulation durch BL löst dann eine synchronisierte Streckung der benachbarten Pflanzenzellen aus [Friedrichsen & Chory, 2001].

Ein Experiment mit transgenen Reis-Protoplasten belegt die exogene Bindung von BL durch BRI1. Die XA21-LRR-Kinase aus Reis ist *in vivo* an der Pathogenabwehr beteiligt, indem sie den programmierten Zelltod nach einer Pathogeninfektion auslöst. Eine Chimäre aus der

extrazellulären BRI1-Domäne und der Kinase-Domäne von XA21 löst in Reis-Protoplasten den programmierten Zelltod nach BL-Stimulation aus [He *et al.*, 2000; Becraft, 2001].

Durch die Aktivierung von BRI1 in *Arabidopsis* wird eine Autophosphorylierung der cytosolischen Kinase-Domäne induziert [Wang *et al.*, 2001]. Rekombinant exprimierte BRI1-Kinase-Domäne zeigt neben der Autophosphorylierungsaktivität eine Präferenz gegenüber Serinresten und speziell gegenüber Peptiden mit den Aminosäureresten Arginin und Lysin in der Umgebung des zu phosphorylierenden Serins [Oh *et al.*, 2000].

Die Carboxypeptidase BRS1 beeinflusst die Signaltransduktion von BRI1 extrazellulär [Li *et al.*, 2001a]. Die Mutationen im Gen des intrazellulären Proteins BIN2 (BR-INSENSITIVE 2) führt wie bei der Rezeptormutante *bri1* und *twi1* zu einer Insensitivität gegenüber exogenem BL und zeigt insgesamt einen *twi1*-ähnlichen Phänotyp [Li *et al.*, 2001b; Perez-Perez *et al.*, 2002]. *BIN2* ist auch als *Ultracurvata1 (Ucu1)* beschrieben [Perez-Perez *et al.*, 2001b]. Das codierte Protein besitzt Homologie zu Kinasen des Glykogen-Synthase-Kinase-3/Shaggy-Typs, die in Eukaryoten weit verbreitet sind [Perez-Perez *et al.*, 2002]. Für rekombinant hergestelltes BIN2-Protein ist eine Kinaseaktivität nachgewiesen. Die Überexpression von *BIN2* in der Pflanze führt zu einem *bri1*-ähnlichen Phänotyp [Li & Nam, 2002]. Über BIN2 wird das kernlokalisierte Protein BES1 (BRI1-EMS-Suppressor1) reguliert, dadurch dass BIN2 das BES1-Protein destabilisiert. BES1 greift in die BL-induzierte Genexpression ein. Eine Überexpression von BES1 in *Arabidopsis* führt zu vergrößerten Pflanzen [Yin *et al.*, 2002].

Ein *AtBRI1* homologer Rezeptor ist im Reis (*O. sativa*)-Genom codiert [Yamamuro *et al.*, 2000]. In transgenen Reispflanzen, die die umgekehrte und komplementäre Form der *OsBRI1*-mRNA exprimieren, so genannten *Antisense*-Pflanzen, sind die Phosphorylierungsaktivitäten von zwei Kinasen verändert. Eine plasmamembranassoziierte 60 kDa MAP-Kinase wird in der Aktivität reduziert und die Aktivität einer 50 kDa cytosolischen Ca^{2+} -abhängigen Kinase wird verstärkt [Sharma *et al.*, 2001]. Auch in der Tomate (*L. esculentum*) und der Erbse (*P. sativum*) sind Mutanten bekannt, die dem Phänotyp von *Arabidopsis bri1* gleichen. Sie zeigen den typischen Zwergwuchs und einen erhöhten endogenen Gehalt von BR [Nomura *et al.*, 1997; Koka *et al.*, 2000; Bishop & Yokota, 2001]. Eine Identifikation des korrespondierenden Gens bzw. Proteins ist für beide Phänotypen noch nicht publiziert.

Aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus des pflanzlichen BL-SHR und löslichen Säuger-SHR ist ein paralleler Mechanismus der Steroidwirkung zweifelhaft [Meyerowitz, 2002]. Trotzdem können pflanzliche FKBP mit TPR-Domäne (*TaFKBP73*, *TaFKBP77*) aus Weizenkeim-Lysat *in*

vitro bei der Bildung eines Säugetier-SHR-Komplexes mitwirken [Stancato *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1998] und die Interaktion von TPR-Domänen und Hsp90 ist in Pflanzen konserviert [Owens-Grillo *et al.*, 1996b].

Eine Beteiligung von AtFKBP42 an der Steroidsignaltransduktion ist wahrscheinlich, wie die bereits einführend erwähnten Kreuzungsversuche zeigen [Harrar *et al.*, 2001; Schulz *et al.*, 2001]. AtFKBP42 ähnelt in seinem modularen Aufbau den FKBP, die an den löslichen SHR-Komplexen der Säuger beteiligt sind. Wegen einer vorhandenen TPR-Domäne wird die Beteiligung an der Steroidsignaltransduktion in *Arabidopsis* auch für weitere AtFKBP diskutiert, obwohl das Mitwirken eines Chaperonkomplexes an der Reifung von BRI1 bisher nicht nachgewiesen wurde [Berardini *et al.*, 2001; Carol *et al.*, 2001; Harrar *et al.*, 2001; Perez-Perez *et al.*, 2001a].

1.3 Ziele der Arbeit

Arabidopsis thaliana ist der erste Vertreter der höheren Pflanzen, dessen Genom vollständig sequenziert wurde. *Arabidopsis* stellt ebenso wie die Säuger einen multizellulären, hoch differenzierten Organismus dar. Obwohl die Zahl von 26.000 vorhergesagten Proteinen in einem vergleichbaren Rahmen mit denen des Menschen liegt [The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000; de Jong *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001], sind die Funktionen der Proteine in vielen Bereichen absolut verschieden [Meyerowitz, 2002]. Die ubiquitär verbreitete Klasse der PPIasen wurde sowohl in Pflanzen als auch in Säugern nachgewiesen.

Durch die Nutzung der zugänglichen Daten und eigene Analysen sollten die PPIasen des *Arabidopsis*-Genoms vollständig erfasst werden. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die *AtFKBP* gerichtet. Der Domänenaufbau sowie die mögliche subzelluläre Lokalisation sollten analysiert werden.

Der Funktionsverlust eines einzigen FKBP-Gens kann zu einem drastisch veränderten Phänotyp führen. Die *twd1*-(*AtFKBP42*)-Mutante ist eines von sehr wenigen charakterisierten Beispielen für einen solchen Phänotyp in höheren Organismen. Durch die Untersuchung von T-DNA-Insertionslinien sollten weitere *Arabidopsis*-FKBP-Mutanten identifiziert und mögliche Phänotypen analysiert werden.

Für *AtFKBP12* und *AtFKBP62* sind publizierte Daten über Bindungspartner bzw. die Veränderung des mRNA-Gehalts durch exogene Einflüsse verfügbar. Für keines der Proteine wurde jedoch bisher eine mögliche PPIase-Aktivität untersucht. Nach Klonierung und Reinigung der rekombinanten Proteine sollte deren PPIase-Aktivität untersucht und verglichen werden.

Die *TWD1*-Gendeletion verursacht bei *Arabidopsis*-Pflanzen einen Phänotyp, der als *twisted dwarf* bezeichnet wird. Die Domänenanalyse des korrespondierenden Proteins *AtFKBP42* zeigt ein FKBP, das in seinem modularen Aufbau denen gleicht, die an den löslichen SHR-Komplexen der Säuger beteiligt sind (FKBP-Domäne und TPR-Domäne). Über das humane Protein hFKBP38, das das homologe Protein zu *AtFKBP42* darstellt, wurde nur ein Artikel publiziert, der Daten über die Klonierung und Sequenzanalyse enthält.

Nach erfolgreicher Klonierung geeigneter Konstrukte sollte *AtFKBP42* heterolog exprimiert und gereinigt werden. Neben der proteinchemischen Charakterisierung und Untersuchung der enzymatischen Eigenschaften des Proteins sollte die Frage der zellulären Lokalisation *in vivo* beantwortet werden. Weiter sollte untersucht werden, ob es biochemische Zusammenhänge gibt, die eine Beteiligung von *AtFKBP42* an der Brassinosteroid-Signaltransduktion vermuten lassen.

2 Material

Alle Chemikalien hatten mindestens den Reinheitsgrad *pro analysii* und wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma (München), Serva (Heidelberg) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

[α - ³² P]dATP	ICN (Ohio, USA)
Agar	AppliChem (Darmstadt)
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Antibiotika	Roche Diagnostics (Mannheim)
Dextran T-500	Amersham Pharmacia (Freiburg)
dNTP Mix	Biometra (Göttingen)
FK506	Fujisawa (München)
Floradur [®] Anzuchterde	Floragard (Oldenburg)
Hefeextrakt Select 150	Invitrogen
Hortiperl [®] Mineralgranulat	Otavi Minen AG (Dorfprozelten)
Hyperfilm ECL [®]	Amersham Pharmacia
IPTG	AppliChem
Milbona Milchpulver	Lidl UK (London, GB)
Miracloth [®]	Calbiochem (La Jolla, USA)
Nitrozellulose Blotmembran	Pall Gelman (Dreieich)
Peptidsubstrate	Bachem (Heidelberg)
Pepton Select 150	Invitrogen
Protease Inhibitoren <i>Complete</i> [®] EDTA frei	Roche Diagnostics
Sterilfilter 0,2 μ M	Schleicher + Schüll (Dassel)
VivaSpin [®] (6 kDa Membran)	Sartorius (Göttingen)

Nachweis von Peroxidase-Aktivität:

ECL[®] *Western blotting analysis system* Amersham Pharmacia

Plasmidisolierung aus *E. coli*:

QIAprep[®] *spin miniprep kit* Qiagen

Radioaktive Markierung von DNA-Molekülen:

Megaprime DNA labelling system[®] Amersham Pharmacia

Reinigung von PCR Produkten:

High Pure[®] *PCR product purification* Roche Diagnostics

Zwischenklonierung von PCR-Produkten:

Perfectly Blunt cloning kit[®] Novagen (Madison, USA)

Die *Kits* wurden nach den entsprechenden Vorschriften der Hersteller benutzt.

2.1.5 Standards

100 bp DNA Standard	New England Biolabs
1 kb DNA Standard	New England Biolabs
10 kDa Proteinstandard	Invitrogen
Benchmark Proteinstandard	Invitrogen

2.1.6 *E. coli*-Stämme

DH5 α	<i>supE44 DlacU169 (f80 lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1gyrA96 thi relA1</i> [Hanahan, 1983]
XL1 Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1gyrA46 thi relA1 lac⁻ F'[proAB⁺lacI^q lacZ ΔM15 Tn10(tet^r)]</i> [Bullock <i>et al.</i> , 1987]
BL21 (DE3)	<i>hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)</i> Novagen
BL21 (DE3) Codon plus RIL	<i>ompT hsdS(rBmB) dcm Tet gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Camr]</i> Stratagene

2.1.7 Plasmide

pSTBlue-1	Novagen
pET28a	Novagen
pGEX-4T-1	Amersham Pharmacia

2.1.8 PCR-Primer

Die Synthese der Oligodesoxyribonukleotide erfolgte durch die Firma MWG Biotech AG (München).

Primer	Sequenz	Schnittstelle
TWD5Q	GAT CGA <u>CCA TGG</u> ATG AAT CTC TGG AGC ATC	<i>NcoI</i>
TWD12HINDIIIneu	TCA <u>GAA GCT TAG</u> TCT GCT GCA CCA ATC C	<i>HindIII</i>
TWD3HIND339	TCA CTA <u>AGC TTA</u> AAG GCT CTT TGA CTT AGC ACC	<i>HindIII</i>
TWD3Q	TCG ATC <u>AAG CTT</u> AAT CTG CTT TAA CTC TGT GG	<i>HindIII</i>
CH905Q	GAT GCA <u>CCA TGG</u> TTG TGG TCT CAG ACA GGA TTG	<i>NcoI</i>
CH903Q	GCA GTC <u>AAG CTT</u> AGT CGA CTT CCT CCA TC	<i>HindIII</i>
ATPARNCO	ATA <u>CCA TGG</u> GGA AGG ACG CAA	<i>NcoI</i>
ATPARSAL	TAA <u>GTC GAC</u> CTT AAA AGA TGG ATC	<i>SalI</i>
ROF1BAM5	ACT GGA <u>TCC ATG GAT</u> GCT AAT TTC G	<i>Bam HI</i>
ROF1SMA3	AGT <u>CCC GGG</u> TTA TTC CTT ACT TAG TTT CG	<i>SmaI</i>
AT12NCO5	TCG <u>ACC ATG GGT</u> GTG GAG AAG CAA G	<i>NcoI</i>
AT12HIND3	TCG <u>AAA GCT TAC</u> TGC ACG CTC AGT AC	<i>HindIII</i>

Mutagenese *AtFKBP42*

Mutagenese <i>AtFKBP42</i>	Austausch
A76G5	A76G
A76G3	
E86D5	E86D
E86D3	
E105Vff5	E105V L106I
E105Vff3	
L109W5	L109W
L109W3	
N142I5	N142I
N142I3	
Y151F5	Y151F
Y151F3	

2.1.10 Geräte

CD-Spektrophotometer Jasco J710	Jasco (Gross-Umstadt)
Chromatographiesystem	AmershamPharmacia
Diodenarray Spektrophotometer HP8453	Hewlett Packard (Böblingen)
Elektrophorese- und Blot-Apparatur	Biometra
FPLC	AmershamPharmacia
French [®] Press	SLM Aminco (Rochester, USA)
Heraeus Biofuge Stratos, Zentrifuge	Kendro (Hanau)
Optima [®] LE-80 K, Ultrazentrifuge	Beckman Coulter (Krefeld)
SMART (Chromatographiesystem)	AmershamPharmacia
Sorvall M120GX, Ultrazentrifuge	Kendro
Sorvall RC5B+, Zentrifuge	Kendro
Trio-Thermocycler	Biometra
Ultra-Turrax	IKA Werke (Staufen)
VP-ITC	MicroCal (Northampton, USA)

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* Kulturen erfolgte in LB- oder 2 × YT-Medium bei 37°C im Inkubationsschüttler (220 U/min). Benötigte Antibiotika wurden dem Medium in der gewünschten Konzentration zugegeben.

Glyzerinkulturen: Für die Herstellung von Glyzerinkulturen wurden 700 µl einer *E. coli* Übernachtskultur mit 300 µl Glycerin (50% (v/v)) versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Kultivierung von Expressionsklonen: Zur Erzeugung rekombinanter Proteine in *E. coli* wurde je 1 Liter 2 × YT-Medium mit 30 ml Übernachtskultur unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika angeimpft und im Inkubationsschüttler bis zu einer $OD_{600nm} = 0,5 - 0,7$ inkubiert. Nach Induktion mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) wurde die Inkubation für 5h fortgesetzt und anschließend die Zellen sedimentiert (6.000 U/min, 10 min, 4°C). Die Lagerung der Zellen bis zur Proteinreinigung erfolgte bei -80°C.

3.1.2 Agarosegelelektrophorese

Für die Auftrennung der DNA wurden 1%ige (w/v) Agarosegele verwendet, denen bei der Herstellung 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt wurde. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen Auftragspuffer versetzt, aufgetragen und die DNA mit einer angelegten Spannung von 5 – 10 V/cm getrennt. Das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid wurde mit UV-Licht sichtbar gemacht und das erhaltene Bild fotografiert.

3.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode, mit der es möglich ist, schnell und gezielt DNA-Fragmente zu amplifizieren. Durch den Einsatz entsprechender Primer können Schnittstellen und Nukleotidaustausche in das PCR-Produkt eingeführt werden [Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988].

Die Reaktion wurde in sterilen 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Ein Reaktionsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

- 1 μ l *Template*-DNA (10 - 100 ng)
- 0,5 μ l dNTP-Mix
- 0,5 μ l 3' PCR-Primer
- 0,5 μ l 5' PCR-Primer
- 5 μ l 10 \times PCR-Puffer
- 41,5 μ l steriles Wasser
- 1 μ l *Pfu*-Polymerase (2,5 units)

Da ein Thermocycler mit Deckelheizung (Biometra) benutzt wurde, konnte auf den Einsatz von Mineralöl verzichtet werden. Für die Reaktion wurde folgendes Programm verwendet:

- 1) 3 min 95°C Denaturierung der *Template*-DNA
- 2) 1 min 95°C Denaturierung der *Template*-DNA
- 3) 1 min 48°C - 58°C Binden der PCR-Primer an die *Template*-DNA (*Annealing*)
- 4) 0,5 – 2 min 72°C Polymerasereaktion (*Elongation*)
- 5) 5 min 72°C Vervollständigung der letzten Reaktion

Die Programmschritte 2) – 4) wurden bei jeder PCR in 35 Zyklen durchlaufen. Das Binden der PCR-Primer an die *Template*-DNA ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer. Die Temperatur des *Annealings* und die *Elongationszeit* wurden für die einzelnen PCR-Reaktionen angepasst. Das Ergebnis der PCR-Reaktion wurde mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Nach Reinigung und Zwischenklonierung der PCR-Produkte wurde eine DNA-Sequenzierung durchgeführt.

3.1.4 Quantifizierung von DNA

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde mit einem GeneQuant II-Spektrophotometer in 10 mm Quarzglasküvetten bestimmt. Eine $OD_{260} = 1,0$ entspricht 50 μ g/ml Doppelstrang-DNA.

3.1.5 Enzymatische Modifikation von DNA

Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen: Für den Gebrauch der Restriktionsendonukleasen wurden die Empfehlungen des Herstellers beachtet. Der Entsprechende 1 \times Reaktionspuffer und 0,5 – 10 μ g DNA wurden mit 1 – 5 U Restriktionsendonuklease für drei Stunden bei

37°C inkubiert und der Reaktionsansatz anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

Ligation von DNA Fragmenten: Etwa 50 – 200 ng des zu verknüpfenden DNA Fragments wurden mit 5- bis 10-fachem Überschuss Vektor-DNA gemischt und für 5 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 10 × Ligationspuffer wurde der Ansatz mit 1U *T4* DNA-Ligase versetzt und 15 min bei 20°C inkubiert. Ein Teil dieses Reaktionsansatzes wurde für die folgende Transformation eingesetzt.

3.1.6 Transformation

Ein 50 µl Aliquot chemisch kompetenter Zellen [hergestellt nach: Hanahan, 1983; Hanahan, 1985] wurde mit 0,1 – 20 µg Plasmid-DNA für 60 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 s bei 42°C erfolgte eine erneute Inkubation für 2 min auf Eis. Der Transformationsansatz wurde mit 300 µl LB-Medium versetzt, 45 min bei 37°C geschüttelt und auf selektiven Agarplatten ausplattiert.

3.2 Arbeiten mit *Arabidopsis*

3.2.1 Kultivierung von *Arabidopsis*

Kultivierung auf Erde: Für die Kultivierung von *Arabidopsis* auf Erde wurde ein Gemisch aus Anzuchterde und Hortiperl[®] hergestellt und in Pflanzschalen mit Wasser angestaut. Das Saatgut wurde auf die Erde gestreut und mit einer klaren Kunststoffhaube abgedeckt, die eine Woche nach dem Keimen entfernt wurde. Die Kultivierung erfolgte unter Langtagbedingungen bei 22°C. Die Bewässerung der Pflanzen war gering und erfolgte durch Anstauung von Wasser.

Kultivierung in Flüssigmedium: Ein Volumen von 400 ml des Kulturmediums aus Murashige & Skoog Mix (Sigma), 2% Sucrose, pH 5,8 (KOH) wurde in 1 l Erlenmeyerkolben autoklaviert. Oberflächensterile Pflanzensamen (s. unten) oder Keimlinge von Agarplatten des selben Mediums wurden für vier Wochen in Flüssigmedium kultiviert. Die Kulturen wurden auf einem Schüttler mit 150 U/min unter Langtagbedingungen bei 22°C geschüttelt. Vier Tage vor Beendigung der Inkubation wurden die Kolben mit Aluminiumfolie umwickelt. Die Pflanzen wurden vor dem Aufschluss zweifach mit H₂O gewaschen und das restliche Wasser mit Küchentüchern aufgenommen.

Erzeugung und Lagerung von *Arabidopsis*-Samen: Pflanzen, die für die Erzeugung weiterer Samen kultiviert wurden, wurden nach Ausbildung der Samenschoten getrocknet. Die trockenen Pflanzen wurden in Papiertüten zerrieben, die Samen durch ein Teesieb gegeben und dadurch von den übrigen Pflanzenteilen getrennt. Die Samen wurden bei 4°C gelagert. Die kühle Lagerung ermöglichte ein direktes Ausbringen der Samen, ohne vorherige Kältebehandlung.

3.2.2 Oberflächensterilisation von *Arabidopsis*-Samen

Arabidopsis-Samen wurden kurz in 70% (v/v) EtOH gewaschen und anschließend für 10 min in 6% (v/v) Natriumhypochlorid-Lösung mit einigen Tropfen Tween[®] 20 inkubiert. Die am Gefäßboden abgesetzten Samen wurden in eine neues Gefäß überführt, mit 70% (v/v) EtOH und sterilem H₂O gewaschen und in Flüssigmedium oder auf Agarplatten kultiviert.

3.2.3 Präparation von *Arabidopsis*-Plasmamembranen

Puffer A: 50 mM Hepes (KOH) pH 7,5
(1000 ml) 0,5 M Sucrose
2 mM DTT
0,1 mg/ml BHT
1% (w/v) PVP

Puffer B: 50 mM Hepes (KOH) pH 7,5
(100 ml) 0,33 M Sucrose
1 Tablette *complete EDTA free*

Für den Nachweis, dass der Phänotyp von *twd1* auf der *AtFKBP42*-Null-Mutation beruht, wurden Expressionspflanzen aus den *twd1*-Pflanzen hergestellt, die Hemagglutinin-Epitop (HA) fusioniertes *AtFKBP42* (HA-*AtFKBP42*) exprimieren [Geisler *et al.*, 2001]. Die Pflanzen gleichen in ihrem Erscheinungsbild dem *Arabidopsis*-Wildtyp.

Arabidopsis-Pflanzen wurden geerntet und mit einem Ultra-Turrax (6 × 30 s) in 10 × Volumen eiskaltem Puffer A sorgfältig homogenisiert. Das Homogenat wurde durch zwei Lagen Miracloth filtriert und die kleineren Zelltrümmer durch Zentrifugation (8.000 × g, 10 min) bei 4°C entfernt. Aus dem Überstand wurde die Mikrosomenfraktion durch einen zweiten Zentrifugationsschritt (48.000 × g, 45 min, 4°C) sedimentiert. Das erhaltene Pellet wurde mittels wässriger Zweiphasenextraktion weiter gereinigt [Kammerloher *et al.*, 1994].

Die Mikrosomenfraktion wurde genutzt, um eine Extraktion von HA-*AtFKBP42* mit 2% (w/v) Triton[®] X-100, Triton[®] X-114, Tween[®] 20, CHAPS, Mega-9, Dodecylmaltosid (DDM) und SDS durchzuführen. Je 30µl resuspendierte Mikrosomenfraktion (10 µg Protein) wurden sedimentiert, in 50µl Puffer B (ohne Proteaseinhibitoren) aufgenommen und für 20 min bei 25°C auf einem

Schüttler (500 U/min) inkubiert. Durch Zentrifugation ($48.000 \times g$, 30 min, 4°C) wurden die lösliche Fraktion (Extrakt) und Sediment voneinander getrennt. Nach SDS-PAGE und Western-Blot wurde die Verteilung von HA-AtFKBP42 mit anti-HA Antikörper nachgewiesen.

3.2.4 Elektronenmikroskopie¹

Arabidopsis-Wildtyp und HA-AtFKBP42 exprimierende Pflanzen wurden etwa drei Wochen auf Erde kultiviert. Die Pflanzen wurden fixiert wie beschrieben [Neumann *et al.*, 1987]. Der Nachweis von HA-AtFKBP42 erfolgte mit anti-HA Antikörpern. Die monoklonalen Antikörper stammten aus einer Rattenzelllinie, deren IgG von Protein-A schlecht erkannt wird. Aus diesem Grund wurde an den anti-HA Antikörper ein polyklonaler anti-Ratte Antikörper aus Kaninchen gebunden. Der Komplex wurde mit Gold-markiertem ($\varnothing = 15 \text{ nm}$) ProteinA im Elektronenmikroskop nachgewiesen.

3.2.5 Identifikation von *Arabidopsis*-T-DNA-Insertionslinien

Die Insertion von Transfer-DNA (T-DNA) aus *A. tumefaciens* geschieht stabil an einer zufälligen Stelle der *Arabidopsis*-DNA. Ein an dieser Stelle enthaltenes Gen wird in seiner Struktur verändert und somit inaktiviert [Babiychuk *et al.*, 1997; Krysan *et al.*, 1999]. Die T-DNA kann fremde Gene mit eigenem Promotor und einen Selektionsmarker enthalten. Für die Erzeugung von T-DNA-Insertionslinien, die auf die resultierenden Gendefekte untersucht werden sollen, ist es ausreichend, einen Selektionsmarker zu transformieren.

Die Identifikation (*Screening*) neuer *Arabidopsis*-T-DNA-Insertionslinien in FKBP codierenden Genen wurde während eines Forschungsaufenthaltes in der Arbeitsgruppe von Dr. B. Schulz im Max-Delbrück-Laboratorium in Köln durchgeführt. Ein großer Bestand genomischer *Arabidopsis*-DNA-Präparationen verschiedener T-DNA-Insertionslinien, die aus den öffentlichen *Arabidopsis*-Linienkollektionen bezogen wurden, stand für die Untersuchungen zur Verfügung. Die Analysen erfolgten durch PCR mit einem genspezifischen und einem T-DNA-spezifischen Primer. Als *Template*-DNA wurde genomische *Arabidopsis*-DNA eingesetzt. Ein PCR-Produkt kann nur unter bestimmten Bedingungen amplifiziert werden: Die T-DNA muss in das Gen inseriert sein, für das auch der eingesetzte, genspezifische Primer abgeleitet wurde. Der Nachweis eines PCR-Produkts erfolgte nach Southern-Blot mittels radioaktiv markierten genspezifischen Sonden. Die PCR wurde zunächst mit DNA aus 18 Gruppen von je 1.000 Linien

¹ Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden von Dr. Dieter Neumann (IPB Halle) durchgeführt.

durchgeführt. Die Gruppen setzten sich aus Untergruppen zusammen, deren DNA ebenfalls einzeln zur Verfügung stand. Nach einer erfolgreichen Identifikation einer FKBP T-DNA-Insertionslinie wurde die Linie in den zugehörigen Untergruppen erneut zugeordnet. Nach dieser Eingrenzung auf 20 – 100 Linien wurden die Linien ausgesät und Einzelpflanzen auf die Insertion untersucht.

Präparation genomischer DNA: Genomische *Arabidopsis*-DNA der verschiedenen T-DNA-Insertionslinien wurde nach Murray und Thompson [1980] isoliert.

PCR: Die Primer für das *Screening* waren so abgeleitet, dass für alle PCR-Reaktionen ein Programm genutzt werden konnte:

- 1) 94°C, 4 min
- 2) 94°C, 60s
- 3) 58°C, 60s
- 4) 72°C, 2 min

Die Schritte 2) – 4) wurden mit 35 Zyklen durchlaufen.

Für die PCR-Reaktion wurde folgender Standardansatz pipettiert:

- 5 µl 10 × Puffer
- 5 µl dNTP Mix (2,5 mM je Nukleotid)
- 1 µl T-DNA-Primer (12 pmol)
- 1 µl genspezifischer Primer (12 pmol)
- 1 µl DNA (20 - 50 ng)
- 36 µl H₂O
- 1 µl *Taq*-Polymerase

Southern-Blot: Die PCR-Produkte wurden im 1%igen Agarosegel aufgetrennt und nach Southern [1974] auf Biodyne B Membran transferiert. Das Agarosegel wurde vor dem Transfer für 20 min in 1% HCl inkubiert und anschließend mit H₂O gewaschen. Der Transfer erfolgte mit 0,4 M NaOH für mindestens 6 Stunden. Der Aufbau und das Prinzip sind bei Sambrook *et al.* [1989] erläutert.

Herstellung genspezifischer Sonden: Mit zwei genspezifischen Primern und *Arabidopsis*-Wildtyp DNA wurde ein PCR-Produkt hergestellt, das nach Reinigung mit dem *Megaprime*

DNA labelling system[®] radioaktiv markiert wurde. Mit dieser genspezifischen Sonde können PCR Produkte aus einer Primerkombination von T-DNA-spezifischem Primer mit genspezifischem Primer durch Hybridisierung und Autoradiographie nachgewiesen werden.

Nachweis von PCR-Produkten:

Kasein-Puffer: 5 × SSC
 0,5% (w/v) SDS
 0,5% (w/v) Kasein

Die Prähybridisierung erfolgte mit Kasein-Puffer für 1 h bei 65°C. Die Hybridisierung erfolgte nach Zugabe der Sonde für mindestens 4 h bei 65°C. Anschließend wurde die Membran nach folgendem Protokoll gewaschen:

- 1) 10 min 2 × SSC, 0% (w/v) SDS
- 2) 30 min 2 × SSC, 1% (w/v) SDS
- 3) 20 min 2 × SSC, 0,1% (w/v) SDS
- 4) 30 min 0,5 × SSC, 0,1% (w/v) SDS
- 5) 45 min 0,2 × SSC, 0,1% (w/v) SDS

Die Lösung für Schritt 1) war nicht temperiert, alle übrigen Lösungen waren auf 65°C temperiert. Die gewaschene Membran wurde für die Autoradiographie benutzt.

3.3 Präparative Methoden

3.3.1 Zellaufschluss für die Proteinreinigung

Das Zellpellet geernteter Überexpressionskulturen wurde in Puffer des ersten Chromatographie-schrittes suspendiert. Durch dreimaliges Passieren einer French[®] Press mit 10.000 psi wurden die Zellen aufgeschlossen. Zelltrümmer und lösliche Fraktion wurden in einem Zentrifugations-schritt (100.000 × g, 45 min, 4°C) separiert. Die lösliche Fraktion (Überstand) wurde für die Chromatographie eingesetzt.

3.3.2 Proteinreinigung

Nach der Herstellung der löslichen Fraktion von *E. coli* Überexpressionskulturen wurde das rekombinant erzeugte Protein durch eine Kombination verschiedener Chromatographieprinzipien gereinigt.

Ionenaustauschchromatographie: Die Ionenaustauschchromatographie beruht auf der Wechselwirkung von geladenen Proteinseitenketten mit Gegenionen, die an das Chromatographiematerial gebunden sind. Für die Proteinreinigung wurden Fractogel EMD-DEAE-650(M) und Fractogel EMD-SO₃⁻-650(M) genutzt. Die Elution erfolgte mit steigenden Salzkonzentrationen im Elutionspuffer.

Affinitätschromatographie: Die Affinitätschromatographie beinhaltet alle Trennprinzipien, die auf der spezifischen Bindung von Proteinen an kovalent fixierten Liganden beruhen. Für die Reinigung der verschiedenen Proteine wurde die Farbstoff-Affinitätschromatographie (Fractogel TSK-AF-Blue) und Substrat-Affinitätschromatographie (Glutathion-Sepharose) genutzt. Die Elution erfolgte durch verschiedene Zusätze in Puffer. Von Fractogel TSK-AF-Blue wird mit steigenden Salzkonzentrationen eluiert. Die Elution von Glutathion-Sepharose erfolgte mit 15 mM reduziertem Glutathion. Die Säule für die Glutathion-Affinitätschromatographie wurde nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Calmodulin-Agarose wurde im Kleinmaßstab für analytische Experimente benutzt.

Hydrophobe Interaktionschromatographie: Die hydrophobe Interaktionschromatographie beruht auf der Wechselwirkung hydrophober Proteinbereiche mit hydrophobem Chromatographiematerial. Für die Reinigung wurde Fractogel EMD-Propyl Material eingesetzt. Der Proteinprobe wurden 25% (NH₄)₂SO₄ (maximaler Sättigung) zugesetzt und die Chromatographiesäule wurde vor der Chromatographie mit 25% (NH₄)₂SO₄ equilibriert. Die Elution erfolgte mit einem fallenden (25% - 0%) (NH₄)₂SO₄-Gradienten und gleichzeitigem Anstieg der Konzentrationen von Glycerol (0% - 5% (w/v)) und CHAPS (0% - 0,5% (w/v)).

Präparative Gelfiltration: Durch Gelfiltration werden Proteine aufgrund eines unterschiedlichen hydrodynamischen Volumens getrennt. Je kleiner das hydrodynamische Volumen eines Proteins ist, um so langsamer passiert es die Säule. Für die präparative Gelfiltration wurden Proteinproben (1 ml) auf einer HiLoad Superdex 75 HR 16/60 aufgetrennt.

3.3.3 Dialyse und Proteinkonzentrierung

Um Proteine in einen anderen Puffer zu überführen, wurden sie dialysiert. Die Dialyse zwischen zwei Reinigungsschritten erfolgte für $2 \times 3\text{h}$ gegen 5 l Puffer. Kleine Volumina homogener Proteine wurden in 1 ml Dialysezellen für $2 \times 3\text{h}$ gegen 500 ml Puffer dialysiert. Die Dialyse für ITC-Messungen erfolgte über Nacht.

Um die Konzentration von Proteinlösungen zu erhöhen, wurden sie in *VivaSpin* Konzentratoren mit 6 kDa Ausschlussvolumen zentrifugiert ($6.000 \times g$, 10°C).

3.4 Analytische Methoden

3.4.1 SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) nach der Methode von Laemmli [1970]. Die nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine wurden mittels Coomassie- oder Silberfärbung nachgewiesen [Heukeshoven & Dernick, 1988].

3.4.2 Western-Blot

Für die Immundetektion wurden durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine mit verschiedenen Methoden auf Nitrozellulose transferiert.

A: Das *Semi-dry-blotting* nach Khyse-Anderson [1984] ist für Moleküle mit kleinen und mittleren MM effizient. In einer Semi-Dry-Blotkammer (Biometra) wurden die Proteine nach SDS-PAGE mit Towbin-Puffer [Towbin *et al.*, 1979] transferiert. Es wurde eine Stromstärke von 2 mA/cm^2 Nitrozellulose bei variabler Spannung für 60 min angelegt.

B: Der Transfer von Proteinen mit großer MM erfolgte in einem Tank-Blot Verfahren nach Towbin *et al.* [1979]. Der Transfer wurde in Towbin-Puffer mit einem Zusatz von 0,1 % SDS für 4h mit einer angelegten Spannung von 400V unabhängig von der Gelgröße durchgeführt. Die Apparatur wurde während des Blottens gekühlt.

3.4.3 Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung von Proteingemischen wurde die Methode nach Bradford [1976] angewendet. Die Proteinkonzentration von Membranpräparationen aus *Arabidopsis* wurde mit der BCA-Methode bestimmt [Walker, 1994].

Die Konzentration homogener Proteine wurde spektroskopisch ermittelt. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 280nm entspricht nach dem Lambert-Beerschen Gesetz einer definierten Konzentration:

$$A_{280} = \epsilon_{280} \cdot c \cdot d$$

Formel 1: A_{280} = Absorption bei 280nm; ϵ_{280} = Extinktionskoeffizient bei 280 nm ($\text{cm}^2 \text{ mol}^{-1}$); c = Proteinkonzentration (M); d = Schichtdicke der Küvette (cm).

Der Extinktionskoeffizient wurde nach Gill und von Hippel [1989] berechnet.

Für die Bestimmung der Konzentration der *AtHsp90.1*-Proteinfragmente wurde nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung mit der BioRad-Software das Verhältnis der Banden bestimmt und daraus der Extinktionskoeffizient für die Mischung errechnet.

3.4.4 Quervernetzung von Proteinen

Für die Quervernetzung von Proteinen wurde das aminoreaktive, bifunktionale Reagenz Dithiobis(sulfosuccinimidylpropionat) (DTSSP) verwendet. Die Vernetzung durch DTSSP kann mit Hilfe von Reduktionsmitteln wieder aufgehoben werden. Der Inkubationsansatz der zu vernetzenden Proteine wurde 30 min bei 24°C mit Quervernetzungsreagenz inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1/10 Volumen 1.8 M Tris/HCl (pH 8,8) und eine Inkubation für weitere 30 min abgestoppt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert.

3.4.5 Calmodulin-Präzipitation

Die Bindung von *AtFKBP42* an eine CaM-Affinitätsmatrix wurde mit Hilfe von CaM-Agarose untersucht. Je 10µg *AtFKBP24*¹⁻³³⁹, *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ oder Calcineurin wurden mit 50µl CaM-Agarose in HEPES-Puffer (40 mM, pH 7,5), der 3 mM CaCl₂, 0,1 mM EDTA und 0,1 mM DTT enthielt, auf einem Schüttler für 1 h bei 4°C inkubiert. Der Überstand wurde entfernt, die Agarose fünffach mit Puffer gewaschen und für 15 min mit Elutionspuffer inkubiert. Im Elutionspuffer war statt CaCl₂ EGTA gelöst. Der Überstand der Inkubation, die Elutionsfraktion und die CaM-Agarose wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Banden des Coomassiegefärbten Gels quantifiziert. Das verwendete Calcineurin wurde in *E. coli* exprimiert und wie beschreiben gereinigt [Mondragon *et al.*, 1997].

3.4.6 Analytische Gelfiltration

Für die Untersuchung von Protein-Protein Wechselwirkungen wurde ein SMART-System mit einer Superdex75 HR 10/30 Säule genutzt. Durch eine Interaktion zwischen mehreren, aufgetragenen Proteinen vergrößert sich deren hydrodynamisches Volumen. Dies führt zu einer schnelleren Elution von der Gelfiltrationssäule, im Vergleich zu den separat aufgetragenen Proteinen.

3.4.7 Analytische Ultrazentrifugation²

Durch analytische Ultrazentrifugation kann z.B. der Oligomerisierungszustand und das effektive Molekulargewicht eines Proteins bestimmt werden [Schuster & Toedt, 1996]. Die Messung wird in zwei Abschnitte unterteilt. Nach der vollständigen Sedimentation des Proteins, wird die Umdrehungszahl der Zentrifuge reduziert und die Einstellung eines Sedimentationsgleichgewichts des sedimentierten Proteins in die Lösung verfolgt. Während der Zentrifugation wird in der Proteinlösung die Absorption gemessen. *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ wurde in einer Konzentration von 0,35 mg/ml in 10 mM HEPES, pH 7,5 und 150 mM NaCl bei 20°C analysiert. Die Sedimentation erfolgte mit 40.000 U/min. Die Messungen des Sedimentationsgleichgewichts wurde für 34 h mit 10.000 U/min durchgeführt. Die Anpassung der Daten erfolgte nach der Svedberg-Gleichung [Schuster & Toedt, 1996].

3.4.8 Isothermale-Titrationskalorimetrie³

Mit Hilfe der Isothermalen-Titrationskalorimetrie (ITC) kann die frei werdende Wärme von auftretenden Protein-Protein Interaktionen untersucht werden [Pierce *et al.*, 1999]. Für die Bestimmung der Dissoziationskonstante von *AtFKBP42* mit *AtHsp90* und die Untersuchung einer möglichen Bindung von FK506 an *AtFKBP42* wurde ein VP-ITC Kalorimeter der Firma Microcal (Microcal Inc., USA) genutzt. Die Proteine wurden vor den Messungen sorgfältig dialysiert, und als Referenz diente der Dialysepuffer.

² Die Analytische Ultrazentrifugation wurde von Dr. Hauke Lilie (MLU Halle) durchgeführt.

³ Die ITC-Messungen wurden von Jörg Fanghänel (MP-FS Enzymologie der Proteinfaltung) durchgeführt.

3.4.9 CD-Spektroskopie

Zur Messung der optischen Aktivität von Proteinen wurde die Circular dichroismus- (CD) Spektroskopie eingesetzt. Mit einem temperierbaren Jasco J-710 CD Spektrometer wurden Fern-UV CD-Spektren in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) von 195 nm bis 260 nm aufgenommen. Die Spektren wurden mit einer Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml in einer 0,1 cm Quarzglasküvette bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen. Für *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ wurde die pH- und Puffer-Abhängigkeit untersucht. Es wurden Spektren in 50 mM Phosphatpuffer bei pH 6,5, 7,5 und 8,5 aufgenommen sowie in 20 mM Tris/HCl (pH 7,5). Die Proteinspektren wurden pufferkorrigiert und die molare Elliptizität berechnet.

Die Änderung des CD-Signals durch Temperaturerhöhung (1°C/min) wurde bei festgelegten Wellenlängen über die Zeit aufgenommen.

3.5 Aktivitäts-Tests

3.5.1 PPIase-Aktivitäts-Tests

Proteasegekoppelter Test: Der proteasegekoppelte Test wurde wie beschrieben durchgeführt [Fischer *et al.*, 1984b; Hani *et al.*, 1999]. Die Messungen erfolgten bei 10°C in 35 mM HEPES-Puffer (pH 7,8) mit einem Dioden-Array UV/VIS-Spektrophotometer. Die Stammlösungen der Peptidsubstrate Suc-AXPF-pNA (20 mg/ml) wurden in DMSO hergestellt. Die isomerspezifische Protease Chymotrypsin [Fischer *et al.*, 1984a] wurden in einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml eingesetzt. Für die Bestimmung der Inhibitionskonstante K_i von GST-*AtFKBP62* durch FK506 wurden PPIase und FK506 in einem Messansatz 5 min vorinkubiert. Um eine mögliche Bindung von FK506 an *AtFKBP42* zu untersuchen, wurde ein kompetitiver Ansatz genutzt. Die Konzentration von hFKBP12 wurde so gewählt, dass die unkatalysierte Reaktion dreifach beschleunigt wurde (3 Beschleunigungseinheiten = 3 BE). Durch Zusatz von FK506 wurde die Beschleunigung auf 1 BE reduziert. In weiteren Messungen wurde *AtFKBP42* als Kompetitor zugegeben.

Proteasefreier Test: Die Messung der PPIase-Aktivitäten im proteasefreien Test erfolgte nach Janowski *et al.* [1997]. Die Substrate Suc-AXPF-pNA wurden in wasserfreiem 0,5 M LiCl/Trifluorethanol Lösung gelöst. Die Messungen wurden bei 10°C in 35 mM HEPES-Puffer (pH 7,8) durchgeführt.

RCM-T1 Rückfaltungstest: Die Rückfaltung der denaturierten, S-carboxy-methylierten S54G/P55N Variante der RNaseT1 (RCM-T1) wurde wie beschrieben gemessen [Schmid *et al.*, 1996]. RCM-T1 liegt in 100 mM Tris/HCl Puffer (pH 8,0) mit geringer Salzkonzentration denaturiert vor. Durch Verdünnung in 100 mM Tris/HCl und 2M NaCl faltet RCM-T1 spontan zurück. Diese Rückfaltung kann mittels Fluoreszenzspektroskopie verfolgt werden. PPIasen können die Rückfaltung von RCM-T1 beschleunigen.

3.5.2 Citratsynthase-Tests

Thermisch induzierte Aggregation von Citratsynthase (CS): Citratsynthase aggregiert spontan durch Inkubation bei 40°C. Diese Reaktion kann mit einem UV/VIS-Spektrophotometer bei 360 nm über die Zunahme der Trübung verfolgt werden [Buchner *et al.*, 1998]. Die Messungen wurden in 40 mM Hepes-Puffer (pH 7,5) in einem Volumen von 120 µl in einer 10 mm Küvette durchgeführt. Der Effekt von AtFKBP42-Proteinfragmenten auf die Aggregation der CS wurde untersucht.

Thermische Inaktivierung von CS: Parallel mit der Aggregation der CS geht deren Inaktivierung einher. Diese kann mit einem von Buchner *et al.* [1998] ausführlich beschriebenen Test gemessen werden. Bei diesem Test wird ein Substratumsatz mit einer Farbreaktion gemessen und in Relation zu der Aktivität (= 100 %) vor der thermischen Inaktivierung gesetzt. Durch Chaperone wird die Geschwindigkeit der Inaktivierung verlangsamt.

3.6 Computergestützte Analysen

Für die Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen und die Auswertung von Daten wurden verschiedene Computerprogramme benutzt. Die meisten dieser Programme sind über das Internet frei zugänglich. Eine Liste der Internetadressen der genutzten Programme und Datenbanken ist im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

3.6.1 Internet basierte Programme

Zur Analyse von Restriktionsendonuklease-Schnittstellen von DNA diente das Programm *WebCutter2.0*. Die Eigenschaften der eingesetzten PCR-Primer wurden mit dem Programm *Oligonucleotide Properties Calculator* berechnet und analysiert.

Für die Identifikation von beschriebenen und neuen PPIasen aus *Arabidopsis* wurden die Datenbanken des *NCBI*, der *AGI* und *SwissProt* genutzt. Suchen nach homologen Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen wurden mit den entsprechenden *BLAST* Programmen des *NCBI* durchgeführt [Altschul *et al.*, 1990]. Vergleiche mehrerer Sequenzen wurden mit *ClustalW* vorgenommen [Thompson *et al.*, 1994]. Viele genutzte Hilfsprogramme, z.B. für die Kalkulation von MM und Extinktionskoeffizienten von Proteinen nach der Methode von Gill und von Hippel, sind auf der *Expasy* Internetseite zu finden. Mit dem Programm *SMART* [Schultz *et al.*, 1998; Schultz *et al.*, 2000] wurden die Domänen der *Arabidopsis*-PPIasen analysiert. Die Existenz möglicher Signalsequenzen, die in Proteinen die subzelluläre Lokalisation bewirken, wurde mit den Programmen *TargetP* [Emanuelsson *et al.*, 2000] und *PSORT* vorhergesagt. Die Vorhersage der dreidimensionalen Struktur von Proteinen wurde mit dem Programmen *Swiss Model* und *Swiss PDB-Viewer* [Peitsch, 1996; Guex & Peitsch, 1997] ausgeführt.

3.6.2 Lokal installierte Programme

Zusätzlich wurden lokal installierte Programme genutzt. Die Auswertung der CD- und ITC-Messungen erfolgte mit Software, die durch den Hersteller der entsprechenden Geräte zur Verfügung gestellt wurde. Die CD-Spektren wurden zusätzlich mit der Software *CDNN* ausgewertet, die von Dr. Gerald Böhm programmiert wurde und im Internet kostenfrei zur Verfügung steht. Die Quantifizierung von Coomassie gefärbten Proteinbanden wurden mit der BioRad Auswertungssoftware durchgeführt. Die Programme *WebLabViewer*[®] und *SwissPDB Viewer* dienen zur Darstellung von Proteinstrukturen.

4 Ergebnisse

4.1 *Arabidopsis thaliana*-Genomanalyse

Das Genom von *Arabidopsis thaliana* wurde vollständig sequenziert [Lin *et al.*, 1999; Mayer *et al.*, 1999; Salanoubat *et al.*, 2000; Tabata *et al.*, 2000; Theologis *et al.*, 2000] und eine Vorhersage für mögliche codierte Proteine getroffen [The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000]. In den *Arabidopsis*-Datenbanken des *European Bioinformatics Institute* (EBI) sind alle vorhergesagten und identifizierten Proteine verzeichnet. Die in diesen Datenbanken aufgeführten Cyclophiline, FKBP und Parvuline wurden analysiert. Zusätzlich wurde das *Arabidopsis*-Genom mit dem Programm *Blast* nach PPIase-homologen Sequenzen durchsucht (vgl. Tabelle 4 – Tabelle 6).

Neben der Chromosomenlokalisierung eines Gens wurde die vorhergesagte Aminosäuresequenz mit dem Programm *SMART* auf Domänen untersucht und eine mögliche, subzelluläre Lokalisation vorhergesagt. Die Auswertungen wurden für die PPIase-Domänen durch einen Sequenzvergleich und die Bestimmung des Anteils ähnlicher AS noch einmal überprüft.

4.1.1 Datenbankanalyse der *Arabidopsis thaliana*-Cyclophiline

Es wurden 35 putative Cyclophilin Sequenzen analysiert. Durch Analyse mit dem Programm *SMART* wurden bei sieben dieser Sequenzen⁴ unvollständige Cyclophilin-Domänen festgestellt. Ein Sequenzvergleich mit *BlastP* gegen die Sequenz des *AtCyp18* wurde bei drei dieser Sequenzen wegen zu geringer Homologie durch das Programm abgebrochen. Diese Sequenzen wurden in Tabelle 4 nicht berücksichtigt. Bei den anderen 28 der 35 Sequenzen wurde eine Cyclophilin-Domäne identifiziert, von denen elf Sequenzen neben der Cyclophilin-Domäne zusätzliche Domänen oder Struktur motive aufwiesen. Für keine der untersuchten Sequenzen wurde mehr als eine Cyclophilin-Domäne vorhergesagt.

In der Literatur beschriebene Cyclophiline wurden aus unterschiedlichen Ökotypen (*Columbia / Landsberg erecta*) von *Arabidopsis* identifiziert. Dabei wurde für jedes Cyclophilin ein eigener Eintrag in den Datenbanken vorgenommen. Die Einträge der verschiedenen Ökotypen wurden verglichen und die entsprechenden Cyclophilin-Isoformen zusammengefasst (vgl. *AtCyp18*).

⁴ Datenbank: Q9SSA5, P82869, Q9C835, Q9LIK2, Q9ZVG4, Q9C9C7, O65220

Protein	Theoretische MM des translatierten Proteins (Anzahl der Aminosäuren); % Ähnlichkeit zu hCyp18 [#]	Genlokus (Genname)	Schematische Darstellung der vorhergesagten Motive	Vorhergesagte Lokalisation des prozessierten Proteins	Datenbank
<i>AtCyp15</i>	14,9 kDa (173); 79 %	Chr.2 ¹⁾ (<i>roc3</i>)	 Cyclophilin	Peroxisom / Cytosol	Q38900 ²⁾
<i>AtCyp18</i> <i>Columbia:</i> <i>Landsberg:</i>	18,4 kDa (172); 79 % 18,4 kDa (172); 81 %	Chr.4 ³⁾ (<i>roc1</i>) Chr.4 ³⁾ (<i>atcyp1</i>)	 Cyclophilin	Cytosol ^{4), 5)}	P34790 ⁴⁾ Q42406 ⁵⁾
<i>AtCyp18-2</i>	18,4 kDa (174); 80 %	Chr.2 ¹⁾ (<i>atcyp2</i>)	 Cyclophilin	Peroxisom / Cytosol ⁵⁾	O22516 ⁵⁾
<i>AtCyp18-3</i> <i>Landsberg</i>	18,2 kDa (169); 71 %	Chr.2 ¹⁾ (<i>atcyp</i>)	 Cyclophilin	Peroxisom / Cytosol	P35627 ⁶⁾
<i>AtCyp18-4</i>	18,2 kDa (164); 65 %	Chr.2 ¹⁾	 Cyclophilin	Cytosol	Q9SIH1 ^{D)}
<i>AtCyp18-5</i>	17,5 kDa (160); 66 %	Chr.1 ¹⁴⁾	 Cyclophilin	Cytosol / Peroxisom	Q9LPC7 ^{D)}
<i>AtCyp19</i> <i>Columbia:</i> <i>Landsberg:</i>	18,9 kDa (176); 76 %	Chr.3 ⁸⁾ (<i>roc2</i>) Chr.3 ⁸⁾ (<i>atcyp4</i>)	 Cyclophilin	Cytosol / Peroxisom	Q38901 ²⁾ Q38867 ⁵⁾
<i>AtCyp22</i>	21,5 kDa (201); 73 %	Chr.2 ¹⁾ (<i>cyp5</i>)	 Cyclophilin	ER ⁷⁾	O22515 ⁷⁾
<i>AtCyp22-2</i>	21,9 kDa (204); 71 %	Chr.5 ⁸⁾ (<i>roc7</i>)	 Cyclophilin	ER-Membran	Q9SP02 ⁹⁾
<i>AtCyp22-3</i>	21,5 kDa (199); 67 %	Chr.2 ¹⁾	 Cyclophilin	ER-Membran / Chloroplast	Q9ZVJ4 ^{D)}
<i>AtCyp25</i>	24,6 kDa (224); 67 %	Chr.4 ³⁾	 Cyclophilin	Sekretion	O49605 ^{D)}
<i>AtCyp25-2</i>	25,1 kDa (234); 64 %	Chr.3 ¹⁰⁾	 Cyclophilin	Sekretion / Vakuole	Q9LY53 ^{D)}
<i>AtCyp26</i>	26,0 kDa (232); 60 %	Chr.3 ¹⁰⁾ (<i>roc2</i>)	 Cyclophilin	PM	Q9LIK6 ^{D)}
<i>AtCyp26-2</i>	26,0 kDa (230); 47 %	Chr.2 ¹⁾	 Cyclophilin	PM / Thylakoid-Membran	O22906 ^{D)}
<i>AtCyp28</i>	28,2 kDa (260); 72 %	Chr.3 ¹⁰⁾ (<i>roc4</i>)	 Cyclophilin	Chloroplast ⁴⁾ / Chloroplast-Stroma	P34791 ⁴⁾
<i>AtCyp28-2</i>	28,3 kDa (259); 76 %	Chr.5 ⁸⁾	 Cyclophilin	Thylakoid ¹⁵⁾ / Chloroplast-Stroma	Q9ASS6 ¹⁵⁾
<i>AtCyp29</i>	28,5 kDa (259); 76 %	Chr.5 ⁸⁾	 Cyclophilin	Kern / Thylakoid	Q9FY98 ^{D)}
<i>AtCyp40</i>	40,6 kDa (361); 69 %	Chr.2 ¹⁾ (<i>sqn</i>)	 Cyclophilin TPR	Cytosol ¹¹⁾ / Kern	Q9C566 ¹¹⁾
<i>AtCyp45</i>	45,0 kDa (404); 69 %	s. <i>AtCyp40</i>	s. <i>AtCyp40</i>	s. <i>AtCyp40</i>	Q9XIL2 ^{D)}
<i>AtCyp57</i>	57,1 kDa (510); 64 %	Chr.4 ³⁾	 Cyclophilin	Kern	O82646 ^{D)}

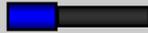
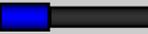
Protein	Theoretische MM des translatierten Proteins (Anzahl der Aminosäuren); % Ähnlichkeit zu hCyp18 [#]	Genlokus (Genname)	Schematische Darstellung der vorhergesagten Motive	Vorhergesagte Lokalisation des prozessierten Proteins	Datenbank
<i>AtCyp59</i>	59,0 kDa (509); 53 %	Chr.1 ¹⁴⁾	 Cyclophilin RNA Erkennungs-Motiv Zink-Finger	Kern	Q9C8M7 ^{16); D)}
<i>AtCyp64</i>	63,5 kDa (570); 71 %	Chr.3 ¹⁰⁾	 Cyclophilin	Kern	Q9LY75 ^{D)}
<i>AtCyp65</i>	65,0 kDa (595); 62 %	Chr.5 ⁸⁾	 ,Ubox'- Cyclophilin	Kern	Q9FJX0 ^{13); D)}
<i>AtCyp71</i>	70,7 kDa (629); 67 %	Chr.3 ¹⁰⁾	 4 WD40 Cyclophilin	Kern	Q9LXM7 ^{D)}
<i>AtCyp97</i>	96,9 kDa (857); 55 %	Chr.4 ³⁾	 Cyclophilin	Kern	Q9SUV0 ^{D)}

Tabelle 4 (vorherige Seite): Aufstellung der Cyclophiline aus *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp: *Columbia*, soweit nicht anders verzeichnet). Die Einträge wurden aus den Datenbanken *SwissProt* / *TrEMBL* entnommen. Die Isoformen aus verschiedenen Ökotypen von *Arabidopsis* sind in einem Eintrag zusammengefasst. #) Die Angaben zur Sequenzähnlichkeit beziehen sich auf die Cyclophilin-Domänen verglichen mit hCyp18. Symbole: Cyclophilin-Domäne ; Signalpeptid ; Membrananker ; TPR-Domäne (3 Motive) ; RNA-Erkennungs-Motiv ; Zink-Finger-Motiv ; ,Ubox'-Domäne ; WD40-Domäne ; kurze AS-Sequenzen ohne bekannte Domäneneigenschaften sind nicht eingezeichnet. Literatur: 1) [Lin *et al.*, 1999]; 2) [Chou & Gasser, 1997]; 3) [Mayer *et al.*, 1999]; 4) [Lippuner *et al.*, 1994]; 5) [Saito *et al.*, 1995]; 6) [Bartling *et al.*, 1992]; 7) [Saito *et al.*, 1999a]; 8) [Tabata *et al.*, 2000]; 9) [Jackson & Söll, 1999]; 10) [Salanoubat *et al.*, 2000]; 11) [Berardini *et al.*, 2001]; 12) [Fulgosi *et al.*, 1998]; 13) [Kotani *et al.*, 1998]; 14) [Theologis *et al.*, 2000]; 15) [Schubert *et al.*, 2002]; 16) [Krzywicka *et al.*, 2001; Lorkovic & Barta, 2002]; D) Datenbankeintrag des Proteins, keine Charakterisierung verfügbar. Eigene Analysen sind grau unterlegt.

Für *AtCyp40* und *AtCyp45* wurde je eine TPR-Domäne identifiziert. Beide Proteine sind für 252 der ersten 253 AS identisch und differieren nur in der C-terminalen Sequenz der folgenden 18 (*AtCyp40*) bzw. 61 AS (*AtCyp45*). Die Authentizität von *AtCyp40* wurde durch die Isolierung der entsprechenden mRNA und Charakterisierung bestätigt [Berardini *et al.*, 2001]. Bei *AtCyp45* könnte es sich um einen Sequenzierfehler oder eine alternative *Splicevariante* handeln. *AtCyp59* besteht aus drei verschiedenen Domänen. N-terminal ist die Cyclophilin-Domäne lokalisiert. Es

folgt eine RNA-Erkennungsdomäne (RRM)⁵ [Shamoo *et al.*, 1995], die an der Prozessierung von Prä-mRNA zu mRNA beteiligt ist [Reddy, 2001], und C-terminal ein Zink-Finger-Motiv⁶. Für Zink-Finger-Motive wurde DNA-Bindung nachgewiesen. Die ‚Ubox‘-Domäne⁷, die für *AtCyp65* vorhergesagt wurde, zählt zu den modifizierten RING-Finger-Domänen [Aravind & Koonin, 2000], die an der durch Ubiquitin vermittelten Proteindegradation beteiligt sind [Freemont, 2000]. In *AtCyp71* wurden vier WD40-Domänen⁸ N-terminal der Cyclophilin-Domäne vorhergesagt. Eine WD40-Domäne ist aus 44-60 AS aufgebaut, in der die zwei AS Tryptophan (W) und Aspartat (D) als ‚WD-Paar‘ vorkommen [Smith *et al.*, 1999]. Die WD40-Domäne wurde in Proteinen nachgewiesen, die essentielle Prozesse in der Zelle regulieren, z.B. Signaltransduktion, Zellzyklus und Apoptose. Humane Proteine mit WD40-Domänen sind mit verschiedenen humanen Krankheiten assoziiert, wie z.B. den Cockayne- und Allgrove-Syndromen [Li & Roberts, 2001].

Die subzelluläre Lokalisation wurde für Cyclophiline unterschiedlich vorhergesagt, nicht für alle konnte sie eindeutig erfolgen. Für das Cytosol und die Peroxisomen wurden mit einer Ausnahme *Arabidopsis*-Cyclophiline mit einer MM <19 kDa vorhergesagt. Die Ausnahme ist *AtCyp40*, das ebenfalls als cytosolisch charakterisiert wurde [Berardini *et al.*, 2001]. Nach der Analyse durch die entsprechenden Programme wäre für *AtCyp40* auch eine Kernlokalisierung möglich. Die sechs Cyclophiline mit den höchsten MM (*AtCyp57*, *AtCyp59*, *AtCyp64*, *AtCyp65*, *AtCyp71*, *AtCyp97*) wurden alle eindeutig als kernlokalisiert vorhergesagt. Die Analyse von *AtCyp26* und *AtCyp26-2* sagt eine Lokalisation in der Plasmamembran (PM) voraus (vgl. *AtFKBP42*). Für *AtCyp26-2* ist die Lokalisation nicht eindeutig, es könnte auch in der Thylakoidmembran integriert sein. Sowohl für das ER (*AtCyp22*) als auch die Chloroplasten (*AtCyp28*, *AtCyp28-2*) wurden *AtCyp* vorhergesagt, nicht aber für die Mitochondrien. *AtCyp25* und *AtCyp25-2* werden laut Analyse sekretiert. Bei der Auswertung durch das Programm *PSORT* wird die Sekretion aus der Zelle heraus von der Sekretion in die Vakuole der Pflanzenzelle unterschieden.

⁵ Datenbank *InterPro*: IPR000504

⁶ IPR001878

⁷ IPR003613

⁸ IPR001680

4.1.2 Datenbankanalyse der *Arabidopsis thaliana*-FKBP

Die Nomenklatur der *Arabidopsis*-FKBP in der Literatur ist uneinheitlich, oft werden Trivialnamen genutzt. Die Proteine FKBP15-1 und FKBP15-2 wurden von Luan *et al.* [1996] nach der MM der isolierten Proteine bezeichnet. Nach der Nomenklatur [Fischer, 1994] werden sie als *AtFKBP16* und *AtFKBP18* bezeichnet. *Pasticcino1* (PAS1 = *AtFKBP72*) steht für ein FKBP, dessen Mutantenphänotyp mit *pasticcino1* bezeichnet wird [Vittorioso *et al.*, 1998]. Insgesamt wurden 24 vorhergesagte FKBP Sequenzen analysiert, die eine oder drei FKBP-Domänen enthalten (Tabelle 5).

Protein (in der Literatur benutzte Namen)	Theoretische MM des translatierten Proteins (Anzahl der Aminosäuren); % Ähnlichkeit zu hFKBP12 [#])	Gen- lokus	Schematische Darstellung der vorhergesagten Motive	Vorhergesagte Lokalisation des prozessierten Proteins	Datenbank
<i>AtFKBP12</i>	12,0 kDa (112); 63 %	Chr.5 ¹⁾	 FKBP	Cytosol ²⁾	O04263 ²⁾
<i>AtFKBP15</i> (<i>AtFKBP15-3</i> ³⁾)	15,3 kDa (143); 65 %	Chr.5 ¹⁾	 FKBP	Chloroplast- Stroma / Cytosol	Q9FLB3 ^{D)}
<i>AtFKBP16</i> (<i>AtFKBP15-1</i>)	15,7 kDa (146); 57 %	Chr.3 ¹⁾	 FKBP	ER ⁴⁾	AAC49390 ⁴⁾ Q38935
<i>AtFKBP16-2</i>	16,4 kDa (153); 57 %	Chr.3 ⁹⁾	 FKBP	Sekretion / ER	Q9LSF4 ^{D)}
<i>AtFKBP18</i> (<i>AtFKBP15-2</i>)	17,7 kDa (163); 61 %	Chr.5 ¹⁾	 FKBP	ER ⁴⁾	Q38396 ⁴⁾ (U52407)
<i>AtFKBP18-2</i> (<i>AtFKBP17</i> ³⁾)	17,6 kDa (167); 52 %	Chr.2 ⁵⁾	 FKBP	Thylakoid- Lumen ⁶⁾	O22870 ⁶⁾
<i>AtFKBP20</i>	20,3 kDa (190); 66 %	Chr.3 ⁹⁾	 FKBP	Kern	Q9M2S7 ^{D)}
<i>AtFKBP22</i>	22,0 kDa (208); 55 %	Chr.5 ¹⁾	 FKBP	Thylakoid- Lumen ⁶⁾	Q9SCY2 ⁶⁾
<i>AtFKBP23</i> (<i>AtFKBP22-2</i> ³⁾)	23,3 kDa (217); 50 %	Chr.4 ⁷⁾	 FKBP	Thylakoid- Lumen	Q9SCY3 ^{D)} (O65658)
<i>AtFKBP23-2</i>	22,5 kDa (197); 52 %	Chr.3 ⁹⁾	 FKBP	Thylakoid- Lumen ⁶⁾	Q9M222 ⁶⁾
<i>AtFKBP25</i> (<i>AtFKBP24-1</i> ³⁾)	24,7 kDa (229); 40 %	Chr.4 ⁷⁾	 FKBP	Thylakoid- Lumen	O81864 ^{D)}
<i>AtFKBP25-2</i>	24,5 kDa (230); 50 %	Chr.3 ⁹⁾	 FKBP	Cytosol	Q9SR70 ^{D)}
<i>AtFKBP26</i> (<i>AtFKBP24-2</i> ³⁾)	25,5 kDa (232); 55 %	Chr.1 ⁸⁾	 FKBP	Thylakoid- Lumen ⁶⁾	Q9LM71 ⁶⁾
<i>AtFKBP27</i>	26,5 kDa (247); 39 %	Chr.1 ⁸⁾	 FKBP	Thylakoid Membran	Q9LDY5 ^{D)}
<i>AtFKBP28</i>	27,8 kDa (248); 53 %	Chr.3 ⁹⁾	 FKBP	Kern	Q9C7C8 ^{D)}

Protein (in der Literatur benutzte Namen)	Theoretische MM des translatierten Proteins (Anzahl der Aminosäuren); % Ähnlichkeit zu hFKBP12 [#])	Gen- lokus	Schematische Darstellung der vorhergesagten Motive	Vorhergesagte Lokalisation des prozessierten Proteins	Datenbank
<i>AtFKBP28-2</i>	27,8 kDa (256); 43 %	Chr.5 ¹⁾	 FKBP	Thylakoid- Lumen ⁶⁾	Q9LYR5 ⁶⁾
<i>AtFKBP42</i> (TWD1; UCU2 ¹⁴⁾)	41,8 kDa (365); 53 %	Chr.3 ⁹⁾	 FKBP TPR	PM	Q9LDC0 ^{D); 3)}
<i>AtFKBP51</i>	50,5 kDa (451); 39 %	Chr.1 ⁸⁾	 FKBP 5 Transmembran- segmente	Thylakoid Membran	Q9C9U6 ^{D)}
<i>AtFKBP53</i>	53,3 kDa (487); 59 %	Chr.4 ⁷⁾	 FKBP	Kern	Q9STK2 ^{D)}
<i>AtFKBP62</i> (ROF1)	61,8 kDa (551); >53 %	Chr.3 ⁹⁾	 3 FKBP TPR	Cytosol ¹⁰⁾	S72485 ¹⁰⁾ (Q9LSF3)
<i>AtFKBP65</i> (ROF2)	65,2 kDa (578); >58 %	Chr.5 ¹⁾	 3 FKBP TPR	Cytosol	Q9FJL3 ^{D)}
<i>AtFKBP71</i>	71,0 kDa (647); 59 %	Chr.3 ⁹⁾	 FKBP	Kern	Q9C7A0 ^{D)}
<i>AtFKBP72</i> (Pasticcino1)	71,7 kDa (634); >44 %	Chr.3 ¹¹⁾	 3 FKBP TPR	Kern ¹²⁾	U77366 ¹³⁾
<i>AtTrigger-Faktor</i>	65,0 kDa (629); 43 % TF)	Chr.5 ¹⁾		Chloroplast- Stroma	MCO15.17 PR); D)

Tabelle 5: Aufstellung aller beschriebenen und neu identifizierten FKBP aus *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp: *Columbia*). Die Einträge wurden aus den Datenbanken *SwissProt* / *GenBank* entnommen. #) Angaben zur Sequenzähnlichkeit beziehen sich auf die FKBP-Domänen verglichen mit hFKBP12. Symbole: FKBP-Domäne  ; Signalsequenz  ; Membrananker  ; TPR-Domäne (3 Motive)  ; Trigger-Faktor-Domänen 1 + 3  ; kurze AS-Sequenzen ohne bekannte Domäneneigenschaften sind nicht eingezeichnet. TF) Bezogen auf die Sequenz des *E. coli* Trigger-Faktors. Literatur: 1) [Tabata *et al.*, 2000]; 2) [Xu *et al.*, 1998]; 3) [Harrar *et al.*, 2001]; 4) [Luan *et al.*, 1996]; 5) [Lin *et al.*, 1999]; 6) [Schubert *et al.*, 2002]; 7) [Mayer *et al.*, 1999]; 8) [Theologis *et al.*, 2000]; 9) [Salanoubat *et al.*, 2000]; 10) [Vucich & Gasser, 1996]; 11) [Faure *et al.*, 1998b]; 12) [Carol *et al.*, 2001]; 13) [Vittorioso *et al.*, 1998]; 14) [Perez-Perez *et al.*, 2001a]; D) Datenbankeintrag des Proteins, keine Charakterisierung verfügbar; PR) Dr. P. Rücknagel, persönliche Mitteilung. Eigene Analysen sind grau unterlegt.

Als Erweiterungen neben den FKBP-Domänen wurden nur die TPR-Domäne und Signal- bzw. Transmembransequenzen identifiziert. Der Aufbau von *AtFKBP53* und *AtFKBP71* unterscheidet sich von den übrigen FKBP. Die jeweils einzige FKBP-Domäne wurde im C-terminalen Bereich der Aminosäuresequenzen identifiziert. Bei allen übrigen *AtFKBP* sind die FKBP-Domänen

N-terminal lokalisiert. Die vorhergesagte Lokalisation der *AtFKBP* war mit Ausnahme von *AtFKBP15* und *AtFKBP16-2* eindeutig. Demnach sind fünf Proteine (*AtFKBP20*, *AtFKBP28*, *AtFKBP53*, *AtFKBP71*, *AtFKBP72*) kernlokalisiert. Für *AtFKBP16* und *AtFKBP18* wurde die Lokalisation im ER gezeigt [Luan *et al.*, 1996]. Eine Lokalisation in den Chloroplasten wurde für zehn der *AtFKBP* (*AtFKBP18-2*, *AtFKBP22*, *AtFKBP23*, *AtFKBP23-2*, *AtFKBP25*, *AtFKBP26*, *AtFKBP27*, *AtFKBP28-2*, *AtFKBP51*, *AtTrigger-Faktor*) vorhergesagt und ist auch für *AtFKBP15* nicht auszuschließen. Die Thylakoide bilden ein eigenes Subkompartiment mit Thylakoid-Membran und -Lumen in den Chloroplasten [Bauer *et al.*, 2001; Schubert *et al.*, 2002]. Eine Besonderheit stellt der *AtTrigger-Faktor* (MCO15.17) dar. Der Aufbau dieses eukaryotischen Proteins ist fast identisch zum prokaryotischen Trigger-Faktor. Hinzu kommt eine identifizierte Signalsequenz, die den *AtTrigger-Faktor* in das Chloroplasten-Stroma dirigiert. Dort sind auch 70S Ribosomen lokalisiert, die den prokaryotischen gleichen. *AtFKBP51* ist laut Analyse durch 5 Transmembransegmente in der Thylakoidmembran gebunden, während *AtFKBP42* das einzige *AtFKBP* ist, das in der Plasmamembran verankert ist. Auffällig ist, dass keines der analysierten *AtFKBP* als mitochondrial lokalisiert vorhergesagt wurde.

4.1.3 Datenbankanalyse der *Arabidopsis thaliana*-Parvuline

Im Gegensatz zu den insgesamt 28 *AtCyp* und 24 *AtFKBP* wurden nur drei *AtParvuline* identifiziert und analysiert. Zwei *AtParvuline*, die beide cytosolisch lokalisiert vorhergesagt wurden, sind nur aus je einer Parvulin-Domäne aufgebaut. Die Substratspezifität von *AtPar13* wurde publiziert (vgl. Tabelle 3, Seite 10). *AtPar15* wurde in dieser Arbeit kloniert und das gereinigte, rekombinante Protein charakterisiert. Die Substratspezifität und k_{cat}/K_m -Werte sind *EcPar10* ähnlich (vgl. Tabelle 9, Seite 52). Das dritte Parvulin *AtPar25* ist chloroplastidär oder mitochondrial lokalisiert. Es wurde eine Null-Mutante für das *AtPar25*-Gen bei dem Nachweis der Funktionalität einer neuen Methode zur Erzeugung von Mutanten identifiziert [Babiychuk *et al.*, 1997]. Die Parvulin-Domäne des *AtPar25* befindet sich im Protein N-terminal einer putativen Rhodanese-Domäne⁹ (Thiosulfat Schwefeltransferase; E.C. 2.8.1.1) [Hofmann *et al.*, 1998]. Bisher wurden weder ein möglicher Phänotyp der Mutante noch enzymatische Aktivitäten des *AtPar25* publiziert.

⁹ IPR001763

Protein	Theoretische MM des translatierten Proteins (Anzahl der Aminosäuren); % Ähnlichkeit zu <i>EcPar10</i>	Genlokus	Schematische Darstellung der vorhergesagten Motive	Vorhergesagte Lokalisation des prozessierten Proteins	Datenbank
<i>AtPar13</i> (<i>AtPin1</i>)	13,0 kDa (119); 54 %	Chr.2 ¹⁾	 Parvulin	Cytosol	AAD20122 ²⁾
<i>AtPar15</i>	14,8 kDa (142); 55 %	Chr.1 ³⁾	 Parvulin	Cytosol	T1K7.8 ^{D)} Q9FE18
<i>AtPar25</i>	24,7 kDa (221); 57 %	Chr.5 ⁴⁾	 Parvulin Rhodanese	Chloroplasten / Mitochondrien	O23727 ⁵⁾

Tabelle 6: Aufstellung aller beschriebenen und neu identifizierten Parvuline aus *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp: *Columbia*). Die Einträge wurden aus den Datenbanken *SwissProt* / *GenBank* entnommen. #) Angaben zur Sequenzähnlichkeit beziehen sich auf die Parvulin-Domänen verglichen mit *EcPar10*. Symbole: Parvulin-Domäne ; Rhodanese-Domäne . kurze AS-Sequenzen ohne bekannte Domäneneigenschaften sind nicht eingezeichnet. 1) [Lin *et al.*, 1999]; 2) [Landrieu *et al.*, 2000a]; 3) [Salanoubat *et al.*, 2000]; 4) [Tabata *et al.*, 2000]; 5) [Babiychuk *et al.*, 1997]; D) Datenbankeintrag des Proteins, keine Charakterisierung verfügbar. Eigene Analysen sind grau unterlegt.

4.2 Identifikation von *AtFKBP* T-DNA-Insertionslinien

Bei insgesamt 24 identifizierten FKBP in *Arabidopsis* ist es nicht auszuschließen, dass der Verlust einzelner FKBP durch eine funktionale Redundanz mit anderen *AtFKBP* ausgeglichen werden kann. Andererseits sind spezielle *AtFKBP* in ihrer Funktion wahrscheinlich nicht zu ersetzen, z.B. wegen einer besonderen Lokalisation (*AtFKBP42*) oder einer einzigartigen Domänenstruktur (*AtFKBP42*, *AtTrigger-Faktor* und *AtFKBP51*). Aus einer Gruppen von T-DNA-Insertionslinien sollten neben den für *AtFKBP42* und *AtFKBP72* bekannten, weitere *AtFKBP*-Null-Mutanten identifiziert und soweit möglich charakterisiert werden.

Die 18.000 untersuchten Linien waren in verschiedenen Forschungseinrichtungen mit unterschiedlichen T-DNA-Insertionen hergestellt worden und wurden über das *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* bezogen. Zum Zeitpunkt der Durchführung des Screenings standen 13 Paare von unterschiedlichen genspezifischen Primern zur Verfügung, mit denen jeweils alle verfügbaren Insertionslinien untersucht wurden. Zusätzlich wurden zwei Primer für jeden Typ T-DNA benötigt, die in der äußeren 5'- bzw. 3'-Region der T-DNA binden. Für jede Gruppe von je 1.000 Linien wurden vier PCR-Reaktionen mit allen möglichen Kombinationen aus einem genspezifischen und einem T-DNA-spezifischen Primer durchgeführt. Ein PCR-Produkt kann nur mit DNA aus T-DNA-Insertionslinien amplifiziert werden, in denen die T-DNA in das entsprechende Gen des genspezifischen Primers inseriert ist.

Mit den eingesetzten Primern wäre es möglich gewesen, 12 *AtFKBP*- sowie *AtHsp90*-Insertionslinien der Isoformen *AtHsp90.1* - *AtHsp90.4* [Krishna & Gloor, 2001] zu identifizieren. Nach der PCR wurden die Reaktionen im Agarosegel und mittels Southern-Blot auf eine Trägermembran übertragen. Die erste Identifizierung einer Insertion in den Gruppen aus 1.000 Linien erfolgte durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten, genspezifischen Sonde und anschließender Autoradiographie. Durch die Autoradiographie konnte die Insertion jeweils in einer Gruppe von 1.000 Linien für die Gene von *AtFKBP12*, *AtFKBP65* und eine *AtHsp90*-Isoform nachgewiesen werden, in denen eine Linie eine T-DNA-Insertion im untersuchten Gen trägt. Mit den Untergruppen der identifizierten Linien wurde die PCR-Reaktion mit der Primerkombination wiederholt, die ein PCR-Produkt ergeben hatte. Hier ist es durch den höheren Anteil von DNA der Insertionslinie möglich, das PCR-Produkt zu reinigen und zu sequenzieren. Die in der ersten PCR durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbaren PCR-Produkte sind oft unspezifische Produkte, die in der Autoradiographie kein Signal geben (vgl. Abbildung 4C).

Die Insertion der T-DNA in die *Arabidopsis*-DNA geschieht zufällig. Je kleiner das Gen ist, um so geringer ist die Wahrscheinlichkeit einer Insertion. Die Identifikation hängt somit von der Größe des Gens und der Anzahl der untersuchten Linien ab. Um eine 95%ige Wahrscheinlichkeit für die Identifikation einer Insertionslinie zu erhalten, müssen für jedes Gen 180.000 Linien untersucht werden [Krysan *et al.*, 1999]. Für zwei *AtFKBP* (*AtFKBP12*, *AtFKBP65*) und *AtHsp90* gelang eine Identifikation in den untersuchten Linien (Abbildung 4, Tabelle 7).

Gen	Identifiziert mit der Primerkombination	Insertion bestätigt durch	T-DNA-Insertionslinienkollektion Nr. ¹⁾
<i>AtFKBP12</i>	F12-C2 TJ-LB1	Hybridisierung, Identifikation in der Untergruppe, Sequenzierung *	N19954 (100 Linien)
<i>AtFKBP65</i>	ROF12-S1 VsRB1	Hybridisierung, Identifikation in der Untergruppe, Sequenzierung *	N5371 (20 Linien)
<i>AtHsp90.2</i>	81A TJ-RB1	Hybridisierung, Identifikation in der Untergruppe Sequenzierung *	N19965 (100 Linien)

Tabelle 7: Identifikation von T-DNA-Insertionslinien in *AtFKBP12*, *AtFKBP65* und *AtHsp90.2*. 1) Informationen zu den Kollektionsnummern sind in den Datenbanken des *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC) verfügbar;

* Daten nicht gezeigt.

Die Identifikation der *AtFKBP12*-Insertion (Abbildung 4C) gelang aus einer Linie, die am *Dartmouth College* (New Hampshire, USA) in der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Jack erzeugt worden war [Campisi *et al.*, 1999]. Die PCR und Autoradiographie konnte in der entsprechenden Untergruppe N19954 erfolgreich wiederholt werden. Eine Sequenzierung des PCR-Produkts ergab eine Insertion ca. 300 bp stromaufwärts des Start-ATG in der Promotorregion des *AtFKBP12*-Gens.

Die zweite T-DNA-Insertion wurde im Gen des noch nicht näher charakterisierten *AtFKBP65* identifiziert (Abbildung 4A). Wie für *AtFKBP12* konnte die Hybridisierung in einer Untergruppe reproduziert werden (N5371). Diese Gruppe von Insertionslinien wurde am *Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA, Versailles, Frankreich) erzeugt [Bechtold *et al.*, 1993]. Die Sequenzierung des PCR-Produktes, durch das die *AtFKBP65*-Insertionslinie nachgewiesen wurde, zeigt eine Insertion in das sechste Intron des *AtFKBP65*-Gens.

Die dritte Identifizierung gelang für das *AtHsp90.2*-Gen. Nach der Hybridisierung und dem Nachweis der Insertion in den Untergruppen, wurde die T-DNA-Insertionslinie der Untergruppe N19965 (Thomas Jack Linie) zugeordnet (Abbildung 4B). Die Sequenzierung zeigte die T-DNA-Insertion im dritten Exon des *AtHsp90.2*-Gens.

Durch Aussähen der identifizierten Untergruppen in einem Raster, in dem jeder Pflanze eine definierte Koordinate zuzuordnen war, wurden einzelne Pflanzen auf die Insertion von T-DNA untersucht und so die entsprechenden T-DNA-Insertionslinien identifiziert. Die identifizierten Pflanzen wurden vermehrt und auf einen direkt sichtbaren Phänotyp untersucht. Die bisher untersuchten Pflanzen wiesen keinen erkennbaren Phänotyp auf. Eine präzise Untersuchung der Phänotypen ist noch nicht abgeschlossen und wird fortgesetzt (vgl. Seite 77).

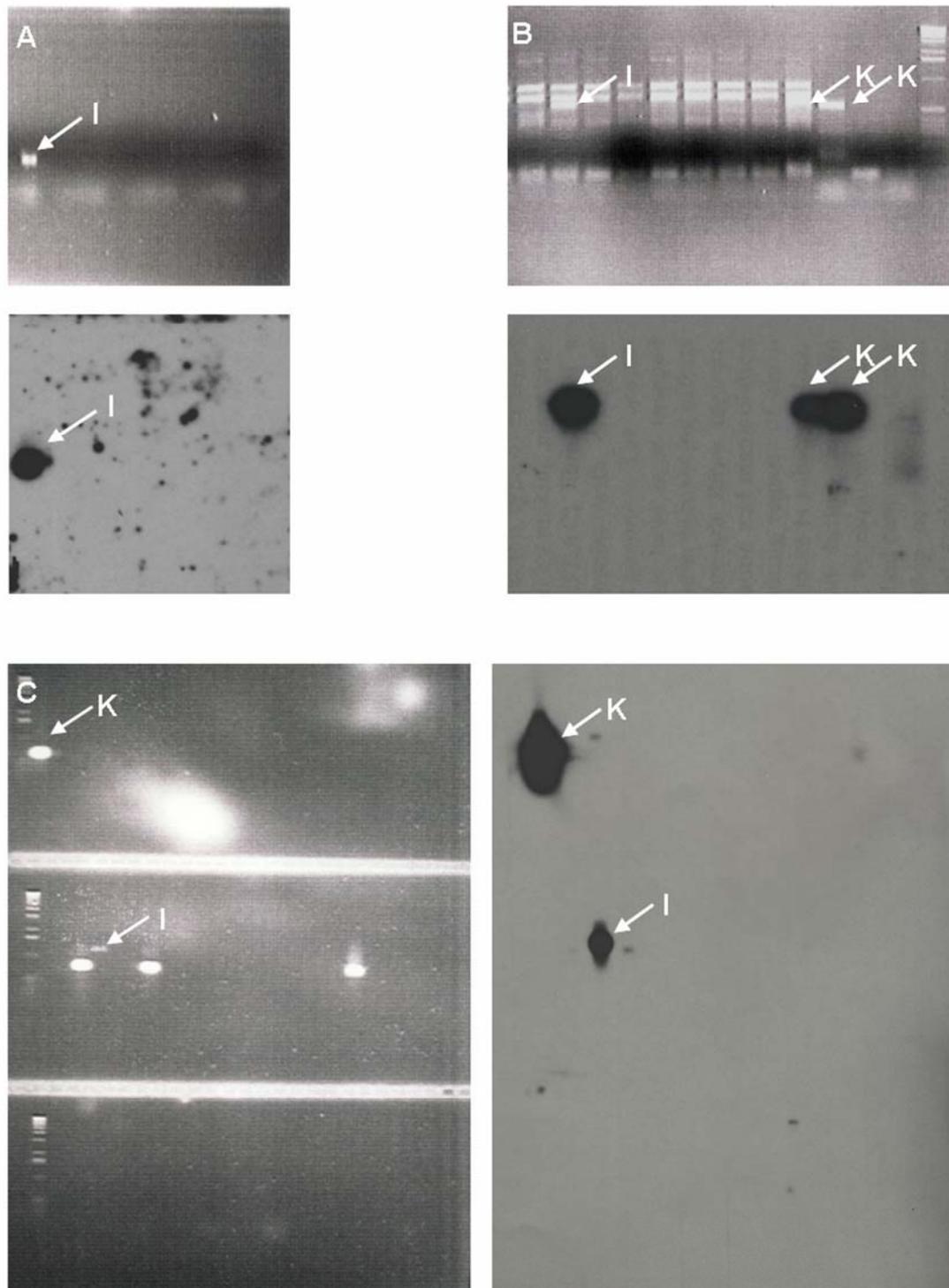


Abbildung 4: Identifikation der T-DNA-Insertionslinien durch Autoradiographie. A) *AtFKBP65* (Nachweis in den Gruppen zu je 1.000 Linien) oben: Ausschnitt des Agarosegels; unten: Ausschnitt der Autoradiographie; B) *AtHsp90* (Nachweis in den Untergruppen) oben: Agarosegel; unten: Autoradiographie; C) *AtFKBP12* (Nachweis in den Gruppen zu je 1.000 Linien) links: Agarosegel; rechts: Autoradiographie. K = Kontrolle; I = identifiziertes PCR-Produkt; PCR-Produkte, die in der Autoradiographie kein Signal zeigen, sind keine positiv identifizierten Signale.

4.3 Klonierungen

Für die vorliegende Arbeit wurden verschiedene Expressionsklone benötigt, die mit Hilfe der genannten molekularbiologischen Methoden hergestellt und für die Expression in *E. coli* transformiert wurden. Die spezifischen Bedingungen für die verschiedenen Konstrukte sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Die erste und letzte AS, aus denen sich verkürzte Proteine zusammensetzen, sind dem Proteinnamen hochgestellt angefügt. *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ entspricht folglich einem Fragment der AS 1-180 von *AtFKBP42*.

Konstrukt	5' Primer 3' Primer Template-DNA	Annealing Elongation	Genutzte Schnittstellen	Vektor Stamm Temperatur der Expression	Bemerkung
<i>AtFKBP12</i>	AT12NCO5 AT12HIND3 cDNA – Klon ¹⁾	56°C 1 min	<i>NcoI</i> <i>HindIII</i>	pET28a BL21 C+ RIL 37°C	Keine Erweiterungen, volle Länge
GST- <i>AtFKBP62</i>	ROF1BAM5 ROF1SMA3 cDNA – Klon ²⁾	50°C 2 min	<i>BamH1</i> <i>SmaI</i>	pGEX-4T-1 BL21 (DE3) 37°C	N-terminale GST-Fusion
<i>AtPar15</i>	ATPARNCO ATPARSAL cDNA - Klon ³⁾	56°C 1 min	<i>NcoI</i> <i>SalI</i>	pET28a BL21 (DE3) 37°C	Keine Erweiterungen
<i>AtFKBP42</i>	TWD5Q TWD3Q pQE31- <i>AtFKBP42</i> ²⁾	50°C 1 min	<i>NcoI</i> <i>HindIII</i>	pET28a BL21 C+ RIL 30°C	Keine Erweiterungen, volle Länge
<i>AtFKBP42</i> ¹⁻¹⁸⁰	TWD5Q TWD12HINDIIIneu pQE31- <i>AtFKBP42</i> ²⁾	50°C 30 sec	<i>NcoI</i> <i>HindIII</i>	pET28a BL21 C+ RIL 30°C	Keine Erweiterungen, FKBP-Domäne
<i>AtFKBP42</i> ¹⁻³³⁹	TWD5Q TWD3HIND339 pQE31- <i>AtFKBP42</i> ²⁾	50°C 1 min	<i>NcoI</i> <i>HindIII</i>	pET28a BL21 C+ RIL 30°C	Keine Erweiterungen, MA fehlt
<i>AtHsp90.1</i> ⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰	CH905Q CH903Q cDNA – Klon ²⁾	55°C 1min	<i>NcoI</i> <i>HindIII</i>	pET28a BL21 C+ RIL 37°C	Keine Erweiterungen, C-terminales Fragment

Tabelle 8: Bedingungen für die Klonierung der erzeugten Expressionsklone. MA = Membrananker; Herkunft der Template-DNA: 1) erhalten vom Kazusa DNA research institute (Klon Nummer: FB098h12F); 2) von Dr. B. Schulz zur Verfügung gestellt; 3) kommerziell erhältlicher Klon (NCBI Datenbank: T45176);

4.4 Charakterisierung von AtFKBP12

AtFKBP12 stellt den prototypischen Vertreter der FKBP in *Arabidopsis* dar. Es kann ebenso wie VjFKBP12 durch FK506-Affinitätschromatographie aus den entsprechenden Pflanzenextrakten präpariert werden [Luan *et al.*, 1993; Luan *et al.*, 1994a]. Die Interaktion mit dem Protein AtFIP37 konnte in einem Hefedibridsystem gezeigt werden [Faure *et al.*, 1998a]. Trotz dieser Daten über AtFKBP12 wurde bisher keine PPIase-Aktivität von AtFKBP12 oder einem homologen Pflanzenprotein nachgewiesen (vgl. Tabelle 2, Seite 9).

Nach der Klonierung eines geeigneten Konstrukts ohne künstlich angefügte Erweiterungen wurde AtFKBP12 in *E. coli* rekombinant hergestellt und gereinigt, um das Protein näher zu charakterisieren.

4.4.1 Proteinreinigung

Aus den sedimentierten Zellen einer 6 l *E. coli* Expressionskultur wurde die lösliche Fraktion mittels Zellaufschluss und Ultrazentrifugation gewonnen. Im ersten Chromatographieschritt passierte die lösliche Fraktion eine mit 10 mM Hepes (pH 7,5) equilibrierte Fractogel EMD-DEAE-650(M)-Säule (60 ml). Gebundene Proteine wurden mit einem 300 ml KCl-Gradienten (0 – 2 M) eluiert. Der Verlauf der Chromatographie wurde durch SDS-PAGE und Coomassie Färbung überprüft. Der Durchlauf, der das AtFKBP12 enthielt, wurde konzentriert und mittels präparativer Gelfiltration weiter gereinigt. Nach diesem Schritt wurden ca. 250 mg homogenes AtFKBP12 erhalten, das für die folgenden Untersuchungen verwendet wurde.

4.4.2 Eigenschaften

Gereinigtes AtFKBP12 wurde für die Charakterisierung durch CD-Spektroskopie (Abbildung 5) und eine Untersuchung der PPIase-Aktivität eingesetzt.

Um eine mögliche, thermisch induzierte Veränderung der Sekundärstruktur festzustellen, wurden CD-Spektren bei 20°C und 80°C aufgenommen. Das CD-Spektrum bei 20°C weist neben einem Minimum bei 216 nm ($-2.800 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) ein Maximum bei 201 nm ($1.100 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) auf. Ein Minimum bei 222nm, das für Proteine mit einem hohen α -helikalen Anteil typisch ist, fehlt. Insgesamt gleicht das Spektrum dem CD-Spektrum von hFKBP12 (Abbildung 5). Bei einer Temperatur von 80°C ist das CD-Spektrum, verglichen mit dem bei 20°C, verändert. Es weist bei 203 nm ein Minimum von $-7.300 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ auf. Das Spektrum gleicht dem der thermisch entfalteten AtFKBP42-FKBP-Domäne (vgl. Abbildung 12, Seite 64).

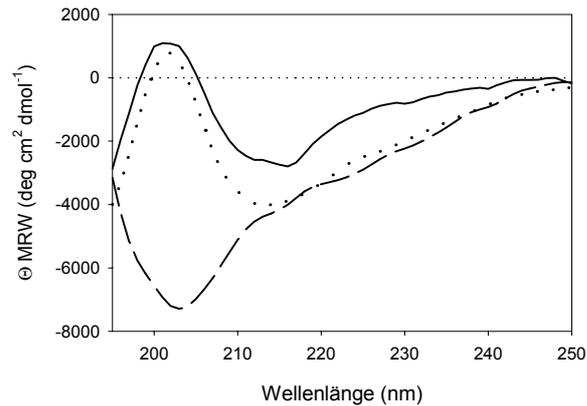


Abbildung 5: CD-Spektren von *AtFKBP12* (12 μM) aufgenommen in 50 mM Phosphat-Puffer pH 7,5, bei 20°C (—) und 80°C (---), sowie *hFKBP12* (11 μM) bei 20°C (.....). Das 20°C – CD-Spektrum enthält ein Minimum bei 216 nm ($-2.800 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) und ein Maximum bei 201 nm ($1.100 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$). Das 80°C – CD-Spektrum enthält ein Minimum bei 203 nm ($-7.300 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$).

Die PPIase-Aktivität von *AtFKBP12* wurde im proteasegekoppelten Test untersucht. Obwohl mehrere Substrate mit verschiedenen AS N-terminal des Prolins (Suc-AXPF-pNA) getestet wurden, konnte keine PPIase-Aktivität nachgewiesen werden. *AtFKBP12* wurde bis zu einer Konzentration von 6 μM im Messansatz eingesetzt. Diese Konzentration ist deutlich höher als Konzentrationen, die für die Bestimmung der äußerst geringen PPIase-Aktivität von *hPar14* nötig waren [Uchida *et al.*, 1999]. Die von *AtFKBP12* aufgenommenen CD-Spektren zeigen, dass das gereinigte Protein *hFKBP12* analoge Sekundärstrukturen enthält. Aufgrund dieser gezeigten Sekundärstrukturmerkmale kann somit ausgeschlossen werden, dass die fehlende Aktivität des rekombinanten Proteins durch unstrukturiertes, aggregiertes Protein verursacht wird.

Der Sequenzvergleich von *AtFKBP12* und *hFKBP12* (Abbildung 6) zeigt, dass von 14 AS-Resten, die an der Bindung von FK506 beteiligt sind, nicht alle in *AtFKBP12* konserviert sind [Kay, 1996]. Für die AS Tyrosin²⁶ des *hFKBP12* wurde durch Mutagenese festgestellt, dass die OH-Gruppe der Seitenkette während der Katalyse nicht für eine Wasserstoffbrücke benötigt wird [DeCenzo *et al.*, 1996]. Trotzdem kann die PPIase-Aktivität durch einen Austausch von Tyrosin²⁶ zu Phenylalanin verringert werden [Timerman *et al.*, 1995]. Auch die Proteinvarianten *hFKBP12* L30A und *hFKBP12* D37L sind in der PPIase-Aktivität reduziert [Timerman *et al.*, 1995; Tradler *et al.*, 1997]. Die Sequenz von *AtFKBP12* entspricht an den angegebenen Positionen nicht der Sequenz der *hFKBP12* Proteinvarianten, aber die entsprechenden AS des *AtFKBP12* sind in ihren Eigenschaften weiter von denen der *hFKBP12* Wildtyp-AS entfernt als die untersuchten Varianten. Hier kann ein möglicher Grund für die nicht gezeigte PPIase-Aktivität liegen.

```

AtFKBP12: GVEKQVIRPGNGPK-PAPGQTVTCTGFCKDGLSQKFWTKDEGQKPFSTQIGKGAVI 59
hFKBP12:  GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDG---KFDSSRDLN-KPKEMLGKQEVI 56
                                     *          * *      *      *      ***

AtFKBP12: KGWDEGVIGMQICEVARLRCSSDYAYGAGGGFAWGLQPNSVLDEEIEVLSVQ 111
hFKBP12:  RGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHEGI-IPPHATIVEDVELLKLE 107
          *                **      *   *                *

```

Abbildung 6: Sequenzvergleich von *AtFKBP12* und *hFKBP12*. Identische AS (43%) sind grau unterlegt. Der Anteil der ähnlichen AS beträgt 63%. Ein Sternchen markiert die AS, die bei der Bindung von FK506 diskutiert werden [Kay, 1996]. Die im Text näher bezeichneten AS-Varianten des *hFKBP12* sind schwarz unterlegt.

4.5 Charakterisierung von GST-*AtFKBP62*

Die Konzentration an *AtFKBP62*-mRNA kann durch exogene Stressfaktoren erhöht werden [Vucich & Gasser, 1996]. Die PPIase-Aktivität von *AtFKBP62* wurde bisher nicht charakterisiert. Weiterhin stellt *AtFKBP62* mit 73 % Sequenzidentität (85 % ähnliche AS) das FKBP mit der höchsten Homologie zu *AtFKBP65* dar, für das eine T-DNA-Insertionslinie identifiziert, aber kein Expressionsklon erhalten wurde.

Für einen erzeugten *AtFKBP62*-Expressionsklon ohne Erweiterungen konnte keine Proteinüberexpression in *E. coli* nachgewiesen werden. Mit einer N-terminalen GST-Fusion war eine Expression möglich, der entsprechende Klon wurde für die anschließende Proteinreinigung genutzt.

4.5.1 Proteinreinigung

Die lösliche Fraktion eines Zellaufschlusses aus 2 l einer Überexpressionskultur wurde wie beschrieben hergestellt und mit Hilfe der Glutathion-Affinitätschromatographie (1 ml Glutathion-Sepharose) aufgetrennt. Die Analyse durch SDS-PAGE zeigte bereits nach diesem Chromatographieschritt ein homogenes Protein (Abbildung 11, Seite 62), das nach Dialyse gegen 10 mM HEPES (pH 7,5) und Konzentrationsbestimmung für die Charakterisierung der PPIase-Aktivität eingesetzt wurde. Aus 2 l Expressionskultur wurden 15 mg GST-*AtFKBP62* erhalten.

4.5.2 PPIase-Aktivität

Für die Charakterisierung der PPIase-Aktivität von *AtFKBP62* wurde zunächst geprüft, ob das mit *AtFKBP62* fusionierte GST-Protein einen Effekt im proteasegekoppelten PPIase-Test hatte.

Für GST ohne Fusionsprotein, das nach dem gleichen Reinigungsschema wie GST-*AtFKBP62* erhalten wurde, wurde keine PPIase-Aktivität festgestellt. Es kann folglich auch die parallele Reinigung einer *E. coli*-PPIase durch Glutathion-Affinitätschromatographie ausgeschlossen werden. Auf die proteolytische Abspaltung der GST-Fusion wurde verzichtet. Die gemessenen PPIase-Aktivitäten verschiedener Substrate von GST-*AtFKBP62* sind in Tabelle 9 dargestellt. Für das Substrat Suc-ALPF-pNA wurde mit $5,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ die größte PPIase-Aktivität gemessen. Diese Größenordnung für den k_{cat}/K_m -Wert ist die etwa die Hälfte verglichen mit den humanen PPIasen hFKBP12 und hFKBP52. Der k_{cat}/K_m -Wert von hFKBP12 im proteasegekoppelten Test wurde für das gleiche Substrat mit $1,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bestimmt [Tradler *et al.*, 1997]. Die Substratspezifität von GST-*AtFKBP62* ist ähnlich der für andere FKBP. Auffällig ist die deutlich erhöhte PPIase-Aktivität gegenüber dem Substrat Suc-AKPF-pNA. Die gleiche Spezifität wurde mit 140% im Vergleich zu Suc-AFPF-pNA (100%) für *EcFKBP29* festgestellt (Dr. Jens-U. Rahfeld, persönliche Mitteilung). Für das Substrat Suc-AFPF-pNA wurde die Inhibitionskonstante von GST-*AtFKBP62* und FK506 bestimmt. Mit einem $K_i \approx 50 (\pm 10) \text{ nM}$ wurde eine Konzentration ermittelt, die etwa $100 \times$ höher ist, als für hFKBP12 (Daten nicht gezeigt) [Siekierka *et al.*, 1989].

Substrat (Suc-AXPF-pNA)	GST- <i>AtFKBP62</i> $k_{cat}/K_m [\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}]$	hFKBP12 $k_{cat}/K_m [\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}]$	<i>AtPar15</i> $k_{cat}/K_m [\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}]$	<i>EcPar10</i> $k_{cat}/K_m [\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}]$
Suc-ALPF-pNA	$530 \pm 0,47$ (139%)	1200 (153%) ¹⁾	$220 \pm 0,02$ (220%)	1650 (150%) ²⁾
Suc-AFPF-pNA	$380 \pm 0,08$ (100%)	780 (100%) ¹⁾	$100 \pm 0,11$ (100%)	1100 (100%) ²⁾
Suc-AAPF-pNA	$21 \pm 0,12$ (5,5%)	100 (13%) ¹⁾	$74 \pm 0,61$ (74%)	660 (60%) ²⁾
Suc-ARPF-pNA	$290 \pm 0,06$ (76%)	---	$67 \pm 0,50$ (67%)	550 (50%) ³⁾
Suc-AKPF-pNA	$520 \pm 0,05$ (136%)	58 (7%) ¹⁾	$170 \pm 0,10$ (170%)	330 (30%) ²⁾
Suc-AEPPF-pNA	0 (0%)	1,5 (0%) ¹⁾	$6,1 \pm 0,35$ (6,1%)	165 (15%) ²⁾
Suc-AGPF-pNA	$1,4 \pm 0,20$ (0,4%)	1,6 (0,2%) ⁴⁾	$0,5 \pm 0,07$ (0,5%)	0 (0%) ⁴⁾

Tabelle 9: Übersicht der im proteasegekoppelten Test bestimmten PPIase-Aktivitäten (relative Aktivitäten bezogen auf Suc-AFPF-pNA = 100%) von GST-*AtFKBP62* und *AtPar15*. Zum Vergleich sind die Aktivitäten von hFKBP12 und *EcPar10* angegeben. 1) [Tradler *et al.*, 1997]; 2) [Rahfeld *et al.*, 1994]; 3) [Uchida *et al.*, 1999]; 4) Dr. J.U. Rahfeld, persönliche Mitteilung

4.6 Charakterisierung von AtPar15

AtPar15 wurde durch eine Analyse von *Arabidopsis*-cDNA-Datenbanken identifiziert und nach Erhalt des Klons Nr. T45176 erfolgreich in einen Expressionsvektor kloniert. Im Menschen sind zwei verschiedene Parvuline identifiziert: hPin1 [Lu *et al.*, 1996] und hPar14 [Uchida *et al.*, 1999]. Ein Parvulin mit einer hPin1 vergleichbaren Substratspezifität [Yaffe *et al.*, 1997] ist mit AtPar13 identifiziert [Landrieu *et al.*, 2000a; Yao *et al.*, 2001]. Das zweite humane Parvulin ist hPar14. Bei einem Sequenzvergleich von AtPar15 mit hPar14 wurde 54% ähnliche AS und 44% Sequenzidentität festgestellt. Ein Vergleich der Substratspezifität von hPar14 und AtPar15 wurde nach der Reinigung von AtPar15 vorgenommen.

4.6.1 Proteinreinigung

Die lösliche Fraktion des Pellets aus 6 l *E. coli*-Überexpressionskultur wurde für die Reinigung eingesetzt. Im ersten Chromatographieschritt passierte das Lysat zwei aufeinander folgende Säulen, die mit 2 mM Trizin (pH 8,0) equilibriert waren. An eine Fractogel EMD-DEAE-650(M)-Säule (60 ml) war eine Fractogel TSK-AF-Blue-Säule (10 ml) angeschlossen. AtPar15 wurde nach Durchlauf durch die DEAE- auf der AF-Blue-Säule gebunden. Die Elution erfolgte mit einem KCl-Gradienten (0 - 3 M) in 200 ml Puffer. Der Chromatographieverlauf wurde durch SDS-PAGE und Coomassie Färbung überprüft. Die AtPar15-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, gegen 10 mM Hepes (pH 7,5) dialysiert und auf eine Fractogel EMD-SO₃⁻-650(M) Säule aufgetragen. Nach der Elution mit einem steigenden KCl-Gradienten (0 - 2 M) wurden die AtPar15-enthaltenden Fraktionen durch Elektrophorese und Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 11, Seite 62). Die Ausbeute betrug ca. 150 mg Protein aus 6 l Expressionskultur.

4.6.2 Eigenschaften

Das gereinigte AtPar15 wurde für die Charakterisierung durch CD-Spektroskopie (Abbildung 7) und Bestimmung der Substratspezifität verwendet (Tabelle 9). Das aufgenommene CD-Spektrum zeigt zwei Minima bei 207 nm und 224 nm mit einer Signalintensität von -4.700 deg cm² dmol⁻¹ bzw. -4.900 deg cm² dmol⁻¹. CD-Spektren eines Proteins mit einem hohen α -helikalen Anteil besitzen ein absolutes Minimum bei 222 nm und ein lokales bei 209 nm (vgl. AtFKBP42¹⁻³³⁹: Abbildung 12, Seite 64 und hFBKP52 [Pirkl & Buchner, 2001]). Proteine mit einem hohen β -Faltblattanteil sind durch ein einziges Minimum bei ca. 212 nm charakterisiert (vgl. AtFKBP42¹⁻¹⁸⁰: Abbildung 12, Seite 64 und hFKBP12 [Pirkl & Buchner, 2001]). hFKBP12 enthält neben unstrukturierten Bereichen ein β -Faltblatt aus fünf antiparallelen Strängen und eine

kurze α -Helix [Michnick *et al.*, 1991]. Die mit Kernresonanzmessungen bestimmte Struktur von hPar14 zeigt das typische FKBP12-Faltungsmuster in der globalen Anordnung der Sekundärstrukturelemente. Es sind aber drei kurze α -Helices enthalten [Sekerina *et al.*, 2000]. Nimmt man eine gleiche Sekundärstruktur für AtPar15 an, so erklärt der erhöhte α -helikale Anteil das Minimum bei 224 nm.

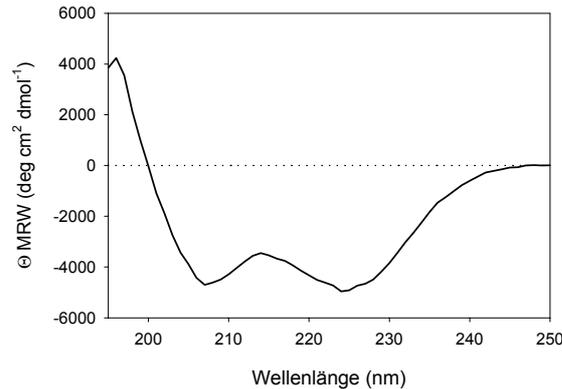


Abbildung 7: CD-Spektrum von AtPar15 (7 μ M), aufgenommen in 50 mM Phosphat-Puffer pH 7,5 bei 20°C. Die Minima des CD-Spektrums liegen bei 207 nm ($-4.700 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) und 224 nm ($-4.900 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$).

Die für AtPar15 bestimmte Substratspezifität entspricht der des EcPar10 (Tabelle 9). Die gemessene Aktivität liegt in der Größenordnung von $k_{cat}/K_m = 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, d.h. $10 \times$ niedriger als für EcPar10. Auffällig ist die erhöhte Aktivität gegenüber dem Substrat Suc-AKPF-pNA. Verglichen mit hPar14 ist die PPIase-Aktivität deutlich höher. Für hPar14 wurde im proteasegekoppelten Test der höchste k_{cat}/K_m -Wert = $3,9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für das Substrat Suc-ARPF-pNA bestimmt [Uchida *et al.*, 1999]. Dieser ist 56-fach niedriger als der k_{cat}/K_m -Wert für AtPar15 gegenüber dem besten gemessenen Substrat Suc-ALPF-pNA.

4.7 Sequenzanalyse von AtFKBP42

Wie die Sequenzen von allen AtFKBP wurde auch die AS-Folge von AtFKBP42 mit dem SMART Programm auf Domänen und Sequenzmerkmale untersucht. Durch das Programm wurden eine FKBP-Domäne, eine TPR-Domäne bestehend aus 3 TPR-Motiven und ein Membran durchspannender Bereich vorhergesagt (vgl. Tabelle 5, Seite 42).

Die FKBP-Domäne von *AtFKBP42* beginnt mit AS 50 und endet mit AS 159. Sie besitzt 30% Sequenzidentität mit hFKBP12 (53% ähnliche AS).

Eine für FKBP charakteristische TPR-Domäne enthält drei TPR-Motive, die aus je 34 AS aufgebaut sind [Goebl & Yanagida, 1991]. Ein TPR-Motiv ist ein degeneriertes Strukturmotiv, das nur an acht von 34 AS auf eine gemeinsame Sequenz (Konsensussequenz) zurückgeführt werden kann. Für diese acht Positionen kann die folgende, nicht immer vollständig zutreffende Konsensussequenz abgeleitet werden: AS 4 (W/L/F), 7 (L/I/M), 8 (G/A/S), 11 (Y/L/F), 20 (A/S/E), 24 (F/Y/L), 27 (A/S/L) und 32 (P/K/E) [Blatch & Lässle, 1999]. Die acht AS nehmen in der Helixstruktur eines TPR-Motivs eine charakteristische Anordnung in zwei Helices ein [Lamb *et al.*, 1995]. Das erste TPR-Motiv von *AtFKBP42* beginnt mit AS 179 und endet mit AS 212. Das zweite Motiv beginnt mit AS 230 und geht in das dritte über, das mit AS 297 endet (Abbildung 8).

Eine CaM-Bindung wurde für verschiedene Multidomänen-FKBP gezeigt und in der C-terminalen Region lokalisiert [Massol *et al.*, 1992; Hueros *et al.*, 1998; Carol *et al.*, 2001; Kurek *et al.*, 2002]. Durch die Sequenzhomologie dieser PPIasen zu *AtFKBP42* liegt auch hier eine CaM-Bindung nahe.

Die letzten C-terminalen AS von *AtFKBP42* (AS 340-365) wurden als membrandurchspannend vorhergesagt. Sie könnten aus diesem Grund als Membrananker von *AtFKBP42* fungieren.

4.7.1 AtFKBP42 homologe Proteine

Die Suche nach verwandten Proteinen von *AtFKBP42* führte zu der Identifizierung von homologen Proteinen, in deren Sequenzen auch der Membrananker vorhergesagt wurde (Abbildung 8). Die 38 kDa FKBP aus Mensch und Maus wurden bereits beschrieben, der putative Membrananker aber nicht identifiziert [Lam *et al.*, 1995; Pedersen *et al.*, 1999]. In der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wurde ein vorhergesagtes 44,8 kDa Protein (*DmFKBP45*, NCBI: AAF57662) als homolog identifiziert. Diese Proteine sind alle nach dem *AtFKBP42* typischen Muster aus einer FKBP-Domäne, einer TPR-Domäne mit drei Motiven, einer wahrscheinlichen CaM-Bindungsstelle und dem Membrananker aufgebaut (Abbildung 9).

Die FKBP- und TPR-Domänen sowie der Membrananker wurden für alle vier Proteine durch *SMART* vorhergesagt. Die wahrscheinliche CaM-Bindung wurde für hFKBP38 und muFKBP38 von Lam *et al.* [1995] und Pedersen *et al.* [1999] postuliert. Um die vorhergesagte Transmembranregion zu bestätigen, wurde die Vorhersage mit dem Programm *TMpred* überprüft und hier ebenfalls identifiziert. Die Analyse der vorgegebenen Sequenz durch das Programm *TMpred* basiert auf Matrizen, die Daten über bereits identifizierte Transmembranproteine enthalten. Das Programm *SMART* greift auf das Programm *TMHMM2* zurück. Dieses verwendet für diese Analyse ein entsprechend trainiertes *Hidden-Markov-Model*. Die Präzision der Vorhersage liegt über 97% [Krogh *et al.*, 2001].

Die Homologie der FKBP Domänen in den identifizierten *AtFKBP42*-homologen Proteinen zu hFKBP12 ist ähnlich der des *AtFKBP42*. Sie wurde für hFKBP38 mit 33% Identität (50% ähnliche AS), für muFKBP38 mit 32% (47%) und für *DmFKBP45* mit 28% (52%) bestimmt.

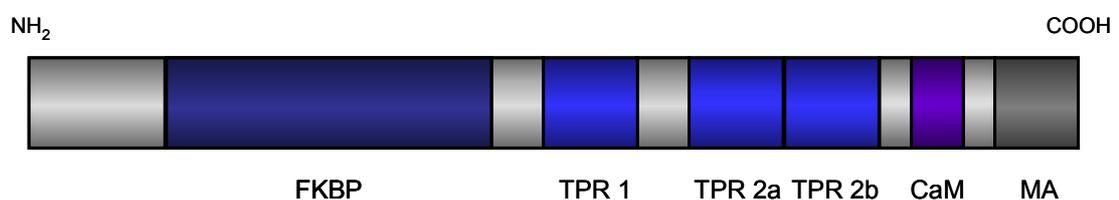


Abbildung 9: Domänenaufbau von *AtFKBP42* und den identifizierten Homologen. FKBP = FKBP-Domäne, TPR = TPR-Motiv (1, 2a und 2b), CaM = mögliche CaM-Bindungsstelle, MA = Membrananker.

4.7.2 Modellierung der dreidimensionalen Struktur von FKBP-Domänen

Um einen weiteren Anhaltspunkt für die Verwandtschaft der analysierten Proteine zu hFKBP12 zu erhalten, wurde mit dem Programm *Swiss Model* eine Modellierung der dreidimensionalen Struktur der jeweiligen FKBP-Domänen vorgenommen. Die Sequenz der FKBP-Domänen von *At*FKBP42 (AS 50-159), hFKBP38 (AS 44-147) und *Dm*FKBP45 (AS 65-175) wurden für die Modellierung angegeben. Als Grundlage für die Berechnungen durch das Programm *Swiss Model* wurden die Koordinaten der Röntgenkristallstruktur von hFKBP12 komplexiert mit FK506 in einer 1,7 Å Auflösung (RCSB-Datenbank: 1FKJ) vorgegeben [Krogh *et al.*, 2001]. Die erhaltenen Strukturen sind in Abbildung 10 dargestellt.

Die theoretische Struktur von *At*FKBP42 gleicht der des hFKBP12 (Abbildung 10A, B). Das für hFKBP12 charakteristische β -Faltblatt wird durch eine α -Helix stabilisiert [Michnick *et al.*, 1991; Van Duyne *et al.*, 1991]. Die modellierten Strukturen der FKBP-Domänen von *Dm*FKBP45 und hFKBP38 unterscheiden sich von hFKBP12 durch das Fehlen der α -Helix. Diese ist nur durch eine entsprechende Spiralform eines unstrukturierten Bereichs angedeutet (Abbildung 10C, D). Der Struktur der hFKBP38-FKBP-Domäne fehlt zusätzlich der fünfte Strang des β -Faltblatts. Für alle drei modellierten FKBP-Domänen ist das typische FKBP-Faltungsmotiv und eine Ähnlichkeit zu der hFKBP12-Struktur erkennbar. Die C_{α} -Atome des jeweiligen Proteinrückgrats wurden mit den C_{α} -Atomen der hFKBP12-Struktur überlagert. Die durchschnittliche Fehlerquadratsumme wurde mit 1,96 Å Abweichung für die FKBP-Domäne des *At*FKBP42, 1,07 Å (hFKBP38) und 1,28 Å (*Dm*FKBP45) festgestellt. Die Prinzipielle Genauigkeit der Modellierung durch das Programm *Swiss Model* wurden in 1201 Modellierungen für Sequenzen mit unterschiedlicher Homologie zur Vorlage bestimmt [Guex *et al.*, 1999]. Die Genauigkeit der Berechnungen wurde mit der Abweichung des durchschnittlichen Fehlerquadrats in Å bezogen auf die C_{α} -Atome des Proteinrückgrats angegeben. Für eine Sequenzhomologie von 30% bis 39% zu der Sequenzvorlage betragen die Fehler von $18\% \leq 2$ Å und von 77% der Berechnungen ≤ 5 Å [Guex *et al.*, 1999].

Ein Ausschnitt der Überlagerung der Struktur der FKBP-Domäne von *At*FKBP42 mit der hFKBP12-Struktur stellt einige der AS dar (Abbildung 10E), die an der Komplexierung von FK506 in hFKBP12 beteiligt sind sowie die entsprechenden AS des *At*FKBP42. Für die AS des hFKBP12 (und *At*FKBP42) D37 (E86), W59 (L109) und F99 (Y151) ist die Übereinstimmung in der räumlichen Orientierung der Seitenketten gegeben. Die Abstände der C_{α} -Atome der überlagerten Strukturen liegen bei 1,0 Å, 0,21 Å bzw. 0,38 Å. Die Abstände sind geringer als der Abstand der bestimmten Fehlerquadratsumme von 1,96 Å. Für H87 (S139), L90 (N142) und besonders V55 (E105) ist die räumliche Orientierung stark unterschiedlich. Die Abstände der

entsprechenden C_{α} -Atome wurden mit 3,0 Å, 2,55 Å bzw. 4,29 Å bestimmt. Diese Abstände liegen außerhalb der Fehlerquadratsumme und sollten daher einen Strukturunterschied darstellen.

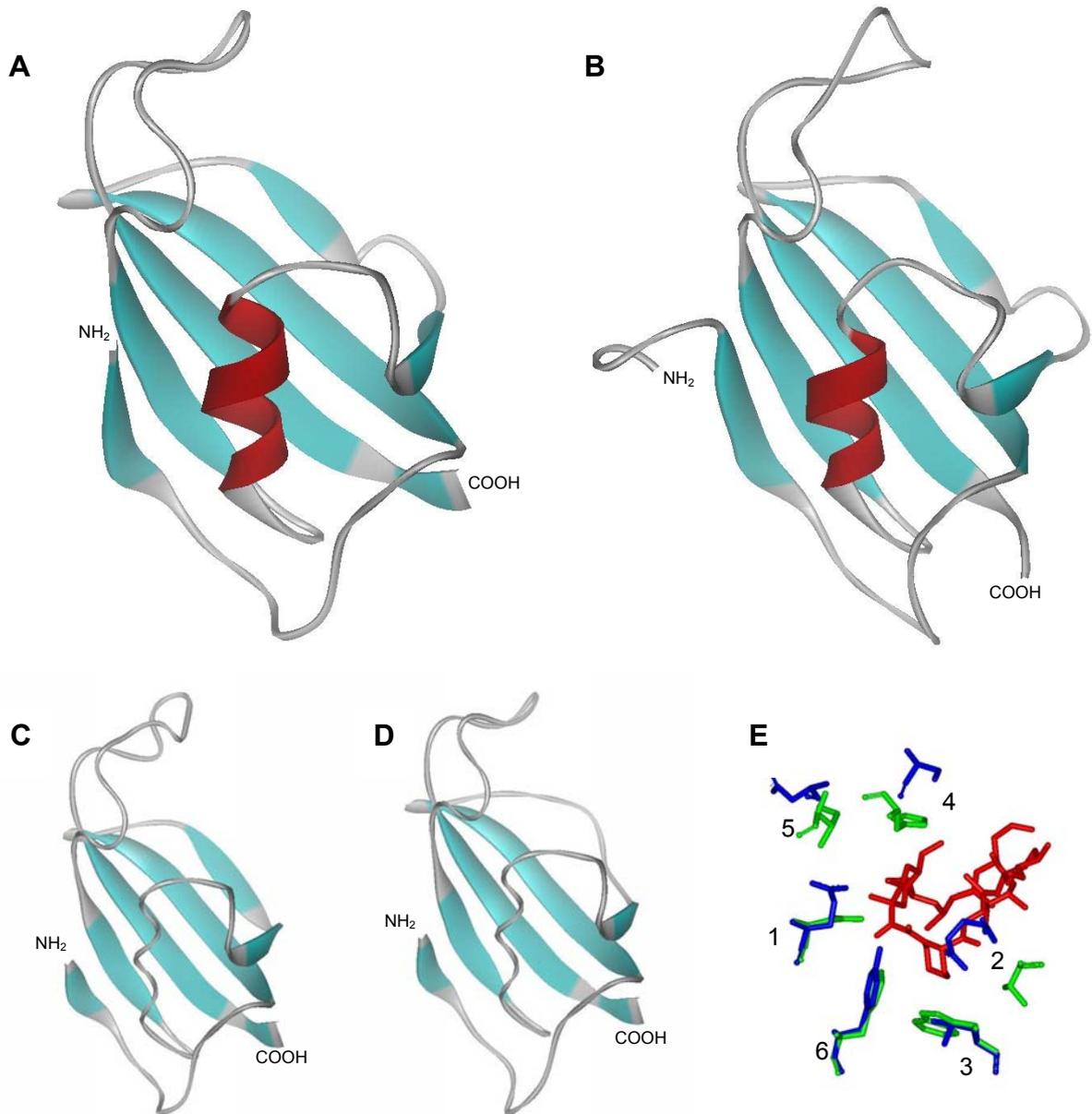


Abbildung 10: Strukturen von hFKBP12 (A) [Wilson *et al.*, 1995] und den modellierten FKBP Domänen von *At*FKBP42 (B), *Dm*FKBP45 (C) und hFKBP38 (D). α -Helices sind rot dargestellt, β -Faltblattstränge türkis und nicht näher definierte Strukturen grau. Abbildung E zeigt eine Vergrößerung der FK506-Bindungsregion (rot dargestellt) des hFKBP12 (grün) mit der überlagerten Sequenz von *At*FKBP42 (blau). 1: D37/E86; 2: V55/E105; 3: W59/L109; 4: H87/S139; 5: I90/N142; 6: F99/Y151. Weitere Details der Abbildung sind im Text (Seite 58) beschrieben.

4.8 Proteinreinigung von AtFKBP42 und AtHsp90

4.8.1 Reinigung von AtFKBP42

Die Kultivierung der *AtFKBP42* Expressionsklone wurde bei 30°C durchgeführt, da bei 37°C das rekombinant hergestellte Protein nur partiell in der löslichen Fraktion des Lysats erhalten wurde. Das Zellpellet der *AtFKBP42* Expressionskultur musste in 10 Volumen HEPES Puffer (10 mM, pH 8,0) aufgenommen werden, dem 5% (% maximale Sättigung) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zugesetzt wurden, um *AtFKBP42* während des Aufschlusses in der löslichen Fraktion zu halten. Trotz eines theoretischen Isoelektrischen Punkts $pI = 6,0$ konnte *AtFKBP42* an eine Fractogel EMD-SO³-650(M)-Säule (30 ml) gebunden werden, die mit HEPES-Puffer (10 mM, pH 8,0; 5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) equilibriert war. Nach der Elution mit einem KCl-Gradienten (0-1,5 M) wurden die Proben mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Die *AtFKBP42* enthaltenden Fraktionen wurden gegen 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,5), 5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dialysiert und auf eine Heparin-Sepharose-Säule (7 ml) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem KCl-Gradienten (0-0,7 M). Die Bindung an Heparin-Sepharose war nicht quantitativ. Der Reinigungsschritt wurde mit dem Durchlauf nochmals wiederholt. Nach diesem Chromatographieschritt wurde homogenes Protein erhalten (Abbildung 11, Seite 62). Da bereits in den ersten Fraktionen des Durchlaufs auch *AtFKBP42* im Coomassie-gefärbten SDS-Gel nachgewiesen wurde, ist eine Überschreitung der Bindungskapazität der Säule auszuschließen. Die maximale Konzentration von *AtFKBP42* in Puffer, mit 5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lag bei 0,2 mg/ml. Bei höher konzentrierten Proteinlösungen trat Aggregation auf. Das Entfernen des $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ durch Dialyse führte ebenfalls zu Aggregation. Dieser Effekt wird vermutlich von den letzten 26 AS von *AtFKBP42* verursacht, die den hydrophoben Membrananker darstellen. Um höhere Proteinkonzentrationen für Analysen zu erreichen, wurde das Konstrukt *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ kloniert, dem die AS (340 – 365) des vorhergesagten Membranankers fehlen.

4.8.2 Reinigung von AtFKBP42¹⁻¹⁸⁰ und AtFKBP42¹⁻³³⁹

Rekombinant hergestelltes *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ wurde nach Zellaufschluss und Zentrifugation auf eine mit 10 mM HEPES pH 7,5 equilibrierte Fractogel EMD-DEAE-650(M)-Säule (40 ml) aufgetragen und mit einem steigenden KCl-Gradienten eluiert. Die *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ enthaltenden Fraktionen wurden gegen 10 mM HEPES pH 7,5 dialysiert und die dialysierte Probe über eine Fractogel TSK-AF-Blue-Säule (15 ml) gegeben. *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ hat nicht an dem Chromatographiematerial gebunden. Der Durchlauf wurde konzentriert und mittels Gelfiltration weiter

aufgereinigt. Das homogene *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ (Abbildung 11) wurde abschließend auf bis zu 50 mg/ml konzentriert und bei -80°C in Aliquots gelagert.

Homogenes *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰, das der FKBP-Domäne von *AtFKBP42* entspricht, wurde mit der identischen Reinigungsstrategie erhalten (Abbildung 11). Die Ausbeuten aus 6 l Expressionskultur wurden für beide Proteine mit 350 – 500 mg Protein je Präparation bestimmt.

4.8.3 Reinigung von *AtFKBP42* Proteinvarianten

Das Expressionsplasmid von *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ wurde für Mutagenese mit dem *Quick Change Site Directed Mutagenesis*[®] kit eingesetzt, um eine 7-fache Proteinvariante zu erzeugen. Nach mehreren PCR-Reaktionen wurde die 7-fache *AtFKBP42*¹⁻³³⁹-Variante mit den AS-Austauschen A76G, E86D, E105V, L106I, L109W, N142I und Y151F erhalten. Das Protein wurde nach dem gleichen Schema wie *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ gereinigt.

4.8.4 Reinigung von *AtHsp90.1*⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰

Aus dem Zellpellet von 6 l Expressionskultur wurde die lösliche Fraktion gewonnen und auf eine Fractogel EMD-DEAE-650(M)-Säule (40 ml) aufgetragen. Das gebundene C-terminale Fragment *AtHsp90.1*⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰ wurde mit einem linearen KCl-Gradienten (0-2 M) eluiert. Die *AtHsp90.1*⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰ enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, mit 25% (NH₄)₂SO₄ versetzt und an eine Fractogel EMD-Propyl-650(M)-Säule (8 ml) gebunden. Die Elution erfolgte mit einem fallenden (NH₄)₂SO₄-Gradienten, bei steigenden Konzentrationen Glycerin und CHAPS. Die eluierten Proben wurden mittels SDS-PAGE analysiert, die *AtHsp90.1*⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰ enthaltenden Fraktionen gegen 10 mM Hepes (pH 7,5) dialysiert und in Aliquots bei -20°C gelagert. Bei der Reinigung konnte ein um 28 AS verkürztes, parallel exprimiertes Fragment (*AtHsp90.1*⁵⁸⁷⁻⁷⁰⁰) nicht abgetrennt werden (Abbildung 11). Dies weist darauf hin, dass der vollständige Dimerisierungsbereich von *AtHsp90.1* kloniert wurde. Die Ausbeute wurde mit 150 – 200 mg aus 6 l Expressionskultur bestimmt.

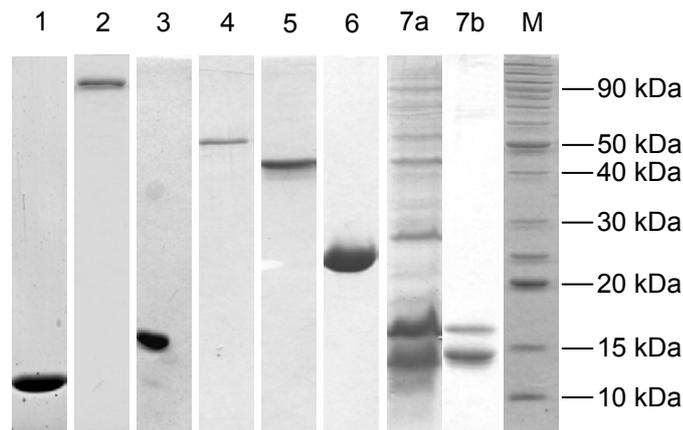


Abbildung 11: SDS-PAGE (Coomassie-Färbung) der gereinigten Proteine. 1) *AtFKBP12*; 2) *GST-AtFKBP62*; 3) *AtPar15*; 4) *AtFKBP42*; 5) *AtFKBP42*¹⁻³³⁹; 6) *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰; 7) *AtHsp90.1* a: Expressionskontrolle vor Reinigung b: gereinigtes Fragment *AtHsp90.1*⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰ und das parallel gereinigte Fragment *AtHsp90.1*⁵⁸⁹⁻⁷⁰⁰; M) Molekulargewichtsstandard *Benchmark*. Nach der Reinigung wurde die Identität aller Proteine durch N-terminale Sequenzierung und Massenspektrometrie bestätigt.

4.9 Charakterisierung von *AtFKBP42*

Nachdem die Reinigung von *AtFKBP42* gezeigt hatte, dass in *E. coli* exprimiertes *AtFKBP42* nur in geringen Konzentrationen löslich war, wurden die proteinchemischen Untersuchungen mit *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ und *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ durchgeführt.

4.9.1 Strukturmerkmale

Die rekombinant hergestellten Proteine *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ und *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ wurden nach der Reinigung auf die Ausbildung von Sekundärstrukturmerkmalen untersucht. Es wurden CD-Spektren bei 20°C und 80°C für *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ sowie 20°C und 65°C für *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ aufgenommen und die Spektren verglichen (Abbildung 12). Die CD-Spektren waren bei den höheren Temperaturen deutlich verändert. Aus diesem Grund wurde die Änderung des CD-Signals bei Temperaturerhöhung über die Zeit verfolgt. Weiterhin wurde die Abhängigkeit der aufgenommenen CD-Spektren von pH-Wert und Puffer für *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ bestimmt.

Das CD-Spektrum von *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ zeigt ein absolutes Minimum bei 208 nm mit einer Signalintensität von $-4.700 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$, was auf einen hohen Anteil von β -Faltblatt Strukturen hindeutet, wie sie für FKBP typisch sind. Die Struktur von hFKBP12 enthält ein β -Faltblatt aus fünf antiparallelen Strängen, eine kurze α -Helix und unstrukturierte Elemente

[Michnick *et al.*, 1991]. Das bei 20°C aufgenommene CD-Spektrum von *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ enthält zwei Minima bei 209 nm und 222 nm mit Signalintensitäten von -11.000 deg cm² dmol⁻¹ und -12.000 deg cm² dmol⁻¹, die auf einen erhöhten α -helikalen Anteil hinweisen (Abbildung 12A, B).

Die Änderung des CD-Signals durch Temperaturerhöhung wurde bei den Wellenlängen verfolgt, die die größte Signaländerung der verglichenen 20°C CD-Spektren mit denen bei 80°C bzw. 65°C aufwiesen. Das CD-Signal für *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ wurde bei 205 nm aufgenommen. Bis zu einer Temperatur von ca. 48°C bleibt das CD-Signal konstant. Die Zunahme des Signals ist bei ca. 70°C abgeschlossen. Der Übergangsmittelpunkt für die Signaländerung liegt bei etwa 59°C. Das CD-Signal, das bei der Abkühlung von 80°C auf 20°C aufgenommen wurde, nähert sich dem Signal des ursprünglichen 20°C Spektrums wieder an. Dies deutet auf eine Reversibilität der thermisch induzierten Strukturänderung hin. Für *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ ändert sich das CD-Signal bei 222 nm in dem Temperaturbereich von 25°C - 40°C nur geringfügig. Über 40°C folgt eine schnelle Abnahme, deren Übergangsmittelpunkt bei ca. 43°C liegt und die bei ca. 48°C abgeschlossen ist. Eine Reversibilität der Signaländerung wurde nicht festgestellt. Das Signal ändert sich beim Abkühlen nicht. Der Vergleich der Übergangskurven zeigt, dass die Signaländerung der separat gereinigten FKBP-Domäne von *AtFKBP42* (*AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰) erst bei Temperaturen beginnt, in denen sie für *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ unter den experimentellen Bedingungen bereits abgeschlossen ist (Abbildung 12C).

Für die bei 20°C aufgenommenen Spektren wurde der α -helikale Anteil der Fragmente mit zwei Methoden bestimmt. Es wurden die Software *CDNN* und die von Forood *et al.* [1993] beschriebene Formel genutzt. Der α -helikale Anteil für *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ wurde nach der Auswertung mit 37% (*CDNN*) bzw. mit 30% (Forood) errechnet. Für *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ wurde ein α -helikaler Anteil von 18% bzw. 7% festgestellt.

Die Änderung der CD-Spektren von *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ wurde bei unterschiedlichen pH-Werten im Bereich von 6,5 – 8,5 untersucht. Eine Abweichung in den CD-Signalen, die auf eine Änderung der Sekundärstrukturanteile hindeutet, wurde nicht nachgewiesen. Der α -helikale Anteil wurde für alle *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ CD-Spektren bei den untersuchten pH-Werten bestimmt. Dabei wurde durch *CDNN* ein α -helikaler Anteil von 37 ± 1 % vorhergesagt, nach Forood wurden $30 \pm 0,5$ % errechnet (Abbildung 12D). Eine Aufnahme von CD-Spektren in Hepes-Puffer war aufgrund der optischen Eigenschaften des Puffers nicht möglich.

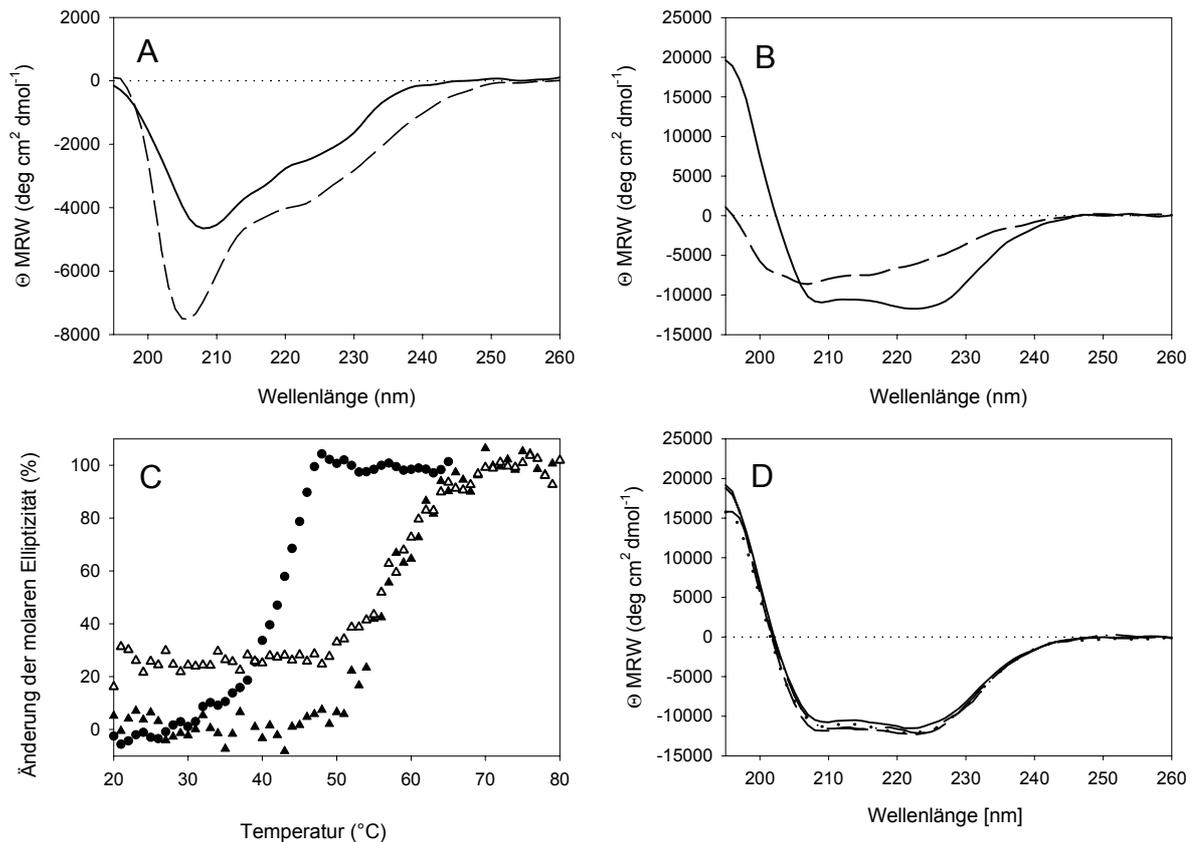


Abbildung 12: CD-Spektren von *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ und *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ **A)** Fern-UV CD-Spektren von *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ bei 20°C (—) mit einem Minimum bei 208 nm und 80°C (---) mit einem Minimum bei 205 nm. **B)** Fern-UV CD-Spektren von *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ bei 20°C (—) mit Minima bei 209 nm und 222 nm und 65°C (---) mit einem Minimum bei 208 nm. **C)** Thermische Stabilität von *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ und *AtFKBP42*¹⁻³³⁹. Die Entfaltung wurde für *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ (▲) bei 205 nm und für *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ (●) bei 222 nm verfolgt. Für wurde auch die Reversibilität verfolgt (△). **D)** pH-Abhängigkeit der aufgenommenen CD-Spektren von *AtFKBP42*¹⁻³³⁹: Phosphatpuffer pH 7,5 (—); Phosphatpuffer pH 6,5 (---); Phosphatpuffer pH 8,5 (.....); Tris/HCl Puffer pH 7,5 (-·-)

4.9.2 PPIase-Aktivität

Eine PPIase-Aktivität von Proteinen kann durch verschiedene Methoden bestimmt werden. Der meist verbreitete Test ist der proteasegekoppelte, in dem die Konformerspezifität bestimmter Proteasen gegenüber den eingesetzten prolinhaltigen Peptidsubstraten ausgenutzt wird [Fischer *et al.*, 1984b; Hani *et al.*, 1999]. Im proteasefreien Test wird die Neueinstellung des *cis/trans*-Gleichgewichts von prolinhaltigen Peptidsubstraten, das sich durch Lösungsmittelsprung ändert, ohne Hilfsprotease verfolgt [Janowski *et al.*, 1997]. Ein dritter Test nutzt den Anstieg der Fluoreszenz während der Rückfaltung von RCM-T1, der durch PPIasen beschleunigt wird [Schmid *et al.*, 1996].

Obwohl die CD-spektroskopischen Daten darauf hindeuten, dass die gereinigten *AtFKBP42*-Fragmente Sekundärstrukturmerkmale aufweisen, wurde in keinem der drei angewendeten Tests eine PPIase-Aktivität für *AtFKBP42* Proteinfragmente nachgewiesen. Im proteasegekoppelten Test wurden sowohl *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ als auch *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ bis zu einer Endkonzentration von 6,35 µM eingesetzt. Dies ist ebenso wie bei *AtFKBP12* deutlich höher als die Konzentrationen, die für die Bestimmung der PPIase-Aktivität von hPar14 nötig waren [Uchida *et al.*, 1999]. *AtFKBP42* wurde im proteasegekoppelten Test bis zu der maximal löslichen Konzentration getestet. Auch durch diese Konzentrationen von *AtFKBP42* wurde die unkatalysierte Reaktion nicht beschleunigt.

PPIasen besitzen eine Substratspezifität gegenüber AS N-terminal des Prolins (vgl. Tabelle 9, Seite 52). Verschiedene Substrate des Typs Suc-AXPF-pNA wurden getestet, um den Effekt von großen und kleinen hydrophoben sowie hydrophilen Seitenketten zu bestimmen. Zusätzlich wurde *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ mit dem proteasefreien Test und dem RCM-T1-Rückfaltungstest untersucht. Bei keinem dieser Tests wurde für die verschiedenen Substrate eine Beschleunigung der Reaktion festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Die FKBP-Domäne von *AtFKBP42* beginnt mit AS 50 und endet bei AS 159. Sie besitzt 30% Sequenzidentität mit hFKBP12 (53% ähnliche AS). Trotz dieser Sequenzidentität sind zehn von 14 AS verändert, die in Zusammenhang mit Katalyse und FK506-Bindung von FKBP diskutiert werden [Kay, 1996]. Für hFKBP12 wurden drei Proteinvarianten beschrieben, von denen jede einzelne die PPIase-Aktivität von hFKBP12 drastisch reduziert. Die verbleibende PPIase-Aktivität für die hFKBP12-Varianten F48L, W59L oder F99Y wurden mit 25%, 13% bzw. 0% – 5% bestimmt [Timerman *et al.*, 1995; DeCenzo *et al.*, 1996; Tradler *et al.*, 1997]. In der Sequenz von *AtFKBP42* sind die entsprechenden Aminosäuren Leucin⁹⁷, Leucin¹⁰⁹ und Tyrosin¹⁵¹. Sie entsprechen somit den in der Aktivität reduzierten Varianten von hFKBP12 (Abbildung 8, Seite 56).

Mit der hergestellten 7-fachen *AtFKBP42*¹⁻³³⁹-Variante sollte eine artifizielle PPIase-Aktivität erzeugt werden. Es konnte aber im proteasegekoppelten PPIase-Test für die 7-fache Variante keine Aktivität bestimmt werden.

Um eine Aktivierung von *AtFKBP42* durch assoziierte Proteine zu prüfen, wurde der proteasegekoppelte Test mit Proteinmischungen aus *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ und *AtHsp90.1*⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰, sowie *AtFKBP42*¹⁻³³⁹, CaM und Ca²⁺ durchgeführt. Auch bei diesen Messungen wurde keine PPIase-Aktivität nachgewiesen.

Eine mögliche Bindung von FK506 an *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ wurde mit Hilfe eines Kompetitionstests und ITC untersucht. Der Zusatz von 6,35 μM *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ hatte weder einen Effekt auf die PPIase-Aktivität von hFKBP12 noch auf die Inhibierung von hFKBP12 durch FK506. In diesem Ansatz wurde ein > 2000-facher molarer Überschuss von *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ gegenüber hFKBP12 eingesetzt. Würde FK506 von *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ gebunden werden, wäre die Effizienz der Inhibierung von hFKBP12 durch FK506 reduziert, was zu einer Beschleunigung der gemessenen Reaktion führen würde. Die Konstante für die Inhibition von hFKBP12 durch FK506 wurde mit 0,4 nM bestimmt [Siekierka *et al.*, 1989]. Unter den gegebenen Bedingungen des Kompetitionstests hätte ein Bindung von FK506 an *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ mit einer Bindungskonstante $\leq 1\mu\text{M}$ bestimmt werden können. Die Messungen der ITC wurden mit 28 μM *AtFKBP42* in der Messzelle und 100 μM FK506 in der Titrationseinheit durchgeführt. Eine Interaktion von hFKBP12 und FK506 mit Hilfe von ITC zu messen ist möglich [Connelly *et al.*, 1994]. Trotzdem konnte für *AtFKBP42* und FK506 kein Messsignal in der ITC aufgenommen werden. Es wurde folglich keine Interaktion festgestellt.

Um nachzuweisen, dass die fehlende PPIase-Aktivität nicht auf eine fehlende Glykosylierung der rekombinanten *AtFKBP42* Fragmente zurückzuführen ist, wurde HA-*AtFKBP42* durch Plasmamembran-Präparation aus *Arabidopsis* angereichert und auf eine mögliche Glykosylierung untersucht. Nach SDS-PAGE und Western-Blot wurden glykosylierte Proteine mit dem *Glycoprotein detection module*[®] nachgewiesen. Derselbe Blot wurde in einem zweiten Versuch mit anti-*AtFKBP42* Antikörper inkubiert und dieser mit anti-Kaninchen Antikörper und dem *ECL*[®] *Western blotting analysis system* nachgewiesen. Der Nachweis von *AtFKBP42* ergab ein zusätzliches Signal, das bei dem Nachweis der glykosylierten Proteine nicht gezeigt werden konnte (Abbildung 13). Dies zeigt, dass in *Arabidopsis* exprimiertes *AtFKBP42* nicht glykosyliert wird.

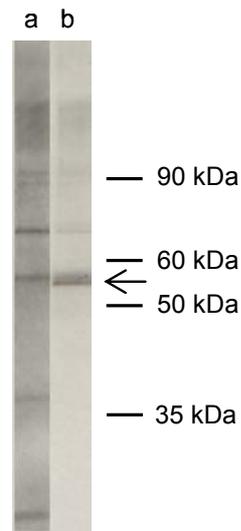


Abbildung 13: HA-*AtFKBP42* ist nicht glykosyliert. **a:** Nachweis glykosylierter Proteine in *Arabidopsis*-Plasmamembranen (7,5 µg aufgetragen). Bei ca. 56 kDa ist ein Signal sichtbar. **b:** Nachweis von HA-*AtFKBP42* auf dem selben Blot. Unter der 56 kDa wird eine Bande ausschließlich mit anti-*AtFKBP42* Antikörper nachgewiesen (Pfeil). Das scheinbare Molekulargewicht von ca. 55kDa entspricht dem von HA-*AtFKBP42* einer 10%igen SDS-PAGE.

4.9.3 Citratsynthase-Aggregationstest

Für die PPIasen hCyp40, hFKBP51 und hFKBP52 wurden neben der PPIase-Aktivität und der Bindung an Hsp90 eine chaperonähnliche Aktivität nachgewiesen, die mit der TPR-Domäne assoziiert ist [Pirkl *et al.*, 2001]. Die Gemeinsamkeiten zu dem Domänenaufbau von *AtFKBP42* legt eine ähnliche Aktivität für *AtFKBP42* nahe. Daher wurde der Effekt von *AtFKBP42* auf die thermisch induzierte Aggregation der CS untersucht. *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ reduzierte die Aggregation deutlich. Bereits in einem molaren Verhältnis *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ zu CS von 1:30 konnte die Aggregation um 15% reduziert werden. Vollständige Unterdrückung der Aggregation von CS wurde mit einem Verhältnis 1,3:1 erreicht (Abbildung 14). In einem Ansatz ohne CS wurde keine Aggregation für *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ festgestellt. *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ wurde untersucht, um den Effekt von *AtFKBP42* auf die Aggregation der CS einzugrenzen. Durch einen 15-fachen molaren Überschuss der *AtFKBP42*-FKBP-Domäne im Test wurde die Aggregation der CS nicht verhindert.

In einem anderen Test wurde die thermische Inaktivierung der CS bei 43°C verfolgt und ein möglicher Einfluss von *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ in diesem Test untersucht. Ein Effekt auf die Inaktivierung wurde nicht nachgewiesen. *AtFKBP42* verhindert folglich die Aggregation der CS bei 40°C, nicht aber die thermische Inaktivierung.

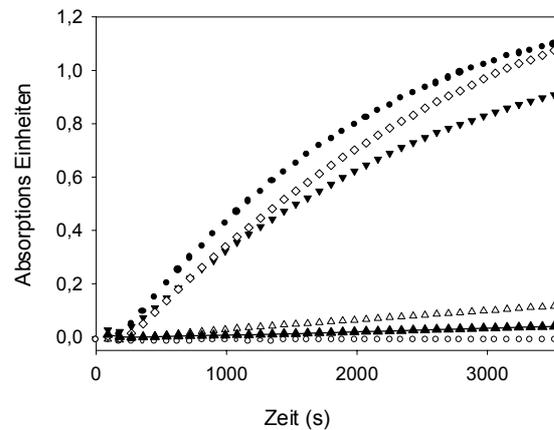


Abbildung 14: Effekte von *AtFKBP42* auf die thermisch Aggregation von CS, gemessen bei 40°C. Die Zunahme der Aggregation von 3 μM CS wurde für 1 h bei 360 nm in 40 mM Hepes (pH 7,5) verfolgt (●). Zusätze: *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ (▼) 0,1 μM ; (△) 2,7 μM ; (▲) 4 μM ; *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ (◇) 45 μM ; Kontrolle (○) 30 μM *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ ohne CS.

4.9.4 Zelluläre Lokalisation

Nach der Vorhersage durch die Analyseprogramme *SMART* und *TMpred* wird *AtFKBP42* durch die 26 C-terminalen AS in der Membran von *Arabidopsis* Zellen verankert. Die subzelluläre Lokalisation von HA-*AtFKBP42* wurde in *Arabidopsis*-Überexpressionspflanzen durch Elektronenmikroskopie untersucht. Mit Immun-Gold-Nachweis wurde HA-*AtFKBP42* in Dünnschnittpräparaten in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen identifiziert (Abbildung 15). Die Goldpartikel erscheinen in den Aufnahmen als schwarze Punkte. HA-*AtFKBP42* wurde in der PM sowie dem Tonoplast nachgewiesen. Während durch die PM Cytosol und Zellwand geteilt werden, trennt der Tonoplast das Cytosol und die Vakuole. HA-*AtFKBP42* wurde in keinem anderen Kompartiment als PM und Tonoplast der untersuchten Pflanzenzellen nachgewiesen. Die weißen, unstrukturierten Bereiche der HA-*AtFKBP42* Überexpressionspflanzen wurden in Kontrolluntersuchungen mit Wildtyppflanzen nicht identifiziert.

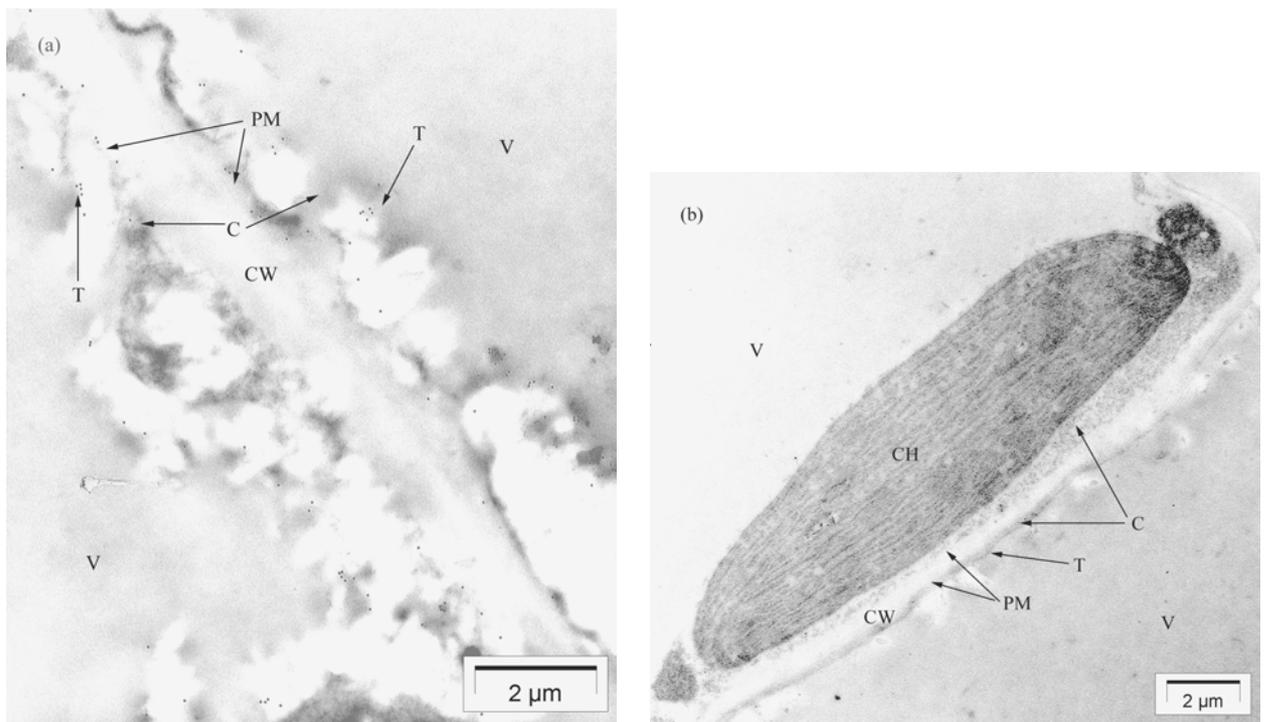


Abbildung 15: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von HA-*AtFKBP42* Überexpressionspflanzen (a) und Wildtyp *Arabidopsis* (b). Die zellulären Bestandteile sind wie folgt beschriftet: C = Cytosol; CH = Chloroplast; CW = Zellwand; PM = Plasmamembran; T = Tonoplast; V = Vakuole. Die schwarzen Punkte geben mit Gold markiertes ProteinA wieder, das die Lokalisation von HA-*AtFKBP42* anzeigt.

PM aus HA-*AtFKBP42* Überexpressionspflanzen wurden mittels Mikrosomenpräparation und anschließender wässriger Zweiphasenextraktion angereichert und auf die Verteilung von HA-*AtFKBP42* untersucht. Nach SDS-PAGE und Western-Blot wurde HA-*AtFKBP42* durch anti-*AtFKBP42* Antikörper nachgewiesen. Im Gegensatz zu der löslichen Fraktion und dem Überstand der PM Sedimentation konnte in der PM-angereicherten Fraktion HA-*AtFKBP42* nachgewiesen werden (Abbildung 16 a-c).

Mit der mikrosomalen Fraktion der aufgeschlossenen HA-*AtFKBP42* Pflanzen wurde die Extraktion von HA-*AtFKBP42* aus Membranen getestet und mit anti-HA Antikörper nachgewiesen. Die Extraktionseffizienz verschiedener Detergenzien wurde verglichen (Abbildung 16; 1-7). Besonders in den Extraktions-Fractionen ist nach der Inkubation mit Detergenzien ein Signal mit geringerer Intensität unterhalb des Signals für HA-*AtFKBP42* zu erkennen. Dieses Signal beruht vermutlich auf einem durch den anti-HA Antikörper nachweisbaren Abbauprodukt. Bei einem Vergleich der Signalintensität der Extrakte wurde festgestellt, dass die stärksten Signale in den extrahierten Fraktionen der Zusätze SDS, Triton®

X-100 und Triton[®] X-114 zu erkennen sind. Die Ausbeute war in keinem der Ansätze quantitativ.

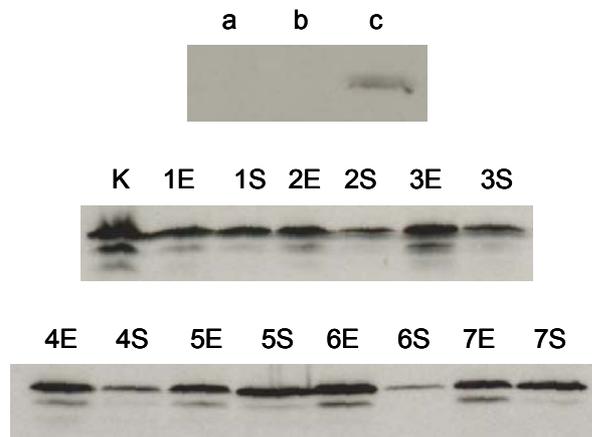


Abbildung 16: Nachweis von HA-*At*FKBP42 in Membranpräparationen. a = Gesamtextrakt aus HA-*At*FKBP42; b = lösliche Fraktion; c = PM-Präparation nach wässriger Zweiphasenextraktion; HA-*At*FKBP42 wurde mit anti-*At*FKBP42 Antikörper nachgewiesen. Jeweils 10µg Mikrosomenfraktion wurden mit verschiedenen Detergenzien (1-7) extrahiert (2% Endkonzentration): K = 10µg Mikrosomenpräparation (ohne Detergenz als Kontrolle mitgeführt); 1 – 7 = Verteilung von HA-*At*FKBP42 in Extrakt (E) und Sediment (S). 1: Mega-9; 2: DDM; 3: Triton[®] X-100; 4: Triton[®] X-114; 5: Chaps; 6: SDS; 7: Tween[®] 20. HA-*At*FKBP42 wurde mit anti-HA Antikörper nachgewiesen.

4.10 Proteininteraktion von AtFKBP42

4.10.1 Analytische Ultrazentrifugation

Mit Hilfe der Analytischen Ultrazentrifugation wurde die Frage nach einer möglichen Dimerisierung von *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ beantwortet. Die Auswertung der Sedimentationsmessung mit 40.000 U/min ergab eine Sedimentationskonstante = 2,47 S. Bei der Messung der Einstellung des Sedimentationsgleichgewichts mit 10.000 U/min wurde ein effektives Molekulargewicht von 44.380 Da mit einem geringen Anteil von Aggregaten in der analysierten Probe festgestellt (Abbildung 17). Bei einer Dimerisierung von *AtFKBP42* hätte das ermittelte Molekulargewicht ca. 80 kDa betragen müssen. Eine Dimerisierung von *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ kann somit nicht nachgewiesen werden.

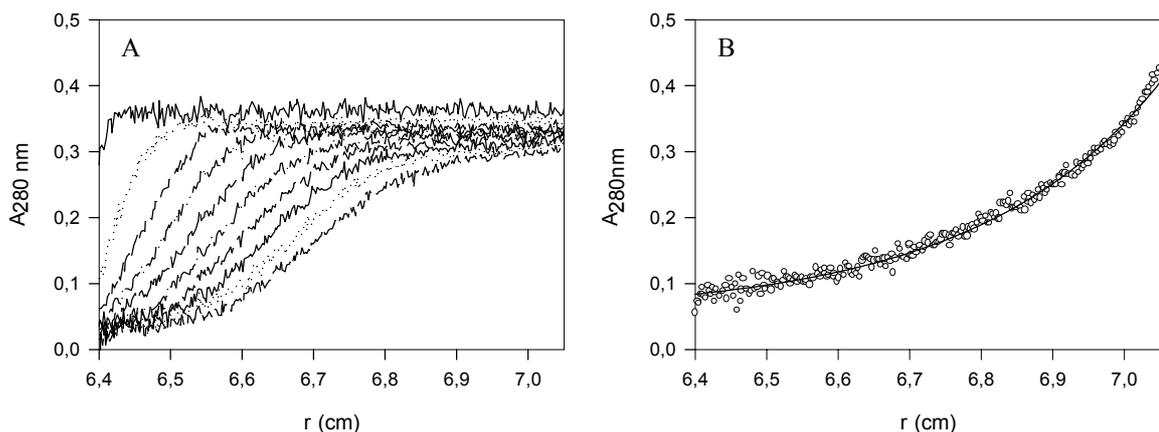


Abbildung 17: Analytische Ultrazentrifugation von *AtFKBP42*¹⁻³³⁹. Absorption (280 nm) zu verschiedenen Zeiten der Zentrifugation gemessen im Radius (r) der Analysenzelle für 0,35 mg/ml *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ aufgenommen in 10mM Hepes (pH 7,5) bei 20°C. **A:** Sedimentation (40.000 U/min), **B:** Einstellung des Sedimentationsgleichgewichts (10.000 U/min). Die aufgenommenen Daten wurden nach der Svedberg-Gleichung ausgewertet.

4.10.2 Bindung an Calmodulin

Nach der ersten Publikation einer CaM-Bindungsstelle in FKBP52 [Callebaut *et al.*, 1992], wurde die Bindung für mehrere FKBP mit TPR-Domäne prinzipiell gezeigt, z.B. für *ZmFKBP66* [Hueros *et al.*, 1998]. Die CaM-Bindung wurde für humanes und Maus FKBP38 vorhergesagt [Lam *et al.*, 1995; Pedersen *et al.*, 1999]. Eine Bindung von CaM an *AtFKBP42* liegt aufgrund des parallelen Domänenaufbaus nahe. Um eine Interaktion näher zu charakterisieren, wurden zwei Ansätze gewählt. Neben der chemischen Verknüpfung durch Quervernetzung von *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ mit CaM wurde die Präzipitation von *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ an CaM-Agarose

untersucht. Bei der Quervernetzung wurden 6 μM Lösungen von *AtFKBP42*¹⁻³³⁹, CaM oder eine Mischung der Proteine mit dem chemischen Quervernetzungsreagenz DTSSP (0,5 mM Endkonzentration) inkubiert. Nach SDS-PAGE und Silberfärbung der Quervernetzungsansätze wurden das Gel analysiert. In der Spur des Quervernetzungsansatzes mit *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ und CaM wurde eine weitere Bande nachgewiesen, die ein apparentes Molekulargewicht von etwa 58 kDa hatte. Dies entspricht der Summe der MM aus *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ und CaM (Abbildung 18B). Bei der Präzipitation von *AtFKBP42* durch CaM-Agarose wurden *AtFKBP42*¹⁻³³⁹, *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ und die Proteinphosphatase Calcineurin untersucht, für die eine Affinitätsreinigung durch CaM-Agarose beschrieben wurde [Mondragon *et al.*, 1997]. Für die Elution wurde ein Puffer verwendet, der statt Ca^{2+} EGTA enthielt. EGTA komplexiert Ca^{2+} -Ionen selektiv und hebt so eine Ca^{2+} -abhängige Bindung an CaM auf. Die Quantifizierung des Coomassie gefärbten Gels ergab, dass 70% *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ (eluierte + nicht eluierte Fraktion) an CaM-Agarose gebunden hatten, von denen 5% mit EGTA eluiert wurden. Insgesamt hatten 95% des Calcineurin gebunden und 31% davon wurden eluiert. Nur 19% des *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ wurden an CaM-Agarose gebunden ohne von der Matrix eluiert zu werden (Abbildung 18A). Auch unter den Ca^{2+} -komplexierenden Bedingungen wurden 21% *AtFKBP42*¹⁻³³⁹, 5% *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ und 26% Calcineurin gebunden.

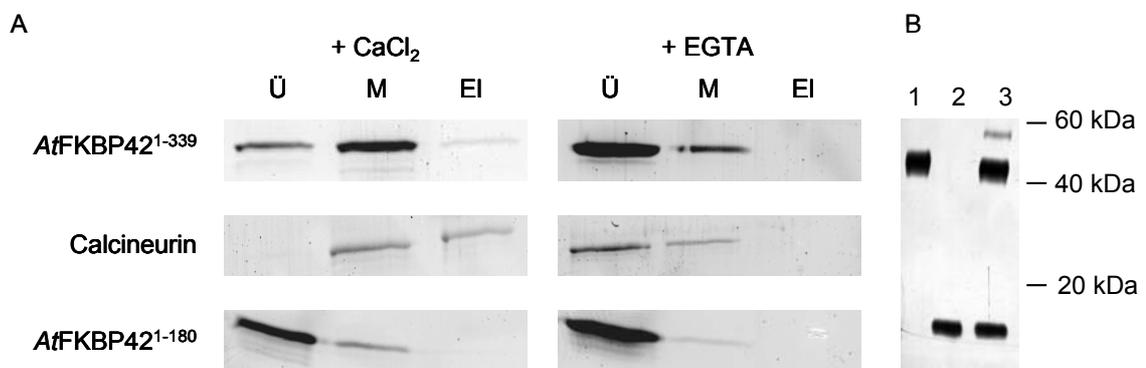


Abbildung 18: Interaktion von *AtFKBP42* mit CaM. **(A)** Banden des Coomassie gefärbten Gels nach CaM-Agarose-Präzipitation. Ü = Überstand; M = CaM-Agarose; El = Elution. **(B)** SDS-PAGE (Silberfärbung) der chemischen Quervernetzung von *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ und CaM mit DTSSP. Spur 1: 6 μM *AtFKBP42*¹⁻³³⁹; Spur 2: 6 μM CaM; Spur 3: Mischung aus 6 μM *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ und 6 μM CaM.

4.10.3 Bindung an *AtHsp90*

C-terminal der FKBP-Domäne wurde für *AtFKBP42* eine TPR-Domäne identifiziert. Im Fragment *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ ist die TPR-Domäne enthalten. Die Interaktion von TPR-Domänen mit der C-terminalen Domäne von Hsp90 wurde *in vitro* mit Hilfe von kurzen Peptiden und größeren Proteinfragmenten von Hsp90 charakterisiert [Scheufler *et al.*, 2000; Pirkl & Buchner, 2001]. In einem Konkurrenzexperiment wurde die Interaktion von *TaFKBP73* bzw. *TaFKBP77* mit Hsp90 durch einen Überschuss der TPR-Domäne der Proteinphosphatase 5 aus Ratte aufgehoben. Dies legt die Vermutung nahe, dass ein ähnlicher Mechanismus der TPR – Hsp90-Interaktion, der für Säugern beschrieben ist, auch in Pflanzen existiert [Reddy *et al.*, 1998]. Es wurden für die Interaktion der Pflanzenproteine noch keine Dissoziationskonstanten veröffentlicht.

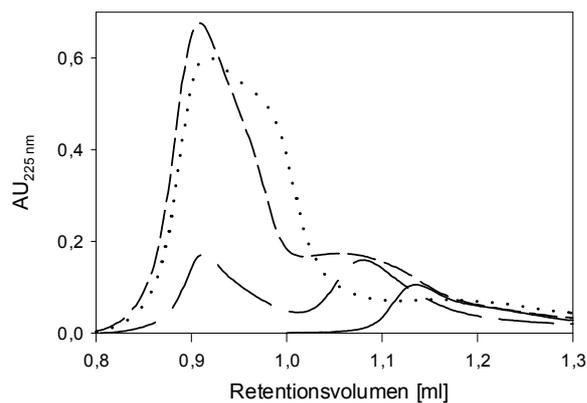


Abbildung 19: Analytische Gelfiltration (Superdex 75 HR 10/30) von *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ und *AtHsp90.1*⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰. (—): 0,2 nmol *AtFKBP42*¹⁻³³⁹; (.....): 1,1 nmol *AtHsp90.1*⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰; (---): 0,2 nmol *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ und 0,4 nmol *AtHsp90.1*⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰; (- - -): 0,2 nmol *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ und 1,1 nmol *AtHsp90.1*⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰

Erste Hinweise auf die Wechselwirkung von *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ mit *AtHsp90.1*⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰ wurden durch analytische Gelfiltration erhalten (Abbildung 19). Das Retentionsvolumen einer Mischung aus *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ und *AtHsp90.1*⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰ war im Vergleich zu einzeln aufgetragenem *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ verringert. Das Retentionsvolumen von separat aufgetragenem *AtHsp90.1*⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰ entsprach nicht der theoretischen und durch Massenspektrometrie ermittelten MM. Die Retention erfolgte in einem kleineren Volumen als für ein 16 kDa Proteinfragment zu erwarten war. Monomeres *AtHsp90.1*⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰ würde in einem größeren Retentionsvolumen als *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ eluiert werden. Die MM scheint demzufolge größer zu sein, was mit einer Oligomerisierung von *AtHsp90.1*⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰ erklärt werden kann. Für *Saccharomyces cerevisiae*-Hsp90 wurde beschrieben,

dass ein Fragment der AS 527 -709 als Dimer vorliegt [Richter *et al.*, 2001]. Das klonierte und gereinigte Fragment von *AtHsp90* ist im Sequenzvergleich N-terminal 39AS kürzer.

Aufgrund der Hinweise für eine Interaktion zwischen *AtFKBP42* und *AtHsp90* wurde mit den Fragmenten *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ und *AtHsp90.1*⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰ die Dissoziationskonstante durch ITC bestimmt. *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ wurde mit einer 283 μM Konzentration in 28 μM *AtHsp90.1*⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰ Proteinlösung titriert. Die Daten der Titration wurden aufgenommen und nach einem 1:1 Bindungsmodell ausgewertet (Abbildung 20). Aus dieser Anpassung wurde ein K_D -Wert von 1,3 μM ermittelt. Die Stöchiometrie für den Komplex wurde mit zwei Molekülen *AtHsp90.1*⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰ und einem Molekül *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ bestimmt.

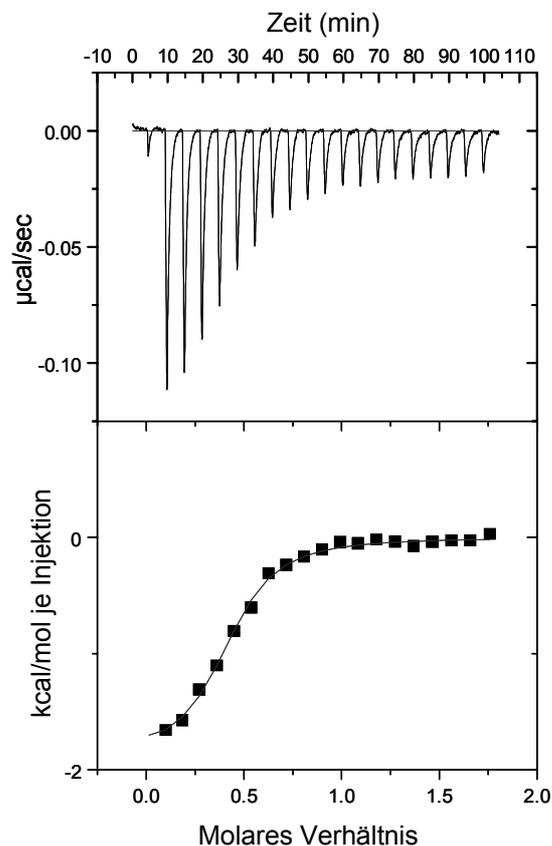


Abbildung 20: Isothermale-Titrationskalorimetrie von *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ und *AtHsp90.1*⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰. Obere Hälfte: Titrationskurve von 28 μM *AtHsp90.1*⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰ mit *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ (283 μM) bei 20°C. Untere Hälfte: Berechnete molare Energie (kcal/mol) aufgetragen gegen das molare Verhältnis von *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ und *AtHsp90.1*⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰. Die errechnete Dissoziationskonstante ist $K_D = 1,3 \mu\text{M}$ mit einem Bindungsverhältnis von 0,48.

5 Diskussion

5.1.1 PPIasen in *Arabidopsis*

Mit dem sequenzierten *Arabidopsis*-Genom wurde die Grundlage für eine vollständige Aufstellung und Computeranalyse der PPIasen in *Arabidopsis* geschaffen. Durch eine automatisierte Sequenzanalyse der vorhergesagten *Arabidopsis*-Proteine, sind Datenbanken, die eine bestimmte Domäne enthalten, auf den Internetseiten des *European Bioinformatics Institute* (EBI) abrufbar. Die Datenbanken für Cyclophiline, FKBP und Parvuline wurden auf eine mögliche fehlerhafte Eingruppierung und weitere subzelluläre Lokalisation der Proteine untersucht sowie mit charakterisierten PPIasen und Isoenzyme verschiedener *Arabidopsis*-Ökotypen abgeglichen.

Aus der Gruppe der vorhergesagten Cyclophiline wurden sieben Proteine nicht weiter analysiert, weil die Zuordnung einer Cyclophilin-Domäne nur in Teilen möglich war. Unter diesen sieben ist auch das *SoCyp50* (TLP40) homologe Protein TLP38 (SwissProt P82869).

Bei den übrigen 28 analysierten Cyclophilinsequenzen wurde jeweils eine Cyclophilin-Domäne identifiziert und fünf verschiedene Nicht-PPIase-Domänen, die in Zusammenhang mit mehreren Funktionen, z.B. mRNA-Prozessierung und Proteininteraktion gebracht werden. Im Gegensatz hierzu, wurden bei den FKBP eine oder drei FKBP-Domänen in einem Protein identifiziert und als weitere Domäne einzig die TPR-Domäne. Dies kann darauf hinweisen, dass eine breite Spezifität und die *in vivo* Funktion der Cyclophilin-Domäne durch die verschiedenen zusätzlichen Domänen der Proteine kontrolliert wird. Im Gegensatz hierzu könnte die Spezifität der FKBP durch eine Veränderung in den Eigenschaften der FKBP-Domäne hergestellt werden. Deutlich wird eine solche Anpassung der Spezifität z.B. bei der dritten PPIase-Familie, den Parvulinen. Während durch *AtPar13* in den PPIase-Tests Peptidsubstrate mit phosphorylierter Seitenkette bevorzugt umgesetzt werden [Yao *et al.*, 2001], konnte für *AtPar15* eine *EcPar10* ähnliche Substratspezifität bestimmt werden (vgl. Tabelle 9, Seite 52).

In Säugetieren wurden Multidomänen-FKBP nachgewiesen, die im ER lokalisiert sind und eine EF-Hand als Ca^{2+} -Bindungsdomäne besitzen [Nakamura *et al.*, 1998; Shadidy *et al.*, 1999]. In *Arabidopsis* wurden *AtFKBP* mit ER-Lokalisation identifiziert [Luan *et al.*, 1996], bei denen keine EF-Hand als zusätzliche Domäne nachgewiesen wurde. Die MM der *AtFKBP16*, *AtFKBP16-2* und *AtFKBP18* ist mit den entsprechenden MM von 15,7, 16,4 und 17,7 kDa geringer als die des FKBP23 oder FKBP60 [Nakamura *et al.*, 1998; Shadidy *et al.*, 1999]. Die Gruppe von FKBP mit EF-Hand scheint daher speziell in Säugern von Bedeutung zu sein.

Auffällig ist die grundsätzliche Verteilung der PPIasen in den subzellulären Kompartimenten von *Arabidopsis*. Obwohl eine mit CsA und FK506 partiell inhibierbare PPIase-Aktivität in Erbsen-Mitochondrien bereits gezeigt wurde [Breiman *et al.*, 1992], ist keine Lokalisation einer PPIase für die *Arabidopsis*-Mitochondrien eindeutig vorhergesagt worden. Für die PPIase-Aktivitätsmessungen wurde von Breiman *et al.* [1992] der proteolytische Test [Fischer *et al.*, 1984b] genutzt. Allerdings wurde Triton X-100 in der Präparation (2% (v/v)) und auch im Messansatz (0,015% (v/v)) eingesetzt. Inzwischen wurde festgestellt, dass künstlich erzeugte Mizellen aus Triton X-100 oder anderen Detergenzien eine FKBP-ähnliche Beschleunigung der unkatalysierten Reaktion im proteasegekoppelten Test bewirken können [Kramer & Fischer, 1997].

In Mitochondrien der Säuger wurde Cyp22 (CypF) nachgewiesen, das an der Regulation der großen Pore der inneren Mitochondrienmembran beteiligt ist [Nicolli *et al.*, 1996; Halestrap *et al.*, 1997]. Bekannt ist auch, dass nicht alle mitochondrialen Proteine durch heutige Lokalisationsprogramme erfolgreich vorhergesagt werden [Millar *et al.*, 2001]. Die Frage, ob in den *Arabidopsis*-Mitochondrien PPIasen nachzuweisen sind, kann daher nicht aufgrund einer computergestützten Analyse beantwortet werden. Bei der systematischen Proteomanalyse von 170 Mitochondrienproteinen wurde keine PPIase identifiziert [Millar *et al.*, 2001].

Im Gegensatz zu den Mitochondrien sind in den Chloroplasten eindeutig zwei Cyclophiline und zehn FKBP vorhergesagt, von denen alle als Proteine nachgewiesen wurden [Lippuner *et al.*, 1994; Peltier *et al.*, 2002; Schubert *et al.*, 2002]. Hinzu kommen insgesamt vier weitere PPIasen, für die eine Lokalisation in den Chloroplasten nicht eindeutig war. Die Chloroplasten enthalten die für die Photosynthese der Pflanzen bedeutenden Photosysteme I und II. Für die Photosynthese ist eine Lichtexposition essentiell, aus der auch ein erhöhter oxidativer Stress resultiert [Mullineaux *et al.*, 2000]. Durch den starken Stress ist die Proteinlebensdauer in den Chloroplasten reduziert [Abarca *et al.*, 2001]. Dies kann eine Erklärung für die hohe Zahl von PPIasen in den Chloroplasten darstellen. Der beschriebene Zusammenhang des Anstiegs der zellulären Cyp18 Konzentration mit einer möglichen Schutzfunktion bei oxidativem Stress wurde gezeigt [Doyle *et al.*, 1999; Liao *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2000]. Auch die Erhöhung von FKBP mRNA in Weizen durch Hitzestress ist bekannt [Kurek *et al.*, 1999]. Die starke Lichteinstrahlung in den Chloroplasten bedeutet gleichzeitig einen erhöhten Hitzestress, verglichen mit den übrigen Pflanzenkompartimenten.

Die durch die genannten Faktoren verkürzte Proteinlebensdauer erfordert einen erhöhten Proteinimport, der über verschiedene Transportsysteme in die Chloroplasten und das Thylakoidsubkompartiment realisiert wird [Bauer *et al.*, 2001] sowie eine starke Faltungs-

aktivität [Peltier *et al.*, 2002]. Beide Prozesse könnten durch die hohe Zahl von PPIasen unterstützt werden.

5.1.2 Identifikation von *AtFKBP* Insertionslinien

Drei neue Insertionslinien für die *Arabidopsis*-Gene *AtFKBP12*, *AtFKBP65* und *AtHsp90.2* konnten durch PCR und Autoradiographie aus 18.000 Linien identifiziert und bis in die einzelne Pflanze bestimmt werden. Die Insertionen in die Gene oder den Promotorbereich des Gens wurden durch Sequenzierung bestätigt. Dass die identifizierten Pflanzen keinen offensichtlichen Phänotyp zeigen, kann auf mehrere Gründe zurückzuführen sein. Das Genom von *Arabidopsis* ist diploid, die mRNA kann folglich von zwei Gen-Kopien abgelesen werden, von denen nur eins durch Insertion der T-DNA ausgeschaltet wurde. Eine rezessiv vererbte Mutation würde einen Phänotyp nur in bezüglich dieses Gens homozygoten Pflanzen erzeugen.

AtFKBP65 ist in seinem modularen Aufbau identisch mit *AtFKBP62*. Die AS-Sequenzen zeigen eine Identität von 73% (85% ähnliche AS, vgl. auch Abbildung 21). Bei einem Ausfall der Funktion von *AtFKBP65* könnten die Funktionen von *AtFKBP62* übernommen werden. Ein anderer Grund für einen fehlenden Phänotyp der *AtFKBP62*-Null-Mutante kann darin gesehen werden, dass eine Funktion von *AtFKBP65* unter den getesteten Bedingungen nicht essentiell ist. Durch die Identifikation einer *AtFKBP62*-Insertionslinie und Kreuzung zu einer Doppelmutante können diese Annahmen differenziert werden. Einen Anhaltspunkt kann der Vergleich des Anteils von *AtFKBP62* mRNA von Wildtyp mit *AtFKBP65*-Insertionspflanzen geben. Die homologen Proteine zu *AtFKBP62* und *AtFKBP65* aus Weizen sind *TaFKBP73* bzw. *TaFKBP77* [Kurek *et al.*, 1999]. *TaFKBP77* kann durch Hitzestress verstärkt induziert werden [Kurek *et al.*, 1999]. Nimmt man eine gleiche Funktion von *AtFKBP65* an, sollten die Pflanzen der *AtFKBP65*-Null-Mutante anfälliger gegen Hitzestress sein.

Die Homologie der *AtHsp90* Isoformen beträgt bei *AtHsp90.2*, *AtHsp90.3* und *AtHsp90.4* bezogen auf die AS-Sequenz mehr als 95% [Krishna & Gloor, 2001], und die Expression erfolgt in allen Pflanzenorganen [Miloni & Hatzopoulos, 1997]. Aus diesem Grund wurden die genspezifischen Primer so gewählt, dass eine Identifikation aller *AtHsp90*-Gene möglich war. Die Zuordnung der T-DNA-Insertion in eines der *AtHsp90*-Gene erfolgte erst nach der Sequenzierung eindeutig. Eine funktionale Redundanz ist unter stressfreien Kultivierungsbedingungen sehr wahrscheinlich. Erst die Mehrfachmutante mit T-DNA-Insertionen in möglichst allen *AtHsp90*-Genen oder gezielte Stressbedingungen während der Kultivierung können Aufschluss über einen möglichen Phänotyp geben.

Für alle identifizierten Insertionslinien wurde bisher nicht gezeigt, dass die T-DNA-Insertion dazu führt, dass keine vollständige mRNA des entsprechenden Gens mehr nachweisbar ist. Ohne die entsprechende mRNA kann kein Protein translatiert werden. Die Untersuchung des mRNA-Gehalts ist für die Insertionslinie des *AtFKBP12* besonders wichtig, da hier die Insertion in die Promotorregion und nicht in translatierte Sequenz erfolgte [Krysan *et al.*, 1999]. Dies bedeutet, dass die identifizierte T-DNA-Insertionslinie auch einen veränderten mRNA-Gehalt enthalten könnte. Der Nachweis fehlender mRNA würde auf die Korrelation eines möglichen beobachteten Phänotyps mit der Insertion hinweisen. Ein weiterer Beweis ist die Aufhebung eines festgestellten Phänotyps nach Transformation des entsprechenden Gens in die Insertionslinie. Diese muss zuvor in den genetischen Hintergrund des *Arabidopsis*-Wildtyp eingekreuzt worden sein, um die Erkenntnisse über die T-DNA-Insertionslinien abzusichern. Durch diese Kreuzungen können zufällig beobachtete Effekte durch andere Mutationen ausgeschlossen werden.

Berücksichtigt man, dass 18.000 Linien auf Insertionen in 12 *FKBP*- und 4 *Hsp90*-Genen untersucht wurden, entspricht die Ausbeute dem erwarteten Maß, das für ein 2,1 kb Gen bei einer theoretischen 95% Chance für 180.000 untersuchte Linien liegt [Krysan *et al.*, 1999]. Besonders hervorzuheben ist die Identifikation der Insertion in die Promotorregion von *AtFKBP12*. Die Insertionslinie stellt erst die zweite festgestellte Mutante, neben der beschriebenen Maus-Null-Mutante, für ein *FKBP12* codierendes Gen höherer Eukaryoten dar [Shou *et al.*, 1998; Aghdasi *et al.*, 2001].

Die Zahl der identifizierten *FKBP*-Mutanten in *Arabidopsis* konnte durch diese Untersuchungen verdoppelt werden.

5.1.3 Charakterisierung von *AtFKBP12*, *AtFKBP62* und *AtPar15*

Mit der Klonierung von *AtFKBP12* sollte ein pflanzlicher Vertreter des *FKBP*-prototypischen Aufbaus untersucht werden, für den bisher in keiner Pflanzenart eine PPIase-Aktivität nachgewiesen wurde (vgl. Tabelle 2, Seite 9). Bei der Untersuchung der PPIase-Aktivität des rekombinant hergestellten *AtFKBP12* konnte keine Aktivität festgestellt werden. Diese fehlende PPIase-Aktivität kann auf den festgestellten AS-Unterschieden beruhen (vgl.: Abbildung 6, Seite 51).

Aufgrund der beschriebenen FK506 Bindung von authentischem *AtFKBP12* und der fehlenden PPIase-Aktivität des rekombinant hergestellten *AtFKBP12* sollte die Identifikation von Bindungspartnern weiteren Aufschluss über die *in vivo* Substrate von *AtFKBP12* geben. Hierzu bietet die identifizierte *AtFKBP12*-Null-Mutante einen möglichen Ausgangspunkt.

AtFKBP62 wurde als GST-Fusionsprotein kloniert und die PPIase-Aktivität von GST-*AtFKBP62* wurde untersucht. *AtFKBP62* ist aus drei FKBP-Domänen und einer TPR-Domäne mit drei TPR-Motiven aufgebaut. Ein Membrananker wie in *AtFKBP42* wurde nicht identifiziert. Eine CaM-Bindung mit vergleichbaren Merkmalen wie für andere FKBP mit dieser Domänenstruktur, z.B. FKBP52, *ZmFKBP66*, *AtFKBP72* *TaFKBP73* und *AtFKBP42* ist nicht auszuschließen. Darüber hinaus ist eine Bindung an die TPR-bindende Domäne von *AtHsp90* naheliegend.

Aufgrund der Sequenzanalyse der drei FKBP-Domänen ist die gemessene PPIase-Aktivität vermutlich auf die erste Domäne zurückzuführen. Die Reste Tryptophan⁵⁹ oder Phenylalanin⁹⁹ bezogen auf hFKBP12 sind in der zweiten und dritten FKBP-Domäne nicht konserviert. Diese Verteilung der aktiven und vermutlich verringert- oder vollständig inaktiven PPIase-Domänen könnte ein generelles Prinzip darstellen. Die Sequenzvergleiche der PPIase-Domänen von *AtFKBP62*, *AtFKBP65*, *TaFKBP72* und *TaFKBP77* belegen dies (Abbildung 21, vgl. auch Abbildung 8, Seite 56). Für hFKBP52 wurde gezeigt, dass die zweite FKBP-Domäne keine nachweisbare PPIase-Aktivität besitzt [Pirkl *et al.*, 2001].

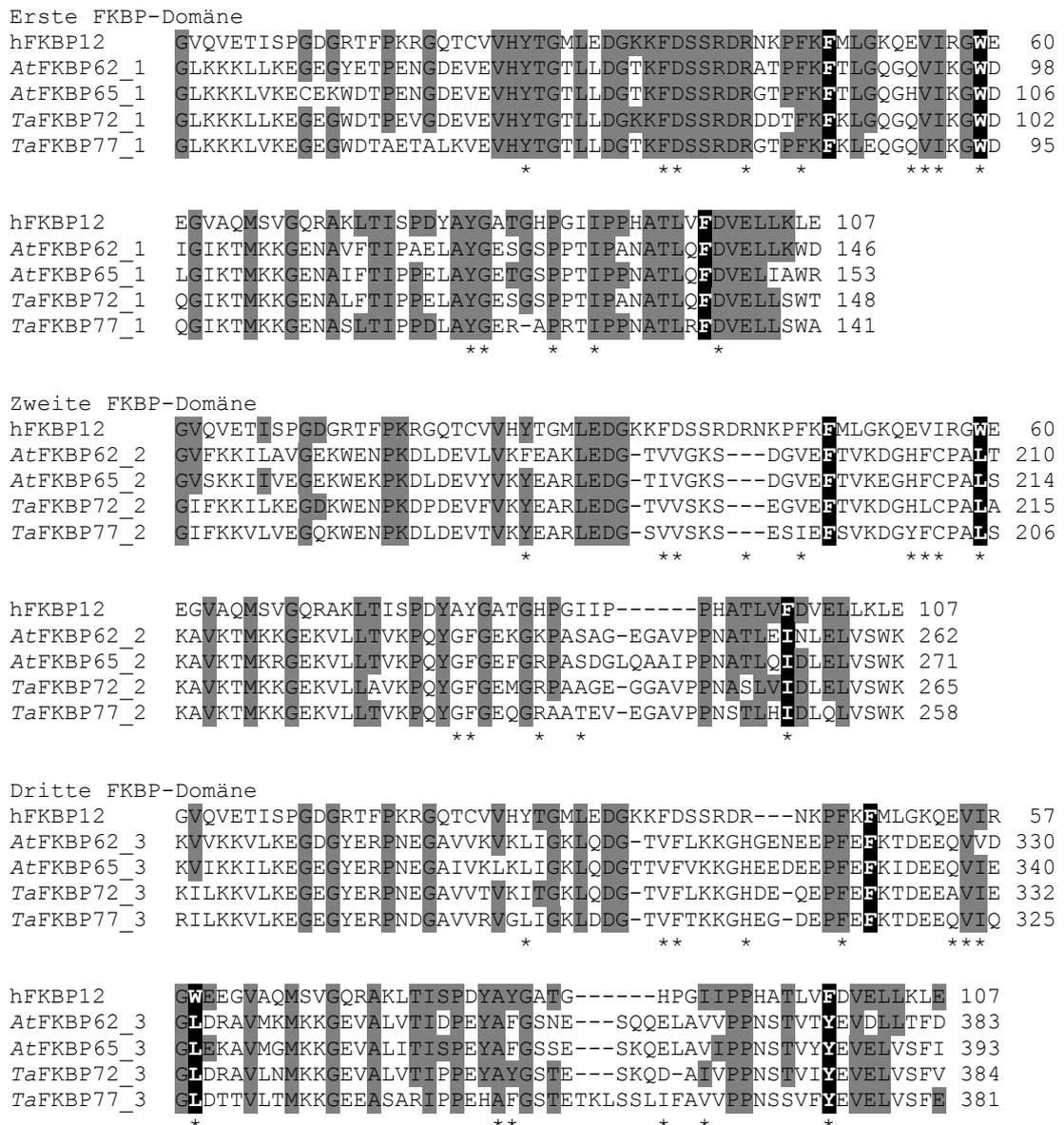


Abbildung 21: Sequenzvergleich von hFKBP12 mit den FKBP-Domänen von *AtFKBP62*, *AtFKBP65*, *TaFKBP72* und *TaFKBP77*. Wie in Abbildung 8 (Seite 56) sind die mit hFKBP12 identischen AS grau unterlegt und die AS, die bei der Bindung von FK506 diskutiert werden, mit einem Sternchen markiert [Kay, 1996]. Schwarz unterlegt sind drei AS, deren Austausch in hFKBP12 (F48L, W59L oder F99Y) zu einer Reduzierung (<25% Restaktivität) der PPIase-Aktivität führt [Timerman *et al.*, 1995; DeCenzo *et al.*, 1996; Tradler *et al.*, 1997].

Auch das Parvulin *AtPar15* wurde kloniert und die PPIase-Aktivität charakterisiert. Das Protein wurde bisher nicht näher beschrieben. Zum Zeitpunkt der Klonierung waren nur cDNA Klone in den Datenbanken verfügbar, das Gen im Rahmen des Genomprojekts jedoch nicht annotiert. In der Sequenz entspricht *AtPar15* humanem Par14. Es besitzt eine N-terminale Erweiterung von 30

AS, die auch für hPar14 charakteristisch ist [Uchida *et al.*, 1999; Sekerina *et al.*, 2000]. Durch Präzipitationsexperimente mit GST-hPar14 konnte die Beteiligung an dem vor-ribosomalen Ribonukleoproteinkomplex gezeigt werden [Fujiyama *et al.*, 2002].

Einen deutlichen Unterschied gibt es in der PPIase-Aktivität von hPar14 und AtPar15. Während für hPar14 eine geringe PPIase-Aktivität nachgewiesen wurde, konnte für AtPar15 eine mit EcPar10 vergleichbare Aktivität und Substratspezifität gezeigt werden. Die AS 89 in AtPar15 ist ein Cystein, das in Parvulinen konserviert ist. Die Parvuline EcPar10 und hPin1 besitzen an den entsprechenden Positionen ebenfalls ein Cystein (C41 bzw. C113). Durch kovalente Modifikation der Cysteinseitenkette mit Juglon konnte eine Inhibierung der PPIase-Aktivität für EcPar10 und hPin1 erreicht werden, die auf einer partiellen Entfaltung des aktiven Zentrums beruht [Hennig *et al.*, 1998]. Ein Austausch des C113 in hPin1 gegen Alanin führt ebenfalls zu einer Inaktivierung von hPin1 [Ranganathan *et al.*, 1997]. Aus diesen Gründen scheint das Vorhandensein oder Fehlen dieses Cysteins einen entscheidenden Unterschied für die differente PPIase-Aktivität zwischen den homologen Parvulinen AtPar15 und hPar14 darzustellen.

5.1.4 AtFKBP42

Der Domänenbau von AtFKBP42 gleicht im grundsätzlichen Schema dem Aufbau der am löslichen SHR-Komplex von Säugern beteiligten PPIasen FKBP51 und FKBP52. Die Interaktion der TPR-Domäne mit dem C-terminalen Bereich von Hsp90 ist für den Chaperonzyklus der SHR-Aktivierung essentiell [Richter & Buchner, 2001]. Für die Interaktion von AtFKBP42¹⁻³³⁹ mit AtHsp90.1⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰ konnte in der vorliegenden Arbeit eine Stöchiometrie von einem Molekül AtFKBP42 zu zwei AtHsp90-Molekülen gezeigt werden. Die gleiche Stöchiometrie wurde für einen Säugerkomplex aus Hsp90 und FKBP52 durch chemische Quervernetzung gezeigt [Silverstein *et al.*, 1999]. Neuere Daten, die mittels ITC gewonnen wurden, zeigen die Stöchiometrie eines Komplexes, der aus 2 Molekülen hCyp40, hFKBP51 oder hFKBP52 und einem Hsp90-Dimer aufgebaut ist [Pirkl & Buchner, 2001].

In früheren Untersuchungen wurde von Krishna *et al.* [1997] AtHsp90.1 *in vivo* als Monomer nachgewiesen. Die analytische Gelfiltration des gereinigten AtHsp90.1⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰ gab dagegen Hinweise auf eine Dimerisierung von AtHsp90, die der Dimerisierung von Hsp90 aus Säugern entspricht [Carrello *et al.*, 1999]. Die AS 527 bis 709 des humanen Hsp90 entsprechen etwa dem klonierten Fragment AtHsp90.1⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰. Für das Fragment des humanen Hsp90 wurde eine Dimerisierung gezeigt [Richter *et al.*, 2001].

Die Dissoziationskonstante eines Komplexes aus dimerem AtHsp90-Fragment mit AtFKBP42¹⁻³³⁹ wurde mit 1,3 μM bestimmt. Die Dissoziationskonstanten von hFKBP51,

hFKBP52 und hCyp40 mit Hsp90 wurden mit 174 nM, 55 nM und 226 nM bestimmt [Pirkl & Buchner, 2001]. Der C-Terminus von Hsp90 besteht aus den AS ‚EEVD‘ und ist für die allgemeine Bindung von Hsp90 an TPR-Domänen verantwortlich. Die Spezifität dieser Interaktion wird aber auch durch hydrophobe Reste bedingt, die N-terminal des EEVD-Motivs lokalisiert sind [Scheufler *et al.*, 2000]. In *Arabidopsis* sind vier cytoplasmatische Hsp90-Isoformen bekannt, die alle das ‚EEVD‘-Motiv enthalten (*AtHsp90.1*: AS 697-700; *AtHsp90.2* – *AtHsp90.4*: 696-699) [Miloni & Hatzopoulos, 1997; Krishna & Gloor, 2001]. Die Familie der Hsp90-Proteine ist hoch konserviert in allen Eukaryoten. In speziesübergreifenden Bindungsexperimenten konnte ein Komplex aus Weizen-PPIasen (*TaFKBP73* und *TaFKBP77*) mit Hsp90 und dem GR aus Säugern nachgewiesen werden [Reddy *et al.*, 1998]. Trotzdem ist der Grad der Konservierung zwischen Pflanzen- und Säuger-Hsp90 Proteinen deutlich geringer, als der innerhalb einer Spezies [Krishna & Gloor, 2001]. Ein Verlust des ‚EEVD‘-Motivs des gereinigten Fragments durch C-terminalen Proteinabbau könnte die in der ITC festgestellte Stöchiometrie der Dissoziationskonstante verändern. Dies ist bei den vorliegenden Messungen unwahrscheinlich, kann aber nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Verschiebung der Stöchiometrie von 2 : 2 nach 1 : 2 würde durch den Verlust von genau 50% der ‚EEVD‘-Motive auftreten. Die Masse der Proteine wurde nach der Reinigung durch Massenspektrometrie bestätigt. Eindeutig wäre diese Aussage nur nach den erfolgten ITC-Messungen.

Die Interaktion zwischen Pflanzen-Hsp90 und FKBP mit TPR-Motiven scheint auf den gleichen Prinzipien zu basieren wie die Interaktion von Säuger Hsp90 mit TPR-Motiven [Pratt *et al.*, 2001]. Der Nachweis der Interaktion von *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ mit *AtHsp90.1* mittels ITC unterstützt diese Aussage und ermöglichte die erste Bestimmung einer Dissoziationskonstante für einen FKBP-Hsp90 Komplex aus *Arabidopsis*-Proteinen. Die gemessene Dissoziationskonstante und die Stöchiometrie stellen vermutlich eine Anpassung an die besonderen Bedingungen dieses Komplexes dar. Es sind bisher keine Daten bekannt, die Aufschluss über einen möglichen Komplex zwischen Hsp90 und FKBP38 oder *DmFKBP45* geben.

Chaperone binden Polypeptidketten in äquimolaren Verhältnissen. Daraus resultiert ein Anteil von bis zu 2% der zellulären Proteinmenge, der nach einem Hitzeschock weiter ansteigen kann [Hemmingsen *et al.*, 1988]. Überexprimiertes HA-*AtFKBP42* kann nur in angereicherten Membranfraktionen mit anti-FKBP42 Antikörper nachgewiesen werden. Der Nachweis von authentischem *AtFKBP42* in Wildtyppflanzen unter den getesteten Bedingungen war nicht möglich, was auf eine sehr geringe zelluläre Konzentration hindeutet. Unter Berücksichtigung dieses Konzentrationsverhältnisses und der gemessenen Dissoziationskonstante von *AtHsp90*

und *AtFKBP42* kann davon ausgegangen werden, dass alle *AtFKBP42*-Moleküle in einem Komplex mit *AtHsp90* vorliegen.

Eine chaperonähnliche Funktion wurde für die TPR-Domäne von *hFKBP52* durch die Untersuchung von *hFKBP52*-Fragmenten im CS-Aggregationstest nachgewiesen [Pirkl *et al.*, 2001]. *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ verhindert die Aggregation von CS im gleichen Test 14-fach besser als *hFKBP52* und dreifach besser als *hCyp40* und *hFKBP51* [Pirkl & Buchner, 2001]. Die gereinigte FKBP-Domäne von *AtFKBP42* zeigte keinen Effekt auf die CS-Aggregation. Der für *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ festgestellte Effekt wird folglich durch die TPR-Domäne erzielt. Auch diese Eigenschaft ist eine Parallele zu den Eigenschaften von *hFKBP51* und *hFKBP52*. Die Bedeutung einer biologischen Funktion für diese Beobachtungen ist bisher nicht geklärt. *In vivo* ist die Erhaltung oder Rekonstitution der Aktivität eines Enzyms durch Chaperone wichtig [Ben-Zvi & Goloubinoff, 2001]. In dem Test, der die Erhaltung der CS-Aktivität durch Chaperone bei 43°C über die Zeit verfolgt, konnte mit *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ keine entsprechende Funktion nachgewiesen werden.

Ein anderer Aspekt der Untersuchung von *AtFKBP42* war die mögliche Calmodulin-Bindung. Die publizierten Bindungsstudien der Multidomänen-FKBP an CaM zeigten eine Affinität von *FKBP52*, *ZmFKBP66* und *AtFKBP72* an CaM-Agarose [Massol *et al.*, 1992; Hueros *et al.*, 1998; Carol *et al.*, 2001]. Trotzdem sind keine Bindungskonstanten oder eine *in vivo* Funktion dieser Interaktion für eine PPIase mit CaM-Bindungsmotiv und CaM publiziert. Für *AtFKBP42* konnte eine CaM-Bindung durch chemische Quervernetzung und Präzipitation mit CaM-Agarose gezeigt werden. Die Bindung war aber in beiden Methoden unter den eingesetzten Bedingungen nicht quantitativ nachzuweisen. Untersuchungen mittels Oberflächenplasmonresonanz mit einem BiacoreX sowie ITC-Experimente wurden durchgeführt, um eine Dissoziationskonstante für die Interaktion zwischen *AtFKBP42* und CaM zu erhalten. Mit beiden Methoden wurden bereits erfolgreich Dissoziationskonstanten für CaM und verschiedenen Proteinliganden bestimmt [Moorthy *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 2001]. In den mit *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ und CaM durchgeführten Experimenten wurden keine K_D -Werte ermittelt, obwohl durch das Design der Experimente eine Dissoziationskonstante bis in den unteren mikromolaren Konzentrationsbereich hätte festgestellt werden können. Aus diesem Grund muss der K_D -Wert für die Interaktion von *AtFKBP42* und CaM über diesem Bereich liegen. Verglichen mit der gut untersuchten Interaktion von CaM mit Calcineurin, für die ein K_D -Wert von 1 nM bestimmt wurde [Hubbard & Klee, 1987], ist dies eine > 1000fach schwächere Bindung.

Die Interaktion von CaM mit anderen Proteinen geschieht über eine charakteristische amphiphile Helix, die von CaM Ca^{2+} -abhängig erkannt und gebunden wird [O' Neil & DeGrado, 1990]. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das CaM-Bindungsmotiv des rekombinant hergestellten Proteins nicht in der korrekten Faltung vorliegt. Es ist aber auch möglich, dass die festgestellte Interaktion von *AtFKBP42* mit CaM durch eine ähnlich dem CaM-Bindungsmotiv strukturierte Helix des *AtFKBP42* zustande kommt, die *in vivo* eine andere Funktion als CaM-Bindung erfüllt. Eine direkte Bindung einer solchen Helix des humanen Proteins AIP (hFKBP37.7) an den Arylhydrocarbonrezeptor-Komplex, der einen vergleichbaren Aufbau besitzt wie die Säuger-SHR-Komplexe, wurde von Bell und Poland vorgeschlagen [2000]. Dies würde bedeuten, dass die Vorhersage eines CaM-Bindungsmotivs für *AtFKBP42* und möglicherweise auch für die ähnlich aufgebauten Proteine prinzipiell falsch war.

Die gereinigten Proteinfragmente von *AtFKBP42* wurden mit Hilfe von CD-Spektroskopie auf ihren Sekundärstrukturgehalt untersucht. Die Spektren der FKBP-Domäne (*AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰) und *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ sind mit den Spektren von hFKBP12 bzw. hFKBP52 vergleichbar. Sie zeigen die Minima im gleichen Wellenlängenbereich und haben eine ähnliche Signalintensität. Das für hFKBP12 festgestellte Maximum im CD-Spektrum bei 204nm fehlt im Spektrum von *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ [Tradler *et al.*, 1997; Pirkl & Buchner, 2001]. Dies kann mit einem höheren Anteil von ungeordneten Strukturen erklärt werden. Die klonierte *AtFKBP42*-FKBP-Domäne enthält N- und C-terminal weitere AS, die den N-Terminus und die Übergangsregion zur TPR-Domäne von *AtFKBP42* darstellen. Nimmt man an, dass diese als flexible, wenig strukturierte Bereiche vorliegen, so erhöht sich der Anteil unstrukturierter Bereiche des Proteins, was sich auch entsprechend im CD-Spektrum auswirkt. Der berechnete Anteil von α -Helices an der gesamten Sekundärstruktur (*AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰: 7%; *AtFKBP42*¹⁻³³⁹: 30%) ist mit den Berechnungen für hFKBP12 (10%) und hFKBP52 (25%) vergleichbar, die nach der gleichen Formel bestimmt wurden [Pirkl & Buchner, 2001].

Ein Vergleich der Übergangskurven von *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ mit *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ zeigt, dass der temperaturinduzierte Entfaltungsprozess von *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ bei höheren Temperaturen beginnt. Dieser Effekt wurde auch für hCyp40, hFKBP51 und hFKBP52 von Pirkl und Buchner [2001] festgestellt. Die durch CD-Spektroskopie erhaltenen Daten belegen, dass die rekombinant hergestellten Proteine Sekundärstrukturmerkmale aufweisen, die auch für ähnlich aufgebaute FKBP gezeigt wurden.

Die Modellierung der dreidimensionalen Struktur für die FKBP Domäne von *AtFKBP42* konnte einen zusätzlichen Hinweis auf eine mögliche Struktur geben. Das Prinzip der Modellierung von

Proteinen durch *SwissModel* beruht auf der Annahme, dass Proteine mit homologer Sequenzen auch ähnlich falten. Für die Überlagerung der C α -Atome des Proteinrückgrats der *AtFKBP42*-FKBP-Domäne und hFKBP12 wurde ein mittleres Fehlerquadrat von 1,96 Å berechnet. Für Sequenzen mit 30% - 39% Homologie zu der vorgegebenen Sequenz wird diese mittlere Fehlerquadratsumme nur für 20% aller Modellierungen erreicht [Guex *et al.*, 1999]. Trotz dieser guten Übereinstimmung mit der vorgegebenen Struktur des FKBP12, ist die Modellierung der FKBP-Domänen kritisch zu sehen. Die Werte für Sequenzidentität zu der vorgegebenen Struktur liegen an der unteren Grenze für verlässliche Berechnungen [Forster, 2002]. Für einen direkten Vergleich der Strukturen mit hFKBP12 muss die modellierte Struktur mit einer experimentellen Methode bestätigt werden. Die Untersuchungen zur Aufklärung der Strukturen von *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ und *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ durch Röntgen-Kristallstrukturanalyse bzw. Kernresonanzuntersuchungen werden von Andreas Eckhoff im Forschungszentrum Jülich¹⁰ durchgeführt.

Im Gegensatz zu der für FKBP51 und FKBP52 gezeigten PPIase-Aktivitäten [Callebaut *et al.*, 1992; Nair *et al.*, 1997] konnte für *AtFKBP42* keine PPIase-Aktivität nachgewiesen werden. In hFKBP52 wurde die PPIase-Aktivität ausschließlich für die erste der zwei PPIase-Domänen nachgewiesen [Pirkl *et al.*, 2001]. Die für die Bindung von FK506 und die PPIase-Aktivität entscheidenden AS sind in der ersten PPIase-Domäne konserviert, während sie in der zweiten verändert sind. Die Sequenzanalyse von *AtFKBP42* weist direkte Parallelen zwischen den konservierten AS der FKBP-Domäne und der inaktiven Domäne von hFKBP52 auf. In beiden Domänen sind die entscheidenden AS nicht konserviert (vgl. Abbildung 8, Seite 56). Gleiche Ergebnisse wurden für die identifizierten homologen Proteine hFKBP38, muFKBP38 und *DmFKBP45* festgestellt. Übereinstimmend mit der fehlenden Konservierung der entscheidenden AS, konnte für rekombinantes hFKBP38, das aus Insektenzellen präpariert wurde, keine PPIase-Aktivität gezeigt werden [Lam *et al.*, 1995]. Auch die mögliche Aktivierung der PPIase-Aktivität von *AtFKBP42* durch die interagierenden Proteine CaM und *AtHsp90.1*⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰ wurde durch die entsprechenden PPIase-Aktivitätstests ausgeschlossen.

Neben der festgestellten PPIase-Aktivität der ersten FKBP Domäne von FKBP52 wurde für diese Domäne eine zweite Funktion gezeigt. Über die Bindung an cytoplasmatisches Dynein wird der Kerntransport des aktivierten Glucocorticoid-Rezeptors vermittelt [Galigniana *et al.*, 2001]. Diese Interaktion wurde auch für Kaninchen-Dynein mit die Weizen-FKBP77 oder Weizen-FKBP73 gezeigt [Pratt *et al.*, 2001; Harrell *et al.*, 2002]. Wenn die Bindung an Dynein

¹⁰ Andreas Eckhoff, Forschungszentrum Jülich, Institut für biologische Informationsverarbeitung (IBI-2), Institutsleiter: Prof. G. Büldt

eine *in vivo*-Funktion der aktiven PPIase-Domäne in diesen Organismen darstellt, wird sie bei *AtFKBP42* sehr wahrscheinlich nicht benötigt, weil *AtFKBP42* in der Pflanze als membran-gebunden nachgewiesen wurde.

Durch die Untersuchung von HA-*AtFKBP42* exprimierenden Pflanzen konnte die Lokalisation von HA-*AtFKBP42* nach Antikörpermarkierung im Elektronenmikroskop gezeigt werden. Die Signale für das ProteinA-gebundene Gold waren deutlich in Tonoplast und Plasmamembran, aber keinem weiteren Kompartiment der Zelle, in den Dünnschnitten zu erkennen. Die zur Kontrolle untersuchten Wildtyppflanzen zeigten nur wenige, verteilte Signale, die als unspezifische Kreuzreaktionen anzusehen sind. Die Lokalisation von HA-*AtFKBP42* ist folglich eindeutig membrangebunden, was mit dem Nachweis von HA-*AtFKBP42* durch anti-*AtFKBP42* Antikörper in den angereicherten Plasmamembranpräparationen weiter untermauert wurde.

Standardpräparationstechniken, in denen für eine verbesserte Kontrastierung der Zellstrukturen Schwermetalle auf die Präparate aufgebracht werden, können für die Immunlokalisation nicht eingesetzt werden, weil die Schwermetalle die Immunmarkierung verhindern. Bei der genutzten alternativen Technik ist die abgebildete Struktur durch die geringere Kontrastierung bei den Aufnahmen reduziert. Der Strukturverlust der in den Strukturen der HA-*AtFKBP42* Dünnschnitte zu erkennen ist, kann nicht hierauf zurückgeführt werden. Der Strukturen in den parallel präparierten Wildtyp-Kontrollen sind deutlich kontrastierter ausgeprägt. Es ist möglich, dass der Strukturverlust durch Membranveränderungen aufgrund erhöhter Expression eines membranständigen Proteins zurückzuführen ist.

Eine andere Erklärung wäre die Einlagerung von Kristallen in die Membran (Dr. Dieter Neumann, persönliche Mitteilung). Dies könnte auch erklären, warum die Extraktion von HA-*AtFKBP42* aus angereicherten Plasmamembranen unvollständig war, obwohl Bedingungen gewählt wurden, die für die schonende, vollständige Extraktion von Membranproteinen als Vorbereitung für die Blau-native Elektrophorese eingesetzt werden [Schagger & von Jagow, 1991; Neff & Dencher, 1999]. Im Gegensatz zur Doppellipidschicht der Membranen wird die Solubilisierung von Kristallen in wässrigen Systemen nicht von Detergenzien gefördert. Das zusätzliche Signal, das nach der Extraktion von HA-*AtFKBP42* auftrat, ist wahrscheinlich ein Abbauprodukt. Das HA-Epitop wurde als N-terminale Fusion angefügt. Der Abbau sollte folglich C-terminal erfolgen, da das neu auftretende Signal weiterhin durch anti-HA Antikörper nachweisbar ist. Der C-Terminus von HA-*AtFKBP42* ist in die Membran integriert. Das Signal könnte ein Abbauprodukt darstellen, dem Teile des Membranankers durch Proteolyse entfernt wurden.

Die Null-Mutationen des Maus-FKBP12 und Maus-FKBP12.6 sind die einzigen charakterisierten FKBP-Deletionsmutanten in höheren Eukaryoten. Die FKBP12-Mausmutanten zeigen Herzdefekte und eine erhöhte Sterblichkeit, die auf einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase beruht [Shou *et al.*, 1998; Aghdasi *et al.*, 2001]. Die Null-Mutation des Gens für FKBP12.6 führt bei männlichen Mäusen zu einem vergrößerten Herz. Weibliche Mäuse sind vor diesem Effekt durch einen höheren Östrogengehalt geschützt [Nelson & Herrera, 2002; Xin *et al.*, 2002]. In *Arabidopsis* sind neben den in der vorliegenden Arbeit neu identifizierten T-DNA-Insertionsmutanten der Gene von *AtFKBP12* und *AtFKBP65* zwei weitere bekannt, *pasticcinol* (*AtFKBP72*) und *twd1* (*AtFKBP42*). Die Wachstumsdefekte von *pasticcinol* und *twd1* wurden bereits mit der BL Signaltransduktion in Verbindung gebracht [Carol *et al.*, 2001; Harrar *et al.*, 2001; Perez-Perez *et al.*, 2001a]. Eine Beteiligung von *AtFKBP72* an einem direkten Komplex mit BRI1 ist fragwürdig, weil es als kernlokalisiert identifiziert wurde [Carol *et al.*, 2001]. Die Interaktion von *AtFKBP42* mit BRI1 ist aufgrund der Lokalisation wahrscheinlicher. Die *twd1*-Pflanzen sind unempfindlich gegenüber der exogenen Applikation von BL und die Kreuzung von *twd1* mit BL-Biosynthesemutanten führt zu einem noch kleinwüchsigeren Phänotyp, der vollständig insensitiv gegenüber der exogenen Applikation von BL ist und identisch zu dem *bril*-Phänotyp ist. Diese Kreuzungsexperimente deuten auf eine Beteiligung von *AtFKBP42* an der BL-Signaltransduktion oder BL-Perzeption hin [Schulz *et al.*, 2001]. Wäre die BL-Signaltransduktion nicht durch das Fehlen von *AtFKBP42* beeinträchtigt, würden die Doppelmutanten durch exogene Applikation von BL den *twd1*-Phänotyp zurückerhalten. Der Reifungszyklus des Säuger-SHR [Richter & Buchner, 2001] und die gezeigte Interaktion von *AtFKBP42* mit *AtHsp90* lassen vermuten, dass ein analoger Komplex auch in *Arabidopsis* existieren könnte. Weiterhin sind BRI1 und *AtFKBP42* in der Plasmamembran von *Arabidopsis* lokalisiert [Friedrichsen *et al.*, 2000; Geisler *et al.*, 2001].

Durch Phosphorylierungsexperimente und die chemische Quervernetzung von Plasmamembranpräparationen soll die mögliche direkte Interaktion von BRI1 und *AtFKBP42* näher untersucht werden. Erste Versuche der Phosphorylierung von Plasmamembranpräparationen zeigten, dass die gesamte Phosphorylierung durch zugegebenes *AtFKBP42* verringert wird (Matthias Weiwad, persönliche Mitteilung).

Neben den löslichen SHR sind in Säugern die membrangebundenen mSHR bekannt. Über eine Beteiligung von PPIasen an diesem Typ von Steroidhormonrezeptor ist nichts bekannt.

BRI1 reguliert die Genexpression verschiedener Proteine [Bishop & Yokota, 2001; Friedrichsen & Chory, 2001], trotzdem ist ein vergleichbarer Prozess, wie er über die Säuger-SHR abläuft

unwahrscheinlich. BRI1 steht aufgrund der Lokalisation und dem heutigen Wissen über die Signalweiterleitung nach der extrazellulären BL-Perzeption den mSHR näher.

5.1.5 Ausblick

Es gibt eine zunehmende Zahl von Hinweisen darauf, dass an vielen untersuchten Rezeptorkomplexen eine PPIase beteiligt ist. Für die löslichen SHR, den TGF- β -Rezeptor, den Ryanodin-Rezeptor [Schiene-Fischer & Yu, 2001], BRI1 und auch für den Ecdyson-Rezeptor der Insekten [Song *et al.*, 1997; Arbeitman & Hogness, 2000] wurde eine Interaktion mit verschiedenen FKBP gezeigt. Das Gleiche gilt für den Arylhydrocarbon-Rezeptor [Carver *et al.*, 1998]. In Zukunft wird sich zeigen, ob für hFKBP38, muFKBP38 und *Dm*FKBP45 eine Beteiligung an Rezeptorkomplexen nachgewiesen werden kann.

Darüber hinaus werden die neu identifizierten Deletionsmutanten weiter charakterisiert werden. Die Analyse von erzeugten Mehrfachmutanten kann einen weiteren Einblick in die Funktion der PPIasen in *Arabidopsis* geben.

6 Zusammenfassung

- Das *Arabidopsis*-Genom wurde mittels der Computerprogramme *BLAST*, *SMART*, *PSORT*, *TargetP* und *TMpred* analysiert und codierte PPIasen identifiziert und den drei PPIase-Familien zugeordnet. Neben 28 Cyclophilinen und drei Parvulinen wurden 24 FKBP analysiert, die nach Computer-Vorhersage im Cytosol, dem ER, dem Zellkern und den Chloroplasten lokalisiert sind. In den Mitochondrien wurden keine PPIasen eindeutig vorhergesagt.
- Während bei den *AtCyclophilinen* fünf verschiedene Domänen zu unterschiedlich aufgebauten Mehrdomänen-Cyclophilinen beitragen, wurde bei den *AtFKBP* nur die TPR-Domäne als zusätzliche Domäne vorhergesagt. Ein Parvulin (*AtPar25*) enthält eine Rhodanese-Domäne.
- *AtFKBP12* wurde kloniert und exprimiert. CD-Spektren des gereinigten *AtFKBP12* wurden bei 20°C und 80°C aufgenommen. Bei 20°C gleicht das CD-Spektrum dem von hFKBP12. Bei 80°C ist eine temperaturinduzierte Strukturänderung festzustellen. Für *AtFKBP12* konnte im proteasegekoppelten Test keine PPIase-Aktivität festgestellt werden.
- *AtFKBP62* wurde als GST-Fusionsprotein kloniert und exprimiert. Die Substratspezifität des gereinigten Enzyms wurde charakterisiert. Für das Substrat Suc-ALPF-pNA wurde mit $5,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ der höchste k_{cat}/K_M -Wert bestimmt. Die untersuchte Substratspezifität entspricht den für hFKBP12 bekannten Verhältnissen. Peptidsubstrate mit großen, hydrophoben AS N-terminal des Prolins werden mit den höchsten k_{cat}/K_M -Werten umgesetzt.
- Nach der Klonierung und Expression von *AtPar15* wurde das Protein gereinigt. Die PPIase-Aktivität für verschiedene Substrate wurde im proteasegekoppelten Test bestimmt. *AtPar15* ist das zu hPar14 homologe Parvulin aus *Arabidopsis*. Der höchste k_{cat}/K_M -Wert wurde mit $2,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für das Substrat Suc-ALPF-pNA bestimmt. Dies ist 56-fach höherer als der höchste für hPar14 bestimmte Wert (Suc-AKPF-pNA).

- Ein C-terminales Fragment (AS 559-700) von *AtHsp90.1*, das den TPR-Bindungsereich enthält, wurde kloniert, in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Das Verhalten des Proteins in Gelfiltrationsexperimenten deutet auf eine Dimerisierung hin.
- Durch die Analyse von 18.000 T-DNA-Insertionslinien konnten zwei neue *AtFKBP*- und eine neue *AtHsp90*-Mutante identifiziert werden. Die T-DNA-Insertion des *AtFKBP12*-Gens wurde 300 bp stromaufwärts des Start-ATG festgestellt. Die Insertion des *AtFKBP65*-Gens liegt im sechsten Intron der codierenden Sequenz. Für das *AtHsp90.2*-Gen wurde eine Insertion im dritten Exon nachgewiesen.
- Die Sequenzanalyse von *AtFKBP42* mit dem Programm *SMART* sagt eine N-terminale FKBP-Domäne, eine TPR-Domäne mit drei TPR-Motiven und einen C-terminalen Membrananker voraus.
- *AtFKBP42* homologe Proteine in Mensch, Maus und *Drosophila* wurden durch Datenbankanalysen (Sequenzvergleiche, Strukturvergleiche) identifiziert. Sie weisen ebenfalls die typische Struktur des *AtFKBP42* mit einer FKBP-Domäne, einer TPR-Domäne und dem C-terminalen Membrananker auf.
- *AtFKBP42* sowie die verkürzten Proteine *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ (FKBP-Domäne) und *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ wurden kloniert und in *E. coli* exprimiert. Alle Proteine wurden gereinigt und charakterisiert.
- Durch CD-Spektroskopie von *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ und *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ wurden Sekundärstrukturelemente der gereinigten Proteine nachgewiesen. Die aufgenommenen CD-Spektren bei 20°C sind mit den Spektren von hFKBP12 bzw. hFKBP51 und hFKBP52 vergleichbar. Eine Temperaturerhöhung führt zu einer Veränderung der über die Zeit aufgenommenen CD-Signale bei 205 nm bzw. 222 nm. Dies deutet auf einen temperaturabhängigen Strukturverlust hin.
- Für keines der gereinigten *AtFKBP42*-Proteine (*AtFKBP42*, *AtFKBP42*¹⁻¹⁸⁰ und *AtFKBP42*¹⁻³³⁹) konnte eine PPIase-Aktivität mit dem proteolytischen Test nachgewiesen werden. Auch die Untersuchung von *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ mit dem proteasefreien Test und dem RCM-T1-Rückfaltungstest konnten keine Hinweise auf eine PPIase-Aktivität erbringen.

- Aus der Literatur ist bekannt, dass die PPIase-Aktivität von hFKBP12 durch drei individuell erzeugte Proteinvarianten auf jeweils weniger als 25% verringert werden kann. Sequenzvergleiche zeigten, dass die drei Austausche der *AtFKBP42* Wild-Typ-Sequenz entsprechen. Ähnliche Austausche wurden in den identifizierten homologen Proteinen aus Mensch, Maus und *Drosophila* festgestellt.
- Die Bindung von *AtFKBP42*¹⁻³³⁹ an Calmodulin-Agarose wurde gezeigt. Auch eine chemisch Quervernetzung mit Calmodulin ist möglich. Trotzdem konnte keine Stöchiometrie und Dissoziationskonstante der Bindung gezeigt werden. Eine *in vivo* Funktion der *in vitro* gezeigten Calmodulin-Bindung an *AtFKBP42* ist offen.
- Die TPR-Domäne von *AtFKBP42* verhindert durch einem chaperonähnlichen Effekt die Aggregation von Citratsynthase bei 40°C. Chaperone verhindern neben der Aggregation auch die thermische Inaktivierung von Citratsynthase (43°C). Eine solche Funktion war ist für *AtFKBP42* im Citratsynthase-Test nicht zu finden.
- *AtFKBP42* bindet an das gereinigte C-terminale Fragmente von *AtHsp90.1* *in vitro* mit einem Wert $K_D = 1,3 \mu\text{M}$ und einer Stöchiometrie von 1 : 2. Die Ergebnisse wurden mittels Isothermaler-Titrationskalorimetrie (ITC) erhalten.
- Die vorhergesagte Membranlokalisierung von *AtFKBP42* wurde durch den Nachweis von Hemagglutinin-fusioniertem *AtFKBP42* mittels Antikörper und goldmarkiertem ProteinA in elektronenmikroskopischen Untersuchungen gezeigt. Die Lokalisation wurde durch den Nachweis von HA-*AtFKBP42* in angereicherten Plasmamembranen weiter untermauert. Eine vollständige Extraktion von *AtFKBP42* aus den Membranpräparationen mit Detergenzien war nicht möglich.
- Die durchgeführten Experimente zu Lokalisation von *AtFKBP42* zeigen eine Lokalisierung in der gleichen Membran wie der einzige Steroidhormonrezeptor aus *Arabidopsis*. Eine Bindung an Hsp90 scheint nach dem gleichen Muster wie bei Säugern zu funktionieren. Dies kann auf einen an die Membranlokalisierung angepasste Bildung eines säuger-ähnlichen Steroidhormonrezeptorkomplex hinweisen.

7 Literaturverzeichnis

- Abarca, D., Roldan, M., Martin, M. & Sabater, B. (2001). "*Arabidopsis thaliana* ecotype Cvi shows an increased tolerance to photo-oxidative stress and contains a new chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase isoenzyme." Journal of Experimental Botany **52**(360): 1417-1425.
- Aghdasi, B., Ye, K. Q., *et al.* (2001). "FKBP12, the 12-kDa FK506-binding protein, is a physiologic regulator of the cell cycle." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(5): 2425-2430.
- Alnemri, E., Fernandes-Alnemri, T., Pomeroy, K., Robertson, N., Dudley, K., DuBois, G. & Litwack, G. (1994). "FKBP46, a novel S¹⁹ insect cell nuclear immunophilin that forms a protein-kinase complex." Journal of Biological Chemistry **269**(49): 30828-30834.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). "Basic local alignment search tool." Journal of Molecular Biology **215**(3): 403-410.
- Anfinsen, C. B. (1973). "Principles That Govern Folding of Protein Chains." Science **181**(4096): 223-230.
- Aravind, L. & Koonin, E. V. (2000). "The U box is a modified RING finger - a common domain in ubiquitination." Current Biology **10**(4): R132-134.
- Arbeitman, M. N. & Hogness, D. S. (2000). "Molecular chaperones activate the *Drosophila* ecdysone receptor, an RXR heterodimer." Cell **101**(1): 67-77.
- Aviezer, K., Kurek, I., Erel, N., Blecher, O., Devos, K. & Breiman, A. (1998). "Studies on the expression of the wheat prolyl isomerase FKBP73 during plant development." Plant Science **139**(2): 149-158.
- Babiychuk, E., Fuangthong, M., Van Montagu, M., Inze, D. & Kushnir, S. (1997). "Efficient gene tagging in *Arabidopsis thaliana* using a gene trap approach." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(23): 12722-12727.
- Barent, R. L., Nair, S. C., *et al.* (1998). "Analysis Of FKBP51/FKBP52 Chimeras and Mutants For Hsp90 Binding and Association With Progesterone Receptor Complexes." Molecular Endocrinology **12**(3): 342-354.
- Bartling, D., Heese, A. & Weiler, E. W. (1992). "Nucleotide sequence of a cDNA encoding an *Arabidopsis* cyclophilin-like protein." Plant Molecular Biology **19**(3): 529-530.
- Bauer, J., Hiltbrunner, A. & Kessler, F. (2001). "Molecular biology of chloroplast biogenesis: gene expression, protein import and intraorganellar sorting." Cellular and Molecular Life Sciences **58**(3): 420-433.
- Baulieu, E. E., Atger, M., *et al.* (1975). "Steroid hormone receptors." Vitamins & Hormones **33**: 649-736.
- Bechtold, N., Ellis, J. & Pelletier, G. (1993). "*In-Planta Agrobacterium*-Mediated Gene-Transfer by Infiltration of Adult *Arabidopsis-Thaliana* Plants." Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences **316**(10): 1194-1199.
- Becraft, P. W. (2001). "Plant steroids recognized at the cell surface." Trends in Genetics **17**(2): 60-62.
- Bell, D. R. & Poland, A. (2000). "Binding of aryl hydrocarbon receptor (AhR) to AhR-interacting protein - The role of hsp90." Journal of Biological Chemistry **275**(46): 36407-36414.
- Ben-Zvi, A. P. & Goloubinoff, P. (2001). "Review: Mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones [Review]." Journal of Structural Biology **135**(2): 84-93.
- Berardini, T. Z., Bollman, K., Sun, H. & Poethig, R. S. (2001). "Regulation of vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by cyclophilin 40." Science **291**(5512): 2405-2407.

- Bishop, G. J. & Yokota, T. (2001).** "Plants steroid hormones, brassinosteroids: current highlights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response." Plant and Cell Physiology **42**(2): 114-120.
- Blatch, G. L. & Lässle, M. (1999).** "The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions." Bioessays **21**(11): 932-939.
- Blecher, O., Erel, N., Callebaut, I., Aviezer, K. & Breiman, A. (1996).** "A Novel Plant Peptidyl-Prolyl-*Cis-Trans*-Isomerase (PPIase) - Cdna Cloning, Structural Analysis, Enzymatic Activity and Expression." Plant Molecular Biology **32**(3): 493-504.
- Borski, R. J. (2000).** "Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates." Trends in Endocrinology and Metabolism **11**(10): 427-436.
- Boston, R. S., Viitanen, P. V. & Vierling, E. (1996).** "MOLECULAR CHAPERONES AND PROTEIN FOLDING IN PLANTS [Review]." Plant Molecular Biology **32**(1-2): 191-222.
- Bradford, M. M. (1976).** "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**: 248-254.
- Breiman, A., Fawcett, T. W., Ghirardi, M. L. & Mattoo, A. K. (1992).** "Plant Organelles Contain Distinct Peptidylprolyl *Cis*, *Trans*-Isomerases." Journal of Biological Chemistry **267**(30): 21293-21296.
- Buchner, J., Grallert, H. & Jakob, U. (1998).** "Analysis of chaperone function using citrate synthase as nonnative substrate protein." Methods in Enzymology **290**: 323-338.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M. (1987).** "X11-Blue - a High-Efficiency Plasmid Transforming *Reca Escherichia-Coli* Strain with Beta-Galactosidase Selection." Biotechniques **5**(4): 376-&.
- Callebaut, I., Renoir, J. M., Lebeau, M. C., Massol, N., Burny, A., Baulieu, E. E. & Mornon, J. P. (1992).** "An immunophilin that binds M(r) 90,000 heat shock protein: main structural features of a mammalian p59 protein." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **89**(14): 6270-6274.
- Campisi, L., Yang, Y., et al. (1999).** "Generation of enhancer trap lines in *Arabidopsis* and characterization of expression patterns in the inflorescence." Plant Journal **17**(6): 699-707.
- Carol, R. J., Breiman, A., Erel, N., Vittorioso, P. & Bellini, C. (2001).** "PASTICCINO1 (*AtFKBP70*) is a nuclear-localised immunophilin required during *Arabidopsis thaliana* embryogenesis." Plant Science **161**(3): 527-535.
- Carrello, A., Ingley, E., Minchin, R. F., Tsai, S. & Ratajczak, T. (1999).** "The common tetratricopeptide repeat acceptor site for steroid receptor-associated immunophilins and Hop is located in the dimerization domain of hsp90." Journal of Biological Chemistry **274**(5): 2682-2689.
- Carver, L. A., LaPres, J. J., Jain, S., Dunham, E. E. & Bradfield, C. A. (1998).** "Characterization of the Ah receptor-associated protein, ARA9." Journal of Biological Chemistry **273**(50): 33580-33587.
- Chou, I. T. & Gasser, C. S. (1997).** "Characterization Of the Cyclophilin Gene Family Of *Arabidopsis Thaliana* and Phylogenetic Analysis Of Known Cyclophilin Proteins." Plant Molecular Biology **35**(6): 873-892.
- Clouse, S. D., Langford, M. & McMorris, T. C. (1996).** "A Brassinosteroid-Insensitive Mutant in *Arabidopsis Thaliana* Exhibits Multiple Defects in Growth and Development." Plant Physiology **111**(3): 671-678.
- Clouse, S. D. & Sasse, J. M. (1998).** "BRASSINOSTEROIDS - ESSENTIAL REGULATORS OF PLANT GROWTH AND DEVELOPMENT [Review]." Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology **49**: 427-451.
- Connelly, P. R., Aldape, R. A., et al. (1994).** "Enthalpy of hydrogen bond formation in a protein-ligand binding reaction." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(5): 1964-1968.

- Davies, T. H., Ning, Y. M. & Sanchez, E. R. (2002). "A new first step in activation of steroid receptors - Hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins." Journal of Biological Chemistry **277**(7): 4597-4600.
- de Jong, P., Catanese, J. J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S. & Chen, Y. J. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome (vol 409, pg 860, 2001)." Nature **412**(6846): 565-566.
- DeCenzo, M. T., Park, S. T., Jarrett, B. P., Aldape, R. A., Futer, O., Murcko, M. A. & Livingston, D. J. (1996). "FK506-Binding Protein Mutational Analysis - Defining the Active-Site Residue Contributions to Catalysis and the Stability of Ligand Complexes." Protein Engineering **9**(2): 173-180.
- DeFranco, D. B., Ramakrishnan, C. & Tang, Y. T. (1998). "Molecular Chaperones and Subcellular Trafficking of Steroid Receptors." Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology **65**(1-6): 51-58.
- Deng, W. Y., Chen, L. S., *et al.* (1998). "Agrobacterium VirD2 Protein Interacts With Plant Host Cyclophilins." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(12): 7040-7045.
- Doyle, V., Virji, S. & Crompton, M. (1999). "Evidence that cyclophilin-A protects cells against oxidative stress." Biochemical Journal **341**(Pt 1): 127-132.
- Eaton, W. A., Munoz, V., Hagen, S. J., Jas, G. S., Lapidus, L. J., Henry, E. R. & Hofrichter, J. (2000). "Fast kinetics and mechanisms in protein folding." Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure **29**: 327-359.
- Ecker, J. R. (1997). "BRI-ghtening the pathway to steroid hormone signaling in plants [Review]." Cell **90**(5): 825-827.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. & von Heijne, G. (2000). "Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence." Journal of Molecular Biology **300**(4): 1005-1016.
- Falkenstein, E., Eisen, C., Schmieding, K., Krautkramer, M., Stein, C., Losel, R. & Wehling, M. (2001). "Chemical modification and structural analysis of the progesterone membrane binding protein from porcine liver membranes." Molecular and Cellular Biochemistry **218**(1-2): 71-79.
- Falkenstein, E., Meyer, C., Eisen, C., Scriba, P. C. & Wehling, M. (1996). "Full-Length Cdna Sequence of a Progesterone Membrane-Binding Protein from Porcine Vascular Smooth Muscle Cells." Biochemical & Biophysical Research Communications **229**(1): 86-89.
- Falkenstein, E., Tillmann, H. C., Christ, M., Feuring, M. & Wehling, M. (2000). "Multiple actions of steroid hormones - A focus on rapid, nongenomic effects." Pharmacological Reviews **52**(4): 513-555.
- Faure, J. D., Gingerich, D. & Howell, S. H. (1998a). "An *Arabidopsis* Immunophilin, AtFKBP12, Binds to AtFIP37 (FKBP Interacting Protein) In an Interaction That Is Disrupted By FK506." Plant Journal **15**(6): 783-789.
- Faure, J. D., Vittorioso, P., *et al.* (1998b). "The PASTICCINO genes of *Arabidopsis thaliana* are involved in the control of cell division and differentiation." Development **125**(5): 909-918.
- Ferrari, D. M. & Söling, H. D. (1999). "The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds." Biochemical Journal **339**(Pt 1): 1-10.
- Fischer, G. (1994). "Peptidyl-Prolyl *Cis/Trans* Isomerases and Their Effectors." Angewandte Chemie. International Ed. In English **33**(14): 1415-1436.
- Fischer, G., Bang, H., Berger, E. & Schellenberger, A. (1984a). "Conformational specificity of chymotrypsin toward proline-containing substrates." Biochimica et Biophysica Acta **791**(1): 87-97.
- Fischer, G., Bang, H. & Mech, C. (1984b). "Nachweis einer Enzymkatalyse für die *cis-trans*-Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden." Biomedica Biochimica Acta **43**(10): 1101-1111.

- Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T. & Schmid, F. X. (1989). "Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins." Nature **337**(6206): 476-478.
- Fischer, T., Beyermann, M. & Koch, K. W. (2001). "Application of different surface plasmon resonance biosensor chips to monitor the interaction of the CaM-binding site of nitric oxide synthase I and calmodulin." Biochemical and Biophysical Research Communications **285**(2): 463-469.
- Flores-Delgado, G., Bringas, P., Buckley, S., Anderson, K. D. & Warburton, D. (2001). "Nongenomic estrogen action in human lung myofibroblasts." Biochemical and Biophysical Research Communications **283**(3): 661-667.
- Forood, B., Feliciano, E. J. & Nambiar, K. P. (1993). "Stabilization of alpha-helical structures in short peptides via end capping." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(3): 838-842.
- Forster, M. J. (2002). "Molecular modelling in structural biology." Micron **33**(4): 365-384.
- Freedman, R. B., Klappa, P. & Ruddock, L. W. (2002). "Protein disulfide isomerases exploit synergy between catalytic and specific binding domains." EMBO Reports **3**(2): 136-140.
- Freemont, P. S. (2000). "RING for destruction?" Current Biology **10**(2): R84-87.
- Friedrichsen, D. & Chory, J. (2001). "Steroid signaling in plants: from the cell surface to the nucleus." Bioessays **23**(11): 1028-1036.
- Friedrichsen, D. M., Joazeiro, C. A. P., Li, J. M., Hunter, T. & Chory, J. (2000). "Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase." Plant Physiology **123**(4): 1247-1255.
- Frydman, J. (2001). "Folding of newly translated proteins in vivo: The role of molecular chaperones [Review]." Annual Review of Biochemistry **70**: 603-647.
- Fujiyama, S., Yanagida, M., Hayano, T., Miura, Y., Isobe, T. & Takahashi, N. (2002). "Isolation and proteomic characterization of human parvulin-associating periribosomal ribonucleoprotein complexes." Journal of Biological Chemistry: M201181200.
- Fulgosi, H., Vener, A. V., Altschmied, L., Herrmann, R. G. & Andersson, B. (1998). "A Novel Multi-Functional Chloroplast Protein - Identification Of a 40 Kda Immunophilin-Like Protein Located In the Thylakoid Lumen." EMBO Journal **17**(6): 1577-1587.
- Galat, A. (1999). "Variations of sequences and amino acid compositions of proteins that sustain their biological functions: An analysis of the cyclophilin family of proteins." Archives of Biochemistry & Biophysics **371**(2): 149-162.
- Galat, A. (2000). "Sequence diversification of the FK506-binding proteins in several different genomes." European Journal of Biochemistry **267**(16): 4945-4959.
- Galigniana, M. D., Radanyi, C., Renoir, J. M., Housley, P. R. & Pratt, W. B. (2001). "Evidence that the peptidylprolyl isomerase domain of the hsp90-binding immunophilin FKBP52 is involved in both dynein interaction and glucocorticoid receptor movement to the nucleus." Journal of Biological Chemistry **276**(18): 14884-14889.
- Gasser, C. S., Gunning, D. A., Budelier, K. A. & Brown, S. M. (1990). "Structure and expression of cytosolic cyclophilin/peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of higher plants and production of active tomato cyclophilin in *Escherichia coli*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **87**(24): 9519-9523.
- Geisler, M., Kolukisaoglu, U., *et al.* (2001). "TWISTED DWARF1, a unique plasma membrane-anchored immunophilin-like protein, interacts with *Arabidopsis* multidrug resistance-like transporter *AtPGP1*." Journal of Biological Chemistry eingereicht.

- Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989). "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data [published erratum appears in *Anal Biochem* 1990 Sep;189(2):283]." *Analytical Biochemistry* **182**(2): 319-326.
- Goebel, M. & Yanagida, M. (1991). "The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription." *Trends in Biochemical Sciences* **16**(5): 173-177.
- Göthel, S. F. & Marahiel, M. A. (1999). "Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts [Review]." *Cellular and Molecular Life Sciences* **55**(3): 423-436.
- Grebe, M., Gadea, J., *et al.* (2000). "A conserved domain of the *Arabidopsis* GNOM protein mediates subunit interaction and cyclophilin 5 binding." *Plant Cell* **12**(3): 343-356.
- Grove, M. D., Spencer, G. F., *et al.* (1979). "Brassinolide, a Plant Growth-Promoting Steroid Isolated from *Brassica-Napus* Pollen." *Nature* **281**(5728): 216-217.
- Guex, N., Diemand, A. & Peitsch, M. C. (1999). "Protein modelling for all." *Trends in Biochemical Sciences* **24**(9): 364-367.
- Guex, N. & Peitsch, M. C. (1997). "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling." *Electrophoresis* **18**(15): 2714-2723.
- Halestrap, A. P., Connern, C. P., Griffiths, E. J. & P, M. K. (1997). "Cyclosporin A Binding to Mitochondrial Cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury." *Molecular & Cellular Biochemistry* **174**(1-2): 167-172.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Journal of Molecular Biology* **166**(4): 557-580.
- Hanahan, D. (1985). *DNA cloning*. D. M. Glover. Oxford, IRL Press: 109-135.
- Hani, J., Schelbert, B., Bernhardt, A., Domdey, H., Fischer, G., Wiebauer, K. & Rahfeld, J. U. (1999). "Mutations in a peptidylprolyl-*cis/trans*-isomerase gene lead to a defect in 3'-end formation of a pre-mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Biological Chemistry* **274**(1): 108-116.
- Hani, J., Stumpf, G. & Domdey, H. (1995). "PTF1 encodes an essential protein in *Saccharomyces*." *FEBS Letters* **365**(2-3): 198-202.
- Harding, M. W., Galat, A., Uehling, D. E. & Schreiber, S. L. (1989). "A receptor for the immunosuppressant FK506 is a *cis-trans* peptidyl-prolyl isomerase." *Nature* **341**(6244): 758-760.
- Harrar, Y., Bellini, C. & Faure, J. D. (2001). "FKBPs: at the crossroads of folding and transduction." *Trends in Plant Science* **6**(9): 426-431.
- Harrell, J. M., Kurek, I., Breiman, A., Radanyi, C., Renoir, J. M., Pratt, W. B. & Galigniana, M. D. (2002). "All of the protein interactions that link steroid receptor.hsp90.immunophilin heterocomplexes to cytoplasmic dynein are common to plant and animal cells." *Biochemistry* **41**(17): 5581-5587.
- Hartl, F. U. (1996). "Molecular chaperones in cellular protein folding." *Nature* **381**(6583): 571-579.
- Haserath, K., Gerdes, D., *et al.* (1999). "Rapid nongenomic effects of aldosterone in mineralocorticoid- receptor-knockout mice." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **266**(1): 257-261.
- Hayman, G. T. & Miernyk, J. A. (1994). "The nucleotide and deduced amino acid sequences of a peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase from *Arabidopsis thaliana*." *Biochimica et Biophysica Acta* **1219**(2): 536-538.
- He, Z. H., Wang, Z. Y., Li, J. M., Zhu, Q., Lamb, C., Ronald, P. & Chory, J. (2000). "Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1." *Science* **288**(5475): 2360-2363.
- Hemenway, C., Heitman, J. (1993). "Proline Isomerases in Microorganisms and Small Eukaryotes." *Immunosuppressive and Antiinflammatory Drugs* **696**: 38-46.

- Hemmingsen, S. M., Woolford, C., *et al.* (1988). "Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly." Nature **333**(6171): 330-334.
- Hennig, L., Christner, C., *et al.* (1998). "Selective Inactivation of Parvuline-Like Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerases by Juglone." Biochemistry **37**(17): 5953-5960.
- Hernandez, M. P., Chadli, A. & Toft, D. O. (2002). "HSP40 binding is the first step in the HSP90 chaperoning pathway for the progesterone receptor." Journal of Biological Chemistry **277**(14): 11873-11881.
- Heukeshoven, J. & Dernick, R. (1988). "Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels." Electrophoresis **9**(1): 28-32.
- Hofmann, K., Bucher, P. & Kajava, A. V. (1998). "A model of Cdc25 phosphatase catalytic domain and Cdk-interaction surface based on the presence of a rhodanese homology domain." Journal of Molecular Biology **282**(1): 195-208.
- Hubbard, M. J. & Klee, C. B. (1987). "Calmodulin binding by calcineurin. Ligand-induced renaturation of protein immobilized on nitrocellulose." Journal of Biological Chemistry **262**(31): 15062-15070.
- Hueros, G., Rahfeld, J., Salamini, F. & Thompson, R. (1998). "A Maize FK506-Sensitive Immunophilin, mFKBP-66, Is a Peptidylproline *Cis-Trans*-Isomerase That Interacts With Calmodulin and a 36-Kda Cytoplasmic Protein." Planta **205**(1): 121-131.
- Ivery, M. T. G. (2000). "Immunophilins: Switched on protein binding domains?" Medicinal Research Reviews **20**(6): 452-484.
- Jackson, K. & Söll, D. (1999). "Mutations in a new *Arabidopsis* cyclophilin disrupt its interaction with protein phosphatase 2A." Molecular & General Genetics **262**(4-5): 830-838.
- Janowski, B., Wöllner, S., Schutkowski, M. & Fischer, G. (1997). "A Protease-Free Assay For Peptidyl Prolyl *Cis/Trans* Isomerases Using Standard Peptide Substrates." Analytical Biochemistry **252**(2): 299-307.
- Kammerloher, W., Fischer, U., Piechottka, G. P. & Schaffner, A. R. (1994). "Water Channels in the Plant Plasma-Membrane Cloned by Immunoselection from a Mammalian Expression System." Plant Journal **6**(2): 187-199.
- Kay, J. E. (1996). "Structure-function relationships in the FK506-binding protein (FKBP) family of peptidylprolyl *cis-trans* isomerases [Review]." Biochemical Journal **314**(Part 2): 361-385.
- Kieffer, L. J., Seng, T. W., Li, W., Osterman, D. G., Handschumacher, R. E. & Bayney, R. M. (1993). "Cyclophilin-40, a protein with homology to the P59 component of the steroid receptor complex. Cloning of the cDNA and further characterization." Journal of Biological Chemistry **268**(17): 12303-12310.
- Kinoshita, T. & Shimazaki, K. (1999). "Characterization of cytosolic cyclophilin from guard cells of *Vicia faba* L." Plant and Cell Physiology **40**(1): 53-59.
- Koka, C. V., Cerny, R. E., *et al.* (2000). "A putative role for the tomato genes DUMPY and CURL-3 in brassinosteroid biosynthesis and response." Plant Physiology **122**(1): 85-98.
- Kong, H. Y., Lee, S. C. & Hwang, B. K. (2001). "Expression of pepper cyclophilin gene is differentially regulated during the pathogen infection and abiotic stress conditions." Physiological & Molecular Plant Pathology **59**(4): 189-199.
- Kotani, H., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kaneko, T., Miyajima, N. & Tabata, S. (1998). "Structural analysis of *Arabidopsis thaliana* chromosome 5. VI. Sequence features of the regions of 1,367,185 bp covered by 19 physically assigned P1 and TAC clones." DNA Research **5**(3): 203-216.
- Kramer, M. L. & Fischer, G. (1997). "FKBP-Like Catalysis Of Peptidyl-Prolyl Bond Isomerization By Micelles and Membranes." Biopolymers **42**(1): 49-60.

- Krishna, P. & Gloor, G. (2001). "The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*." Cell Stress and Chaperones **6**(3): 238-246.
- Krishna, P., Reddy, R. K., Sacco, M., Frappier, J. R. H. & Felsheim, R. F. (1997). "Analysis of the Native Forms of the 90 Kda Heat Shock Protein (Hsp90) in Plant Cytosolic Extracts." Plant Molecular Biology **33**(3): 457-466.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. (2001). "Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes." Journal of Molecular Biology **305**(3): 567-580.
- Krysan, P. J., Young, J. C. & Sussman, M. R. (1999). "T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*." Plant Cell **11**(12): 2283-2290.
- Krzywicka, A., Beisson, J., Keller, A. M., Cohen, J., Jerka-Dziadosz, M. & Klotz, C. (2001). "KIN241: a gene involved in cell morphogenesis in *Paramecium tetraurelia* reveals a novel protein family of cyclophilin-RNA interacting proteins (CRIPs) conserved from fission yeast to man." Molecular Microbiology **42**(1): 257-267.
- Küllertz, G., Liebau, A., Rücknagel, P., Schierhorn, W., Diettrich, B., Fischer, G. & Luckner, M. (1999). "Stress-induced expression of cyclophilins in proembryonic masses of *Digitalis lanata* does not protect against freezing thawing stress." Planta **208**(4): 599-605.
- Kurek, I., Aviezer, K., Erel, N., Herman, E. & Breiman, A. (1999). "The wheat peptidyl prolyl *cis-trans*-isomerase FKBP77 is heat induced and developmentally regulated." Plant Physiology **119**(2): 693-703.
- Kurek, I., Dulberger, R., Azem, A., Tzvi, B. B., Sudhakar, D., Christou, P. & Breiman, A. (2002). "Deletion of the C-terminal 138 amino acids of the wheat FKBP73 abrogates calmodulin binding, dimerization and male fertility in transgenic rice." Plant Molecular Biology **48**(4): 369-381.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose." Journal of Biochemical and Biophysical Methods **10**(3-4): 203-209.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4." Nature **227**(5259): 680-&.
- Lam, E., Martin, M. & Wiederrecht, G. (1995). "Isolation Of a Cdna Encoding a Novel Human FK506-Binding Protein Homolog Containing Leucine Zipper and Tetratricopeptide Repeat Motifs." Gene **160**(2): 297-302.
- Lamb, J. R., Tugendreich, S. & Hieter, P. (1995). "Tetratricopeptide Repeat Interactions - to Tpr or Not to Tpr." Trends in Biochemical Sciences **20**(7): 257-259.
- Landrieu, I., De Veylder, L., *et al.* (2000a). "The *Arabidopsis thaliana* PIN1At gene encodes a single-domain phosphorylation-dependent peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase." Journal of Biological Chemistry **275**(14): 10577-10581.
- Landrieu, I., Wieruszkeski, J. M., Odaert, B., Inze, D., Grzesiek, S. & Lippens, G. (2000b). "Sequence-specific H-1, C-13 and N-15 chemical shift backbone NMR assignment and secondary structure of the *Arabidopsis thaliana* PIN1At protein." Journal of Biomolecular NMR **17**(3): 271-272.
- Levy, A., Garcia Segura, M., Nevo, Z., David, Y., Shahar, A. & Naftolin, F. (1996). "Action of steroid hormones on growth and differentiation of CNS and spinal cord organotypic cultures." Cellular & Molecular Neurobiology **16**(3): 445-450.
- Li, D. & Roberts, R. (2001). "WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases." Cellular and Molecular Life Sciences **58**(14): 2085-2097.
- Li, J., Lease, K. A., Tax, F. E. & Walker, J. C. (2001a). "BRS1, a serine carboxypeptidase, regulates BRI1 signaling in *Arabidopsis thaliana*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(10): 5916-5921.

- Li, J. M. & Chory, J. (1997). "A Putative Leucine-Rich Repeat Receptor Kinase Involved in Brassinosteroid Signal Transduction." Cell **90**(5): 929-938.
- Li, J. M. & Nam, K. H. (2002). "Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase." Science **295**(5558): 1299-1301.
- Li, J. M., Nam, K. H., Vafeados, D. & Chory, J. (2001b). "BIN2, a new brassinosteroid-insensitive locus in *Arabidopsis*." Plant Physiology **127**(1): 14-22.
- Liang, L., Lim, K. L., Seow, K. T., Ng, C. H. & Pallen, C. J. (2000). "Calmodulin binds to and inhibits the activity of the membrane distal catalytic domain of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha." Journal of Biological Chemistry **275**(39): 30075-30081.
- Liao, D. F., Jin, Z. G., Baas, A. S., Daum, G., Gygi, S. P., Aebersold, R. & Berk, B. C. (2000). "Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells." Journal of Biological Chemistry **275**(1): 189-196.
- Lin, X., Kaul, S., *et al.* (1999). "Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*." Nature **402**(6763): 761-768.
- Lippuner, V., Chou, I. T., Scott, S. V., Ettinger, W. F., Theg, S. M. & Gasser, C. S. (1994). "Cloning and characterization of chloroplast and cytosolic forms of cyclophilin from *Arabidopsis thaliana*." Journal of Biological Chemistry **269**(11): 7863-7868.
- Lorkovic, Z. J. & Barta, A. (2002). "Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant *Arabidopsis thaliana*." Nucleic Acids Research **30**(3): 623-635.
- Lu, K. P., Hanes, S. D. & Hunter, T. (1996). "A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis." Nature **380**(6574): 544-547.
- Lu, P. J., Zhou, X. Z., Shen, M. H. & Lu, K. P. (1999). "Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules." Science **283**(5406): 1325-1328.
- Luan, S. (1998). "Immunophilins in animals and higher plants." Botanical Bulletin of Academia Sinica **39**(4): 217-223.
- Luan, S., Albers, M. W. & Schreiber, S. L. (1994a). "Light-regulated, tissue-specific immunophilins in a higher plant." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(3): 984-988.
- Luan, S., Kudla, J., Gruissem, W. & Schreiber, S. L. (1996). "Molecular Characterization Of a FKBP-Type Immunophilin From Higher Plants." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(14): 6964-6969.
- Luan, S., Lane, W. S. & Schreiber, S. L. (1994b). "pCyP B: a chloroplast-localized, heat shock-responsive cyclophilin from fava bean." Plant Cell **6**(6): 885-892.
- Luan, S., Li, W., Rusnak, F., Assmann, S. M. & Schreiber, S. L. (1993). "Immunosuppressants implicate protein phosphatase regulation of K⁺ channels in guard cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(6): 2202-2206.
- Marivet, J., Frendo, P. & Burkard, G. (1992). "Effects of Abiotic Stresses on Cyclophilin Gene-Expression in Maize and Bean and Sequence-Analysis of Bean Cyclophilin cDNA." Plant Science **84**(2): 171-178.
- Marivet, J., Frendo, P. & Burkard, G. (1995). "DNA Sequence Analysis of a Cyclophilin Gene from Maize - Developmental Expression and Regulation by Salicylic Acid." Molecular & General Genetics **247**(2): 222-228.
- Marivet, J., Margispinheiro, M., Frendo, P. & Burkard, G. (1994). "Bean Cyclophilin Gene Expression During Plant Development and Stress Conditions." Plant Molecular Biology **26**(4): 1181-1189.

- Maruyama, T. & Furutani, M. (2000).** "Archaeal peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases (PPIases)." Frontiers in Bioscience **1**(5): D821-D836.
- Massol, N., Lebeau, M. C., Renoir, J. M., Faber, L. E. & Baulieu, E. E. (1992).** "Rabbit FKBP59-heat shock protein binding immunophilin (HBI) is a calmodulin binding protein." Biochemical and Biophysical Research Communications **187**(3): 1330-1335.
- Mayer, K., Schuller, C., et al. (1999).** "Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana*." Nature **402**(6763): 769-777.
- McCarty, D. R. & Chory, J. (2000).** "Conservation and innovation in plant signaling pathways [Review]." Cell **103**(2): 201-209.
- Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D. & Koornneef, M. (1998).** "*Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis." Science **282**: 662-682.
- Metzner, M., Stoller, G., Rücknagel, K. P., Lu, K. P., Fischer, G., Luckner, M. & Küllertz, G. (2001).** "Functional replacement of the essential ESS1 in yeast by the plant parvulin *D/Par13*." Journal of Biological Chemistry **276**(17): 13524-13529.
- Meyerowitz, E. M. (2002).** "Comparative genomics - Plants compared to animals: The broadest comparative study of development." Science **295**(5559): 1482-1485.
- Mi, H., Kops, O., Zimmermann, E., Jaschke, A. & Tropschug, M. (1996).** "A nuclear RNA-binding cyclophilin in human T cells." FEBS Letters **398**(2-3): 201-205.
- Michnick, S. W., Rosen, M. K., Wandless, T. J., Karplus, M. & Schreiber, S. L. (1991).** "Solution Structure of FKBP, a Rotamase Enzyme and Receptor for FK506 and Rapamycin." Science **252**(5007): 836-839.
- Milioni, D. & Hatzopoulos, P. (1997).** "Genomic Organization Of Hsp90 Gene Family In *Arabidopsis*." Plant Molecular Biology **35**(6): 955-961.
- Millar, A. H., Sweetlove, L. J., Giege, P. & Leaver, C. J. (2001).** "Analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome." Plant Physiology **127**(4): 1711-1727.
- Mondragon, A., Griffith, E. C., Sun, L., Xiong, F., Armstrong, C. & Liu, J. O. (1997).** "Overexpression and Purification Of Human Calcineurin Alpha From *Escherichia coli* and Assessment Of Catalytic Functions Of Residues Surrounding the Binuclear Metal Center." Biochemistry **36**(16): 4934-4942.
- Moorthy, A. K., Gopal, B., Satish, P. R., Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., Murthy, M. R. & Surolia, A. (1999).** "Thermodynamics of target peptide recognition by calmodulin and a calmodulin analogue: implications for the role of the central linker." FEBS Letters **461**(1-2): 19-24.
- Morishima, Y., Kanelakis, K. C., Silverstein, A. M., Dittmar, K. D., Estrada, L. & Pratt, W. B. (2000).** "The Hsp organizer protein Hop enhances the rate of but is not essential for glucocorticoid receptor folding by the multiprotein Hsp90-based chaperone system." Journal of Biological Chemistry **275**(10): 6894-6900.
- Mullineaux, P., Ball, L., Escobar, C., Karpinska, B., Creissen, G. & Karpinski, S. (2000).** "Are diverse signalling pathways integrated in the regulation of *Arabidopsis* antioxidant defence gene expression in response to excess excitation energy?" Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences **355**(1402): 1531-1540.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987).** "Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods in Enzymology **155**: 335-350.
- Munck, A., Mosher, K. M., Wira, C., Young, D. A., Bell, P. A. & Hallahan, C. (1972).** "Glucocorticoid-Receptor Complexes and Earliest Steps in Action of Glucocorticoids on Thymus-Cells." Journal of Steroid Biochemistry **3**(3): 567-&.
- Murray, M. G. & Thompson, W. F. (1980).** "Rapid isolation of high molecular weight plant DNA." Nucleic Acids Research **8**(19): 4321-4325.

- Müssig, C. & Altmann, T. (1999). "Physiology and molecular mode of action of brassinosteroids." Plant Physiology & Biochemistry **37**(5): 363-372.
- Müssig, C. & Altmann, T. (2001). "Brassinosteroid signaling in plants." Trends in Endocrinology and Metabolism **12**(9): 398-402.
- Nair, S., Rimerman, R., Toran, E., Chen, S., Prapapanich, V., Butts, R. & Smith, D. (1997). "Molecular cloning of human FKBP51 and comparisons of immunophilin interactions with Hsp90 and progesterone receptor." Molecular and Cellular Biology **17**(2): 594-603.
- Nakamura, T., Yabe, D., Kanazawa, N., Tashiro, K., Sasayama, S. & Honjo, T. (1998). "Molecular Cloning, Characterization, and Chromosomal Localization Of FKBP23, a Novel FK506-Binding Protein With Ca²⁺-Binding Ability." Genomics **54**(1): 89-98.
- Neff, D. & Dencher, N. A. (1999). "Purification of multisubunit membrane protein complexes: isolation of chloroplast FoF1-ATP synthase, Cfo and CF1 by blue native electrophoresis." Biochemical and Biophysical Research Communications **259**(3): 569-575.
- Nelson, M. T. & Herrera, G. M. (2002). "Molecular physiology: protecting the heart." Nature **416**(6878): 273-274.
- Neumann, D., zur Nieden, U., Manteuffel, R., Walter, G., Scharf, K. D. & Nover, L. (1987). "Intracellular-Localization of Heat-Shock Proteins in Tomato Cell-Cultures." European Journal of Cell Biology **43**(1): 71-81.
- Niccoli, A., Basso, E., Petronilli, V., Wenger, R. M. & Bernardi, P. (1996). "Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, and cyclosporin A-sensitive channel." Journal of Biological Chemistry **271**(4): 2185-2192.
- Noguchi, T., Fujioka, S., *et al.* (1999). "Brassinosteroid-insensitive dwarf mutants of *Arabidopsis* accumulate brassinosteroids." Plant Physiology **121**(3): 743-752.
- Nomura, T., Nakayama, M., Reid, J. B., Takeuchi, Y. & Yokota, T. (1997). "Blockage of Brassinosteroid Biosynthesis and Sensitivity Causes Dwarfism in Garden Pea." Plant Physiology **113**(1): 31-37.
- Nuc, K., Nuc, P. & Slomski, R. (2001). "Yellow lupine cyclophilin transcripts are highly accumulated in the nodule meristem zone." Molecular Plant-Microbe Interactions **14**(12): 1384-1394.
- O'Neil, K. T. & DeGrado, W. F. (1990). "How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic alpha-helices." Trends in Biochemical Sciences **15**(2): 59-64.
- Oh, M. H., Ray, W. K., Huber, S. C., Asara, J. M., Gage, D. A. & Clouse, S. D. (2000). "Recombinant brassinosteroid insensitive 1 receptor-like kinase autophosphorylates on serine and threonine residues and phosphorylates a conserved peptide motif in vitro." Plant Physiology **124**(2): 751-765.
- Owens-Grillo, J. K., Czar, M. J., Hutchison, K. A., Hoffman, K., Perdew, G. H. & Pratt, W. B. (1996a). "A Model of Protein Targeting Mediated by Immunophilins and Other Proteins That Bind to Hsp90 Via Tetratricopeptide Repeat Domains." Journal of Biological Chemistry **271**(23): 13468-13475.
- Owens-Grillo, J. K., Stancato, L. F., Hoffmann, K., Pratt, W. B. & Krishna, P. (1996b). "Binding Of Immunophilins to the 90 Kda Heat Shock Protein (Hsp90) Via a Tetratricopeptide Repeat Domain Is a Conserved Protein Interaction In Plants." Biochemistry **35**(48): 15249-15255.
- Page, D. R. & Grossniklaus, L. (2002). "The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*." Nature Reviews Genetics **3**(2): 124-136.
- Pearl, L. H. & Prodromou, C. (2000). "Structure and *in vivo* function of Hsp90 [Review]." Current Opinion in Structural Biology **10**(1): 46-51.
- Peattie, D. A., Harding, M. W., Fleming, M. A., DeCenzo, M. T., Lippke, J. A., Livingston, D. J. & Benasutti, M. (1992). "Expression and characterization of human FKBP52, an immunophilin that associates with the 90-kDa heat shock protein and is a component of steroid receptor complexes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America **89**(22): 10974-10978.

- Pedersen, K. M., Finsen, B., Celis, J. E. & Jensen, N. A. (1999).** "muFKBP38: a novel murine immunophilin homolog differentially expressed in Schwannoma cells and central nervous system neurons *in vivo*." Electrophoresis **20**(2): 249-255.
- Peitsch, M. C. (1996).** "ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling." Biochemical Society Transactions **24**(1): 274-279.
- Peltier, J. B., Emanuelsson, O., et al. (2002).** "Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction." Plant Cell **14**(1): 211-236.
- Perez-Perez, J. M., Ponce, M. R. & Micol, J. L. (2001a).** "Mutations in the ULTRACURVATA2 gene of *Arabidopsis thaliana*, which encodes a FKBP-like protein, cause dwarfism, leaf epinasty and helical rotation of several organs." International Journal of Developmental Biology **45**(Suppl 1): S49-S50.
- Perez-Perez, J. M., Ponce, M. R. & Micol, J. L. (2001b).** "ULTRACURVATA1, a SHAGGY-like *Arabidopsis* gene required for cell elongation." International Journal of Developmental Biology **45**(Suppl 1): S51-S52.
- Perez-Perez, J. M., Ponce, M. R. & Micol, J. L. (2002).** "The UCU1 *Arabidopsis* gene encodes a SHAGGY/GSK3-like kinase required for cell expansion along the proximodistal axis." Developmental Biology **242**(2): 161-173.
- Pierce, M. M., Raman, C. S. & Nall, B. T. (1999).** "Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions." Methods-a Companion to Methods in Enzymology **19**(2): 213-221.
- Pirkkl, F. & Buchner, J. (2001).** "Functional analysis of the Hsp90-associated human peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases FKBP51, FKBP52 and Cyp40." Journal of Molecular Biology **308**(4): 795-806.
- Pirkkl, F., Fischer, E., Modrow, S. & Buchner, J. (2001).** "Localization of the chaperone domain of FKBP52." Journal of Biological Chemistry **276**(40): 37034-37041.
- Pratt, W. B. (1998).** "The Hsp90-based chaperone system - Involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors [Review]." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine **217**(4): 420-434.
- Pratt, W. B., Krishna, P. & Olsen, L. J. (2001).** "Hsp90-binding immunophilins in plants: the protein movers." Trends in Plant Science **6**(2): 54-58.
- Pratt, W. B., Silverstein, A. M. & Galigniana, M. D. (1999).** "A model for the cytoplasmic trafficking of signalling proteins involving the hsp90-binding immunophilins and p50(cdc37) [Review]." Cellular Signalling **11**(12): 839-851.
- Pratt, W. B. & Toft, D. O. (1997).** "Steroid Receptor Interactions with Heat Shock Protein and Immunophilin Chaperones." Endocrine Reviews **18**(3): 306-360.
- Rahfeld, J. U., Rücknagel, K. P., Schelbert, B., Ludwig, B., Hacker, J., Mann, K. & Fischer, G. (1994).** "Confirmation of the Existence of a 3rd Family among Peptidyl-Prolyl *Cis/Trans* Isomerases - Amino-Acid-Sequence and Recombinant Production of Parvulin." FEBS Letters **352**(2): 180-184.
- Ranganathan, R., Lu, K. P., Hunter, T. & Noel, J. P. (1997).** "Structural and Functional Analysis of the Mitotic Rotamase Pin1 Suggests Substrate Recognition Is Phosphorylation Dependent." Cell **89**(6): 875-886.
- Ratajczak, T., Carrello, A., Mark, P. J., Warner, B. J., Simpson, R. J., Moritz, R. L. & House, A. K. (1993).** "The cyclophilin component of the unactivated estrogen receptor contains a tetratricopeptide repeat domain and shares identity with p59 (FKBP59)." Journal of Biological Chemistry **268**(18): 13187-13192.
- Reddy, A. S. N. (2001).** "Nuclear pre-mRNA splicing in plants." Critical Reviews in Plant Sciences **20**(6): 523-571.
- Reddy, R. K., Kurek, I., Silverstein, A. M., Chinkers, M., Breiman, A. & Krishna, P. (1998).** "High-molecular-weight FK506-binding proteins are components of heat-shock protein 90 heterocomplexes in wheat germ lysate." Plant Physiology **118**(4): 1395-1401.

- Richter, K. & Buchner, J. (2001). "Hsp90: Chaperoning signal transduction." Journal of Cellular Physiology **188**(3): 281-290.
- Richter, K., Muschler, P., Hainzl, O. & Buchner, J. (2001). "Coordinated ATP Hydrolysis by the Hsp90 Dimer." Journal of Biological Chemistry **276**(36): 33689-33696.
- Rousseau, G. G. (1984). "Control of Gene-Expression by Glucocorticoid Hormones." Biochemical Journal **224**(1): 1-12.
- Russell, K. S., Haynes, M. P., Sinha, D., Clerisme, E. & Bender, J. R. (2000). "Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(11): 5930-5935.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., *et al.* (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-491.
- Saito, T., Ishiguro, S., Ashida, H., Kawamukai, M., Matsuda, H., Ochiai, H. & Nakagawa, T. (1995). "Cloning and sequence analysis of genes for cyclophilin from *Arabidopsis thaliana*." Plant & Cell Physiology **36**(2): 377-382.
- Saito, T., Niwa, Y., Ashida, H., Tanaka, K., Kawamukai, M., Matsuda, H. & Nakagawa, T. (1999a). "Expression of a gene for cyclophilin which contains an amino-terminal endoplasmic reticulum-targeting signal." Plant & Cell Physiology **40**(1): 77-87.
- Saito, T., Tadakuma, K., *et al.* (1999b). "Two cytosolic cyclophilin genes of *Arabidopsis thaliana* differently regulated in temporal- and organ-specific expression." Bioscience Biotechnology and Biochemistry **63**(4): 632-637.
- Salanoubat, M., Lemcke, K., *et al.* (2000). "Sequence and analysis of chromosome 3 of the plant *Arabidopsis thaliana*." Nature **408**(6814): 820-822.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor.
- Santos, A. N., Korber, S., Küllertz, G., Fischer, G. & Fischer, B. (2000). "Oxygen stress increases prolyl *cis/trans* isomerase activity and expression of cyclophilin 18 in rabbit blastocysts." Biology of Reproduction **62**(1): 1-7.
- Schagger, H. & von Jagow, G. (1991). "Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form." Analytical Biochemistry **199**(2): 223-231.
- Scheufler, C., Brinker, A., *et al.* (2000). "Structure of TPR domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine." Cell **101**(2): 199-210.
- Schiene, C. & Fischer, G. (2000). "Enzymes that catalyse the restructuring of proteins [Review]." Current Opinion in Structural Biology **10**(1): 40-45.
- Schiene-Fischer, C. & Yu, C. (2001). "Receptor accessory folding helper enzymes: the functional role of peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases [Review]." FEBS Letters **495**(1-2): 1-6.
- Schmid, F. X. (1993). "Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions." Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure **22**: 123-142.
- Schmid, F. X., Frech, C., Scholz, C. & Walter, S. (1996). "Catalyzed and assisted protein folding of ribonuclease T1." Biological Chemistry **377**(7-8): 417-424.
- Schmidt, B. M. W., Gerdes, D., Feuring, M., Falkenstein, E., Christ, M. & Wehling, M. (2000). "Rapid, nongenomic steroid actions: A new age? [Review]." Frontiers in Neuroendocrinology **21**(1): 57-94.
- Schubert, M., Petersson, U. A., Haas, B. J., Funk, C., Schröder, W. P. & Kieselbach, T. (2002). "Proteome Map of the Chloroplast Lumen of *Arabidopsis thaliana*." Journal of Biological Chemistry **277**(10): 8354-8365.

- Schultz, J., Copley, R. R., Doerks, T., Ponting, C. P. & Bork, P. (2000). "SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains." Nucleic Acids Research **28**(1): 231-234.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C. P. (1998). "SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(11): 5857-5864.
- Schulz, B., Saal, B., Wanke, D., Lafos, M., Kolukisaoglu, U., Dilkes, B. P. & Feldmann, K. A. (2001). "The *Arabidopsis TWISTED DWARF1 (TWD1)* gene encodes an immunophilin-like (FKBP) protein required for brassinosteroid signaling." Plant Cell eingereicht.
- Schuster, T. M. & Toedt, J. M. (1996). "New revolutions in the evolution of analytical ultracentrifugation." Current Opinion in Structural Biology **6**(5): 650-658.
- Sekerina, E., Rahfeld, J. U., Müller, J., Fanghänel, J., Rascher, C., Fischer, G. & Bayer, P. (2000). "NMR solution structure of hPar14 reveals similarity to the peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase domain of the mitotic regulator hPin1 but indicates a different functionality of the protein." Journal of Molecular Biology **301**(4): 1003-1017.
- Shadidy, M., Caubit, X., Olsen, R., Seternes, O. M., Moens, U. & Krauss, S. (1999). "Biochemical analysis of mouse FKBP60, a novel member of the FKBP family." Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure & Expression **1446**(3): 295-307.
- Shamoo, Y., Abdul-Manan, N. & Williams, K. R. (1995). "Multiple RNA binding domains (RBDs) just don't add up." Nucleic Acids Research **23**(5): 725-728.
- Sharma, A., Matsuoka, M., Tanaka, H. & Komatsu, S. (2001). "Antisense inhibition of a BRI1 receptor reveals additional protein kinase signaling components downstream to the perception of brassinosteroids in rice." FEBS Letters **507**(3): 346-350.
- Sheldon, P. S. & Venis, M. A. (1996). "Purification and characterization of cytosolic and microsomal cyclophilins from maize (*Zea mays*)." Biochemical Journal **315**(Pt 3): 965-970.
- Shou, W. N., Aghdasi, B., *et al.* (1998). "Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12." Nature **391**(6666): 489-492.
- Siekierka, J. J., Hung, S. H., Poe, M., Lin, C. S. & Sigal, N. H. (1989). "A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin." Nature **341**(6244): 755-757.
- Silverstein, A. M., Galigniana, M. D., Chen, M.-S., Owens-Grillo, J. K., Chinkers, M. & Pratt, W. B. (1997). "Protein Phosphatase 5 Is a Major Component of Glucocorticoid Receptor-hsp90 Complexes with Properties of an FK506-binding Immunophilin." Journal of Biological Chemistry **272**(26): 16224-16230.
- Silverstein, A. M., Galigniana, M. D., Kanelakis, K. C., Radanyi, C., Renoir, J. M. & Pratt, W. B. (1999). "Different regions of the immunophilin FKBP52 determine its association with the glucocorticoid receptor, hsp90, and cytoplasmic dynein." Journal of Biological Chemistry **274**(52): 36980-36986.
- Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K. & Neer, E. J. (1999). "The WD repeat: a common architecture for diverse functions [Review]." Trends in Biochemical Sciences **24**(5): 181-185.
- Song, Q., Alnemri, E. S., Litwack, G. & Gilbert, L. I. (1997). "An immunophilin is a component of the insect ecdysone receptor (EcR) complex." Insect Biochemistry and Molecular Biology **27**(11): 973-982.
- Southern, E. M. (1974). "An improved method for transferring nucleotides from electrophoresis strips to thin layers of ion-exchange cellulose." Analytical Biochemistry **62**(1): 317-318.
- Spach, C. & Streeten, D. H. (1964). "Retardation of Sodium Exchange in Dog Erythrocytes by Physiological Concentrations of Aldosterone in Vitro." Journal of Clinical Investigation **43**(2): 217-&.

- Stancato, L. F., Hutchison, K. A., Krishna, P. & Pratt, W. B. (1996).** "Animal and Plant Cell Lysates Share a Conserved Chaperone System That Assembles the Glucocorticoid Receptor into a Functional Heterocomplex with Hsp90." Biochemistry **35**(2): 554-561.
- Tabata, S., Kaneko, T., et al. (2000).** "Sequence and analysis of chromosome 5 of the plant *Arabidopsis thaliana*." Nature **408**(6814): 823-826.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000).** "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*." Nature **408**(6814): 796-815.
- Theologis, A., Ecker, J. R., et al. (2000).** "Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*." Nature **408**(6814): 816-820.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994).** "Clustal W - Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice." Nucleic Acids Research **22**(22): 4673-4680.
- Timerman, A. P., Wiederrecht, G., Marcy, A. & Fleischer, S. (1995).** "Characterization of an exchange reaction between soluble FKBP-12 and the FKBP.ryanodine receptor complex. Modulation by FKBP mutants deficient in peptidyl-prolyl isomerase activity." Journal of Biological Chemistry **270**(6): 2451-2459.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979).** "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **76**(9): 4350-4354.
- Tradler, T., Stoller, G., Rücknagel, K. P., Schierhorn, A., Rahfeld, J.-U. & Fischer, G. (1997).** "Comparative mutational analysis of peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases: active sites of *Escherichia coli* trigger factor and human FKBP12." FEBS Letters **407**(2): 184-190.
- Uchida, T., Fujimori, F., Tradler, T., Fischer, G. & Rahfeld, J. U. (1999).** "Identification and characterization of a 14 kDa human protein as a novel parvulin-like peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase." FEBS Letters **446**(2-3): 278-282.
- Van Duyn, G. D., Standaert, R. F., Karplus, P. A., Schreiber, S. L. & Clardy, J. (1991).** "Atomic structure of FKBP-FK506, an immunophilin-immunosuppressant complex." Science **252**(5007): 839-842.
- Vener, A. V. (2001).** "Peptidyl-prolyl isomerases and regulation of photosynthetic functions." Regulation Of Photosynthesis **11**: 177-193.
- Vener, A. V., Rokka, A., Fulgosi, H., Andersson, B. & Herrmann, R. G. (1999).** "A cyclophilin-regulated PP2A-like protein phosphatase in thylakoid membranes of plant chloroplasts." Biochemistry **38**(45): 14955-14965.
- Venter, J. C., Adams, M. D., et al. (2001).** "The sequence of the human genome." Science **291**(5507): 1304-+.
- Vittorioso, P., Cowling, R., Faure, J. D., Caboche, M. & Bellini, C. (1998).** "Mutation In the *Arabidopsis* Pasticcino1 Gene, Which Encodes a New FK506-Binding Protein-Like Protein, Has a Dramatic Effect On Plant Development." Molecular and Cellular Biology **18**(5): 3034-3043.
- Vucich, V. A. & Gasser, C. S. (1996).** "Novel Structure Of a High Molecular Weight FK506 Binding Protein From *Arabidopsis thaliana*." Molecular and General Genetics **252**(5): 510-517.
- Walker, J. M. (1994).** "The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation." Methods in Molecular Biology **32**: 5-8.
- Wang, Z. Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S. & Chory, J. (2001).** "BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids." Nature **410**(6826): 380-383.
- Wilson, K. P., Yamashita, M. M., et al. (1995).** "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 Crystallographica Section D-Biological Crystallography **51**: 511-521.

- Xin, H. B., Senbonmatsu, T., et al. (2002).** "Oestrogen protects FKBP12.6 null mice from cardiac hypertrophy." Nature **416**(6878): 334-338.
- Xu, Q., Liang, S. P., Kudla, J. & Luan, S. (1998).** "Molecular Characterization Of a Plant FKBP12 That Does Not Mediate Action Of FK506 and Rapamycin." Plant Journal **15**(4): 511-519.
- Yaffe, M. B., Schutkowski, M., et al. (1997).** "Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. [see comments]." Science **278**(5345): 1957-1960.
- Yamamuro, C., Ihara, Y., et al. (2000).** "Loss of function of a rice brassinosteroid insensitive1 homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint." Plant Cell **12**(9): 1591-1605.
- Yao, J. L., Kops, O., Lu, P. J. & Lu, K. P. (2001).** "Functional conservation of phosphorylation-specific prolyl isomerases in plants." Journal of Biological Chemistry **276**(17): 13517-13523.
- Yin, Y. H., Wang, Z. Y., Mora-Garcia, S., Li, J. M., Yoshida, S., Asami, T. & Chory, J. (2002).** "BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation." Cell **109**(2): 181-191.
- Young, J. C., Obermann, W. M. J. & Hartl, F. U. (1998).** "Specific Binding Of Tetratricopeptide Repeat Proteins to the C-Terminal 12-kDa Domain Of Hsp90." Journal of Biological Chemistry **273**(29): 18007-18010.
- Zarnt, T., Tradler, T., Stoller, G., Scholz, C., Schmid, F. X. & Fischer, G. (1997).** "Modular structure of the trigger factor required for high activity in protein folding." Journal of Molecular Biology **271**(5): 827-837.

8 Abkürzungsverzeichnis

Ac-	Acetyl-
AGI	engl.: <i>Arabidopsis genome initiative</i> = <i>Arabidopsis</i> Genom Initiative
Aminosäuren:	Standardabkürzungen (Ein- oder Dreibuchstabencode)
BES1	BRI1-EMS-Suppressor 1
BHT	butyl-Hydroxytoluol
BIN2	engl.: <i>BR-insensitive 2</i>
BL	Brassinolid
bp (kb, Mb)	Basenpaare (Kilobasenpaare, Megabasenpaare)
BRI1	engl.: <i>Brassinolide insensitive 1</i>
CaM	Calmodulin
CD	Circulardichroismus
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1propansulfonat)
Chr.	Chromosom
Cyp	Cyclophilin
Da (kDa)	Dalton (Kilodalton)
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidphosphat
DTSSP	3,3'-Dithiobis(sulfosuccinimidylpropionat)
DTT	1,4-Dithiothreitol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FKBP	FK506-bindendes Protein
GR	Glucorticoid-Rezeptor
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hemagglutinin-Epitop
Hsp	engl.: <i>heat shock protein</i> = Hitzeschockprotein
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITC	engl.: <i>Isothermal titration calorimetry</i> = Isothermale-Titrationskalorimetrie

K _D	Dissoziationskonstante
K _i	Inhibitionskonstante
LRR	engl.: <i>Leucine-Rich-Repeat</i> = Leucin-reiche Wiederholungen
MA	Membrananker
MM	molekulare Masse
NCBI	engl.: <i>National Center for Biotechnology Information</i>
OD _{600nm}	Optische Dichte (gemessen bei 600 nm)
ÖR	Östrogen-Rezeptor
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Par	Parvulin
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i> = Polymerasekettenreaktion
PDI	Proteindisulfidisomerase
PEG	Polyethylenglycol
PM	Plasmamembran / Zellmembran
pNA	para-Nitroanilid
POD	Meerrettich-Peroxidase
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
PR	Progesteron-Rezeptor
PVP	Polyvinylpyrrolidon
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHR	Steroidhormonrezeptor
Suc-	Succinyl-
TPR	engl.: <i>tetratricopeptide repeat</i> = Tetratrikopeptidwiederholung
TWD	engl.: <i>twisted dwarf</i> = 'gedrehter Zwerg'
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: (vorherige Seite) Pflanzen von <i>Arabidopsis</i> Wildtyp und <i>twd1</i> -Mutante.	3
Abbildung 2: Strukturformeln von Cholesterin und Brassinolid.	10
Abbildung 3: Schematischer Aufbau der BRI1-Rezeptoren aus <i>Arabidopsis</i> und Reis.	13
Abbildung 4: Identifikation der T-DNA-Insertionslinien durch Autoradiographie. <i>AtFKBP65</i> , <i>AtHsp90</i> , <i>AtFKBP12</i> .	47
Abbildung 5: CD-Spektren von <i>AtFKBP12</i> .	50
Abbildung 6: Sequenzvergleich von <i>AtFKBP12</i> und <i>hFKBP12</i> .	51
Abbildung 7: CD-Spektrum von <i>AtPar15</i> .	54
Abbildung 8: Sequenzvergleich von <i>hFKBP12</i> , <i>AtFKBP42</i> , <i>hFKBP38</i> , <i>DmFKBP45</i> und <i>hFKBP52</i> (beginnend mit der zweiten PPIase-Domäne, AS 145).	56
Abbildung 9: Domänenaufbau von <i>AtFKBP42</i> und den identifizierten Homologen.	57
Abbildung 10: Strukturen von <i>hFKBP12</i> (A) [Wilson <i>et al.</i> , 1995] und den modellierten FKBP Domänen von <i>AtFKBP42</i> (B), <i>DmFKBP45</i> (C) und <i>hFKBP38</i> (D).	59
Abbildung 11: SDS-PAGE (Coomassie-Färbung) der gereinigten Proteine.	62
Abbildung 12: CD-Spektren von <i>AtFKBP42</i> ¹⁻¹⁸⁰ und <i>AtFKBP42</i> ¹⁻³³⁹ .	64
Abbildung 13: HA- <i>AtFKBP42</i> ist nicht glykosyliert.	67
Abbildung 14: Effekte von <i>AtFKBP42</i> auf die Aggregation von CS.	68
Abbildung 15: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von HA- <i>AtFKBP42</i> Überexpressionspflanzen und Wildtyp <i>Arabidopsis</i> .	69
Abbildung 16: Nachweis von HA- <i>AtFKBP42</i> in Membranpräparationen.	70
Abbildung 17: Analytische Ultrazentrifugation von <i>AtFKBP42</i> ¹⁻³³⁹ .	71
Abbildung 18: Interaktion von <i>AtFKBP42</i> mit CaM.	72
Abbildung 19: Analytische Gelfiltration von <i>AtFKBP42</i> ¹⁻³³⁹ und <i>AtHsp90.1</i> ⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰ .	73
Abbildung 20: Isothermale-Titrationskalorimetrie von <i>AtFKBP42</i> ¹⁻³³⁹ und <i>AtHsp90.1</i> ⁵⁵⁹⁻⁷⁰⁰ .	74
Abbildung 21: Sequenzvergleich von <i>hFKBP12</i> mit den FKBP-Domänen von <i>AtFKBP62</i> , <i>AtFKBP65</i> , <i>TaFKBP72</i> und <i>TaFKBP77</i> .	80

Tabellen:

Tabelle 1: Übersicht der publizierten PPIase-Aktivitäten von Pflanzen-Cyclophilinen.	7
Tabelle 2: Übersicht der publizierten PPIase-Aktivitäten von Pflanzen-FKBP.	9
Tabelle 3: Übersicht der publizierten PPIase-Aktivitäten von Pflanzen-Parvulinen.	10
Tabelle 4: Aufstellung der Cyclophiline aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .	38
Tabelle 5: Aufstellung aller beschriebenen und neu identifizierten FKBP aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .	41
Tabelle 6: Aufstellung aller beschriebenen und neu identifizierten Parvuline aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .	44
Tabelle 7: Identifikation von T-DNA-Insertionslinien in <i>AtFKBP12</i> , <i>AtFKBP65</i> und <i>AtHsp90.2</i> .	45
Tabelle 8: Bedingungen für die Klonierung der erzeugten Expressionsklone.	48
Tabelle 9: Übersicht der im proteasegekoppelten Test bestimmten PPIase-Aktivitäten.	52

10 Anhang

Internetadressen:

CDNN	http://bioinformatic.biochemtech.uni-halle.de/cdnn (Auswertung von CD-Spektren)
Expasy:	http://www.expasy.ch (Sammlung nützlicher Programme)
ClustalW:	http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/ (Sequenzalignment)
ProtParam:	http://www.expasy.ch/tools/protparam.html (Berechnung von MM und Extinktionskoeffizienten einer Aminosäuresequenz)
SwissModel:	http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html (Modellierung von Protein-Strukturen)
SwissProt:	http://www.expasy.ch/sprot (Proteindatenbank)
InterPro:	http://www.ebi.ac.uk/interpro/ (Protein-Domänendatenbank)
Proteom Analyse:	http://www.ebi.ac.uk/teome/ (Proteom-Datenbank)
Kazusa (<i>Arabidopsis</i> DB)	http://www.kazusa.or.jp/en/plant (<i>Arabidopsis</i> Genomprojekt; Kazusa DNA research institute)
MIPS (<i>Arabidopsis</i> DB)	http://www.mips.biochem.mpg.de/proj/thal/
NASC:	http://nasc.nott.ac.uk (Nottingham <i>Arabidopsis</i> Stock Centre)
NCBI:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
BLAST:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ (Sequenzalignment)
Entrez:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez (verschiedene Datenbanken)
Oligo Properties Calculator:	http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html (Primerdesign)
PSORT:	http://psort.nibb.ac.jp/form.html (subzelluläre Lokalisationsvorhersage)
RCSB:	http://www.rcsb.org/pdb/ (Datenbank für Proteinstrukturen)
SMART:	http://smart.embl-heidelberg.de (Domänenanalyse einer Aminosäuresequenz)
TargetP	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/ (subzelluläre Lokalisationsvorhersage)
TAIR	http://www.arabidopsis.org (The <i>Arabidopsis</i> Information Resource)
TMHMM2	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0 (Vorhersage transmembraner Bereiche)
TMpred	http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html (Vorhersage transmembraner Bereiche)
WebCutter:	http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html (Restriktionsendonukleasenanalyse)

Danksagung

Prof. Dr. Gunter Fischer danke ich für die Überlassung dieses spannenden und vielfältigen Themas, das mir viele neue Einblicke in die Wissenschaft vermittelt hat. Weiterhin möchte ich mich für das gezeigte Interesse am Fortschritt der Arbeit bedanken.

Dr. Jens-U. Rahfeld gilt mein besonderer Dank. Er war jederzeit zu einer motivierenden Diskussion bereit und konnte durch seine Erfahrung bei vielen Problemen, besonders im Bereich der Proteinreinigung und -charakterisierung, Unterstützung und praktische Ratschläge geben.

Der *Arbeitsgruppe* von *Dr. Burkhard Schulz* und ihm persönlich gilt mein Dank für die maßgebliche Unterstützung bei der Identifikation neuer T-DNA-Insertionslinien und die zahlreichen Tipps und Diskussionen über Pflanzensteroid.

Die elektronenmikroskopischen Fotos zur Lokalisation wurden von *Dr. Dieter Neumann* aufgenommen. Ich danke ihm für diese Hilfe und die zur Verfügung gestellten Fotos.

Dr. Hauke Lilie danke ich für die Durchführung der analytischen Ultrazentrifugation.

Allen früheren und heutigen *Mitarbeitern* der Forschungsstelle danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die wissenschaftlichen Diskussionen. Besonders zu erwähnen sind:

Jörg Fanghänel für die durchgeführten ITC-Messungen und seine vielen hilfreichen und besonders kritischen Diskussionen,

Dr. Birte Hernandez-Alvarez für ihre Unterstützung und vielen nützlichen Tipps,

Matthias Weiwad, der eine Hilfe bei den begonnenen Versuchen zur Phosphorylierung von Plasmamembranen und *AtFKBP42* war und das gereinigte Calcineurin zur Verfügung stellte,

Dr. Peter Rücknagel und *Dr. Angelika Schierhorn* für die HPLC-Läufe, die Sequenzierung der Proteine und die Aufnahme der Massenspektren.

Frank Edlich und *Stephan Wawra* danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei den Untersuchungen zu *AtFKBP12*.

Frau Klemens, *Frau Gersching* und *Frau Patzer* gilt ein besonderer Dank. Sie waren durch ihre praktischen Hilfen eine große Unterstützung.

Meiner *FAMILIE* und meinen *Eltern* danke ich für die fortwährende Unterstützung und die Nachsicht, wenn ich wieder einmal im Labor oder Arbeitszimmer verschwunden war.

Publikationen

Kamphausen, T., Fanghänel, J., Neumann, D., Schulz, B. & Rahfeld, J.-U. (2002). "Characterisation of *Arabidopsis thaliana* AtFKBP42 that is membrane bound and interacts with Hsp90." Plant Journal **angenommen**.

Cavarec, L., T. Kamphausen, et al. (2002). "Identification and Characterization of Moca-cyp. A *Drosophila melanogaster* Nuclear Cyclophilin." *Journal of Biological Chemistry* 277(43): 41171-41182.

Lebenslauf

Name: Kamphausen
Vorname: Thilo
Geburtsdatum: 31. Oktober 1972
Geburtsort: Essen, Nordrhein-Westfalen
Nationalität: Deutsch
Familienstand: Verheiratet, 1 Kind

Schulbildung:

1980 – 1983 Evangelische Grundschule am Broich, Bergisch Gladbach
1983 – 1984 Nicolaus-Cusanus-Gymnasium, Bergisch Gladbach
1984 – 1990 Ricarda-Huch-Gymnasium, Krefeld
1990 – 1992 Gymnasium Hammonense, Hamm

Zivildienst:

1992 – 1993 Evangelisches Krankenhaus, Hamm

Studium:

1993 – 1998 Biochemiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1997 – 1998 Anfertigung der Diplomarbeit in der Max-Planck-Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ mit dem Thema: „Untersuchungen zu den Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen PTF1 und Pin1“

1998 – 2000 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Max-Planck-Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ in Halle, Leiter: Prof. Dr. G. Fischer
Seit 2001 Angestellter der BioService Halle GmbH
1998 – 2002 Dissertation unter der Anleitung von Prof. Dr. G. Fischer
Thema: „Charakterisierung von *AtFKBP42* und weiteren Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen aus *Arabidopsis thaliana*“

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde. Ich versichere weiterhin, dass alle wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet sind.

Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität vorgelegt.

Halle / Saale, im Juni 2002

Thilo Kamphausen