

Untersuchungen zu Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen –
Interaktionen mit Zielproteinen und Inhibitoren

DISSERTATION

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät I
– Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt von

Herrn MICHAEL GEORG SCHUMANN
geboren am 03.12.1981 in Rodewisch

Gutachter:

1. Prof. Dr. GUNTER FISCHER
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie Göttingen, BO Halle (Saale)
2. Prof. Dr. MIKE SCHUTKOWSKI
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
3. Prof. Dr. REINHARD BAUER
Friedrich-Schiller-Universität Jena

Tag der Verteidigung: 26.10.2015

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerisierung	1
1.2 Cyclosporin A und die Bedeutung extrazellulärer Cyclophiline	2
1.3 Die Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase Pin1	5
1.3.1 Die WW-Domäne von Pin1	5
1.3.2 Die PPIase-Domäne von Pin1	6
1.3.3 Interaktionen zellzyklusrelevanter Proteine mit Pin1	8
1.3.4 Inhibitoren von Pin1	10
1.4 Der MCM2-7-Komplex und die Bedeutung des <i>DNA replication licensing factor</i> MCM3	13
1.5 Ziele der Arbeit	15
2 MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Chemikalien, Peptide, Peptidderivate, Proteine, Inhibitoren, Oligonukleotide, Vektoren und Antikörper	16
2.1.1 Chemikalien	16
2.1.2 Peptide, Peptidderivate, Proteine und Inhibitoren	17
2.1.3 Oligonukleotide und Vektoren	17
2.1.4 Antikörper	20
2.2 Molekularbiologische Methoden	20
2.2.1 Plasmid-Präparation	20
2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion	21
2.2.3 Agarosegel-Elektrophorese	21
2.2.4 Restriktionsverdau	21
2.2.5 Ligation	21
2.2.6 Transformation	22
2.3 Präparative Methoden	22
2.3.1 Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	22
2.3.2 Aufschluss von <i>Escherichia coli</i> -Zellen für Proteinpräparation	23
2.3.3 Präparation von Pin1 und Pin1 PPIase	23
2.3.4 Präparationen von Pin1 WW	24
2.3.5 Präparationen von GST-Pin1 und GST-Pin1-Varianten	25
2.3.6 Erhaltung und Kultivierung von HeLa-Zellen	26
2.3.7 Passagieren von HeLa-Zellen	26
2.3.8 Transfektion und Co-Transfektion von HeLa-Zellen	27
2.3.9 Synchronisierung von HeLa-Zellen	27
2.3.10 Cycloheximid-Behandlung von HeLa-Zellen	27
2.3.11 Staurosporin-Behandlung von HeLa-Zellen	28
2.3.12 HeLa-Zellernte und die Herstellung von HeLa-Zelllysaten	28
2.3.13 Dephosphorylierung von HeLa-Zelllysaten	29
2.3.14 Chromatinfractionierung	29
2.3.15 Präparationen von FLAG-MCM3	29
2.3.16 5-Bromo-2-deoxyuridin-Inkorporationsassay	30
2.3.17 <i>Pull-down</i>	30
2.3.18 Co-Immunpräzipitation	31
2.3.19 Affinitätschromatographie von Serumproteinen mit CsA-Derivat	32

2.4	Analytische Methoden	33
2.4.1	Proteinbestimmung	33
2.4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	33
2.4.3	Western Blot.....	34
2.4.4	Interaktionsstudie mit membrangebundenen Peptiden	34
2.4.5	Proteasefreier PPIase-Assay.....	34
2.4.6	Proteasegekoppelter PPIase-Assay	37
2.4.7	Fluoreszenzemissionsspektren von Peptidderivaten	38
2.4.8	Isotherme Titrationskalorimetrie.....	39
2.4.9	Circulardichroismus-Spektroskopie.....	39
2.4.10	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	40
2.4.11	Massenspektrometrie.....	40
2.4.12	Konfokalmikroskopie.....	40
2.4.13	Durchflusszytometrie	41
2.4.14	Datenverarbeitung	42
3	ERGEBNISSE	43
3.1	Pin1 interagiert <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> mit MCM3	43
3.1.1	Untersuchungen zur Interaktion von Pin1 mit Proteinen aus HeLa-Zellen	43
3.1.2	Untersuchungen zum Einfluss der Phosphorylierung von MCM3 auf die Interaktion mit Pin1	48
3.1.3	Untersuchungen zur Interaktion von Pin1 mit chromatinassoziiertem MCM3	50
3.1.4	Untersuchungen zur Interaktion von Pin1 mit MCM3 im Verlauf des Zellzyklus.....	51
3.2	Untersuchungen von MCM3-abgeleiteten Peptidderivaten.....	55
3.3	Untersuchungen zum Einfluss von Pin1 auf MCM3	64
3.3.1	Untersuchungen zur Biosynthese von MCM3	64
3.3.2	Untersuchungen zur Stabilität von MCM3	65
3.3.3	Untersuchungen zur Proteolyse von MCM3 bei Apoptose.....	66
3.3.4	Untersuchungen zur Assemblierung des MCM2-7-Komplexes	68
3.3.5	Untersuchungen zur Chromatinbeladung von MCM3.....	70
3.3.6	Untersuchungen zur Phosphorylierung von MCM3	72
3.3.7	Untersuchungen zum Zellzyklusverlauf	74
3.4	Untersuchungen niedermolekularer Substanzen als Pin1-Inhibitoren.....	76
3.5	Isolierung und Analyse von PPIasen unter Verwendung immobilisierter Inhibitoren.....	80
4	DISKUSSION.....	85
4.1	MCM3 als neuer Proteininteraktionspartner von Pin1	85
4.2	Pin1 interagiert mit MCM3-abgeleiteten Peptidderivaten.....	87
4.3	Pin1 beeinflusst MCM3 <i>in vivo</i>	92
4.4	Arylhetarylketone, Biarylhetarylketone und Thioketone als Pin1-Inhibitoren.....	95
4.5	Analyse von Cyclophilinen aus humanem Serum	97
5	ZUSAMMENFASSUNG	101
	LITERATURVERZEICHNIS.....	103
	ANHANG.....	117
	DANKSAGUNG.....	134
	LEBENS LAUF	135
	PUBLIKATIONEN.....	136
	EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	137

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abz	Aminobenzoyl	IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid
Ac	Acetyl	ITC	isotherme Titrationskalorimetrie
AK	Antikörper	k_{cat}	Wechselzahl/Katalysekonstante
ATP	Adenosintriphosphat	K_D	Dissoziationskonstante
BIS-TRIS-Propan	1,3-Bis-[tris-(hydroxymethyl)-methylamino]-propan	K_I	Inhibitionskonstante
BrdU	5-Bromo-2-deoxyuridin	K_M	Michaeliskonstante
BSA	Albumin aus Rinderserum	MCM	<i>minichromosome maintenance</i>
CD	Circulardichroismus	MCM2-7	heterohexamerer Komplex aus den Proteinen <i>DNA replication licensing factor</i> MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6 und MCM7
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>	N	Stöchiometrie
CHX	Cycloheximid	Nal	Naphtylalanyl
[<i>cis</i>]	Anteil an <i>cis</i> -Isomer	NP40	<i>Nonidet</i> P40
CsA	Cyclosporin A	PA	Polyacrylamid
<i>ct</i>	<i>cis</i> → <i>trans</i> -Isomerisierung	Par	Parvulin
Cyp	Cyclophilin	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
EGCG	Epigallocatechingallat	Pin1	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1</i>
ΔG^\ddagger	Änderung der freien Aktivierungsenthalpie	Pip	Pipicolinyl
ΔG^0	Änderung der GIBBS-Energie im Gleichgewichtszustand	pK_S	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante K_S
ΔH^\ddagger	Änderung der Aktivierungsenthalpie	- <i>pNA</i>	4-Nitroanilid
ΔS^\ddagger	Änderung der Aktivierungsentropie	PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
DMSO	Dimethylsulfoxid	pSer	phospho-Ser, Ser(PO ₃ H ₂)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	pThr	phospho-Thr, Thr(PO ₃ H ₂)
eGFP	<i>enhanced</i> grün fluoreszierendes Protein	SDS	Natriumdodecylsulfat
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>	SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	Suc	Succinyl
FK506	Tacrolimus	<i>tc</i>	<i>trans</i> → <i>cis</i> -Isomerisierung
FKBP	FK506-bindendes Protein	TCA	Trichloressigsäure
FLAG	Oktapeptid-Fusion mit der Sequenz DYKDDDDK (FLAG- <i>tag</i>)	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
GST	Glutathion-S-Transferase	TFE	2,2,2-Trifluorethanol
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure	[<i>trans</i>]	Anteil an <i>trans</i> -Isomer
His ₆	Hexahistidin-Fusion (<i>His</i> ₆ - <i>tag</i>)	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>	UV	ultraviolett
IC_{50}	mittlere inhibitorische Konzentration	<i>v/v</i>	Volumen pro Volumen
IgG	Immunglobulin G	WT	Wildtyp

BEMERKUNGEN:

In diesem Verzeichnis sind nicht alle Proteine aufgelistet, die in dieser Arbeit Erwähnung finden, da diese zumeist im Text näher erklärt werden.

Der Begriff Input bezeichnet in dieser Arbeit das entsprechende biologische Ausgangsmaterial, welches für ein Experiment oder einen bestimmten experimentellen Schritt eingesetzt wurde.

TABELLENVERZEICHNIS

<i>TABELLE 1:</i>	Verwendete Chemikalien und deren Hersteller.....	16
<i>TABELLE 2:</i>	Verwendete Vektoren und Oligonukleotide und deren Herkunft.....	18
<i>TABELLE 3:</i>	Verwendete Antikörper und deren Hersteller.....	20
<i>TABELLE 4:</i>	Bedingungen der Säulenchromatographien für die Präparation von Pin1 bzw. Pin1 PPIase.....	23
<i>TABELLE 5:</i>	Bedingungen der Säulenchromatographien für die Präparation von Pin1 WW.....	25
<i>TABELLE 6:</i>	Bedingungen der Säulenchromatographien für die Präparationen von GST-Pin1 und der GST-Pin1-Varianten GST-Pin1 W34A, GST-Pin1 K63A und GST-Pin1 R68/69A.....	26
<i>TABELLE 7:</i>	Bedingungen der FLAG-Affinitätschromatographie für die Präparationen von FLAG-MCM3.....	30
<i>TABELLE 8:</i>	Verwendete Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	33
<i>TABELLE 9:</i>	Verwendete Lösungen für die Western-Blot-Analyse.....	34
<i>TABELLE 10:</i>	Verwendete Lösungen für die Interaktionsstudie mit membrangebundenen Peptiden.....	35
<i>TABELLE 11:</i>	Verwendete Lösungen zur Probenvorbereitung für die Konfokalmikroskopie.....	41
<i>TABELLE 12:</i>	PPIase-Aktivität der GST-Pin1-Varianten.....	47
<i>TABELLE 13:</i>	Bezeichnungen und Sequenzen der von MCM3 abgeleiteten Peptidderivate.....	56
<i>TABELLE 14:</i>	Kinetische Konstanten der Peptidyl-Prolyl-Isomerisierung von <i>cis</i> nach <i>trans</i> MCM3-abgeleiteter Peptidderivate und die katalytischen Effizienzen von Pin1 gegenüber diesen Derivaten bei 10 °C.....	61
<i>TABELLE 15:</i>	Thermodynamische Konstanten der Peptidyl-Prolyl-Isomerisierung MCM3-abgeleiteter Peptidderivate.....	62
<i>TABELLE 16:</i>	Massenspektrometrisch identifizierte Cyclophiline aus humanem Serum nach Affinitätschromatographie mit immobilisiertem CsA-Derivat 9	84
<i>TABELLE 17:</i>	Ergebnisse massenspektrometrischer Analysen der gereinigten Proteine.....	120
<i>TABELLE 18:</i>	Massenspektrometrisch identifizierte Proteine aus HeLa-Zellen nach <i>pull-down</i> mit GST-Pin1.....	120
<i>TABELLE 19:</i>	BRAUN-Verbindungen als Pin1-Inhibitoren.....	127

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1:	Isomerisierung zwischen der <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Form einer Peptidyl-Prolylbindung.....	2
ABBILDUNG 2:	<i>Pull-down</i> zellulärer Proteine mit GST-Pin1.....	43
ABBILDUNG 3:	<i>Pull-down</i> von MCM-Proteinen mit GST-Pin1.....	44
ABBILDUNG 4:	<i>Pull-down</i> von MCM-Proteinen bei unterschiedlichen KCl-Konzentrationen mit GST-Pin1...	45
ABBILDUNG 5:	Analyse von gereinigtem FLAG-MCM3 aus HeLa-Zellen und dessen <i>pull-down</i> mit GST-Pin1.....	46
ABBILDUNG 6:	<i>Pull-down</i> von MCM3 mit GST-Pin1-Varianten.....	47
ABBILDUNG 7:	<i>Pull-down</i> von MCM3 mit GST-fusionierten Domänen von Pin1.....	48
ABBILDUNG 8:	Schematische Darstellung von MCM3.....	48
ABBILDUNG 9:	<i>Pull-down</i> von MCM3 mit GST-Pin1 nach Phosphatasebehandlung des HeLa-Zelllysats.....	49
ABBILDUNG 10:	<i>Pull-down</i> von FLAG-MCM3-Varianten mit GST-Pin1.....	50
ABBILDUNG 11:	<i>Pull-down</i> von löslichem MCM3 und MCM3 aus der Chromatinfraction mit GST-Pin1.....	50
ABBILDUNG 12:	Analyse von MCM3 und MCM4 in synchronisierten HeLa-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten im Zellzyklus.....	51
ABBILDUNG 13:	Analyse synchronisierter HeLa-Zellen mittels Durchflusszytometrie zu verschiedenen Zeitpunkten im Zellzyklus.....	52
ABBILDUNG 14:	<i>Pull-down</i> von MCM3 mit GST-Pin1 zu verschiedenen Zeitpunkten im Zellzyklus.....	53
ABBILDUNG 15:	Lokalisierung von Pin1 und MCM3 in HeLa-Zellen.....	54
ABBILDUNG 16:	Interaktionsstudie von Pin1 mit membrangebundenen Peptiden, abgeleitet von der Aminosäuresequenz von MCM3.....	55
ABBILDUNG 17:	Ausschnitte des Vergleichs von Aminosäuresequenzen MCM3-homologer Proteine verschiedener Spezies.....	55
ABBILDUNG 18:	Analyse der Sekundärstruktur von P1 und P2 mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie.....	57
ABBILDUNG 19:	Isotherme Titrationskalorimetrie des Peptidderivates P1 mit Pin1 bzw. Pin1 WW.....	58
ABBILDUNG 20:	Isotherme Titrationskalorimetrie des Peptidderivates P2 mit Pin1 bzw. Pin1 WW.....	59
ABBILDUNG 21:	Katalytische Effizienzen von Pin1 gegenüber MCM3-abgeleiteten Peptidderivaten.....	60
ABBILDUNG 22:	Abhängigkeit der Peptidyl-Prolyl-Isomerisierung von <i>cis</i> nach <i>trans</i> MCM3-abgeleiteter Peptidderivate von der Temperatur.....	62
ABBILDUNG 23:	Abhängigkeit der Peptidyl-Prolyl-Isomerisierung von <i>cis</i> nach <i>trans</i> MCM3-abgeleiteter Peptidderivate vom pH-Wert.....	63
ABBILDUNG 24:	pH-Abhängigkeit der Sekundärstruktur der Peptidderivate P6 und P7	63
ABBILDUNG 25:	Einfluss der intrazellulären Pin1-Menge auf den MCM3-Gehalt von HeLa-Zellen.....	65
ABBILDUNG 26:	Einfluss der intrazellulären Pin1-Menge auf die Stabilität von MCM3.....	66
ABBILDUNG 27:	Einfluss der intrazellulären Pin1-Menge auf MCM3 bei Apoptose.....	67
ABBILDUNG 28:	Einfluss von Pin1 auf die Assemblierung des Komplexes MCM2-7.....	68
ABBILDUNG 29:	Lokalisierung von eGFP-MCM3 und MCM5 bzw. MCM7 in HeLa-Zellen zu einem Interphasezeitpunkt.....	69
ABBILDUNG 30:	Chromatinbeladung von FLAG-MCM3-Varianten.....	70
ABBILDUNG 31:	Einfluss von Pin1 auf die Chromatinbeladung von MCM3.....	71
ABBILDUNG 32:	Einfluss von Pin1 auf die Chromatinbeladung von MCM3 in der G ₂ /M-Phase des Zellzyklus.....	72
ABBILDUNG 33:	Einfluss von Pin1 auf die Phosphorylierung von MCM3 an Position Thr ⁷²²	73
ABBILDUNG 34:	Einfluss von Pin1 auf die Phosphorylierung von MCM3 mit N-terminaler FLAG2-Fusion.....	73

ABBILDUNG 35:	Einfluss von Pin1 auf den Zellzyklus von HeLa-Zellen.....	75
ABBILDUNG 36:	Verbindungen mit struktureller Ähnlichkeit zum Übergangszustand der Peptidyl-Prolyl- bindung während der <i>cis/trans</i> -Isomerisierung.	76
ABBILDUNG 37:	Chemische Strukturen und Inhibitionskonstanten K_i gegenüber Pin1 einiger Biarylhetarylketone, Monoarylhetarylketone und Thioketone.....	77
ABBILDUNG 38:	Inhibition von Pin1 mit dem Monoarylhetarylketon 6e	78
ABBILDUNG 39:	Inhibierungen von PPIase-Aktivitäten mit CsA-Derivaten.	81
ABBILDUNG 40:	<i>Pull-down</i> von CypA mit immobilisierten CsA-Derivaten.	82
ABBILDUNG 41:	Affinitätschromatographie von Serumproteinen mit immobilisiertem CsA-Derivat 9	83
ABBILDUNG 42:	Hypothetisches Modell zur Wirkung von Pin1 auf MCM3 im Zellzyklus.	94
ABBILDUNG 43:	Analyse von rekombinant hergestelltem, gereinigten Pin1 mittels SDS-PAGE, PPIase- Assay und Fern-UV-CD-Spektroskopie.	117
ABBILDUNG 44:	Analyse von rekombinant hergestellten, gereinigten Pin1-Domänen Pin1 WW und Pin1 PPIase.	118
ABBILDUNG 45:	Analyse der gereinigten GST-Pin1-Varianten, welche rekombinant aus <i>E. coli</i> gewonnen wurden.	119
ABBILDUNG 46:	Ladekontrollen diverser <i>pull-down</i> -Experimente (I).	122
ABBILDUNG 47:	Ladekontrollen diverser <i>pull-down</i> -Experimente (II).	123
ABBILDUNG 48:	Analyse von rekombinantem eGFP und eGFP-Pin1 in HeLa-Zellen.....	124
ABBILDUNG 49:	Fluoreszenzbasierte Analyse der <i>cis/trans</i> -Isomerisierung von P3	124
ABBILDUNG 50:	Analyse der Verringerung von Pin1 durch RNAi bzw. der Herstellung von rekombinantem Pin1 in HeLa-Zellen.	125
ABBILDUNG 51:	Einfluss der intrazellulären Pin1-Menge auf den MCM-Proteingehalt von HeLa-Zellen.	125
ABBILDUNG 52:	Einfluss der intrazellulären Pin1-Menge auf die Stabilität von MCM3 (Ladekontrollen).	126
ABBILDUNG 53:	Analyse von rekombinantem eGFP und eGFP-MCM3 in HeLa-Zellen.	126
ABBILDUNG 54:	Chemische Strukturen der verwendeten CsA-Derivate 9 und 11 sowie 10	131
ABBILDUNG 55:	Inhibierung der PPIase-Aktivität von CypB bzw. CypC mit CsA-Derivat 9	131
ABBILDUNG 56:	Analyse zellulärer Proteine in humanem Serum.	132
ABBILDUNG 57:	<i>Pull-down</i> von CypA mit immobilisierten CsA-Derivaten.	133
ABBILDUNG 58:	Untersuchung der Immobilisierung von CsA-Derivat 9 an Streptavidin-Agarose.....	133

1 EINLEITUNG

1.1 Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung

In Peptidketten sind die Aminosäuren über kovalente chemische Bindungen verknüpft. Diese Peptidbindungen bilden damit die Grundlage für die Generierung der Primärstruktur von Proteinen. Mithilfe der Resonanztheorie postulierte LINUS PAULING bereits vor über sechzig Jahren die Planarität der Peptidbindung [1]. Die Basis bildet dabei die Delokalisierung des freien Stickstoff-Elektronenpaars, die zur Resonanz der Doppelbindung innerhalb der Peptidbindung in unterschiedlichen Resonanzstrukturen und folglich zum partiellen Doppelbindungscharakter der C–N-Bindung führt. Diese Bindung besitzt eine Länge von 1,32 Å und ist damit um 0,13 Å kürzer, als sie für eine normale Einfachbindung erwartet würde [2]. Der partielle Doppelbindungscharakter der C–N-Bindung bewirkt eine hohe Rotationsbarriere, schränkt damit die freie Rotation um diese Bindung ein und ist letztlich für die Planarität der Bindung verantwortlich. Abhängig vom Diederwinkel ω ändert sich die Anordnung der flankierenden C ^{α} -Atome zueinander. Es ergeben sich *cis*-Isomere ($\omega \approx 0^\circ$) und *trans*-Isomere ($\omega \approx 180^\circ$), zwei energetisch begünstigte Konformationen, die durch Isomerisierung ineinander überführt werden können. Dabei muss eine Rotationsbarriere überwunden werden, deren energetisches Maximum im Modell in einem orthogonalen Übergangszustand ($\omega \approx 90^\circ$) zu finden ist und mit der Aufhebung des partiellen Doppelbindungscharakters der C–N-Bindung sowie einer pyramidalen Ausrichtung beider Atome einhergeht [3]. Aufgrund sterischer Begünstigung des *trans*-Isomers gegenüber dem *cis*-Isomer in normalen sekundären Amididen, nehmen die meisten Peptidbindungen in Proteinstrukturen die *trans*-Konformation ein [4]. Innerhalb der zwanzig gencodierten Aminosäuren bezieht Prolin eine Sonderstellung, da es als einzige Aminosäure in Peptiden mit der ihr N-terminal gelegenen Aminosäure eine Imidbindung anstelle einer sekundären Amidbindung formt. Die Isomerisierung einer solchen Prolylbindung wird als Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung oder kurz Prolyl-Isomerisierung bezeichnet und ist schematisch in *ABBILDUNG 1* dargestellt. Die Symmetrie des Pyrrolidinringes der Prolyl-Seitenkette verursacht ähnliche sterische Verhältnisse im *cis*- und *trans*-Isomer und wird für eine geringere Energiedifferenz zwischen beiden Konformeren im Vergleich zu sekundären Amididen verantwortlich gemacht [4]. Berechnungen zufolge liegt die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Imidbindungen in *cis*-Konformation bei etwa 30 % [5]. Untersuchungen bestätigen in Proteinen deutlich höhere Anteile an *cis*-Prolylbindungen als an sonstigen Peptidbindungen in *cis*-Konformation [6-8].

Prolyl-Isomerisierungen sind langsame Reaktionen. Sie sind häufig Ursache der langsamen Faltungsreaktionen von Proteinen und bilden geschwindigkeitsbestimmende Schritte bei der Ausbildung von deren nativer Konformation [9]. Bereits 1984 wurde in Halle von FISCHER *et al.* erstmals ein Enzym aus Schweineleber isoliert, das die Prolyl-Isomerisierung beschleunigt und damit eine neue Enzymklasse entdeckt, die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen, EC 5.2.1.8.) [10]. Es stellte sich heraus, dass es sich bei diesem Protein um Cyclophilin A (CypA) handelt, den hochaffinen Interaktionspartner des Immunsuppressivums Cyclosporin A [11, 12]. Die Vertreter dieser ersten Familie innerhalb der PPIasen werden deshalb als Cyclophiline bezeichnet. Auch der Name der zweiten PPIase-Familie,

FK506-bindende Proteine (FKBP), leitet sich von der Entdeckung ihres ersten humanen prototypischen Vertreters FKBP12 ab, welches als Bindeprotein der immunsuppressiv wirkenden Substanz FK506 gefunden wurde [13, 14]. Daneben existiert mit den sogenannten Parvulinen (Par) eine dritte PPIase-Familie. Der Name Parvulin findet seinen Ursprung im lateinischen Wort für klein (*parvulus*) und deutet auf die geringe Molekülmasse des 1994 entdeckten ersten Vertreters dieser Familie aus *Escherichia coli* hin, dem Parvulin 10 [15]. Die Aminosäuresequenzen der drei Familien zeigen keine Homologien untereinander. Sowohl Cyclophiline als auch Pin1 zeigen aber bei ihrer Inhibierung Ähnlichkeiten [16, 17].

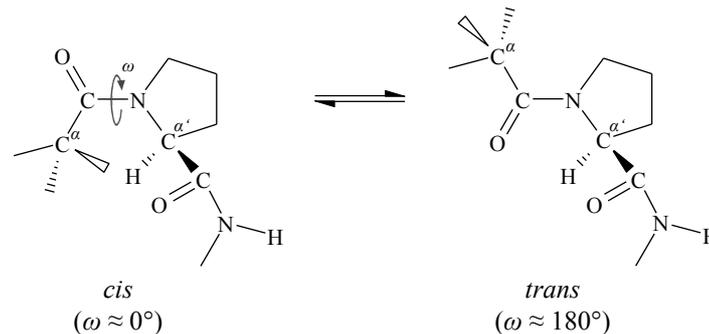


ABBILDUNG 1: ISOMERISIERUNG ZWISCHEN DER CIS- UND TRANS-FORM EINER PEPTIDYL-PROLYLBINDUNG. Abbildung nach FISCHER, 2000, verändert [3].

1.2 Cyclosporin A und die Bedeutung extrazellulärer Cyclophiline

Aus einer im Jahre 1969 aus dem norwegischen Hardangervidda entnommenen Bodenprobe ließ sich ein Pilz isolieren der später als *Tolypocladium inflatum* identifiziert wurde [18-20]. Aus diesem Ascomyceten konnte das hydrophobe cyclische Undekapeptid Cyclosporin A (CsA) gewonnen werden [18]. Nach der Entdeckung der starken immunsuppressiven Eigenschaften dieser Substanz kam diese erstmals 1978 bei der Behandlung von Transplantationspatienten zum Einsatz [20-22].

Als wesentliche zelluläre Ziele für CsA treten die Cyclophiline in den Vordergrund, von denen die meisten durch CsA im nanomolaren Bereich reversibel inhibiert werden [23]. Cyclophiline sind ubiquitär verbreitete und über verschiedene Spezies hoch konservierte Enzyme. In menschlichen Geweben sind derzeit achtzehn Mitglieder der Cyclophilin-Familie mit Molekülmassen zwischen 18 kDa und 358 kDa beschrieben, die entweder lediglich aus einer prototypischen Cyclophilin-Domäne bestehen oder zusätzliche N- bzw. C-terminale Erweiterungen bzw. weitere Domänen aufweisen [24]. Cyclophiline spielen durch ihre PPIase-Aktivität eine Rolle in der Proteinfaltung [25].

Das aus 165 Aminosäuren bestehende prototypische CypA ist hochabundant und wurde als erstes CsA-Bindeprotein identifiziert [26]. Die Reste 9, 10, 11, 1 und 2 von CsA formen die sogenannte „Cyclophilin-Bindedomäne“ und sind maßgeblich an der Interaktion im katalytischen Zentrum von CypA beteiligt [27-29]. Der CypA-CsA-Komplex ist in der Lage, in

Zellen einen ternären Komplex mit dem Zielprotein Calcineurin, einer Ca^{2+} - und Calmodulin-abhängigen Serin/Threonin-Proteinphosphatase (PP2B) auszubilden und deren Phosphataseaktivität zu inhibieren [30]. Die Reste 4 bis 7 von CsA formen die sogenannte „Calcineurin-Bindedomäne“ und sind für die Wechselwirkung des CypA-CsA-Komplexes mit Calcineurin verantwortlich [27-29]. Im Effekt wird die Dephosphorylierung des Calcineurinsubstrates NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) unterdrückt und eine Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors in T-Zellen verhindert. Die daraus resultierende Repression der Transkription von für Cytokine codierenden Genen, wie beispielsweise Interleukin-2, hat die Suppression der T-Zellaktivierung zur Folge [31-33]. Die Blockierung der Cyclophilin-katalysierten Prolyl-Isomerisierung durch Bindung der Cyclophiline an CsA zum einen, die Interaktion des CypA-CsA-Komplexes mit Calcineurin und die damit einhergehende Hemmung der Phosphataseaktivität des Calcineurins zum anderen sind wenigstens zwei verschiedene Ereignisse, die zu den physiologischen Wirkungen von CsA führen [34].

Obwohl Cyclophiline intrazellulär an vielen physiologischen Funktionen beteiligt sind, erfahren extrazelluläre Cyclophiline insbesondere bei der Chemotaxisinduktion von Immunzellen und als Vermittler interzellulärer Kommunikation zunehmende Beachtung [35, 36]. Momentan ist von drei Cyclophilinen, Cyclophilin A, Cyclophilin B (CypB) und Cyclophilin C (CypC), sowohl intra- als auch extrazelluläre Lokalisation prägnant, wobei sich die Sekretionswege aufgrund unterschiedlicher Lokalisierung der einzelnen Isoformen unterscheiden [37]. CypA besitzt kein Sekretionssignal [36]. Neben spontaner Sekretion können verschiedene Faktoren wie beispielsweise oxidativer Stress, Bestrahlung oder die Stimulation mit CsA bzw. Lipopolysacchariden die Sekretion von CypA aus verschiedenen Zelltypen in den Extrazellularraum induzieren [38-41]. In vaskulären glatten Muskelzellen induziert oxidativer Stress die Sekretion von CypA über einen vesikulären Sekretionsweg [38, 42]. Das sekretierte CypA aktiviert ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases*) in Abhängigkeit von der PPIase-Aktivität und stimuliert das Wachstum der vaskulären glatten Muskelzellen [38]. Vor kurzem wurde die Notwendigkeit der Acetylierung der Seitenketten der Aminosäurereste Lys⁸² und Lys¹²⁵ in CypA für diesen Sekretionsweg erkannt [43]. Radioaktive Bestrahlung von Brustkrebszellen führte zur Sekretion von CypA mit Mustern posttranslationaler Modifikationen von Aminosäureseitenketten durch Acetylierung bzw. Methylierung [44]. Generell ist davon auszugehen, dass posttranslationale Modifikation starken Einfluss auf die Proteinsekretion nimmt [45]. Ein hoher Glukose-Gehalt fördert die Sekretion von CypA aus Monozyten [46]. Nekroptose stellt eine durch die Kinase RIP1 (*receptor-interacting protein 1*) regulierte Form des programmierten nekrotischen Zelltods dar, bei der die Plasmamembran ihre Intaktheit im Verlauf des Vorgangs verliert. Sie geht in einer frühen Phase mit der Entlassung von CypA in den extrazellulären Raum einher, dessen Freisetzung auch als Biomarker für Nekroptose diskutiert wird [47].

Eine Signalsequenz, wie sie in CypB vorkommt¹⁾ und zu dessen Lokalisierung im Endoplasmatischen Retikulum sie führt, kann ein Protein in Richtung des sekretorischen Signalwegs dirigieren und dessen Sekretion fördern [35, 36, 48]. Für CypB ist eine schnelle Sek-

¹⁾ Das Signalpeptid am N-Terminus von CypB umfasst 25 Aminosäurereste [35].

retion über einen konstitutiven Sekretionsweg infolge von Stimulation der Zellen mit CsA beschrieben [49, 50]. Einige Zelllinien sekretieren CypB auch spontan [51, 52].

Das transmembrane Glykoprotein CD147 (*cluster of differentiation 147*, EMMPRIN, *extracellular matrix metalloproteinase inducer*, Basigin) ist für extrazelluläre Cyclophiline der vornehmliche Signalrezeptor zur Signalweiterleitung, die sehr wahrscheinlich PPIase-Aktivität der Cyclophiline erfordert [37, 53, 54].

Extrazelluläre Cyclophiline spielen unter pathophysiologischen Gesichtspunkten eine besondere Rolle, da in Patienten mit typischen Entzündungserkrankungen erhöhte Konzentrationen an extrazellulärem CypA in den entzündeten Geweben und Körperflüssigkeiten auftreten. Beispielsweise finden sich erhöhte Mengen an extrazellulärem CypA in Gelenkflüssigkeiten von Patienten mit rheumatoider Arthritis [55]. Extrazelluläres CypA vermittelt die Adhäsion von Monozyten und Makrophagen an die extrazelluläre Matrix und die Steigerung der Biosynthese von MMP-9 (Matrixmetalloproteinase-9), einem Vertreter der Proteasen, die an den entzündeten Gelenken hauptsächlich für den Abbau der Knorpelsubstanz verantwortlich sind [56]. CypA wird deshalb als wichtiges Zielprotein zur Behandlung dieser Erkrankung angesehen [57]. Signifikante Anstiege der PPIase-Aktivitäten fanden sich in Seren von Patienten mit Sepsis und eine erhöhte PPIase-Aktivität in Serum korrelierte mit einer erhöhten Menge an extrazellulärem CypA sowie einer erhöhten Mortalitätsrate dieser Patienten [58]. CypA könnte dabei als Mediator in der Pathophysiologie der Sepsis fungieren, und wird in dieser Beziehung als diagnostischer Marker diskutiert [59]. Im Mausmodell zur Simulation akuten Lungenversagens wurden erhöhte Mengen an CypA in der Flüssigkeit nach bronchoalveolärer Lavage detektiert [60]. Erhöhte Mengen von extrazellulärem CypA fanden sich in Mausmodellen für akute asthmatische Entzündung und für chronisches allergisches Asthma [61, 62]. CypA wird dabei als CD147-abhängiger Induktor der Chemotaxis von aktivierten T-Zellen (CD4+) angesehen, einem Zelltyp dem besondere Bedeutung bei der Asthmaerkrankung beigemessen wird [61]. Der Plasma-CypA-Gehalt korreliert mit dem Alter und dem nüchternen Blutzuckerwert und ist in Patienten mit *Diabetes mellitus* Typ 2 im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht. In Patienten mit zusätzlicher Koronararterienkrankung ist dieser Effekt noch stärker ausgeprägt. Der Plasma-CypA-Gehalt kommt deshalb als klinischer Marker für Gefäßerkrankung bzw. proinflammatorischer Indikator in Patienten mit *Diabetes mellitus* Typ 2 in Betracht [46, 63, 64]. Außerdem wird er in Verbindung mit dem Entzündungsparameter C-reaktivem Protein (CRP) als klinischer Marker für das Risiko von Koronararterienkrankung vorgeschlagen [65, 66].

Da die Cyclophilin-CD147-Interaktion bei der Pathogenese von entzündlichen Erkrankungen eine wichtige Stellung einnimmt, steht ihre Inhibierung durch CsA und durch dessen Derivate als Therapiemöglichkeit im Mittelpunkt. Allerdings ist CsA aufgrund seiner immunsuppressiven Eigenschaften für die klinische Anwendung als Entzündungshemmer oder Krebsmedikament nur wenig geeignet [67]. Das nicht-immunsuppressive CsA-Derivat NIM811 wirkt im Mausmodell von akutem Lungenversagen entzündungshemmend [60]. NIM811 kann jedoch die Zellmembran passieren und dadurch auch intrazelluläre Cyclophiline inhibieren, was zu Nebenwirkungen beitragen kann [67, 68]. Damit bilden CsA-Derivate die Grundlage für die Entwicklung selektiver Inhibitoren extrazellulärer Cyclophiline [34, 69]. Das nicht-immunsuppressive, zellimpermeable CsA-Derivat MM218 besitzt ähnliche inhibi-

torische Aktivität gegenüber CypA wie CsA [69]. Im Mausmodell der akuten allergischen Lungenentzündung hemmt es die Leukozytenrekrutierung und wirkt entzündungshemmend [70]. Außerdem reduziert es Atemwegsschleim und verbessert die Lungenfunktion [70]. Damit scheinen CsA-Derivate als Basis für die Medikamententwicklung gegen derartige Entzündungserkrankungen geeignet zu sein.

1.3 Die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase Pin1

In einem Screening mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde die humane PPIase Pin1 als Interaktionspartner von NIMA entdeckt [71]. NIMA ist das Produkt des Gens *nimA* (*never in mitosis A*), einer für das Fortschreiten der Mitose essentiellen Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinase in *Aspergillus nidulans* [72-75]. Bei Pin1 (*peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1*) handelt es sich um eine PPIase der Parvulin-Familie die vom Gen *PIN1* codiert wird [71]. Viele Organismen besitzen Homologe zum humanen Pin1, beispielsweise das essentielle Ess1/Ptf1 (codiert durch das Gen *ESS1*) in *Saccharomyces cerevisiae*, in *Schizosaccharomyces pombe*, das Ssp1 in *Neurospora crassa* bzw. das Dodo (codiert durch das Gen *DOD*) in *Drosophila melanogaster* [76-80]. Pin1-Homologe PPIasen finden sich auch in verschiedenen Pflanzen [81, 82].

Das humane Pin1 ist aus 163 Aminosäureresten aufgebaut und besitzt eine Molekülmasse von 18243 Da²⁾ [71]. Es ist ein Zwei-Domänen-Protein, das aus einer aminoterminalen WW-Domäne und einer carboxyterminalen PPIase-Domäne besteht [71]. Pin1 ist an der Regulation der Mitose beteiligt [71]. Deletion von *ESS1* in Hefe und Depletion von Pin1 in HeLa-Zellen führen zu einer Arretierung der Zellen in der Mitose [71]. *PIN1* kann *ESS1* in Hefe funktionell ersetzen [71]. Für HeLa-Zellen, die zusätzliches Pin1 generieren, ist eine Arretierung in der G₂-Phase des Zellzyklus beschrieben [71]. In kultivierten Zellen ist Pin1 während der Interphase nahezu vollständig im Nukleus lokalisiert und zeigt Ansammlungen in Substrukturen (*nuclear speckles*) innerhalb des Nukleus [71, 83, 84]. Für diese spezielle Lokalisierung wird die WW-Domäne des Proteins verantwortlich gemacht [83, 84]. Daneben ist Pin1 auch im Cytoplasma präsent [85]. Pin1 besitzt ein putatives Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal*, NLS) in der PPIase-Domäne, das für die nukleäre Lokalisierung des Enzyms eine wichtige Rolle spielt [85]. Die Interaktion von Pin1 mit Importin $\alpha 5$ lässt vermuten, dass Pin1 durch aktiven Transport über ein Importin-Transportsystem in den Nukleus gelangt [85].

1.3.1 Die WW-Domäne von Pin1

WW-Domänen sind kleine, globuläre Proteindomänen, die Protein-Protein-Wechselwirkungen durch Bindung Prolin-reicher Motive vermitteln [86, 87]. Sie lassen sich in verschiedenen regulatorischen und in Signalprozesse involvierten Proteinen finden [86, 88]. WW-Domänen umfassen zwischen 35 und 40 Aminosäuren [87]. Zwei hochkonservierte

²⁾ UniProt-Eintrag Q13526 (PIN1_HUMAN), <http://www.uniprot.org/uniprot/Q13526> (31.01.2015)

Tryptophanreste in der Primärstruktur vieler WW-Domänen sind namensgebend für diese Gruppe von Proteindomänen [86]. Die beiden Tryptophanreste weisen einen Abstand von 20 bis 22 Aminosäuren voneinander auf [87]. Die WW-Domäne von Pin1 wird aus den Aminosäureresten 1 bis 39 gebildet und trägt die konservierten Tryptophanreste Trp¹¹ und Trp³⁴ [71, 89]. WW-Domänen zeigen Unterschiede in der Präferenz für Konsensussequenzen ihrer Liganden und werden danach in verschiedene Gruppen unterteilt [90, 91]. Die WW-Domäne von Pin1 bindet Liganden mit Serin-Prolin- bzw. Threonin-Prolin-Stellen, die eine Phosphorylierung an der β -Hydroxylgruppe des entsprechenden Serin- bzw. Threoninrestes aufweisen, sogenannte phospho-Ser/Thr-Pro-Motive (pSer/Thr-Pro-Motive) [92, 93]. Sie zählt damit zu WW-Domänen der Gruppe IV, die eine charakteristische Präferenz für diese Motive zeigt [90, 93]. Aufgrund ihrer biophysikalischen Eigenschaften (geringe Größe, hohe Löslichkeit, hinreichende thermodynamische Stabilität etc.) eignet sich die isolierte WW-Domäne von Pin1 als Modellsystem und ist biophysikalisch gut charakterisiert [94-97].

Die WW-Domäne von Pin1 besteht aus einem dreisträngigen, antiparallelen β -Faltblatt [89]. Die Verbindung der einzelnen Stränge, als $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 3$ bezeichnet, wird über zwei Schleifen (*loops*), *loop 1* (zwischen $\beta 1$ und $\beta 2$) und *loop 2* (zwischen $\beta 2$ und $\beta 3$), hergestellt [98]. *loop 1* ist ungewöhnlich lang und flexibel und liegt direkt an der Binderegion für pSer/Thr-Pro-Motive [94, 98]. Die konservierten, aromatischen Aminosäurereste Tyr²³ und Trp³⁴ bilden eine Furche auf der Oberfläche der WW-Domäne und sind in die Erkennung und Bindung prolinhaltiger Liganden involviert [98]. Die Prolylseitenkette des Liganden bindet dabei zwischen beiden Resten [93]. Die Phosphatbinderegion umfasst die Seitenketten der Aminosäuren Ser¹⁶ und Arg¹⁷ im *loop 1* sowie Tyr²³ [93, 98]. Die Guanidiumseitengruppe von Arg¹⁷ geht elektrostatische Wechselwirkung mit dem Phosphatrest der N-terminal zum Prolin gelegenen Aminosäureseitenkette des Liganden ein. Weiterhin bilden sich zwischen diesem Phosphatrest und den Seitenketten von Ser¹⁶ und Tyr²³ Wasserstoffbrückenbindungen aus [93]. Die Dissoziationskonstanten K_D zwischen der WW-Domäne und verschiedener Liganden liegen im mikromolaren Bereich [93, 94, 99]. Die WW-Domäne selbst besitzt keine katalytische Aktivität [92].

Die Proteinkinase A ist in der Lage, Pin1 innerhalb der WW-Domäne an Ser¹⁶ zu phosphorylieren [84]. Eine Phosphorylierung an dieser Position kann die Interaktion von Pin1 mit dessen Substraten verhindern [84]. Außerdem wird dadurch die Lokalisierung von Pin1 in *nuclear speckles* unterbunden, was mit einer diffusen Lokalisierung des Proteins innerhalb der Zelle einhergeht [84]. Die Funktion von Pin1 kann damit durch Phosphorylierung der WW-Domäne an Ser¹⁶ reguliert werden [84].

1.3.2 Die PPIase-Domäne von Pin1

Die carboxyterminale PPIase-Domäne von Pin1 wird durch die Aminosäurereste 45 bis 163 gebildet [71, 89]. Ein flexibler Bereich (*linker*, Aminosäuren 40 bis 45) verbindet in Pin1 die WW-Domäne mit der PPIase-Domäne [89]. Beide Domänen sind derart angeordnet, dass zwischen ihnen eine hydrophobe Kavität entsteht [89]. Das Grundgerüst der PPIase-Domäne bildet ein viersträngiges, antiparalleles β -Faltblatt [89]. Vier α -Helices umgeben diese leicht gewölbte Struktur [89]. Die PPIase-Domäne von Pin1 zeigt charakteristische Spezifität für pSer/Thr-Pro-Motive in Substraten und katalysiert effizient die *cis/trans*-Isomerisierung der

Prolylbindung dieser Motive [89, 100]. Pin1 zählt damit zur Gruppe der Parvuline mit Spezifität für bestimmte phosphorylierte Aminosäurereste von Substraten. Zur Gruppe der Parvuline, die diese Spezifität nicht aufweist, gehören Par10 aus *Escherichia coli*, mit Präferenz für Leucyl-Prolylbindungen als Substrate [15] sowie das humane Par14, das die höchste katalytische Effizienz gegenüber Arginyl-Prolylbindungen zeigt [101].

Die hochkonservierten Aminosäurereste Leu¹²², Met¹³⁰ und Phe¹³⁴ formen eine hydrophobe Bindetasche für die zyklische Prolyl-Seitenkette und die Peptidyl-Prolylbindung der Substrate [89]. Die Phosphatbindetasche des aktiven Zentrums des Enzyms wird durch die drei basischen Aminosäurereste Lys⁶³, Arg⁶⁸ und Arg⁶⁹ gebildet [89]. Die beiden Argininreste befinden sich in einer Schleifenregion [89]. Ein Austausch dieser Reste gegen Leucin- oder Alaninreste geht mit einer deutlich verringerten PPIase-Aktivität des Enzyms gegenüber Peptidsubstraten mit pSer-Pro-Motiven einher [83, 100]. Die Aminosäurereste Cys¹¹³, His⁵⁹, His¹⁵⁷ und Ser¹⁵⁴ sind um die isomerisierende Peptidyl-Prolylbindung des Substrates angeordnet [89]. Auch Aminosäureaustausche in Pin1 an Position 59 oder 113 gegen Alaninreste führen zu Pin1-Varianten mit verringerten PPIase-Aktivitäten gegenüber Peptidsubstraten mit pSer-Pro-Motiven [83, 100].

Die PPIase-Domäne von Pin1 zeigte bei Untersuchungen mit konformationsspezifischen substratanalogen Inhibitoren sowohl Affinität zu Inhibitoren in der *cis*- als auch in der *trans*-Konformation. Allerdings wies die PPIase-Domäne gegenüber dem Inhibitor in *cis*-Konformation höhere Affinität auf [102, 103]. Pin1 ist in der Lage, simultan das *cis*-Konformer an der WW-Domäne und das *trans*-Konformer an der PPIase-Domäne zu binden [103]. Die Analyse einer Kristallstruktur von Pin1 im Komplex mit einem Dipeptid lässt auch eine bevorzugte Bindung von *cis*-Konformeren vermuten [89].

Die Affinitäten der Interaktionen phosphorylierter Liganden mit der isolierten PPIase-Domäne von Pin1 unterscheiden sich leicht von denen mit Pin1-Volllängenprotein und lassen eine Modulation der Bindungsaffinität durch Domäneninteraktion mutmaßen [93, 102]. Substratbindung von Pin1 erhöht die Domäneninteraktion und führt zum Verlust von Flexibilität entlang eines Kanals von konservierten hydrophoben Aminosäureresten in der PPIase-Domäne [103]. Die Aminosäurereste 138 bis 142 der PPIase-Domäne und die Aminosäurereste 27 bis 30 der WW-Domäne sind in Pin1 an der Ausbildung einer Berührungsfläche (*domain interface*) beider Domänen beteiligt [104]. Für Pin1 wird eine über diese Berührungsfläche vermittelte allosterische Regulation der PPIase-Domäne durch die WW-Domäne vermutet [103, 104]. Eine Pin1-Variante, die in dieser Berührungsfläche einen Aminosäureaustausch des Isoleucinrestes an Position 28 gegen einen Alaninrest trägt, zeigt reduzierten Interdomänenkontakt im Vergleich zum Wildtyp-Protein, der mit veränderter Substratbindungsaffinität, Isomeraseaktivität und Konformationsdynamik einhergeht [104].

Die Ser/Thr-Kinase DAPK1 (*death-associated protein kinase 1*) interagiert mit der PPIase-Domäne von Pin1 und besitzt die Fähigkeit, diese spezifisch an Ser⁷¹ im katalytischen Zentrum zu phosphorylieren [105]. Eine Phosphorylierung an dieser Position führt zu katalytischer Inaktivität des Enzyms [105]. Darüber hinaus unterbindet die Phosphorylierung die Lokalisierung von Pin1 im Nukleus [105]. Spezifische Phosphorylierung von Pin1 an Ser⁶⁵ in der PPIase-Domäne durch PLK1 (*polo-like kinase 1*) unterdrückt die Ubiquitinierung von Pin1 und führt zu dessen Stabilisierung [106].

1.3.3 Interaktionen zellzyklusrelevanter Proteine mit Pin1

Reversible Proteinphosphorylierung ist ein bedeutender Mechanismus zur Signalweiterleitung in der Zelle [107]. Der Seitenkettenphosphorylierung von Serin- bzw. Threoninresten in Ser/Thr-Pro-Motiven, der sogenannten Prolin-gerichteten Phosphorylierung, kommt dabei eine Schlüsselrolle in der Kontrolle vieler Signalmoleküle in einer Vielzahl zellulärer Prozesse zu [108-110]. Die Kontrolle des zellulären Gehaltes an phosphorylierten Ser/Thr-Pro-Motiven erfolgt dabei durch Prolin-gerichtete Proteinkinasen, beispielsweise durch Vertreter der Kinase-Familien CDK (*cyclin-dependent kinase*), ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) und PLK (*polo-like kinase*) [111]. Für einige Prolin-gerichtete Kinasen und Phosphatasen wurde gezeigt, dass sie konformationsspezifisch sind und die *cis*- oder *trans*-Konformation der Peptidyl-Prolylbindung ihrer Substrate erkennen [112-114]. Seitenkettenphosphorylierung verlangsamt in Ser/Thr-Pro-Motiven die bereits langsame *cis/trans*-Isomerisierungsgeschwindigkeit der Prolylbindung [100]. Außerdem induziert diese Phosphorylierung lokale strukturelle Veränderungen [115]. Die Pin1-spezifische phosphorylierungsabhängige PPIase-Aktivität gegenüber Ser/Thr-Pro-Motiven vermittelt der Prolin-gerichteten Phosphorylierung enorme Bedeutung, da durch Pin1-katalysierte Prolyl-Isomerisierungen Phosphorylierungssignale in Konformationsänderungen transformiert werden können, die dann in diversen Zielaktivitäten der zellulären Proteinsubstrate resultieren [111, 116, 117]. Pin1 interagiert dabei mit vielen zellzyklusrelevanten Proteinen. Die Interaktion und Aktivität von Pin1 kann vielfältige Einflüsse auf die entsprechenden Zielproteine haben [111, 116]. Insbesondere kann Pin1 eine verstärkende oder inhibierende Wirkung auf die Stabilität, den Phosphorylierungsstatus, die enzymatische Aktivität, die Transkriptionsaktivität und die Proteininteraktionen mit Zielproteinen ausüben [111, 116]. Außerdem ist Pin1 in der Lage, die Lokalisierung und Prozessierung von Zielproteinen zu beeinflussen [111].

Beispielsweise erhöht Pin1 die Stabilität von β -Catenin sowie dessen subzelluläre Lokalisierung [118]. *Knockout* von Pin1 führt zu einer verminderten Menge an β -Catenin in Mausgeweben [118]. Pin1 bindet in β -Catenin das Motiv pSer²⁴⁶-Pro²⁴⁷ und katalysiert dessen Isomerisierung [118]. Dies verhindert die Interaktion von β -Catenin mit APC (*adenomatous polyposis coli protein*) [118]. Die Menge an β -Catenin im Nukleus erhöht sich dadurch und führt zu Transaktivierung von Zielgenen des β -Catenins [118]. Pin1 beeinflusst auch den *turnover* des Regulatorproteins Cyclin E [119]. Cyclin E kann durch CDK2 (*cyclin-dependent kinase 2*) an Ser³⁸⁴ phosphoryliert werden [119]. Diese Phosphorylierung beeinflusst die Interaktion des Proteins mit Pin1 [119]. Pin1 unterstützt allerdings die Degradierung von Cyclin E [119]. Abwesenheit von Pin1 resultiert in einem erhöhten zellulären Gehalt an Cyclin E [119].

In *Xenopus laevis* reguliert Pin1, abhängig von dessen katalytischer Aktivität, den Replikationscheckpoint und verhindert vorzeitigen Eintritt der Zellen in die Mitose [120]. Pin1 spielt eine Rolle in der Chromosomenkondensation während der Mitose [121]. Dabei ist die Interaktion von Pin1 mit Chromatin in der G₂/M-Phase erhöht [121]. Pin1 interagiert mit der Topoisomerase TopoII α und ist in der Lage, *in vitro* die Phosphorylierung von TopoII α durch die Kinase Cdc2/Cyclin B zu erhöhen und dadurch die Interaktion von Pin1 mit Chromatin zu verstärken [121]. *In silico* wurden zehn potentielle Interaktionsstellen für Pin1 in der Topoisomerase TopoII α gefunden [122]. Die Interaktion von Pin1 mit Chromatin korreliert mit der Anwesenheit mitotischer Phosphoproteine am Chromatin [121]. Neuere Untersuchun-

gen zeigen die Interaktion von Pin1 mit Histon H1 und die Regulation des Histons durch phosphorylierungsabhängige Prolyl-Isomerisierung [123]. *In vitro* ändert Pin1 die Konformation der C-terminalen Domäne von phosphoryliertem Histon H1, wenn es am Nukleosom gebunden ist [123]. Pin1 fördert die Dephosphorylierung von Histon H1 *in vitro* [123]. Außerdem stabilisiert Pin1 dessen Bindung am Chromatin [123]. Pin1 ist so in die Chromatinregulation involviert [123]. Außerdem ist die Topoisomerase II für die Dissoziation der Replikationsproteine ORC1 (*origin recognition complex 1*) und RPA (*replication protein A*) vom Chromatin in der späten S-Phase des Zellzyklus verantwortlich und koppelt so die Replikationstermination mit der Entfernung der Replikationskomplexe, um die Replikationskomplexe in der Mitose zurückzusetzen [124]. Pin1 ist in diesen Prozess involviert und verhindert die Degradation von ORC1 in der Mitose [124].

Pin1 zeigt zentrosomale Lokalisierung und Überexpression von *PIN1* fördert Zentrosomenduplikation und Aneuploidie [125]. Die Inhibierung des Enzyms verzögert hingegen die Zentrosomenamplifikation [125]. Pin1 wird deshalb als Koordinator der Zentrosomenduplikation und DNA-Synthese angesehen, dessen Fehlregulationen zu Störungen bei diesen Prozessen führen [125].

Während der Zellteilung wird Pin1 zum *midbody* rekrutiert und zeigt während der Cytokinese Lokalisierung im *midbody*-Ring [126]. Pin1 interagiert dort mit dem Cep55 (*centrosome protein 55 kDa*), einem für die Zelltrennung essentiellen Protein dieses Ringes, welches ein Substrat für die PPIase darstellt [126]. Cep55 ist ein mitotisches Phosphoprotein und wird durch die Kinasen CDK1 (*cyclin-dependent kinase 1*) und ERK2 an Ser⁴²⁵ und Ser⁴²⁸ phosphoryliert [127]. Die beiden phosphorylierten Aminosäurereste sind Teile von pSer-Pro-Motiven und stellen die Interaktionsstellen von Pin1 in Cep55 dar [126]. Pin1 vermittelt die Interaktion von Cep55 mit der Kinase PLK1 sowie die Phosphorylierung von Cep55 durch diese Kinase an Ser⁴³⁶ [126]. Außerdem erhöht Pin1 die Stabilität von Cep55 während der Mitose [128]. *Knockdown* von Pin1 führt zur Steigerung von Defekten bei der Cytokinese und unterstreicht dessen wichtige regulierende Funktion bei diesem Prozess [126, 128].

Das PP1-spezifische (PP1, *protein phosphatase 1*) Phosphataseinhibitorprotein I-2 (*inhibitor-2*) interagiert phosphorylierungsabhängig mit Pin1 [129, 130]. Genauere Untersuchungen zeigen, dass Pin1 und I-2 in Lösung Tetramere ausbilden [130]. I-2 verändert als allosterischer Regulator die Pin1-Bindung zu phosphorylierten Proteinsubstraten [129]. I-2 wird deshalb eine Rolle als Pin1-Regulator im Zellzyklus speziell beim Mitoseeintritt und Mitoseaustritt aber auch in anderen Zellzyklusphasen zugeschrieben [129].

Das Tumorsuppressorprotein p53 stellt einen sehr gut charakterisierten Protein-Interaktionspartner von Pin1 dar. p53 ist in sehr viele Signalwege der Zelle involviert. Dem Protein kommt eine Schlüsselrolle bei der zellulären Stressantwort zu. Genotoxischer Stress führt zur Aktivierung von p53. Die Transkriptionsaktivität des Proteins wird durch posttranslationale Modifizierung, Protein-Protein-Interaktion etc. reguliert. DNA-Zerstörung induziert die Phosphorylierung von p53 an Ser/Thr-Pro-Motiven, namentlich an Ser³³, Ser⁴⁶, Thr⁸¹ und Ser³¹⁵ und geht mit der Erhöhung der p53-Pin1-Interaktion einher [131-133]. Die Interaktion wird über die WW-Domäne von Pin1 vermittelt. Die Transaktivierung von p53-Zielgenen erfordert zusätzlich eine funktionale PPIase-Domäne von Pin1. Es wird vermutet, dass Pin1-katalysierte *cis/trans*-Isomerisierungen an pSer/Thr-Pro-Motiven konformationelle Änderun-

gen in p53 hervorrufen, die zur Stabilisierung und Aktivierung des Proteins führen. Für die Zelle hat dies die Arretierung des Zellzyklus und eine beschleunigte p53-abhängige Apoptose durch Aktivierung proapoptotischer p53-Zielgene zur Folge [131-133]. Pin1-katalysierte *cis/trans*-Isomerisierung an pThr⁸¹-Pro⁸² in p53 induziert in dem Protein die Phosphorylierung von Ser²⁰ durch die Kinase Chk2 (*checkpoint kinase 2*) nach DNA-Schädigung [134]. Eine Phosphorylierung an Ser²⁰ in p53 verhindert die Interaktion mit dem Protein Mdm2 (*mouse double minute 2 homolog*) und induziert die Dissoziation des p53-Mdm2-Komplexes [132, 135, 136]. Bei dem p53-Regulator Mdm2 handelt es sich um eine E3-Ubiquitinligase, welche die Ubiquitinierung von p53 vermittelt und damit die Erkennung und Degradierung des Proteins über das Ubiquitin-Proteasom-System sicherstellt [137, 138]. Pin1 beeinflusst so die Stabilität von p53 [134].

Daneben moduliert Pin1 nach Stressinduktion die Transkriptionsaktivität von p53 und ist für die effiziente Beladung von p53 auf Promotoren von p53-Zielgenen und für die p53-abhängige Apoptose erforderlich [139]. Pin1 regt, abhängig von der PPIase-Aktivität, die Interaktion von chromatingebundenem p53 mit der Acetyltransferase p300 sowie dessen Acetylierung an den Aminosäureresten Lys³⁷³ und Lys³⁸² an [139]. Acetylierung von p53 beeinflusst dessen Aktivität und erhöht die Bindung des Proteins mit dessen Zielgenen [140-142]. Nach stressinduzierter Phosphorylierung von p53 an Ser⁴⁶ vermittelt Pin1 außerdem aktivitätsabhängig die Dissoziation von p53 vom Apoptoseinhibitor iASPP und die nachfolgende Expression bestimmter apoptotischer Zielgene [139, 143]. Außerdem spielt Pin1 eine wichtige Rolle bei onkogenen Funktionen bestimmter p53-Varianten resultierend aus sinnverändernden Mutationen (*missense mutations*) in dem für p53 codierenden Gen *TP53* [144]. Pin1 unterstützt dabei die Induktion eines p53-Transkriptionsprogramms zur Erhöhung der Aggressivität von humanem Brustkrebs [144]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass Pin1 die stressinduzierte Lokalisierung von p53 in den Mitochondrien fördert. Diesem Prozess geht stressinduzierte Phosphorylierung an Ser⁴⁶ in p53 voraus [145].

1.3.4 Inhibitoren von Pin1

Pin1 spielt eine wichtige Rolle bei der Onkogenese und Krebs und *PIN1* ist in vielen Krebszelllinien überexprimiert [146, 147]. Daneben ist das Enzym in die Pathogenese vieler Krankheiten involviert, dazu zählen neben Alzheimer und Asthma auch Infektionskrankheiten [148-152]. Pin1 ist für Tumorzellen essentiell. Die Verringerung von Pin1 in humanen Krebszelllinien führt zur Arretierung des Zellzyklus und zur Einleitung der Apoptose [71, 83]. In einer Reihe von Tumoren wie Prostata-, Gebärmutterhals-, Lungen-, Darm- und Brustkrebs wurden erhöhte Expressionsraten von *PIN1* gefunden [147, 153-156]. Bei Brustkrebs unterstützt Pin1 die frühen Ereignisse bei der Tumorentwicklung [157]. *Knockdown* von Pin1 supprimiert in Prostatakrebszellen sowohl das Zellwachstum als auch die Ausbildung des kanzerogenen Phänotyps [158]. Dem Enzym wird deshalb nicht nur ein maßgeblicher Beitrag zur Entstehung, sondern auch zur Erhaltung von Prostatakrebstumoren zugeschrieben [158]. Untersuchungen an *knockout*-Mäusen konnten zeigen, dass Pin1 für die Lebensfähigkeit von Mäusen entbehrlich ist [159]. Aus den genannten Gründen wird Pin1 als Ziel für ein Medikament zur Behandlung von Krebs diskutiert und es wird nach geeigneten Pin1-Inhibitoren gesucht [157, 158, 160]. Bislang wurden zahlreiche Versuche unternommen um einen so po-

tenten Pin1-Inhibitor zu finden, wie er mit CsA für Cyclophiline bzw. FK506 für FKBP existiert [161]. Trotz des Screenings von sehr vielen Substanzen mittels speziell dafür entwickelten Hochdurchsatzverfahren oder durch strukturbasiertes Design von Molekülen konnten bislang nur wenige Substanzen als Pin1-Inhibitoren mit hoher Pin1-Affinität und Zellpermeabilität identifiziert werden [17, 162-165].

Der Naturstoff Juglon (5-Hydroxy-1,4-naphthochinon) kann aus Blättern und Fruchtschalen von Walnussbäumen (*Juglans*) isoliert werden und gilt als einer der ersten bekannten Inaktivatoren der PPIase-Aktivität von Pin1 [166]. Die inhibierende Wirkung von Juglon beruht letztlich auf einer partiellen Entfaltung des aktiven Zentrums von Pin1 und ist Folge einer irreversiblen MICHAEL-Addition der reaktiven Substanz an die Thiolgruppe von Cys¹¹³ des Enzyms [166]. Mittlerweile wurde ein anderer Naturstoff, das Polyphenol Epigallocatechingallat (EGCG), ein Flavonoid aus grünem Tee, als mikromolarer Pin1-Inhibitor (Inhibitionskonstante $K_i = 20 \mu\text{M}$) identifiziert [167]. Die Röntgenkristallstruktur des EGCG/Pin1-Komplexes lässt eine Bindung von EGCG an beide Pin1-Domänen vermuten [167]. Im Mausmodell konnte EGCG das Tumorwachstum unterdrücken [167].

Neben diesen Naturstoffen ließen sich, ausgehend von Peptidsubstraten mit niedriger *cis/trans*-Isomerisierungsbarriere in Gegenwart von Pin1, Mimetika natürlicher Peptide herstellen und als Pin1-Inhibitoren charakterisieren [168-171]. Allerdings sind phosphorylierte Serin- und Threoninreste metabolisch instabil und *in vivo* impermeabel für Zellmembranen [170, 172]. Es wurden deshalb verschiedene Strategien verfolgt, um die entsprechenden Peptide zu stabilisieren und zellpermeabel zu machen. So kann eine Maskierung der negativen Ladung die Zellpermeabilität der Substanzen erhöhen und zur Aufrechterhaltung der inhibitorischen Wirkung dieser Substanzen *in vivo* beitragen [170, 172]. Außerdem kann die Zyklisierung ein Peptid vor Proteolyse schützen und gleichzeitig die Spezifität und Affinität zu einem Bindepartner erhöhen [172, 173]. Das Spektrum von Pin1-Inhibitoren auf Peptidbasis umfasst heute deshalb lineare und zyklische, seitenkettenphosphorylierte und nichtphosphorylierte Peptide und Peptidmimetika, die teilweise eine Affinität im nanomolaren Bereich gegenüber Pin1 aufweisen [163, 172-175].

Der Komplex aus dem Peptid-Inhibitor Ac-Phe-D-Thr(PO₃H₂)-Pip-Nal-Gln-NH₂ mit Pin1 wurde mittels Röntgenkristallstrukturanalyse untersucht [175]. Der Pipecolinsäurerest (Pip) imitiert in diesem Peptid den Prolinrest eines Substrates und nimmt im Vergleich zu diesem einen größeren Raum ein [175]. Das Vorhandensein dieses Restes und die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung im Peptid zwischen dem Carbonylsauerstoff von Phe¹ und der Amidgruppe von Nal⁴ zeigt konformative Homologie zu den natürlichen zyklischen FKBP-Inhibitoren FK506 und Rapamycin [175]. Dabei ist zu bemerken, dass FKBP12 sehr hohe Affinitäten zu FK506 und Rapamycin aufweist. Für diese Interaktionen wurden Dissoziationskonstanten von $K_D = 0,4 \text{ nM}$ (FK506) bzw. $K_D = 0,2 \text{ nM}$ (Rapamycin) bestimmt und beide Substanzen inhibieren die PPIase-Aktivität von FKBP12 [176]. Im FKBP12-FK506-Komplex liegen die Ebenen des Amids und des benachbarten Ketocarbonyls von FK506 orthogonal zueinander [177]. Diese räumliche Orientierung ähnelt stark der Orientierung einer Peptidyl-Prolylbindung eines gebundenen Peptidsubstrates im postulierten Zustand des „verdrillten Amids“ bei dem die Ebene der Carbonylgruppe orthogonal zur Ebene des Prolylringes liegt (vgl. *ABBILDUNG 36*) [177]. Es wird deshalb vermutet, dass

FK506 und Rapamycin diesen Übergangszustand nachahmen und dabei insbesondere als Peptidmimetika des Leucin-Prolin-Dipeptids im Zustand des „verdrillten Amids“ fungieren [177, 178]. In Anlehnung an die funktionelle α -Ketoamidgruppe im FK506 wurden α -Ketoamide als potentielle übergangszustandsanaloge Pin1-Inhibitoren hergestellt. Die schwache Inhibierung von Pin1 durch diese Substanzen unterstützt allerdings keinen der für Pin1 vorgeschlagenen Katalysemechanismen [179].

Durch Röntgenkristallstrukturanalyse des Komplexes aus dem Peptid-Inhibitor Ac-Phe-D-Thr(PO₃H₂)-Pip-Nal-Gln-NH₂ mit Pin1 konnte die Raumgeometrie des seitenkettenphosphorylierten D-Thr² des Peptids im aktiven Zentrum der PPlase-Domäne ermittelt werden [175]. Dieser liegt in einer basischen Kavität von unerwarteter Größe [175]. Die Aminosäurereste Lys⁶³ und Arg⁶⁹ von Pin1 haben direkten Kontakt zum Phosphatrest [175]. Der Aminosäurerest von Arg⁶⁸ bleibt hingegen ungeordnet und zeigt keine direkte Interaktion zum Inhibitorpeptid [175]. Durch die Größe der Phosphatbindetasche ist eine „rollende Bewegung“ des Phosphatrestes bei der Isomerisierungsreaktion unter Aufrechterhaltung der elektrostatischen Wechselwirkung mit den basischen Seitenketten denkbar [175].

Ausgehend von der Hypothese, die Katalyse von Pin1 verlief nach dem Übergangszustandsmodell des „verdrillten Amids“, führte die Suche nach geeigneten Pin1-Inhibitoren zielgerichtet zu übergangszustandsanalogen Substanzen. Dabei rückten Aryl-1-indanylketone in den Forschungsfokus, von denen angenommen wird, diesem Kriterium zu genügen [180]. Die Grundstruktur dieser Substanzen bildet ein Keton dessen Reste von einem Aryl- bzw. Biaryl- und einem an der C₁-Position verknüpften Indanylrest gebildet werden. Formal weisen diese Verbindungen mit ihrer Ketofunktion strukturelle Äquivalenz zur Carbonylgruppe einer Peptidyl-Prolylbindung auf. Der Cyclopentenring am Indanylrest zeigt dabei Ähnlichkeit zum Prolinrest der Prolylbindung und lässt eine verdrillte Konformation zwischen dessen Ebene und der Ebene der Carbonylgruppe erwarten (*ABBILDUNG 36*) [180]. Die Bestimmung des Diederwinkels durch Kristallstrukturanalyse einer Substanz ergab einen Torsionswinkel von 92° und bestätigte die verdrillte Konformation [180]. Einige Vertreter dieser Substanzklasse erwiesen sich bereits als starke, reversible Pin1-Inhibitoren mit Inhibitionskonstanten im submikromolaren Bereich [180]. Einige Substanzen sind zellgängig und inhibierten in der Brustkrebszelllinie MCF-7 die Aktivität eines p53-Reportergens [180]. Damit zeigen Aryl-1-indanylketone biologische Aktivität und sind als Basis für die Weiterentwicklung hochaffiner zellgängiger Pin1-Inhibitoren mit biologischer Wirksamkeit geeignet.

Auch andere Substanzen können den postulierten Übergangszustand des „verdrillten Amids“ eines Pin1-Substrates simulieren und dadurch als Pin1-Inhibitoren fungieren. Für ein Peptidmimetikum auf Basis eines reduzierten Amids konnte dies durch Röntgenstrukturanalyse eines Komplexes mit Pin1 bestätigt werden [171]. Die Kristallstruktur dieses Inhibitors zeigt im Komplex mit Pin1 eine *trans*-Pyrrolidin-Konformation des Prolinringes [171]. Dieser Inhibitor weist gegenüber Pin1 eine höhere Affinität auf, als ein vergleichbares Peptidmimetikum auf Basis eines Alkenisosters in *cis*-Konformation [170, 171]. Stereoisomere der Cyclohexyl-Keton-Inhibitoren Ac-pSer- Ψ [C=OCH]-Pip-Tryptamin als Substratanaloga sind gegenüber Pin1 nur niedrigaffin und zeigen beim *Molecular modelling* ins katalytische Zentrum von Pin1 eine *trans*-diaxiale Cyclohexan-Konformation [181]. Für den Katalysemechanismus von Pin1 lässt sich deshalb eine Senkung der Isomerisierungsbarriere durch Streckung der

Substrate in eine *trans*-Pyrrolidin-Konformation vermuten, die mit einer pyramidalen Anordnung des Stickstoffatoms im Prolylring einhergeht [181].

1.4 Der MCM2-7-Komplex und die Bedeutung des *DNA replication licensing factor* MCM3

Viele Proteine, die eine Relevanz für das Fortschreiten des Zellzyklus innehaben, werden durch Pin1 reguliert [182]. Pin1 ist dadurch in viele Abläufe innerhalb des Zellzyklus involviert, zu denen auch der Replikationsprozess zählt [120, 124, 182]. Fundamental für die Zellteilung ist die vorherige exakte Replikation der DNA, die einen effizienten Mechanismus zur Entwindung der doppelsträngigen DNA bedingt [183]. Die replikative Helikase in Eukaryoten, die an den Replikationsgabeln für diesen Prozess verantwortlich ist, wird aus dem sogenannten CMG-Komplex (Cdc45-MCM-GINS) gebildet [184]. Dieser setzt sich aus drei Replikationsfaktoren zusammen, dem Cdc45-Protein und zwei Proteinkomplexen, dem MCM-Komplex (*minichromosome maintenance*) und dem GINS-Komplex (*go ichi ni san*, japanisch für *fünf, eins, zwei, drei*; tetramerer Komplex aus Cdc105, Cdc101, Cdc102 und Cdc103) [184, 185]. Der CMG-Komplex besteht damit aus insgesamt elf Proteinen (Cdc45, sechs MCM-Untereinheiten und vier GINS-Untereinheiten), deren codierende Gene über alle Gruppen der Eukaryoten konserviert sind [186, 187].

Die MCM-Proteine MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6 und MCM7 sind Adenosintriphosphatasen (ATPasen) der Superfamilie AAA+ (*ATPases associated with diverse cellular activities*) und bilden die Untereinheiten des heterohexameren MCM2-7-Komplexes (MCM2-7) [188]. Die MCM-Proteine tragen zentral eine etwa 200 Aminosäuren umfassende charakteristische ATPase-Domäne, die sogenannte MCM-Box [188]. Die MCM-Box enthält die hochkonservierten Motive für ATP-Bindung und Hydrolyse zur Bereitstellung der Energie für die Helikasefunktion: Walker A und Walker B sowie ein Arginin-Finger-Motiv [188]. Die MCM-Proteine assemblieren zu einem definierten ringförmigen Heterohexamer in einer Weise, dass die konservierten Walker-Motive eines MCM-Proteins mit dem Arginin-Finger des direkt benachbarten MCM-Proteins *in trans* aktive Zentren bilden [189]. Die einzelnen Proteine sind in der Reihenfolge MCM5-MCM3-MCM7-MCM4-MCM6-MCM2 im MCM2-7-Komplex organisiert [184, 189-191]. MCM-Proteine wurden auch in Archaeen gefunden, die jedoch häufig nur ein einzelnes MCM-Protein besitzen, das Homooligomere ausbilden kann [186, 187].

Eukaryoten besitzen auf ihren Chromosomen mehrere Replikationsursprünge (Origins) als Startpunkte der Replikation, die als Bindestellen für den Proteinkomplex ORC (*origin of recognition complex*) dienen [192]. Für die Replikation bildet sich hier während der späten M-Phase und der frühen G₁-Phase des Zellzyklus der Präreplikationskomplex aus [184]. Dazu rekrutiert der am Origin gebundene ORC zunächst das Protein Cdc6 [184, 193]. Außerdem findet die Assemblierung des MCM2-7-Komplexes statt [184]. Die anschließende Beladung des Chromatins mit dem MCM2-7-Komplex zusammen mit dem Protein Cdt1 bildet den

finalen Schritt der Formierung des Präreplikationskomplexes [184, 193]. Die Beladung des Origins mit den MCM-Proteinen erfolgt als MCM-Doppelhexamerkomplex, bei dem beide MCM-Komplexe „Kopf an Kopf“ stehen [194, 195]. In *Saccharomyces cerevisiae* werden beide Hexamere durch MCM3 zum Origin rekrutiert [196]. Dabei interagiert der Carboxy-Terminus von MCM3 mit ORC-Cdc6 und regt die ATPase-Aktivität von ORC-Cdc6 an [196]. Die ATP-Hydrolyse beeinflusst sowohl die Chromatinbeladung als auch die Chromatinentladung mit MCM2-7 [196]. Während der G₁-Phase des Zellzyklus erhöht sich sukzessive und irreversibel die chromatingebundene MCM-Proteinfraction, sodass die Mehrheit der MCM-Proteine direkt vor Beginn der S-Phase in diesem Zustand vorliegen [197]. Zwischen den Komplexuntereinheiten MCM2 und MCM5 befindet sich ein „Gate“, welches vermutlich die bei der Beladung der DNA mit dem Helikase-Komplex erforderliche Ringöffnung und Ringschließung des MCM2-7-Komplexes gewährleistet [190, 198-200].

Die Replikationsinitiation am Beginn der S-Phase geht mit der Disassemblierung des Präreplikationskomplexes und der Ausbildung des CMG-Komplexes einher [184]. Die Beladung mit MCM2-7 korreliert mit verringerter Assoziation des Origins mit ORC, Cdc6 und Cdt1 [193]. Die Assemblierung mit Cdc45 und dem GINS-Komplex führt zur Aktivierung der ATPase- und Helikase-Aktivität des MCM2-7-Komplexes [185]. Mit fortschreitender S-Phase gehen die chromatingebundenen MCM-Proteine allmählich wieder in die ungebundene Form über und dieser Prozess erfordert Replikation [197]. Durch die G₂-Phase bis zur Mitose liegen die MCM-Proteine dann ungebunden in der Zelle vor [197]. Bei Arretierung der Replikation bleiben die MCM-Proteine chromatinassoziiert [197].

Die Replikationsinitiation wird in Eukaryoten durch die Zellzykluskinasen CDK und DDK (*Dbf4/Drf1-dependent kinase*, Cdc7) kontrolliert und die Kinasen sind für die Assemblierung und Aktivierung des CMG-Komplexes erforderlich [201-205]. Der Präreplikationskomplex assembliert bei niedriger CDK-Aktivität in der späten M- und frühen G₁-Phase des Zellzyklus [205-207]. Der Helikasekomplex wird durch steigende CDK-Aktivität am Beginn der S-Phase aktiviert [201, 202]. Ein hoher CDK-Gehalt bleibt im Verlauf der S- und G₂-Phase des Zellzyklus erhalten, bis die Kinasen am Ende der M-Phase inaktiviert werden. Dies gewährleistet die einmalige Initiation der Replikation im Zellzyklusverlauf [201, 202, 208].

Verschiedene Untersuchungen beschreiben die MCM2-7-Komplexproteine als Ziele für multiple Phosphorylierungen [201, 202, 204, 209-213]. Proteinphosphorylierung von MCM3, MCM4 und einer Untereinheit des GINS-Komplexes durch die Aktivität von Chk2 (*checkpoint kinase 2*) kann den CMG-Komplex in *Drosophila melanogaster* inhibieren [209]. Auch die Assemblierung des MCM2-7-Komplexes und die Beladung des Chromatins mit diesem Komplex geschehen zellzyklusabhängig und werden durch Phosphorylierung beeinflusst [201, 202, 211]. Besondere Bedeutung kommt dabei der Komplexuntereinheit MCM3 zu [201, 202]. Dessen CDK1-abhängige Phosphorylierung an Ser¹¹² löst die Assemblierung mit den restlichen Untereinheiten des MCM-Komplexes und die folgende Chromatinbeladung aus [202]. In NIH 3T3-Zellen ist die chromatinassoziierte Menge an MCM3-Variante S112A signifikant geringer im Vergleich zum Wildtyp-Protein [202]. MCM3 stellt auch ein Substrat für Cyclin E/CDK2 dar [201]. Die Kinase kann MCM3 an Thr⁷²² phosphorylieren und diese Phosphorylierung reguliert die Chromatinbeladung des Proteins [201]. Ein Aminosäureaustausch gegen Alanin an dieser Position führt zu einer deutlich verminderten Menge an chromatinge-

bundenem MCM3 [201]. Außerdem inhibiert die Überexpression des Wildtyp-Gens, jedoch nicht die Überexpression des Mutanten-Gens den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus [201]. Ein Experiment mit HEK 293T-Zellen zeigt, dass alle vier FLAG-fusionierten MCM3-Varianten, in denen ein Aminosäureaustausch gegen Alanin in je einer der Phosphorylierungsstellen der Serin/Threonin-Prolin-Motive von MCM3 vorliegt, reduzierte Chromatinbeladung aufweisen [201]. Die Menge an chromatinassoziiertes MCM3-Variante T722A ist um über 80 % geringer im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp-Protein und zeigt innerhalb dieser Reihe die geringste Affinität zum Chromatin [201]. Außerdem kann die Inhibierung von Serin/Threonin-Kinasen durch 6-Dimethylaminopurin die Beladung des Chromatins mit *Xenopus* MCM3 unterbinden [214-216]. Die MCM2-7-Proteine zeigen sehr hohe Abundanz, die chromatinassemblierten MCM2-7-Komplexe sind jedoch nicht an direkten Replikationsorten lokalisiert, sondern zeigen eine Verteilung auf nichtreplikativer DNA. Außerdem wird die DNA mit einer größeren Menge an MCM-Hexameren beladen als Origins und ORCs existent sind. Diese Phänomene werden als sogenanntes „MCM-Paradox“ bezeichnet [208, 217].

Proteine, die bei der DNA-Replikation beteiligt sind, übernehmen zeitlich differenzierte Funktionen in verschiedenen Kompartimenten innerhalb der Zelle [218]. Dazu zählen neben Proteinen des ORC auch MCM-Proteine, die wahrscheinlich abseits ihrer Funktionen bei der DNA-Replikation noch andere Rollen innerhalb des Zellzyklus spielen [219, 220]. Das Zentrosom stellt ein Zellorganell dar, in dem Präreplikationskomplexproteine einschließlich den ORC- und MCM-Proteinen lokalisiert sind [219, 220]. Die MCM-Proteine scheinen durch den gesamten Zellteilungszyklus dort stabil gebunden zu bleiben und sind für die Regulation der Zentrosomenreduplikation verantwortlich [218, 219]. *Knockdown* oder Überexpression codierender Gene des ORC- bzw. MCM-Proteinkomplexes führt zur Fehlregulation der Zentrosomenbiogenese [218]. Ablation von MCM5 führt in CHO-Zellen (*Chinese hamster ovary*) zur Reduplikation des Zentrosoms [221]. Die Rekrutierung von MCM5 zum Zentrosom kann durch die Interaktion des Proteins mit Cyclin A bzw. Cyclin E erfolgen [221, 222]. Die Inhibierung der Zentrosomenreduplikation erfordert keine weiteren Untereinheiten des MCM-Komplexes [221, 222]. Der genaue funktionelle Mechanismus der MCM-Proteine am Zentrosom ist allerdings unklar [218]. Die Anwesenheit von Proteinen des ORC und MCM-Komplexes am Zentrosom lässt aber die Möglichkeit der zeitlichen Koordination zwischen DNA-Replikation und Chromosomensegregation zu [218].

1.5 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, neue Interaktionspartner der PPIase Pin1 zu identifizieren, eine ausgewählte Interaktion mit biochemischen Methoden zu untersuchen und den Einfluss des Enzyms auf den Interaktionspartner unter physiologischen Gesichtspunkten zu charakterisieren. Ferner sollen neue niedermolekulare Substanzen auf die Inhibierung der PPIase-Aktivität von Pin1 *in vitro* getestet werden. Darüber hinaus soll mithilfe neuer CsA-Derivate eine Methode zur Identifizierung von PPIasen in biologischen Proben entwickelt werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien, Peptide, Peptidderivate, Proteine, Inhibitoren, Oligonukleotide, Vektoren und Antikörper

2.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von SIGMA-ALDRICH, St. Louis bezogen, sofern sie nicht in *TABELLE 1* aufgeführt sind.

TABELLE 1: VERWENDETE CHEMIKALIEN UND DEREN HERSTELLER.

Bezeichnung	Hersteller
Agar	ROTH, Karlsruhe
α -Chymotrypsin	MERCK, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	SERVA ELECTROPHORESIS, Heidelberg
Ampicillin	APPLICHEM, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	MERCK, Darmstadt
Brij 35	SERVA ELECTROPHORESIS, Heidelberg
Bromphenolblau	APPLICHEM, Darmstadt
Calciumchlorid	MERCK, Darmstadt
Citrat	ROTH, Karlsruhe
<i>Complete</i> Proteaseinhibitor	ROCHE DIAGNOSTICS, Basel
Coomassie Brillant Blau R 250	ROTH, Karlsruhe
Coomassie Brillant Blau G 250	SERVA ELECTROPHORESIS, Heidelberg
Cyclosporin A (CsA)	LC LABORATORIES, Woburn
DAPI	CHEMICON INTERNATIONAL, Temecula
Dimethylsulfoxid (DMSO, <i>Uvasol</i>)	MERCK, Darmstadt
Dithiothreitol	ROTH, Karlsruhe
Essigsäure	ROTH, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	ROTH, Karlsruhe
Ethanol (<i>Uvasol</i>)	MERCK, Darmstadt
Glukose	ROTH, Karlsruhe
Glycin	MP BIOMEDICALS, Solon
Hefeextrakt	SERVA ELECTROPHORESIS, Heidelberg
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure)	APPLICHEM, Darmstadt
Immersionsöl	ROTH, Karlsruhe
Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid (IPTG)	APPLICHEM, Darmstadt
Kaliumchlorid	APPLICHEM, Darmstadt
Kanamycin	APPLICHEM, Darmstadt
Magnesiumchlorid	MERCK, Darmstadt
Milchpulver	APPLICHEM, Darmstadt
Natriumchlorid	APPLICHEM, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	APPLICHEM, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	SERVA ELECTROPHORESIS, Heidelberg
Paraformaldehyd	ROTH, Karlsruhe
PBS Tabletten	LIFE TECHNOLOGIES, Carlsbad
Pepton (enzymatischer Verdau)	SIGMA-ALDRICH, St. Louis

<i>PhosSTOP</i> Phosphataseinhibitor	ROCHE DIAGNOSTICS, Basel
Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure) PIPES	SERVA ELECTROPHORESIS, Heidelberg
<i>Rotiphorese</i> -Gel 30	ROTH, Karlsruhe
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	BACHEM, Bubendorf
Suc-Ala-Glu-Pro-Phe-pNA	BACHEM, Bubendorf
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	ROTH, Karlsruhe
Trichloressigsäure (TCA)	MERCK, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	APPLICHEM, Darmstadt
<i>Triton X-100</i>	APPLICHEM, Darmstadt
Trypsin	SERVA ELECTROPHORESIS, Heidelberg
Trypsin-EDTA-Lösung	PAA, Cölbe
<i>Tween 20</i>	SERVA ELECTROPHORESIS, Heidelberg
Wasser, destilliert, <i>Super Q</i> entionisiert	MERCK MILLIPORE, Darmstadt

2.1.2 Peptide, Peptidderivate, Proteine und Inhibitoren

Die verwendeten Peptide einschließlich der membrangebundenen Peptide und der CsA-Derivate **9** und **11** wurden von Dr. M. MALEŠEVIĆ synthetisiert. CsA-Derivat **10** wurde von Dr. V. KAHLERT synthetisiert. Humanes CypA, humanes CypB und murines CypC wurden von Dr. C. SCHIENE-FISCHER rekombinant hergestellt und gereinigt. Die Pin1-Inhibitoren wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. BRAUN der Universität Düsseldorf synthetisiert. Alle Substanzen wurden von den genannten Personen freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Oligonukleotide und Vektoren

TABELLE 2 liefert eine Übersicht zu den in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und Oligonukleotiden. Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-BIOTECH, Ebersberg bezogen. Alle im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Vektoren wurden mit üblichen molekularbiologischen Methoden (*KAPITEL 2.2*) hergestellt. Die Richtigkeit der verwendeten DNA-Sequenzen wurde durch kommerzielle DNA-Sequenzierung (MWG-BIOTECH, Ebersberg) der entsprechenden DNA-Abschnitte überprüft. Die codierende Sequenz von *MCM3* wurde durch Amplifikation des entsprechenden DNA-Abschnitts mittels Polymerase-Kettenreaktion (*KAPITEL 2.2.2*) an einer cDNA-Bibliothek erhalten. Diese cDNA-Bibliothek wurde von Dr. M. FROST aus einer mRNA-Präparation aus HeLa-Zellen hergestellt und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

TABELLE 2: VERWENDETE VEKTOREN UND OLIGONUKLEOTIDE UND DEREN HERKUNFT.

Herstellung von <i>h</i> Pin1-pET28a bzw. Pin1-PPIase	
Vektor	pET28a(+) (EMD BIOSCIENCES, Darmstadt)
kloniert von	S. HOTTENROTT
Restriktionsstellen	<i>NcoI/HindIII</i>
Antibiotikaresistenz	Kanamycin
Verwendung	Transformation in <i>E. coli</i> BL21 zur Herstellung und Reinigung von Pin1 (Pin1 ¹⁻¹⁶³) bzw. Pin1 PPIase-Domäne (Pin1 PPIase, Pin1 ⁴⁵⁻¹⁶³)
Herstellung von pPin1-WW ^{a)}	
Vektor	pGEX-4T1 (GE HEALTHCARE, Chalfont St. Giles)
Restriktionsstellen	<i>EcoRI/XhoI</i>
Primer	5' -ATAGAATTCATCGACGGGAGGGCGGACGAGGAGAAGCTG-3' 5' -TATCTCGAGTCAGCCGCTGGGCCGCTCCCA-3'
Antibiotikaresistenz	Ampicillin
Verwendung	Transformation in <i>E. coli</i> BL21 zur Herstellung von Pin1 WW mit N-terminaler GST-Fusion (GST-Xa-WW) und anschließender Reinigung von Pin1 WW (Pin1 ²⁻³⁹)
Herstellung von pEGFP-Pin1	
Vektor	pEGFP-C1 (BD BIOSCIENCES CLONTECH, Franklin Lakes)
kloniert von	S. DAUM
Restriktionsstellen	<i>XhoI/EcoRI</i>
Antibiotikaresistenz	Kanamycin, Neomycin
Verwendung	Transfektion in HeLa-Zellen zur transienten Biosynthese von Pin1 mit N-terminaler eGFP-Fusion (eGFP-Pin1)
Herstellung von pGST-Pin1 und pGST-Pin1_W34A, pGST-Pin1_K63A sowie pGST-Pin1_R68/69A ^{b)}	
Vektor	pGEX-4T (GE HEALTHCARE, Chalfont St. Giles)
kloniert von	T. STUKENBERG [223]
Antibiotikaresistenz	Ampicillin
Mutageneseprimer für pGST-Pin1_W34A:	5' -CGCCAGCCAGGCGGAGCGGCCCCAG-3' 5' -CTGGGCCGCTCCGCCTGGCTGGCG-3'
pGST-Pin1_K63A:	5' -CCTGCTGGTGGCGCACAGCCAGTC-3' 5' -GACTGGCTGTGCGCCACCAGCAGG-3'
pGST-Pin1_R68/69A:	5' -CAGCCAGTCAGCGGCCCTCGTCCTG-3' 5' -GGACGAGGGCGCCGCTGACTGGCTGTG-3'
Verwendung	Transformation in <i>E. coli</i> BL21 zur Herstellung und Reinigung von Pin1 und Pin1-Varianten mit N-terminaler GST-Fusion (GST-Pin1, GST-Pin1 W34A, GST-Pin1 K63A bzw. GST-Pin1 R68/69A)
Herstellung von pGST-WW	
Vektor	pET42_mod_TEV [224]
kloniert von	P. BAYER [224]
Restriktionsstellen	<i>NcoI/EcoRI</i>
Antibiotikaresistenz	Kanamycin
Verwendung	Transformation in <i>E. coli</i> BL21 zur Herstellung von Pin1 WW-Domäne mit N-terminaler GST-Fusion (GST-Pin1 WW)
Herstellung von pGST-PPIase	
Vektor	pGEX-5X1 (GE HEALTHCARE, Chalfont St. Giles)
kloniert von	B. HERNANDEZ
Restriktionsstellen	<i>EcoRI/XhoI</i>
Antibiotikaresistenz	Ampicillin
Verwendung	Transformation in <i>E. coli</i> BL21 zur Herstellung von Pin1 PPIase-Domäne mit N-terminaler GST-Fusion (GST-Pin1 PPIase)

Herstellung von pSuper-Pin1 ^{a)}	
Vektor	pSUPERIOR.neo+gfp (OLIGOENGINE, Seattle)
Restriktionsstellen	<i>BglII/HindIII</i>
Primer	5' -GATCCGCCGAGTGTACTACTTCAATTCAAGAGATTGAAGTAGTAC ACTCGGCTTTTTTGGAAA-3' 5' -AGCTTTTCCAAAAAGCCGAGTGTACTACTTCAATCTCTTGAATT GAAGTAGTACTACTCGGCG-3'
Antibiotikaresistenz	Ampicillin, Neomycin
Verwendung	Transfektion in HeLa-Zellen zur transienten Biosynthese von Pin1-gerichteten <i>siRNA</i> 's (RNAi gegen Pin1)
Herstellung von pHisMax-Pin1 ^{a)}	
Vektor	pcDNA4/HisMax B (LIFE TECHNOLOGIES, Carlsbad)
Restriktionsstellen	<i>EcoRI/XhoI</i>
Primer	5' -GATTAGAATTCTGCGGACGAGGAGAAG-3' 5' -CTAGACTCGAGTCACTCAGTGCGGAGG-3'
Antibiotikaresistenz	Ampicillin, Zeocin
Verwendung	Transfektion in HeLa-Zellen zur transienten Biosynthese von Pin1 mit N-terminaler Hexahistidin-Fusion (His ₆ -Pin1)
Herstellung von pFLAG-MCM3 ^{a)} und pFLAG-MCM3_S112A, pFLAG-MCM3_T464A, pFLAG-MCM3_S611A, pFLAG-MCM3_T722A sowie pFLAG2-MCM3 ^{b)}	
Vektor	pCMV-Tag2B (AGILENT TECHNOLOGIES, Santa Clara)
Restriktionsstellen	<i>EcoRI/XhoI</i>
Primer für die Klonierung	5' -ATGATAGAATTCGCGGGTACCGTGGTGCTGGACGAT-3' 5' -ATGATACTCGAGTCAGATGAGGAAGATGATGCCCTC-3'
Antibiotikaresistenz	Kanamycin, Neomycin
Mutageneseprimer für pFLAG-MCM3_S112A:	5' -CTCCAAGCACGTGCCCCGCGGACTC-3' 5' -GAGTCCGCGGGGCGACGTGCTTGGAG-3'
pFLAG-MCM3_T464A:	5' -GACCAGTATAAGGCTCCAATGGAGAAC-3' 5' -GTTCTCCATTGGAGCCTTATACTGGTC-3'
pFLAG-MCM3_S611A:	5' -CCGCCAGGACAGCTCCAGTTACAGC-3' 5' -GCTGTAAGTGGAGCTGTCCTGGCGG-3'
pFLAG-MCM3_T722A:	5' -CTCAAGTACACGCTCCAAAGACGGC-3' 5' -GCCGTCTTTGGAGCGTGTACTTGAG-3'
pFLAG2-MCM3:	5' -GATGACGACGATAAGGCCCGGGCGGAGCCCCGGGCTGCAG-3' 5' -CTGCAGCCCCGGGGCTCCGCCCCGGGCCTTATCGTCGTCATC-3'
Verwendung	Transfektion in HeLa-Zellen zur transienten Biosynthese von MCM3 und MCM3-Varianten mit N-terminaler FLAG-Fusion (FLAG-MCM3, FLAG-MCM3 S112A, FLAG-MCM3 T464A, FLAG-MCM3 S611A, FLAG-MCM3 T722A) bzw. mit modifizierter N-terminaler FLAG-Fusion (FLAG2-MCM3)
Herstellung von pEGFP-MCM3 ^{a)}	
Vektor	pEGFP-C1 (BD BIOSCIENCES CLONTECH, Franklin Lakes)
Restriktionsstellen	<i>EcoRI/XhoI</i>
Primer für die Klonierung	5' -GATCTCGAGCTGCGGGTACCGTGGTGCTG-3' 5' -TGGATGAATTCTCAGATGAGGAAGATGAT-3'
Antibiotikaresistenz	Kanamycin, Neomycin
Verwendung	Transfektion in HeLa-Zellen zur transienten Biosynthese von MCM3 mit N-terminaler eGFP-Fusion (eGFP-MCM3)

^{a)} Der entsprechende Vektor wurde im Rahmen dieser Arbeit kloniert. ^{b)} Im vorhandenen Vektor wurden im Rahmen dieser Arbeit die entsprechenden Mutationen eingeführt.

2.1.4 Antikörper

TABELLE 3: VERWENDETE ANTIKÖRPER UND DEREN HERSTELLER.

Antikörper	Antigen	Hersteller	Bezeichnung
Alexa-Fluor 546-Anti-Maus IgG		MOLECULAR PROBES, Eugene	A11003
Anti- β -Aktin	β -Aktin	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Dallas	sc-1616
Anti-BrdU	BrdU	BIOLEGEND, San Diego	317901
Anti-CypA	CypA	PAB PRODUCTION, Hebertshausen	
Anti- γ -Tubulin	γ -Tubulin	SIGMA-ALDRICH, St. Louis	T3559
Anti-GFP	GFP	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Dallas	SC-8334
Anti-FLAG	FLAG-Tag	BETHYL LABORATORIES, Montgomery	A190-102A
Anti-Histon H3	Histon H3	CELL SIGNALING TECHNOLOGY, Cambridge	#9715
Anti-MCM2	MCM2	MBL, Japan	M069-3S
Anti-MCM3	MCM3	ABD SEROTEC, Puchheim	AHP839
Anti-MCM3 (phospho-Thr ⁷²²)	MCM3 phospho-Thr ⁷²²	BIORBYT, Cambridge	orb128348
Anti-MCM4	MCM4	ABD SEROTEC, Puchheim	AHP840
Anti-MCM5	MCM5	ABD SEROTEC, Puchheim	MCA1860
Anti-MCM6	MCM6	BD BIOSCIENCES, Heidelberg	557595
Anti-MCM7	MCM7	BIOLEGEND, San Diego	602701
Anti-Pin1	Pin1	BIOGENES, Berlin	
Anti-pThr-Pro	phospho- Thr-Pro	NEW ENGLAND BIOLABS, Ipswich	#9391S
FITC-Anti-Maus IgG		SIGMA-ALDRICH, St. Louis	F9006
Peroxidase-Anti-Kaninchen IgG		SIGMA-ALDRICH, St. Louis	A6154
Peroxidase-Anti-Maus IgG		SIGMA-ALDRICH, St. Louis	A5902
Peroxidase-Anti-Ziege IgG		SIGMA-ALDRICH, St. Louis	A-5420
Rhodamin Red-X-Anti-Kaninchen IgG		MOLECULAR PROBES, Eugene	R-6394
Texas Red-Anti-Ziege IgG		SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Dallas	SC-2786

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Plasmid-Präparation

Präparationen von Plasmid-DNA erfolgten üblicherweise mithilfe des *GenElute Plasmid Miniprep Kits* (SIGMA-ALDRICH, St. Louis) nach Angaben des Herstellers. Plasmid-Präparationen im größeren Maßstab wurden nach Herstellerangaben mit dem *GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit* (SIGMA-ALDRICH, St. Louis) durchgeführt. Die Bestimmung der Konzentration der präparierten DNA geschah an einem Spektrophotometer *NanoDrop ND-1000* (PEQLAB BIOTECHNOLOGIE, Erlangen) durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm. Als Referenz diente der jeweils verwendete Puffer. Die Lagerung der präparierten DNA erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) für Klonierungen wurden mit dem *Phusion High-Fidelity PCR Kit* (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham) durchgeführt. Polymerase-Kettenreaktionen für die ortsgerichtete Mutagenese erfolgten mit dem *Pfu DNA Polymerase Kit* (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham). Polymerase-Kettenreaktionen für analytische Zwecke wurden mithilfe des *Taq DNA Polymerase Kits* (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham) durchgeführt. Sämtliche Polymerase-Kettenreaktionen erfolgten nach Protokollen des Herstellers in einem *Mastercycler gradient* (EPPENDORF, Hamburg). Zur Analyse und Reinigung der amplifizierten DNA-Zielsequenzen wurde die Methode der Agarosegel-Elektrophorese (KAPITEL 2.2.3) verwendet. Die Lagerung amplifizierter DNA-Zielsequenzen erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.3 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese wurde in einer horizontalen Trennkammer mit Netzgerät *EV-243* (BIOTEC-FISCHER, Reiskirchen) in TAE-Puffer (40 mM TRIS/HCl pH 8,0, 0,1142 % (v/v) Essigsäure, 1 mM EDTA) bei einer konstanten Spannung von 90 V durchgeführt. Hierfür wurden Agarosegele mit einer Größe von $10 \times 10\text{ cm}$ mit 0,5 – 2 % Agarose und 0,01 % (v/v) *SYBR Safe DNA Gel Stain* (INVITROGEN, Eugene) in TAE-Puffer verwendet. DNA-Proben wurden mit *Gel Loading Dye Blue (6X)* (NEW ENGLAND BIOLABS, Ipswich) versetzt. Als Referenz wurde ein DNA-Größenstandard *1 kb DNA Ladder* bzw. *100 bp DNA Ladder* (NEW ENGLAND BIOLABS, Ipswich) mitgeführt. Die Analyse der Agarosegele erfolgte an einem Geldokumentationssystem *DIANA II* (RAYTEST, Straubenhardt). Extraktion von DNA aus dem Agarosegel wurde mithilfe des *EasyPure DNA Purification Kits* (BIOZYM SCIENTIFIC, Hessisch Oldendorf) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.4 Restriktionsverdau

Restriktionsverdau von DNA für Klonierungen mittels Restriktionsendonukleasen (NEW ENGLAND BIOLABS, Ipswich) erfolgten unter Bedingungen des Herstellers, üblicherweise für 2 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Anschließend wurden die Ansätze durch Agarosegel-Elektrophorese (KAPITEL 2.2.3) analysiert und gereinigt. Danach wurde die verdaute DNA aus dem Agarosegel eluiert und für die Ligation eingesetzt. Restriktionsansätze für ortsgerichtete Mutagenesen wurden mit *DpnI* des *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kits* (AGILENT TECHNOLOGIES, Waldbronn) für 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurden $4\text{ }\mu\text{l}$ des Restriktionsansatzes direkt zur Transformation (KAPITEL 2.2.6) in *E. coli* DH5 α eingesetzt. Die Lagerung verdauter DNA erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.5 Ligation

Die Ligation von DNA für Klonierung erfolgte mithilfe der T4 DNA Ligase (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham) unter den Spezifikationsangaben des Herstellers, üblicherweise in einem Horizontalschüttler *Thermomixer comfort* (EPPENDORF, Hamburg) für 1 h bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Danach wurde der gesamte Ligationsansatz direkt zur Transformation (KAPITEL 2.2.6) in *E. coli* DH5 α eingesetzt.

2.2.6 Transformation

Die Transformation von DNA erfolgte in chemisch kompetente Zellen *E. coli* DH5 α oder *E. coli* BL21. Diese wurden von der Arbeitsgruppe SCHIENE-FISCHER bereitgestellt. Für die Transformation wurde ein bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagertes Aliquot der kompetenten Zellen für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe der zu transformierenden DNA. Die Zellen wurden anschließend für weitere 60 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock der Zellen für 90 s bei $43\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem *Thermomixer comfort* wurden die Zellen erneut für 3 min auf Eis inkubiert. Danach wurde $400\text{ }\mu\text{l}$ LB-Medium zugegeben und die Zellen für 1 h in einem *Thermomixer comfort* bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Zellen wurden schließlich auf Agarplatten mit LB-Medium und entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und diese für 16 h im Brutschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

2.3 Präparative Methoden

2.3.1 Anzucht von *Escherichia coli*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die K-12-Sicherheitsbakterienstämme *E. coli* DH5 α und *E. coli* BL21 (DE3) verwendet. Alle Arbeiten wurden an einer Sicherheitswerkbank *HERASafe* (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham) durchgeführt. Die Kultivierungen der *E. coli*-Zellen in Flüssigkulturen erfolgten je nach Maßstab in sterilen Kulturröhrchen oder in Erlenmeyerkolben. Als Kulturmedium diente steriles LB-Medium (10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl), dem das entsprechende Antibiotikum (100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin) zugesetzt wurde. Für die Herstellung von Festkulturen in Petrischalen wurden dem Medium zusätzlich 20 g/l Agar zugesetzt. Die Kulturgefäße wurden mit einer ausgeglühten Impföse mit den entsprechenden *E. coli*-Zellen angeimpft und für 16 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Festkulturen wurden in dem Inkubator *Unitherm BE 67* (UNIEQUIP, Martinsried) inkubiert. Flüssigkulturen wurden in einem Inkubationsschüttler *Innova 4330* (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, Edison) bei 200 U/min schüttelnd inkubiert.

Für die Anzucht von *E. coli*-Zellen zur Proteinherstellung wurden Erlenmeyerkolben mit je 1 l LB-Medium und entsprechendem Antibiotikum mit je 50 ml einer Vorkultur angeimpft. Diese Hauptkulturen wurden dann so lange kultiviert, bis die optische Dichte bei 600 nm einen Wert zwischen 0,5 und 0,7 erreicht hatte. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte an einem UV/VIS-Spektrophotometer *Novaspec II* (PHARMACIA LKB BIOTECHNOLOGY, Uppsala) in Einmalküvetten aus Acryl (SARSTEDT, Nümbrecht) mit Schichtdicken von 1 cm. Die Genexpression wurde zu diesem Zeitpunkt durch Zusetzen von 1 mM IPTG induziert. Die Hauptkulturen wurden dann für 4 h weiterkultiviert. Die Zellen wurden schließlich durch Zentrifugation in der Zentrifuge *Sorvall RC 5B Plus* (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham) mit dem Rotor *SLA-3000* (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham) pelletiert (6000 U/min, 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Das Zellpellet wurde bis zu dessen Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.3.2 Aufschluss von *Escherichia coli*-Zellen für Proteinpräparation

Für den Zellaufschluss wurden üblicherweise 8 g *E. coli*-Pellet auf Eis mit 50 ml des jeweiligen Lysepuffers versetzt und eine Zellsuspension hergestellt. Der Zellaufschluss erfolgte anschließend mechanisch mit dem Hochdruckzellaufschlussystem *TS 0.75* (CONSTANT SYSTEMS LIMITED, Daventry) bei einer Temperatur von 4 °C und einem Druck von 2,5 kbar. Dieser Arbeitsschritt wurde einmal wiederholt. Danach wurde das Lysat in einer Ultrazentrifuge *Sorvall WX 100 Ultra* (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham) mit dem Rotor *T-647.5* (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham) pelletiert (35000 U/min, 15 min, 4 °C).

2.3.3 Präparation von Pin1 und Pin1 PPIase

Die mechanischen Aufschlüsse der *E. coli*-Zellen erfolgten in Lysepuffer 10 mM HEPES pH 7,2, 1 mM DTT. Die gesamten Reinigungsprozeduren erfolgten bei 4 °C. Die Reinigung von Pin1 (Pin1¹⁻¹⁶³) bzw. Pin1 PPIase (Pin1⁴⁵⁻¹⁶³) aus dem Überstand des *E. coli*-Lysats nach der Ultrazentrifugation erfolgte mittels Säulenchromatographien in drei Trennschritten. Detaillierte Beschreibungen zu den verwendeten Chromatographiesäulen und den Bedingungen der einzelnen Trennungen finden sich in *TABELLE 4*.

TABELLE 4: BEDINGUNGEN DER SÄULENCHROMATOGRAPHIEN FÜR DIE PRÄPARATION VON PIN1 BZW. PIN1 PPIASE.

Trennschritt 1 – Anionenaustauschchromatographie	
Säulenmaterial	<i>Fractogel EMD-DEAE-650(M)</i> (MERCK, Darmstadt)
Säulenvolumen	70 ml
Flussgeschwindigkeit	2 ml/min
Laufpuffer	10 mM HEPES pH 7,2, 1 mM DTT
Trennschritt 2 – Kationenaustauschchromatographie	
Säulenmaterial	S-Sepharose (AMERSHAM PHARMACIA, Uppsala)
Säulenvolumen	30 ml
Flussgeschwindigkeit	1,5 ml/min
Laufpuffer	10 mM HEPES pH 7,2, 1 mM DTT
Elutionspuffer	Laufpuffer, 1 M NaCl
Gradientvolumen	200 ml
Fraktionsvolumen	1,5 ml
Trennschritt 3 – Größenausschlusschromatographie	
Säulenmaterial	<i>HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade</i> (AMERSHAM PHARMACIA, Uppsala)
Säulenvolumen	120 ml
Flussgeschwindigkeit	0,8 ml/min
Laufpuffer	10 mM HEPES pH 7,8, 150 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
Fraktionsvolumen	1,5 ml

Die Analysen nach den einzelnen Reinigungsschritten erfolgten mittels SDS-PAGE (*KAPITEL 2.4.2*) und 15-prozentigen SDS-PA-Gelen. Zunächst wurde das Rohextrakt auf eine mit Laufpuffer äquilibrierte Anionenaustauschsäule aufgetragen. Dieser Trennschritt wurde an einem *Chromatographie-System LKB* (AMERSHAM PHARMACIA, Uppsala) durchgeführt. Unter den gewählten Bedingungen band Pin1 bzw. Pin1 PPIase nicht an die Säulenmatrix und befand sich im Durchlauf der Säule. Dieser wurde gesammelt und auf eine mit Laufpuffer äquilibrierte Kationenaustauschsäule gegeben. Dieser Trennschritt wurde an einem *FPLC*-

System (AMERSHAM PHARMACIA, Uppsala) durchgeführt. Pin1 bzw. Pin1 PPIase band an die Säulenmatrix. Die Säule wurde mit zehn Säulenvolumina Laufpuffer gespült. Danach wurde Pin1 bzw. Pin1 PPIase durch den Elutionspuffer von der Säulenmatrix eluiert. Die Elutionsfraktionen, die Pin1 bzw. Pin1 PPIase enthielten, wurden vereinigt. Die Proteinlösung wurde anschließend mit einer Ultrafiltrationseinheit *Vivaspin 20* (SARTORIUS, Göttingen) mit einem Molekulargewichtsausschluss von 5 kDa bis zu einem Volumen von 2 ml konzentriert. Diese Lösung wurde final durch Größenausschlusschromatographie an einem *ÄKTAprime*-System (GE HEALTHCARE, Chalfont) getrennt. Pin1 eluierte bei einem Retentionsvolumen von 80 ml. Pin1 PPIase eluierte bei einem Retentionsvolumen von 86 ml. Die Pin1 bzw. Pin1 PPIase enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt. Die Proteinlösung wurde erneut konzentriert. Die finale Analyse der gereinigten Proteine mittels SDS-PAGE lieferte einzelne Banden im SDS-PA-Gel nach der Coomassie-Färbung (ABBILDUNG 43A bzw. ABBILDUNG 44A). Die Identität der Proteine wurden durch Massenspektrometrie belegt (TABELLE 17). Die Konzentrationen der gereinigten Proteinlösungen wurden spektrophotometrisch bestimmt (KAPITEL 2.4.1). Die Lösungen wurden aliquotiert. Die Lagerungen erfolgten bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mithilfe des proteasefreien PPIase-Assays wurden die PPIase-Aktivitäten der rekombinant hergestellten Proteine nachgewiesen (ABBILDUNG 43B bzw. ABBILDUNG 44B). Die Proteine wurden außerdem mittels CD-Spektroskopie charakterisiert (ABBILDUNG 43C, D bzw. ABBILDUNG 44C). Die Fern-UV-CD-Spektren von nativem und thermisch denaturiertem Pin1 sowie dessen thermische Stabilität stimmen gut mit den bereits publizierten Daten überein, Pin1 zeigt keine Reversibilität nach thermischer Denaturierung [225-227].

2.3.4 Präparationen von Pin1 WW

Der mechanische Aufschluss der *E. coli*-Zellen erfolgte in Lysepuffer (50 mM TRIS/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 1 mM DTT, 1 Tablette/50 ml *Complete* Proteaseinhibitor). Die gesamte Reinigungsprozedur von Pin1 WW (Pin²⁻³⁹) aus dem Überstand des *E. coli*-Lysats nach Ultrazentrifugation erfolgte bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die zwei säulenchromatographischen Trennschritte wurden an einem *ÄKTAprime*-System (GE HEALTHCARE, Chalfont) durchgeführt. Detaillierte Angaben zu den dabei verwendeten Bedingungen finden sich in TABELLE 5. Die Analysen nach den einzelnen Reinigungsschritten erfolgten mittels SDS-PAGE (KAPITEL 2.4.2) und 15-prozentigen SDS-PA-Gelen. Zunächst wurde das Rohextrakt auf eine mit Laufpuffer äquilibrierte GST-Affinitätschromatographiesäule aufgetragen. Pin1 WW mit N-terminaler GST-Fusion (GST-Xa-WW) band an die Säulenmatrix. Die Säule wurde mit zehn Säulenvolumina Laufpuffer gespült. Danach wurde das Fusionsprotein GST-Xa-WW durch den Elutionspuffer von der Säulenmatrix eluiert. Die Elutionsfraktion, die GST-Xa-WW enthielt, wurde anschließend mit einer Ultrafiltrationseinheit *Centricon 3000* (MERCK MILLIPORE, Darmstadt) mit einem Molekulargewichtsausschluss von 3 kDa bis zu einem Volumen von 5 ml konzentriert. Die Proteinlösung wurde dann mit $100\text{ }\mu\text{g}$ *Factor Xa Protease* (NEW ENGLAND BIOLABS, Ipswich) versetzt und für 18 h bei Raumtemperatur inkubiert um die GST-Fusion abzuspalten. Der gesamte Ansatz wurde final durch Größenausschlusschromatographie getrennt. Pin1 WW eluierte bei einem Retentionsvolumen von 221 ml. Die Fraktionen, die Pin1 WW enthielten wurden vereinigt und konzentriert. Die Analyse des gereinigten Proteins mittels SDS-PAGE lieferte eine einzelne Bande im SDS-PA-Gel

nach der Coomassie-Färbung (*ABBILDUNG 44A*). Die Identität des Proteins wurde durch Massenspektrometrie belegt (*TABELLE 17*). Die Konzentration der gereinigten Proteinlösung wurden spektrophotometrisch bestimmt. Die Proteinlösung wurde aliquotiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Pin1 WW wurde außerdem mittels CD-Spektroskopie charakterisiert (*ABBILDUNG 44C*). Das Fern-UV-CD-Spektrum von nativer WW-Domäne stimmt gut mit bereits publizierten Daten überein [228].

TABELLE 5: BEDINGUNGEN DER SÄULENCHROMATOGRAPHIEN FÜR DIE PRÄPARATION VON PIN1 WW.

Trennschritt 1 – GST-Affinitätschromatographie	
Säulenmaterial	Glutathion-Sepharose 4B (GE HEALTHCARE, Chalfont)
Säulenvolumen	3 ml
Flussgeschwindigkeit	0,8 ml/min
Laufpuffer	50 mM TRIS/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl ₂ , 1 mM DTT
Elutionspuffer	Laufpuffer, 10 mM Glutathion
Fraktionsvolumen	5 ml
Trennschritt 2 – Größenausschlusschromatographie	
Säulenmaterial	HiLoad 26/60 Superdex 30 prep grade (AMERSHAM PHARMACIA, Uppsala)
Säulenvolumen	318 ml
Flussgeschwindigkeit	2,5 ml/min
Laufpuffer	50 mM TRIS/HCl pH 7,2, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT
Fraktionsvolumen	8 ml

2.3.5 Präparationen von GST-Pin1 und GST-Pin1-Varianten

Die mechanischen Aufschlüsse der *E. coli*-Zellen erfolgten in Lysepuffer 20 mM HEPES pH 7,4, 50 mM NaCl. Die gesamten Reinigungsprozeduren erfolgten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Reinigungen von GST-Pin1 und der GST-Pin1-Varianten aus den Überständen der *E. coli*-Lysate nach den Ultrazentrifugationen erfolgten in zwei Trennschritten. Detaillierte Angaben zu den dabei verwendeten Bedingungen finden sich in *TABELLE 6*. Die Analysen der einzelnen Reinigungsschritte erfolgten mittels SDS-PAGE und 12,5-prozentigen SDS-PA-Gelen. Für die GST-Affinitätschromatographie wurden Einwegtropfsäulen aus Polypropylen (PIERCE, Rockford) verwendet. Die Rohextrakte wurden auf die mit Laufpuffer äquilibrierten Säulen geladen. Die GST-fusionierten Proteine banden an die Säulenmatrizes. Die Säulen wurden mit zehn Säulenvolumina Laufpuffer gespült. Danach wurden die GST-fusionierten Proteine durch Elutionspuffer von den Säulenmatrizes eluiert. Die Elutionsfraktionen, die die GST-fusionierten Proteine enthielten, wurden vereinigt. Die Proteinlösungen wurden anschließend in Ultrafiltrationseinheiten *Vivaspin 20* mit Molekulargewichtsausschlüssen von 10 kDa bis zu einem Volumen von 2 ml konzentriert. Die Lösungen wurden final durch Größenausschlusschromatographien an einem *ÄKTAprime*-System getrennt. GST-Pin1 und die GST-Pin1-Varianten eluierten bei einem Retentionsvolumen von 54 ml. Die Fraktionen, die GST-fusionierte Proteine enthielten, wurden vereinigt. Die Proteinlösungen wurden danach erneut konzentriert. Die Analysen der gereinigten Proteine mittels SDS-PAGE lieferten jeweils einzelne Banden im SDS-PA-Gel nach der Coomassie-Färbung (*ABBILDUNG 45A*). Die Identitäten der Proteine wurden durch Massenspektrometrie belegt (*TABELLE 17*). Die Konzentrationen

nen der gereinigten Proteinlösungen wurden spektrophotometrisch bestimmt. Die Lösungen wurden aliquotiert. Die Lagerungen erfolgten bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

TABELLE 6: BEDINGUNGEN DER SÄULENCHROMATOGRAPHIEN FÜR DIE PRÄPARATIONEN VON GST-PIN1 UND DER GST-PIN1-VARIANTEN GST-PIN1 W34A, GST-PIN1 K63A UND GST-PIN1 R68/69A.

Trennschritt 1 – GST-Affinitätschromatographie	
Säulenmaterial	Glutathion-Sepharose 4B (GE HEALTHCARE, Chalfont)
Säulenvolumen	2 ml
Laufpuffer	20 mM HEPES pH 7,4, 50 mM NaCl
Elutionspuffer	Laufpuffer, 10 mM Glutathion
Fraktionsvolumen	2 ml
Trennschritt 2 – Größenausschlusschromatographie	
Säulenmaterial	HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade (AMERSHAM PHARMACIA, Uppsala)
Säulenvolumen	120 ml
Flussgeschwindigkeit	0,8 ml/min
Laufpuffer	10 mM HEPES pH 7,8, 150 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
Fraktionsvolumen	2 ml

2.3.6 Erhaltung und Kultivierung von HeLa-Zellen

Die dauerhafte Kultivierung der humanen Krebszelllinie HeLa [229] als adhärenente Monolayerkulturen geschah üblicherweise in Zellkulturflaschen mit Schraubverschlüssen mit Wachstumsflächen von 75 cm^2 (TPP, Trasadingen). Kurzzeitige Kultivierungen der Zellen für experimentelle Ansätze wurden auch in Zellkulturflaschen mit Schraubverschlüssen mit Wachstumsflächen von 150 cm^2 (TPP, Trasadingen) oder Zellkulturtestplatten mit sechs Kallotten (TPP, Trasadingen) durchgeführt. Als Kulturmedium diente *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM *high glucose*, PAA, Cölbe) mit 9 % (v/v) fötalem Rinderserum (PAA, Cölbe). Es wurde dabei immer ein der Wachstumsfläche entsprechendes Volumen an Medium eingesetzt. Die Zellen in einer 75 cm^2 -Zellkulturflaschen wurden in 15 ml Medium kultiviert. Die Kultivierung erfolgte im CO_2 -Inkubator *Heracell* (HERAEUS, Waltham) bei einer Temperatur von $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 8,5 % (v/v) CO_2 und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 96 % (v/v). Alle Arbeiten wurden an einer Sicherheitswerkbank *HERAsafe* (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham) durchgeführt.

2.3.7 Passagieren von HeLa-Zellen

Die Subkultivierung wurde zu einem Zeitpunkt durchgeführt, bei dem die Zellkultur noch nicht vollständige Konfluenz erreicht hatte. Die HeLa-Zellen einer 75 cm^2 -Zellkulturflasche wurden zunächst einmal mit 10 ml PBS (10 mM Natriumphosphat pH 7,45, 140 mM NaCl, 2,68 mM KCl) gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung (PAA, Cölbe) auf die Zellen gegeben und diese für 3 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Danach wurde 9 ml Medium hinzugefügt und die von der Wachstumsfläche abgelösten Zellen suspendiert. Schließlich wurde 1 ml dieser Zellsuspension in eine neue, mit 14 ml frischem Medium gefüllte 75 cm^2 -Zellkulturflasche überführt.

2.3.8 Transfektion und Co-Transfektion von HeLa-Zellen

Die Transfektion der HeLa-Zellen erfolgte üblicherweise mit der Calciumphosphat-Methode [230]. HeLa-Zellen wurden in Zellkulturflaschen oder Zellkulturtestplatten ausgesät und am darauffolgenden Tag bei einer Konfluenz von etwa 80 % transfiziert. Zur Herstellung der Transfektionslösung für eine Kalotte einer Zellkulturtestplatte mit sechs Kalotten wurden hierfür 8 µg der zu transfizierenden DNA mit 12,5 µl 2 M Calciumchloridlösung gemischt und mit sterilem Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Zu dieser Lösung wurden 100 µl Präzipitationspuffer (50 mM HEPES pH 7,05, 280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM NaH₂PO₄, 12 mM Glukose) gegeben. Diese Transfektionslösung wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend direkt ins Kulturmedium der Zellen gegeben. Die Menge der Transfektionslösung wurde der Wachstumsfläche entsprechend angepasst. Für Co-Transfektionen wurden die verschiedenen DNAs gemischt und die Transfektionsansätze entsprechend vergrößert. Die Zellen wurden für 18 h unter Kulturbedingungen inkubiert, anschließend dreimal mit PBS gewaschen, mit frischem Medium versorgt und weiter inkubiert. Die Zellernte erfolgte zwischen 48 h und 72 h nach Transfektion. Die Transfektion von HeLa-Zellen mittels *Lipofectamine 2000* (INVITROGEN, Carlsbad) erfolgte nach Herstellerangaben. Zur Herstellung der Transfektionslösung für eine Kalotte einer Zellkulturtestplatte mit sechs Kalotten wurden 4 µg zu transfizierende DNA verwendet. Die Zellernte erfolgte zwischen 48 h und 72 h nach Transfektion. Für Co-Transfektionen wurden die verschiedenen Plasmid-DNAs gemischt und die Transfektionsansätze entsprechend vergrößert.

2.3.9 Synchronisierung von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden in einer 75 cm²-Zellkulturflasche oder einer Zellkulturtestplatte mit sechs Kalotten ausgesät und für 18 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und durch frisches Medium mit 2 mM Thymidin ersetzt. Die Zellen wurden für 24 h inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Medium ohne Thymidin inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und frisches Medium zugegeben. Anschließend erfolgte die Zellernte zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Proben wurden per Western Blot oder Durchflusszytometrie analysiert. Für Zellen, welche vor der Zellzyklusblockierung transfiziert wurden, erfolgte die Transfektion mit entsprechenden Vektoren 48 h vor der Blockierung mit *Lipofectamine 2000* in Zellkulturtestplatten mit sechs Kalotten. Die Blockierung erfolgte durch Inkubation der Zellen für 24 h in Medium dem 5 µg/ml Aphidicolin bzw. 2 mM Thymidin zugesetzt war. Für die Blockierung der Zellen mit 0,4 µg/ml Nocodazol in Medium erfolgte diese Inkubation für 20 h. Die Agenzien wurden dafür in DMSO gelöst und in einer Verdünnung von 1 : 1000 direkt ins Medium gegeben. Kontrollzellen wurde die entsprechende Menge DMSO zugesetzt. Die Zellen wurden nach der Blockierung mit PBS gewaschen, geerntet und Proben für die Chromatinfractionierung und Analyse mittels Western Blot vorbereitet.

2.3.10 Cycloheximid-Behandlung von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden in Zellkulturtestplatten mit sechs Kalotten ausgesät und mithilfe der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit

200 µg/ml Cycloheximid (CHX) inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe von CHX (0 h bis 24 h) geerntet und lysiert. CHX wurde aus einer Stammlösung in DMSO direkt ins Wachstumsmedium gegeben. Die finale DMSO-Konzentration betrug 0,2 % (v/v). Die Zellyse erfolgte mittels Lysepuffer (PBS, 1 % (v/v) NP40, 1 Tablette/50 ml *Complete* Proteaseinhibitor).

2.3.11 Staurosporin-Behandlung von HeLa-Zellen

Um in HeLa-Zellen Apoptose auszulösen, wurden diese 60 h nach der Transfektion für 4 h mit Staurosporin inkubiert. Staurosporin wurde in finalen Konzentrationen zwischen 0 µM und 4 µM aus einer Stammlösung in DMSO ins Wachstumsmedium gegeben. Die finale DMSO-Konzentration betrug 1 % (v/v). Anschließend wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Zellyse erfolgte mittels Detergens im Lysepuffer.

2.3.12 HeLa-Zellernte und die Herstellung von HeLa-Zellysaten

Erfolgte der Zellaufschluss durch Detergens im Lysepuffer, wurden die HeLa-Zellen einer 75/150 cm²-Zellkulturflasche zunächst zweimal mit 10 ml bzw. 20 ml PBS gewaschen. Die HeLa-Zellen einer Zellkulturtestplatte mit sechs Kalotten wurden zunächst je zweimal mit 2 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde die Flüssigkeit über den Zellen mit Pasteurpipetten aus Glas (ROTH, Karlsruhe) vollständig abgesaugt. Danach wurde der entsprechende Lysepuffer zugegeben (600 µl bzw. 1 ml bei einer 75/150 cm²-Zellkulturflasche; je 100 µl bei einer Zellkulturtestplatte mit sechs Kalotten) und die Wachstumsfläche wurde damit vollständig benetzt. Falls nicht anders angegeben, diente als Lysepuffer 20 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) NP40, 1 Tablette/50 ml *Complete* Proteaseinhibitor, 1 Tablette/10 ml *PhosSTOP* Phosphataseinhibitor. Nach einer Inkubationszeit von 1 min wurden die Zellen unter Zuhilfenahme eines Zellschabers entsprechender Größe (TPP, Trasadingen) von der Wachstumsfläche abgeschabt und die Suspension in ein entsprechendes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min auf Eis erfolgte die Zentrifugation der Suspension (13000 U/min, 15 min, 4 °C) in der *Biofuge fresco* (HERAEUS, Hanau) mit dem Rotor #3325B (HERAEUS, Hanau). Danach wurde der Überstand in ein entsprechendes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis aufbewahrt.

Erfolgte der Zellaufschluss mechanisch, wurden die Zellen wie unter *KAPITEL 2.3.7* beschrieben mithilfe von Trypsin von der Wachstumsfläche gelöst. Nach der Zugabe von Medium wurden die Zellen suspendiert, in ein entsprechendes Reaktionsgefäß überführt und in der Zentrifuge *Megafuge 1.0RS* (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham) mit dem Rotor #7570 D (HERAEUS, Hanau) pelletiert (300 g, 5 min, 20 °C). Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen und mit dem entsprechenden Volumen Lysepuffer versetzt und suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte danach auf Eis mit Ultraschall an einem *Sonifier W-250 D* (BRANDSON, Danbury). Am Gerät wurden dafür die Einstellungen Pulszeit: 1 s, Pausenzeit: 9 s, Gesamtpulszeit: 10 s, Amplitude: 30 % vorgenommen. Es folgte die Zentrifugation der Suspension (13000 U/min, 15 min, 4 °C) in der *Biofuge fresco* mit dem Rotor #3325B. Der Überstand wurde in ein entsprechendes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung auf Eis aufbewahrt.

2.3.13 Dephosphorylierung von HeLa-Zelllysats

Die HeLa-Zellen einer 75 cm²-Zellkulturflasche wurden geerntet und das Lysat nach mechanischem Aufschluss der Zellen in Dephosphorylierungspuffer (50 mM HEPES pH 7,5, 10 mM NaCl, 1 mM MnCl₂, 2 mM DTT, 0,01 % (v/v) Brij 35) wie unter *KAPITEL 2.3.12* beschrieben präpariert. 150 µl des Zelllysats wurden 1 : 10 mit Dephosphorylierungspuffer verdünnt. Die Ansätze mit je 540 µl dieser Lösung wurden mit 6000 U Lambda-Proteinphosphatase (NEW ENGLAND BIOLABS, Ipswich) bzw. mit *PhosSTOP* Phosphataseinhibitor (1 Tablette/10 ml) versetzt und auf 605 µl mit Dephosphorylierungspuffer aufgefüllt. Die Ansätze wurden anschließend für 2 h bei 30 °C in einem Horizontalschüttler *Thermomixer comfort* (EPPENDORF, Hamburg) bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 450 U/min inkubiert. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt (13000 U/min, 10 min, 4 °C) in der *Biofuge fresco* mit dem Rotor #3325B. Die Überstände wurden direkt für nachfolgende Experimente eingesetzt.

2.3.14 Chromatinfractionierung

Die Methode folgte im Prinzip dem Protokoll von LIN *et al.* [202]. Nach dem Ablösen der HeLa-Zellen von der Wachstumsfläche mit Trypsin wurden diese in Chromatinfractionierungspuffer (10 mM PIPES pH 7,0, 100 mM NaCl, 300 mM Sucrose, 3 mM MgCl₂, 0,5 % (v/v) Triton X-100, 1 Tablette/50 ml *Complete* Proteaseinhibitor, 1 Tablette/10 ml *PhosSTOP* Phosphataseinhibitor) lysiert und anschließend für 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation des Zelllysats (2000 U/min, 5 min, 4 °C) in der *Biofuge fresco* mit dem Rotor #3325B wurde der Überstand als lösliche Fraktion gewonnen und entweder für die SDS-PAGE vorbereitet (*KAPITEL 2.4.2*) oder für nachfolgende Experimente auf Eis aufbewahrt. Das Pellet wurde zweimal mit Benzonasepuffer (50 mM TRIS/HCl pH 8,0, 1 mM MgCl₂) gewaschen. Anschließend erfolgte in Benzonasepuffer ein Verdau mit *Benzonase* Nuclease (NOVAGEN, San Diego) nach Herstellerangaben in einem Horizontalschüttler *Thermomixer comfort* bei 600 U/min für 30 min bei 37 °C. Nach Zentrifugation der Probe (13000 U/min, 15 min, 4 °C) wurde der erhaltene Überstand als Chromatinfraction gewonnen und entweder für die SDS-PAGE vorbereitet oder für nachfolgende Experimente auf Eis aufbewahrt.

2.3.15 Präparationen von FLAG-MCM3

HeLa-Zellen von sechs 150 cm²-Zellkulturflaschen wurden mittels Calciumphosphat-Methode mit dem Vektor pFLAG-MCM3 transfiziert und 60 h nach der Transfektion geerntet. Der Zellaufschluss geschah in Lysepuffer (50 mM TRIS/HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % (v/v) Triton X-100, 1 Tablette/50 ml *Complete* Proteaseinhibitor, 1 Tablette/50 ml *PhosSTOP* Phosphataseinhibitor). Die gesamte Reinigungsprozedur erfolgte bei 4 °C. Die Affinitätsreinigung erfolgte in einer Einwegtropfsäule aus Polypropylen (PIERCE, Rockford) nach den Angaben des Herstellers der Affinitätsmatrix (SIGMA-ALDRICH, St. Louis). Detaillierte Angaben zu den Bedingungen finden sich in *TABELLE 7*. Die Analyse der Reinigung erfolgte mittels SDS-PAGE und 7,5-prozentigem SDS-PA-Gel.

TABELLE 7: BEDINGUNGEN DER FLAG-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE FÜR DIE PRÄPARATIONEN VON FLAG-MCM3.

FLAG-Affinitätschromatographie	
Säulenmaterial	ANTI-FLAG M2 Affinity Gel (SIGMA-ALDRICH, St. Louis)
Säulenvolumen	0,5 ml
Laufpuffer	50 mM TRIS/HCl pH 7,4, 150 mM NaCl
Elutionspuffer	Laufpuffer mit 100 µg/ml FLAG-Peptid (SIGMA-ALDRICH, St. Louis)
Fraktionsvolumen	0,5 ml

2.3.16 5-Bromo-2-deoxyuridin-Inkorporationsassay

Die mit der Calciumphosphat-Methode (KAPITEL 2.3.8) transfizierten HeLa-Zellen einer Zellkulturtestplatte mit sechs Kalotten wurden 48 h nach der Transfektion für 2 h in 20 µM 5-Bromo-2-deoxyuridin (BrdU) in Medium inkubiert. Nicht transfizierte HeLa-Zellen wurden gleichbehandelt. Die Zellen wurden danach für die Konfokalmikroskopie vorbereitet (KAPITEL 2.4.12) oder trypsiniert (KAPITEL 2.3.7) und Proben mittels Western Blot (KAPITEL 2.4.3) bzw. Durchflusszytometrie (KAPITEL 2.4.13) analysiert.

2.3.17 Pull-down

Die *E. coli* BL21-Zelllysate welche GST bzw. GST-Fusionsproteine enthielten, wurden wie in KAPITEL 2.3.2 beschrieben präpariert und für die *pull-down*-Experimente eingesetzt. Die mechanischen Aufschlüsse der *E. coli*-Zellen erfolgten in Lysepuffer 20 mM HEPES pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 Tablette/50 ml *Complete* Proteaseinhibitor. Die verwendeten HeLa-Zelllysate wurden wie in KAPITEL 2.3.12 beschrieben frisch präpariert und für die *pull-down*-Experimente eingesetzt.

Für *pull-down*-Experimente mit GST bzw. GST-Fusionsproteinen bei denen die Proben anschließend massenspektrometrisch analysiert wurden, erfolgte die Durchführung unter Verwendung eines ÄKTaprime-Systems mit der Säule *GSTrap FF* (GE HEALTHCARE, Chalfont) mit einem Säulenvolumen von 1 ml bei einer Temperatur von 4 °C. Diese Experimente wurden freundlicherweise von Dr. S. MATHEA durchgeführt. Die Experimente erfolgten bei einer konstanten Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min. Auf die mit Bindungspuffer A (20 mM HEPES pH 7,4, 50 mM NaCl, 0,1 % (v/v) NP40) äquilibrierte Säule wurden 10 ml *E. coli*-Zelllysate, welches GST oder GST-Fusionsprotein enthielt, geladen. Die Säule wurde mit Bindungspuffer A gespült, bis die Absorption bei 280 nm des Durchlaufs kleiner als 1 mAU war. Danach wurden 5 ml des HeLa-Zelllysats auf die Säule gegeben. Die Säule wurde mit Bindungspuffer A gespült. Sobald die Absorption bei 280 nm des Durchlaufs kleiner als 15 mAU war, erfolgte die Elution mit Elutionspuffer A (10 mM Glutathion in Bindungspuffer A). Dabei wurden Fraktionen mit einem Volumen von 0,5 ml gesammelt. Die Fraktion mit der maximalen Absorption bei 280 nm wurde mittels SDS-PAGE separiert und anschließend massenspektrometrisch analysiert.

Für *pull-down*-Experimente mit GST bzw. GST-Fusionsproteinen, bei denen die Proben anschließend für eine Western-Blot-Analyse verwendet wurden, erfolgte die Durchführung unter Verwendung von je 60 µl Glutathion-Sepharose-Suspension (Glutathion-Sepharose 4B, GE HEALTHCARE, Chalfont) parallel in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einem *Thermomixer comfort* bei einer Temperatur von 10 °C. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei einer

konstanten Schüttelgeschwindigkeit von 1000 U/min. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Ansätze in einer Zentrifuge *Biofuge fresco* mit dem Rotor #3325B zentrifugiert (2000 U/min, 2 min, 4 °C) und die Flüssigkeiten über den Glutathion-Sepharose-Matrizes durch Absaugen mit Kanülen *Sterican* (B. BRAUN, Melsungen) entfernt. Zunächst wurden die Glutathion-Sepharose-Matrizes für 5 min mit 0,5 ml Wasser gewaschen und anschließend für 5 min mit 0,5 ml Bindungspuffer B (20 mM HEPES pH 7,4, 50 mM NaCl) äquilibriert. Danach wurden Matrizes mit 0,5 ml *E. coli*-Zelllysats welches GST bzw. GST-Fusionsprotein enthielt, für 1 h inkubiert. Die Matrizes wurden dann dreimal 5 min mit je 1 ml Bindungspuffer B gewaschen. Danach wurde je 1 ml des HeLa-Zelllysats auf die Matrizes gegeben und diese für 1 h inkubiert. Es folgte ein Waschschriff mit 1 ml Bindungspuffer B für 5 min. Danach wurden die Ansätze mit 50 µl Elutionspuffer B (50 mM Glutathion in Bindungspuffer B) versetzt und für 10 min inkubiert. Proben des HeLa-Zelllysats und der Elutionen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Für *pull-down*-Experimente mit immobilisierten CsA-Derivaten erfolgte die Durchführung bei Raumtemperatur unter Verwendung von je 200 µl Streptavidin-Agarose-Suspension (EMD CHEMICALS, Gibbstown) parallel in 15 ml-Reaktionsgefäßen in einem Überkopfschüttler bei Raumtemperatur. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Ansätze in einer Zentrifuge *Megafuge 1.0RS* mit dem Rotor #7570 D zentrifugiert (300 g, 5 min, 20 °C) und die Flüssigkeiten über den Matrizes durch Absaugen mit Kanülen *Sterican* entfernt. Die Matrizes wurden zweimal mit je 1 ml Wasser und Bindungspuffer C (10 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl) gewaschen. Stammlösungen der entsprechenden CsA-Derivate (1 mM in DMSO) wurden mit Bindungspuffer C verdünnt und so 20 µM CsA-Derivat-Lösungen hergestellt. Die Streptavidin-Agarose-Matrizes wurden für 1 h mit 4 ml dieser Lösungen inkubiert. Als Kontrolle dienten Streptavidin-Agarose-Matrizes, welche parallel mit 4 ml einer entsprechenden DMSO-Lösung in Bindungspuffer C inkubiert wurden. Nach zweimaligem Waschen der Matrizes in Bindungspuffer C wurden diese für 30 min entweder mit 1 ml einer Lösung von 0,25 µM rekombinantem CypA, 1 µM BSA in Bindungspuffer C oder mit 11 ml humanem Serum inkubiert. Nach Waschen der Ansätze in Bindungspuffer C erfolgte die Elution durch Zusetzen von je 100 µl SDS-Probenpuffer und anschließender Inkubation der Ansätze für 5 min bei 95 °C. Es folgte die Analyse der Proben mittels SDS-PAGE und Western Blot.

2.3.18 Co-Immunpräzipitation

HeLa-Zellen aus 75 cm²-Zellkulturflaschen wurden mit dem Vektor pFLAG-MCM3 und zusätzlich mit dem Vektor pSuper-Pin1 bzw. mit Leervektor co-transfiziert. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen mitgeführt. Die Zellernte erfolgte 60 h nach Co-Transfektion. Hierfür wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 0,6 ml CoIP-Puffer (20 mM HEPES pH 7,4, 50 mM NaCl, 1 Tablette/50 ml *Complete* Proteaseinhibitor, 1 Tablette/50 ml *PhosSTOP* Phosphataseinhibitor) wurden die Zellen jeweils mithilfe von Zellschabern entsprechender Größe (TPP, Trasadingen) in eine Ecke der Zellkulturflaschen geschoben und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall. Nach Zentrifugation der Zellsuspensionen wurden Proben der Überstände als Input für die Analyse mittels SDS-PAGE vorbereitet. Die Co-Immunpräzipitationen erfolgten, unter Verwendung von je 40 µl *ANTI-FLAG M2 Affinity Gel* (SIGMA-ALDRICH,

St. Louis) als Matrizes, parallel in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einem *Thermomixer comfort* bei einer Temperatur von 10 °C. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei einer konstanten Schüttelgeschwindigkeit von 1000 U/min. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Ansätze in einer Zentrifuge *Biofuge fresco* mit dem Rotor #3325B zentrifugiert (7000 U/min, 1 min, 4 °C) und die Flüssigkeiten über den Matrizes durch Absaugen mit Kanülen *Sterican* entfernt. Zunächst wurden die Matrizes zweimal für je 5 min mit 0,5 ml CoIP-Puffer äquilibriert. Danach wurden die Matrizes mit 0,5 ml des jeweiligen HeLa-Zelllysats für 1 h inkubiert. Die Matrizes wurden dann zweimal für je 5 min mit je 0,5 ml CoIP-Puffer gewaschen und die Überstände vollständig abgesaugt. Danach wurden die Ansätze mit je 50 µl SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C inkubiert und für die Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot vorbereitet.

2.3.19 Affinitätschromatographie von Serumproteinen mit CsA-Derivat

Das humane Serum wurde von Dr. E. PRELL aus Blut von vier erwachsenen, gesunden Probanden präpariert und für die Untersuchungen bereitgestellt. Bis zur Verwendung wurde es bei -80 °C gelagert. Die gesamte Reinigungsprozedur erfolgte bei 4 °C. 1 ml einer Streptavidin-Agarose-Suspension (EMD CHEMICALS, Gibbstown) wurde in eine Einwegtropfsäule aus Polypropylen (PIERCE, Rockford) gefüllt. Die Säule wurde mit Wasser gespült und anschließend mit Bindungspuffer (10 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl) äquilibriert. Eine 1 mM Stammlösung des CsA-Derivates **9** (chemische Struktur siehe *ABBILDUNG 54*) wurde in Bindungspuffer verdünnt und so eine 20 µM CsA-Derivat-Lösung hergestellt. Die Säule wurde mit 20 ml dieser Lösung beladen. Anschließend wurde die Säule mit 20 ml Bindungspuffer gewaschen, danach mit 100 ml Serum beladen und erneut mit 20 ml Bindungspuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution mit 5 ml einer 1 mM Lösung von Derivat **11** (chemische Struktur siehe *ABBILDUNG 54*) in Bindungspuffer. Die Elutionsfraktion wurde durch Fällung konzentriert. Hierfür wurden zur Elutionsfraktion drei Volumen 25-prozentige Trichloroessigsäure zugegeben. Nach der Inkubation für 20 min bei -20 °C wurde die Probe *Biofuge fresco* mit dem Rotor #3325B zentrifugiert (13000 U/min, 15 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit Aceton gewaschen, getrocknet, in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für die Analyse mittels SDS-PAGE vorbereitet.

2.4 Analytische Methoden

2.4.1 Proteinbestimmung

Die Aufnahme von UV/Vis-Spektren gereinigter Proteinproben erfolgte an einem UV/Vis-Spektrophotometer *NanoDrop ND-1000* (PEQLAB BIOTECHNOLOGIE, Erlangen). Ein Spektrum der jeweiligen Pufferlösung diente dabei als Referenz. Die Konzentration der gereinigten Proteinproben wurde anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm nach dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz bestimmt (*GLEICHUNG 1*). Die Bestimmung der spezifischen Extinktionskoeffizienten der jeweiligen Proteine anhand ihrer Aminosäuresequenzen erfolgte online mit dem Programm *ProtParam* (<http://web.expasy.org/protparam/>) [231].

GLEICHUNG 1:
$$A = \varepsilon \times c \times d$$

<i>A</i> :	Absorption
ε :	Extinktionskoeffizient ($l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
<i>c</i> :	Konzentration (M)
<i>d</i> :	Schichtdicke (cm)

2.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die analytische Trennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte im Prinzip nach der Methode von LAEMMLI [232]. Die hierzu verwendeten Lösungen sind in *TABELLE 8* näher beschrieben.

TABELLE 8: VERWENDETE LÖSUNGEN FÜR DIE SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE.

Lösung	Zusammensetzung
SDS-Probenpuffer	156 mM TRIS/HCl pH 6,8, 80 mM SDS, 10 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,5 g/l Bromphenolblau
Laufpuffer	25 mM TRIS/HCl pH 8,3, 190 mM Glycin, 3,5 mM SDS
Coomassie-Lösung	2 g/l Coomassie Brilliant Blau R 250, 0,5 g/l Coomassie Brilliant Blau G 250, 30 % (v/v) Methanol, 17,5 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung	45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure

Es wurden SDS-Polyacrylamidgele (SDS-PA-Gele) mit einem Anteil von 7,5–15 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (Verhältnis 37,5:1) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in einer Gelelektrophorese-Apparatur *Minigel-Twin* (BIOMETRA, Göttingen). Die zu analysierenden Proteinproben wurden vor Beladung des Gels mit einem Volumen SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min im Thermoblock *Dri-Block DB-3D* (TECHNE, Staffordshire) inkubiert. Als Standard für die molare Masse der Proteine wurde der *PageRuler Prestained Protein Ladder #26616* (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham) bzw. *SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard* (INVITROGEN, Eugene) mit auf das SDS-PA-Gel geladen. Coomassie-Färbungen erfolgten mit Coomassie Brilliant Blau in Coomassie-Lösung [233]. Danach wurden die Gele in Entfärbelösung inkubiert.

2.4.3 Western Blot

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden aus dem SDS-PA-Gel im *semi-dry-blotting*-Verfahren auf Membranen aus Nitrozellulose (PALL, Pensacola) übertragen. Die verwendeten Lösungen sind in *TABELLE 9* näher beschrieben.

TABELLE 9: VERWENDETE LÖSUNGEN FÜR DIE WESTERN-BLOT-ANALYSE.

Lösung	Zusammensetzung
Transferpuffer	25 mM TRIS/HCl pH 8,3, 150 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol
Ponceau S-Lösung	0,5 % Ponceau S, 1 % (v/v) Essigsäure
TBT-Puffer	50 mM TRIS/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,2 % (v/v) Tween 20
AK-Inkubationslösung	TBT-Puffer, 3 % Milchpulver

Für den Western Blot wurde das SDS-PA-Gel in der Western-Blot-Kammer *Fast-blot B43* (BIOMETRA, Jena) direkt auf die Nitrozellulosemembran gelegt, darüber und darunter jeweils drei Lagen *Gel-Blotting*-Papier (WHATMAN, Dassel). Alle Bestandteile wurden vorher vollständig mit Transferpuffer benetzt. Die Übertragung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von $3,4 \text{ mA/cm}^2$ für 40 min. Die Übertragung wurde anschließend durch Anfärben der Membran mit Ponceau S-Lösung überprüft, danach wurde die Membran gescannt und anschließend die Ponceau S-Färbung mit Wasser abgewaschen. Soweit nicht anders angegeben erfolgten sämtliche Wasch- und Inkubationsschritte auf einem Kippschüttler *Duomax 1030* (HEIDOLPH, Schwabach) mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 40 U/min bei Raumtemperatur. Es erfolgte die Blockierung der Membran in AK-Inkubationslösung für 2 h. Danach wurde der spezifische Antikörper üblicherweise in einer Verdünnung von 1 : 1000 zugegeben und die Membran für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran in TBT-Puffer für 5 min folgte die Inkubation der Membran mit dem Peroxidase-konjugierten Immunglobulin in AK-Inkubationslösung für 1 h. Danach folgten drei Waschschrte in TBT-Puffer für jeweils 5 min. Die Detektion erfolgte mithilfe von Chemilumineszenzsubstrat *ECL Western blotting detection reagents* (GE HEALTHCARE, Little Chalfont) oder *SuperSignal West Femto* (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham) an einem Chemilumineszenz-Detektionssystem *Chemi-Smart 5000* (VILBER LOURMAT, Eberhardzell).

2.4.4 Interaktionsstudie mit membrangebundenen Peptiden

Sämtliche Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten auf einem Kippschüttler *Duomax 1030* mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 40 U/min bei Raumtemperatur. Bei allen Waschschrten wurde die Zellulosemembran für 10 min mit 20 ml der entsprechenden Lösung inkubiert. Die verwendeten Lösungen sind in *TABELLE 10* näher beschrieben. Zunächst wurde die Membran einmal mit Methanol, dann zweimal mit Wasser und zweimal mit Bindungspuffer gewaschen. Anschließend erfolgte ein Inkubationsschritt mit 10 μM Pin1 in Bindungspuffer für 1 h. Die Membran wurde anschließend mit Bindungspuffer gewaschen. Das an die Peptidmembran gebundene Pin1 wurde in der Western-Blot-Kammer *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* mit entsprechendem Stromversorgungsgerät *PowerPac 200* (BIO-RAD LABORATORIES, Hercules) direkt zwischen zwei Nitrozellulosemembranen (PALL, Pensacola)

gelegt, darüber und darunter jeweils vier Lagen *Gel-Blotting*-Papier (WHATMAN, Dassel). Alle Bestandteile wurden vorher mit Transferpuffer getränkt. Die Übertragung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 1 mA/cm^2 für 30 min. Die Weiterbehandlung der Nitrocellulose-Membranen und die Detektion unter Verwendung von Anti-Pin1-Antikörpern erfolgte wie unter dem *KAPITEL* Western Blot beschrieben (*KAPITEL* 2.4.3). Die Membran mit den gebundenen Peptiden wurde durch Waschen in Puffer, dreimaligem Waschen in Regenerationslösung A, dreimaligem Waschen in Regenerationslösung B und Waschen in Methanol regeneriert, anschließend getrocknet und bis zur erneuten Verwendung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

TABELLE 10: VERWENDETE LÖSUNGEN FÜR DIE INTERAKTIONSSTUDIE MIT MEMBRANGEBUNDENEN PEPTIDEN.

Lösung	Zusammensetzung
Bindungspuffer	10 mM HEPES pH 7,4
Transferpuffer	25 mM TRIS/HCl pH 8,3, 150 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol
TBT-Puffer	50 mM TRIS/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,2 % (v/v) Tween 20
AK-Inkubationslösung	TBT-Puffer, 3 % Milchpulver
Regenerationslösung A	8 M Harnstoff, 3,5 mM SDS, 0,1 % (v/v) β -Mercaptoethanol
Regenerationslösung B	50 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure

2.4.5 Proteasefreier PPIase-Assay

Der proteasefreie PPIase-Test erfolgte im Prinzip nach der Vorschrift von Janowski *et al.* [234]. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Messungen an einem *Agilent 8453* UV/Vis-Spektralphotometersystem (AGILENT TECHNOLOGIES, Waldbronn) bei einer konstanten Temperatur von $10 \text{ }^\circ\text{C}$ unter ständigem Rühren in *Hellma QS* Quarzglas-Küvetten mit Magnetrührer (HELLMA ANALYTICS, Müllheim) und einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt. Als Messpuffer wurde 35 mM HEPES pH 7,8 verwendet. Üblicherweise wurde dem Messpuffer noch $1 \text{ } \mu\text{M}$ BSA zugesetzt. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug $1500 \text{ } \mu\text{l}$. Für die Herstellung der Substratstammlösung wurde zunächst $0,5 \text{ M}$ wasserfreies LiCl in TFE gelöst, welches über Molekularsieb (MERCK, Darmstadt) getrocknet war. Diese Lösung wurde auf CaCl_2 aufbewahrt. Das Substrat wurde in einer Konzentration von 30 mM in dieser Lösung frisch gelöst und für die Messungen verwendet. Als Substrat wurde Suc-Ala-Glu-Pro-Phe-*p*NA für Messungen mit dem Enzym Pin1 bzw. Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*NA für Messungen mit dem Enzym Cyclophilin A verwendet. Vor dem Start jeder Messung wurden alle Komponenten, mit Ausnahme des Substrates, in der Küvette im Messgerät für 360 s temperiert. Die Messung wurde sofort nach Substratzugabe gestartet. Die finale Substratkonzentration betrug $60 \text{ } \mu\text{M}$. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 330 nm wurde im Intervall von $0,5 \text{ s}$ für $240 - 600 \text{ s}$ aufgezeichnet. Als Referenz diente die Absorption bei einer Wellenlänge von 510 nm . Die Einstellung des *cis/trans*-Gleichgewichts nach dem Lösungsmittelsprung des Substrates durch *cis/trans*-Isomerisierung wurde als Absorptionsänderung im Zeitverlauf registriert. Nach Abschneiden der Mischphase am Anfang lieferte die nichtlineare Regression dieses Verlaufs nach einer monoexponentiellen Funktion die Geschwindigkeitskonstante k_{obs} für jede Messung, die der Summe der Geschwindigkeitskonstanten der *cis*→*trans*- und der *trans*→*cis*-Reaktionen entspricht.

Die Geschwindigkeitskonstante der enzymkatalysierten Reaktion k_{enz} lässt sich nach *GLEICHUNG 2* aus der Differenz der Geschwindigkeitskonstante k_{obs} und der Geschwindigkeitskonstante der unkatalysierten Reaktion k_0 ermitteln. Die katalytische Effizienz eines Enzyms ist definiert als k_{cat}/K_M und wurde nach *GLEICHUNG 3* berechnet.

$$\text{GLEICHUNG 2:} \quad k_{\text{enz}} = k_{\text{obs}} - k_0$$

$$\text{GLEICHUNG 3:} \quad \frac{k_{\text{cat}}}{K_M} = \frac{k_{\text{enz}}}{[E_0]}$$

k_{enz} :	Geschwindigkeitskonstante der enzymkatalysierten Reaktion (s^{-1})
k_{obs} :	beobachtete Geschwindigkeitskonstante (s^{-1})
k_0 :	Geschwindigkeitskonstante der unkatalysierten Reaktion (s^{-1})
k_{cat} :	Wechselzahl/Katalysekonstante (s^{-1})
K_M :	Michaeliskonstante (M)
$[E_0]$:	Gesamtkonzentration des Enzyms (M)

Für Messungen mit Inhibitoren wurden dem Messpuffer 0,1 μM BSA zugesetzt. Üblicherweise erfolgten die Messungen mit Inhibitoren bei einer Enzymkonzentration von 10 nM Pin1 bzw. 1 nM Cyclophilin A. Die Inhibitoren wurden in DMSO gelöst, in verschiedenen Konzentrationen zum Messansatz gegeben und die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktionen bestimmt. Die finale Konzentration an DMSO betrug stets 0,2 % (v/v). Für die Bestimmung von Inhibitionskonstanten K_I wurden die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten k_{enz} der Reaktionen gegen die eingesetzten Inhibitorkonzentrationen aufgetragen und durch Regression der Messwerte nach *GLEICHUNG 4* ermittelt, die sich von einer Gleichung nach CHENG und PRUSOFF [235] ableitet. IC_{50} -Werte von Inhibitoren wurden nach Auftragung der PPIase-Aktivitäten gegen die entsprechenden Inhibitorkonzentrationen durch Regression der Messwerte mithilfe von *GLEICHUNG 5* ermittelt.

$$\text{GLEICHUNG 4:} \quad A = (Q \times [E]) / (1 + [I] / K_I)$$

A :	PPIase-Aktivität, äquivalent zu k_{enz} (s^{-1})
Q :	katalytische Effizienz des Enzyms ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
$[E]$:	Enzymkonzentration (M)
$[I]$:	Inhibitorkonzentration (M)
K_I :	Inhibitionskonstante (M)

$$\text{GLEICHUNG 5:} \quad A = 100 \% / (1 + [I] / IC_{50})$$

A :	PPIase-Aktivität (%)
$[I]$:	Inhibitorkonzentration (M)
IC_{50} :	Inhibitorkonzentration bei der die Hälfte der PPIase-Aktivität inhibiert ist (M)

Fluoreszenzbasierte, proteasefreie Messungen glichen in der Durchführung fluoreszenzbasierten proteasegekoppelten Messungen (*KAPITEL 2.4.6*), erfolgten jedoch in Abwesenheit

einer isomerspezifischen Protease. Die Auslenkung des *cis/trans*-Gleichgewichtes erfolgte entweder durch pH-Sprung (0,5 mM Substrat in 50 mM H₃PO₄ pH 2,1 zu Messpuffer 35 mM HEPES pH 7,8) oder durch Lösungsmittelsprung (0,5 mM Substrat in 0,5 M LiCl/TFE zu Messpuffer 35 mM HEPES pH 7,8), Anregungsspaltbreite: 5 nm, Emissionsspaltbreite: 20 nm.

2.4.6 Proteasegekoppelter PPIase-Assay

Der proteasegekoppelte PPIase-Test erfolgte im Prinzip nach der Vorschrift von FISCHER *et al.* [10]. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Messungen an einem *Agilent 8453* UV/Vis-Spektralphotometersystem (AGILENT TECHNOLOGIES, Waldbronn) bei einer konstanten Temperatur von 10 °C unter ständigem Rühren in *Hellma QS* Quarzglas-*Küvetten* mit Magnetrührer (HELLMA ANALYTICS, Müllheim) mit einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt. Als Messpuffer wurde 35 mM HEPES pH 7,8 verwendet. Falls nicht anders angegeben, diente α -Chymotrypsin in einer finalen Konzentration von 1 mg/ml als isomerspezifische Protease. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 1500 μ l. Vor dem Start der Messung wurden alle Komponenten, mit Ausnahme des Substrates, in der *Küvette* für 360 s temperiert. Die Messung wurde sofort nach Substratzugabe gestartet. Die finale Substratkonzentration betrug 60 μ M. Die *cis/trans*-Isomerisierung wurde über die Freisetzung des 4-Nitroanilins als Absorptionsänderung im Zeitverlauf verfolgt. Dazu wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 390 nm im Intervall von 0,5 s für 240 – 600 s aufgezeichnet. Als Referenz diente die Absorption bei einer Wellenlänge von 510 nm. Die Auswertung der Messungen erfolgte dem proteasefreien Messsystem analog (KAPITEL 2.4.5), jedoch entspricht k_{obs} im proteasegekoppelten Messsystem der Geschwindigkeitskonstante der *cis*→*trans*-Reaktion.

GLEICHUNG 6:

$$K = (k_{\text{obs}} - k_0) / k_0$$

K :	Aktivitätsfaktor (relative Einheiten, RE)
k_{obs} :	beobachtete Geschwindigkeitskonstante (s ⁻¹)
k_0 :	Geschwindigkeitskonstante der unkatalysierten Reaktion (s ⁻¹)

Für Messungen in Gegenwart von CsA bzw. CsA-Derivaten diente als Messpuffer 10 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl. Als isomerspezifische Protease diente α -Chymotrypsin in einer Konzentration von 0,2 mg/ml. Das Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA wurde als Stammlösung in einer Konzentration von 26,7 mM in DMSO für die Messungen verwendet. Die finale Substratkonzentration im Messansatz betrug 53,4 μ M. CypA wurde aus einer Stammlösung (0,25 μ M CypA, 1 μ M BSA in Messpuffer) in den Ansatz gegeben. Die finale Konzentration an CypA betrug 0,5 nM. Inhibitoren wurden in DMSO gelöst und in verschiedenen Konzentrationen zum Messansatz gegeben. Die finale Konzentration an DMSO betrug stets 1,2 % (v/v). Für Messungen in Gegenwart von humanem Serum wurde α -Chymotrypsin in einer finalen Konzentration von 1 mg/ml eingesetzt. Um den *cis*-Isomeranteil des Substrates zu steigern wurde das Substrat in TFE gelöst, welches 0,5 M wasserfreies LiCl enthielt. Die finale Konzentration an DMSO betrug dann stets 1 % (v/v). Für Inhibitionsmessungen betrug die Serumkonzentration 25 % (v/v). Der Aktivitätsfaktor K der Serumprobe in relativen Einheiten (RE) wurde über GLEICHUNG 6 berechnet [236].

Proteasegekoppelte Messungen, die an einem Fluoreszenz-Spektrophotometer *F-3010* (HITACHI, Tokio) durchgeführt wurden, erfolgten bei einer konstanten Temperatur von 10 °C unter ständigem Rühren in *Hellma QS* Quarzglasküvetten mit Magnetrührer (HELLMA ANALYTICS, Müllheim) mit einer Schichtdicke von 1 cm. Als Messpuffer wurde 35 mM HEPES pH 7,8 verwendet. 1 mg/ml Trypsin diente dabei als isomerspezifische Protease. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 1500 µl. Die Anregungswellenlänge wurde auf 320 nm festgelegt und die Emission bei einer Wellenlänge von 420 nm für 5 – 120 min detektiert (je nach Substrat: Anregungsspaltbreite: 3 – 5 nm, Emissionsspaltbreite: 5 – 10 nm). Die jeweiligen Substrate wurden in Konzentrationen von 0,5 mM in DMSO gelöst und für die Messungen eingesetzt. Die finale Substratkonzentration im Messansatz betrug 1 µM. Die auf den Zeitpunkt 0 s extrapolierte nichtlineare Regression einer Verlaufskurve lieferte den Startpunkt sowie den Endpunkt der Reaktion. Beide Werte wurden mit dem entsprechenden Wert aus dem Fluoreszenzemissionsspektrum des Substrates vor isomerspezifischer Proteolyse korrigiert. Die Differenz der Fluoreszenzsignale aus Endpunkt (entspricht 100 % *trans*-Isomer) und Startpunkt (entspricht dem prozentualen Anteil an *trans*-Isomer) lieferte näherungsweise den prozentualen *cis*-Gehalt des Substrates.

GLEICHUNG 7:
$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$$

GLEICHUNG 8:
$$\Delta G^0 = -RT \times \ln K$$

ΔG^\ddagger :	Änderung der freien Aktivierungsenthalpie (J mol ⁻¹)
ΔH^\ddagger :	Änderung der Aktivierungsenthalpie (J mol ⁻¹)
ΔS^\ddagger :	Änderung der Aktivierungsentropie (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
ΔG^0 :	Änderung der GIBBS-Energie im Gleichgewichtszustand (J mol ⁻¹)
T :	Temperatur (K)
R :	universelle Gaskonstante (8,3144621 J mol ⁻¹ K ⁻¹)
K :	Gleichgewichtskonstante ($[cis] / [trans]$)

Die Bestimmungen der Temperaturabhängigkeiten der Geschwindigkeitskonstanten der *cis/trans*-Isomerisierungen erfolgten bei konstanten Temperaturen zwischen 5 °C und 40 °C. Die thermodynamischen Parameter für diese Reaktionen wurden durch lineare Regressionen der EYRING-Plots und mithilfe von GLEICHUNG 7 und GLEICHUNG 8 ermittelt. Die Messungen der Geschwindigkeitskonstanten der *cis/trans*-Isomerisierungen bei unterschiedlichen pH-Werten wurde als Messpuffer 35 mM Kaliumcitrat (4,5 ≤ pH ≤ 6,5) bzw. 35 mM BIS-TRIS-Propan (6,4 ≤ pH ≤ 9,5) verwendet. Die Anpassung der Datenpunkte erfolgte an ein Modell basierend auf der HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung (GLEICHUNG 9) [237].

GLEICHUNG 9:
$$y = y_{\min} + (y_{\max} - y_{\min}) / (1 + 10^{(pH - pK_s)})$$

2.4.7 Fluoreszenzemissionsspektren von Peptidderivaten

Alle Messungen wurden an einem *FluoroMax-2* Spektralfluorimeter (HORIBA JOBIN YVON, Kyoto) bei einer konstanten Temperatur von 10 °C unter ständigem Rühren in *Hellma QX* Quarzglasküvetten mit Magnetrührer (HELLMA ANALYTICS, Müllheim) und einer

Schichtdicke von 1 cm durchgeführt. Die Messungen erfolgten in Messpuffer 35 mM HEPES pH 7,8. Die Peptidderivate wurden als Stammlösungen in Konzentrationen von jeweils 0,5 mM in DMSO (für isomerspezifische Proteolyse) bzw. in 50 mM H₃PO₄ pH 2,1 (für pH-Sprung) für die Messungen verwendet. Die finale Peptidkonzentration im Messansatz betrug jeweils 1 μ M. Die Fluoreszenzemissionsspektren wurden nach Anregung bei einer Wellenlänge von 320 nm von den Peptidderivaten nach Proteolyse mit 1 mg/ml Trypsin (Anregungsspaltbreite: 3 nm, Emissionsspaltbreite: 5 nm) oder nach pH-Sprung (Anregungsspaltbreite: 5 nm, Emissionsspaltbreite: 20 nm) aufgenommen. Die Aufnahme der Spektren erfolgte je nach Experiment vor Proteasezugabe, direkt nach Proteasezugabe bzw. pH-Auslenkung und nach vollständiger Proteolyse bzw. Relaxation. Alle Spektren wurden mit den jeweiligen Referenzspektren korrigiert.

2.4.8 Isotherme Titrationskalorimetrie

Sämtliche Untersuchungen mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) wurden an einem Mikrokalorimeter *VP-ITC* (MICROCAL, Northampton) mit freundlicher Unterstützung durch E. HINZE durchgeführt. Die Messungen erfolgten in Puffer 35 mM HEPES pH 7,8 bei einer Temperatur von 20 °C. Die verwendeten Proteine wurden gegen den Puffer dialysiert. Die verwendeten Liganden wurden direkt in dem Puffer gelöst. Die Referenzzelle und die Probenzelle des Kalorimeters wurden mit Puffer bzw. mit der Proteinlösung befüllt. Die Apparatur wurde auf eine Rührerdrehzahl von 310 U/min eingestellt. In einem typischen Experiment wurden 300 μ l Ligand mit einer Konzentration von 3,75 mM schrittweise zu 1,4 ml einer 237,5 μ M Proteinlösung titriert. Die Titration erfolgte in 20 Injektionsschritten. Bei der ersten Injektion wurden lediglich 2 μ l, bei den folgenden Injektionen jeweils 15 μ l Ligand injiziert. Als Referenztitration diente die Injektion des entsprechenden Liganden in Puffer unter den gleichen Bedingungen. Die Auswertung der Messwerte erfolgte mit der Herstellersoftware *Origin* (MICROCAL, Northampton). Die Messwerte der Titration von Ligand mit Protein wurden mit denen der Referenztitration korrigiert. Die Messwerte der ersten Injektion wurden dabei eliminiert. Die Berechnung der thermodynamischen Parameter erfolgte nach einem Ein-Seiten-Bindemodell.

2.4.9 Circular dichroismus-Spektroskopie

Die Aufnahme von CD-Spektren erfolgte an einem *Jasco J-710* Spektropolarimeter (JASCO, Groß-Umstadt) unter konstantem Stickstoffstrom von 12 l/min. Soweit nicht anders angegeben erfolgte die Messung in 5 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 bei einer Temperatur von 20 °C. Das Gerät wurde für die Messungen auf eine Spaltbreite von 1 nm und eine Verzögerungszeit von 1 s eingestellt. Die Scangeschwindigkeit betrug 100 nm/min. Für die Messungen wurden *Hellma QX* Quarzglaszuvetten (HELLMA ANALYTICS, Müllheim) mit Schichtdicken von 0,1 cm verwendet. Das finale Spektrum einer Messung wurde aus 20 Einzelspektren akkumuliert. Zur Basislinienkorrektur wurde das Spektrum des Puffers vom Proteinspektrum subtrahiert. Die Berechnung der *mean residue weight ellipticity* $[\Theta]_{MRW}$ erfolgte nach *GLEICHUNG 10*. Messungen bei unterschiedlichen pH-Werten erfolgten bei 10 °C in Zitronensäure-Phosphat-Puffer.

GLEICHUNG 10:
$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta \times [\text{MRW}]}{10 \times c \times d}$$

- Θ : Elliptizität (mdeg)
 [MRW]: mittlere molare Masse der Aminosäuren (g/mol)
 c: Konzentration (g/l)
 d: Schichtdicke (cm)

2.4.10 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Alle Trennungen von Proteinproben zur Analyse mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatographie*, HPLC) wurden an einem System *Class-LC10* (SHIMADZU, Kyoto) mit Diodenarraydetektor (SHIMADZU, Kyoto) und Säule *C8* (5 μm , 300 \AA , 4,6 \times 250 mm, VYDAC, Columbia) bei einer Temperatur von 40 °C durchgeführt. Als Laufmittel diente Acetonitril/Wasser, versetzt mit jeweils 0,1 % Trifluoressigsäure. Die Flussgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Die Elution der jeweiligen Probe erfolgte durch einen linearen Gradienten von 5 – 100 % Acetonitril innerhalb einer Zeit von 30 min.

Trennungen von niedermolekularen Substanzen, Peptiden und Peptidderivaten zur Analyse mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie erfolgten an einem System HPLC-MS *ASI-100* (DIONEX, Sunnyvale) mit Pumpe *P-680* (DIONEX, Sunnyvale), Diodenarraydetektor *PDA-100* (DIONEX, Sunnyvale) und Säule *Kinetex C18* (2,6 μm , 4,6 \times 250 mm, PHENOMENEX, Torrance) bei einer Temperatur von 40 °C. Als Laufmittel diente Acetonitril/Wasser, versetzt mit jeweils 0,1 % Trifluoressigsäure. Die Elution der jeweiligen Probe erfolgte durch einen linearen Gradienten von 5 – 100 % Acetonitril innerhalb einer Zeit von 15 min.

2.4.11 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Analysen zur Identifizierung von Pin1-Interaktionspartnern nach *pull-down*-Experimenten erfolgten in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. HAEHNEL am Institut für Biologie II der Universität Freiburg. Die massenspektrometrische Analyse zur Identifizierung von Serumproteinen nach Affinitätsreinigung mit immobilisierten CsA-Derivaten erfolgte durch Dr. C. H. IHLING. Sonstige massenspektrometrische Analysen, insbesondere Analysen gereinigter Proteinproben wurden von Dr. A. SCHIERHORN durchgeführt. Hierfür wurden die gereinigten Proteinproben vorher mittels HPLC entsalzt.

2.4.12 Konfokalmikroskopie

HeLa-Zellen wurden zunächst mittels Calciumphosphat-Methode transfiziert (*KAPITEL 2.3.8*) und üblicherweise 28 h nach Transfektion mithilfe von Trypsin von der Wachstumsfläche gelöst (*KAPITEL 2.3.7*) und in frischem Medium suspendiert. 222 μl dieser Suspension mit ca. 25000 Zellen wurde anschließend in eine Kulturkammer des Objektträgersystems *μ -Slide 8-well* (IBIDI, Martinsried) gegeben und für 18 h unter Kultivierungsbedingungen (*KAPITEL 2.3.6*) inkubiert. Danach wurden die Zellen für die Konfokalmikroskopie vorbereitet. Alle Wasch- und Inkubationsschritte der Kulturkammer erfolgten mit jeweils 222 μl der entsprechenden Lösung bei Raumtemperatur auf einem Laborschüttler *KS 260 basic* (IKA, Staufen)

bei einer Drehzahl von 150 U/min. Bei einem Waschschrift wurde die Kulturkammer immer für 3 min mit PBS inkubiert. Die verwendeten Lösungen sind in *TABELLE 11* näher beschrieben. Die Kulturkammer wurde zunächst zweimal gewaschen und anschließend für 10 min mit Formaldehydlösung in PBS inkubiert, gefolgt von zwei Waschschriften. Danach wurde die Kulturkammer für 2 min mit Methanol inkubiert, gefolgt von einem Waschschrift. Es schloss sich ein Inkubationsschritt in Glycinlösung für 5 min an. Schließlich wurde die Kulturkammer einmal gewaschen und für 60 min mit Milchpulverlösung inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation in 100 µl AK-Inkubationslösung 1 für 30 min im Dunkeln. Nach dreimaliger Inkubation für 2 min in Milchpulverlösung schloss sich die Inkubation in 100 µl AK-Inkubationslösung 2 für 30 min im Dunkeln an. Die Kulturkammer wurde zum Schluss dreimal für 2 min in Milchpulverlösung inkubiert und noch dreimal mit PBS gewaschen. Nun erfolgte die Analyse des Präparats am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop *D-ECLIPSE CI Si* (NIKON, Tokio) mit drei separaten Lasern (404 nm, 488 nm und 561 nm; MELLES GRIOT, Albuquerque) mit dem Ölimmersionsobjektiv *Plan Apo 60x* (NIKON, Tokio) mit numerischer Apertur von 1,40. Die Analyse der Bilder erfolgte mithilfe der Software *EZ-CI Version 3.7* (NIKON, Tokio). Die Bilder wurden üblicherweise mit einer Größe von 512 × 512 Pixel aufgenommen.

TABELLE 11: VERWENDETE LÖSUNGEN ZUR PROBENVORBEREITUNG FÜR DIE KONFOKALMIKROSKOPIE.

Lösung	Zusammensetzung
Formaldehydlösung	PBS, 2 % Formaldehyd
Glycinlösung	PBS, 2 % Glycin
Milchpulverlösung	PBS, 2 % Milchpulver
AK-Inkubationslösung 1	PBS, 2 % Milchpulver, 10 µg/ml DAPI, primäre Antikörper
AK-Inkubationslösung 2	PBS, 2 % Milchpulver, entsprechende sekundäre Antikörper mit Fluoreszenzmarker

Die Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1 : 100 eingesetzt.

2.4.13 Durchflusszytometrie

Die sich in der Proliferation befindlichen HeLa-Zellen einer Kalotte einer Zellkulturtestplatte mit sechs Kalotten (ca. 4×10^5 Zellen), wurden zweimal mit PBS gewaschen, mithilfe von Trypsin von der Wachstumsfläche gelöst, nach darauffolgender Zugabe von 0,5 ml Medium in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in der *Megafuge 1.0RS* mit dem Rotor #7570 D zentrifugiert (300 g, 5 min, 20 °C). Nach Verwerfen des Überstands wurden die Zellen in 80-prozentiger (v/v) Ethanollösung resuspendiert und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde in der Tischzentrifuge *Mini* (ABIMED, Langenfeld) für 30 s bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Die Zellen des 5-Bromo-2-deoxyuridin-Inkorporationsassays wurden nach diesem Schritt für 20 min mit 0,5 ml 2 N HCl behandelt und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit Anti-BrdU Antikörper in 0,5 % (v/v) Tween 20, 5 g/l BSA in PBS für 1 h. Die Zellen wurden anschließend einmal mit PBS und einmal mit 0,5 % (v/v) Tween 20, 5 g/l BSA in PBS gewaschen und danach für 30 min mit FITC-Anti-Maus IgG in 0,5 % (v/v) Tween 20, 5 g/l BSA in PBS inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit

PBS gewaschen, für 30 s bei Raumtemperatur in der Tischzentrifuge *Mini* zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Die Zellen wurden für die Messungen mittels Durchflusszytometrie (fluoreszenzaktivierte Zellsortierung, FACS) in 0,5 ml FACS-Puffer (100 µg/ml Ribonuclease A, 50 µg/ml Propidiumiodid in PBS) resuspendiert und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Proben mit dem Cytometer *FACSort* (BECTON-DICKINSON, Franklin Lakes) analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Computerprogramm *WinMDI 2.9* (JOSEPH TROTTER, La Jolla).

2.4.14 Datenverarbeitung

Die Auswertung der Daten, die Regression der Datenpunkte, die Erstellung von Diagrammen und die statistische Auswertung mittels *t*-Test erfolgte, soweit nicht anders angegeben, mit *SigmaPlot 12.3* (SYSTAT SOFTWARE, Erkrath). Densitometrische Auswertungen erfolgten mit dem Programm *Multi-Analyst* (BIO-RAD LABORATORIES, Hercules). Für die Erstellung der chemischen Strukturen dieser Arbeit wurde das Programm *ChemBioDraw Ultra 12.0* (PERKINELMER, Waltham) verwendet. Digitalisierung von SDS-PA-Gelen erfolgte mit dem Scanner *ScanMaker 1000XL* (MICROTEK, Hsinchu) mit zugehöriger Software *Microtek ScanWizard Pro V7.021* (MICROTEK, Hsinchu). Bilddateien wurden mit dem Programm *Adobe Photoshop CS3* (ADOBE SYSTEMS, San José) aufbereitet. Alle übrigen Abbildungen und Texte dieser Arbeit wurden mithilfe von *Microsoft Office 2013* (MICROSOFT, Redmond) erstellt und aufbereitet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Pin1 interagiert *in vitro* und *in vivo* mit MCM3

3.1.1 Untersuchungen zur Interaktion von Pin1 mit Proteinen aus HeLa-Zellen

Um neue Interaktionspartner von Pin1 zu identifizieren wurde ein GST-pull-down-Experiment durchgeführt. Dafür wurde eine Glutathion-Sepharose-Matrix, an der das Fusionsprotein GST-Pin1 immobilisiert war, mit HeLa-Zelllysate inkubiert, gewaschen und danach von dieser Matrix eluiert. Als Kontrolle wurde eine Glutathion-Sepharose-Matrix, an der das Fusionsprotein GST immobilisiert war, gleichbehandelt. Die Elutionen beider Matrices wurden mittels SDS-PAGE analysiert (ABBILDUNG 2).

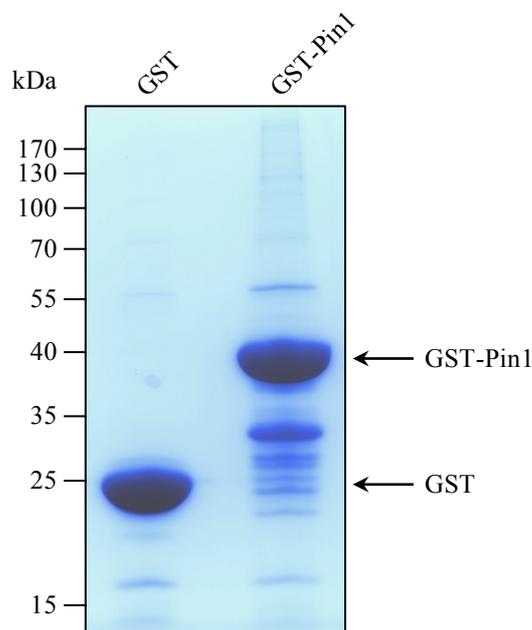


ABBILDUNG 2: PULL-DOWN ZELLULÄRER PROTEINE MIT GST-PIN1. Eine Glutathion-Sepharose-Säule mit einem Säulenvolumen von 1 ml wurde mit *E. coli*-Lysat inkubiert, welches GST (Kontrolle) bzw. GST-Pin1 enthielt. Nach einem Waschschrift mit Puffer erfolgte die Inkubation der Säule mit HeLa-Zelllysate. Die Säule wurde mit Puffer gewaschen und mit einer Glutathion-Lösung (10 mM) eluiert. Die Elutionsfraktionen (GST und GST-Pin1) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das SDS-PA-Gel (12,5 %) wurde einer Coomassie-Färbung unterzogen.

Nach der Coomassie-Färbung des Gels wurden beide Spuren, GST und GST-Pin1, aus dem SDS-PA-Gel ausgeschnitten und vollständig massenspektrometrisch auf humane Proteine untersucht. In zwei identisch durchgeführten Experimenten konnten 68 eukaryotische Proteine jeweils in der Elution von GST-Pin1, nicht aber in der Elution der Kontrolle (GST) nachgewiesen werden. Diese Proteine sind in TABELLE 18 im Anhang aufgelistet. Eine Datenbankanalyse ergab, dass lediglich sechs dieser Proteine weder Ser-Pro- noch Thr-Pro-Motive in ihren Primärstrukturen enthalten und damit in 62 der identifizierten Proteine mindestens eines dieser Motive enthalten ist. Für zwölf Proteine wurden bereits Interaktionen mit Pin1 in der Literatur erwähnt (siehe TABELLE 18). Bei den Experimenten konnten die Proteine MCM2, MCM3, MCM4, MCM6 und MCM7 als neue potentielle Interaktionspartner von Pin1 detektiert werden. Diese fünf Proteine sind Untereinheiten des aus sechs Proteinen bestehenden *minichromosome-maintenance*-Komplexes, MCM2-7-Komplex. Das Protein MCM5, ebenfalls eine Untereinheit dieses Komplexes wurde lediglich in einem der beiden identisch durchgeführten Experimente als möglicher Interaktionspartner von Pin1 detektiert. Alle Prote-

ine des MCM2-7-Komplexes enthalten in ihrer jeweiligen Primärstruktur Ser/Thr-Pro-Motive (siehe TABELLE 18). In der Proteindatenbank *UniProtKB*³⁾ sind MCM2⁴⁾, MCM3⁵⁾, MCM4⁶⁾, MCM6⁷⁾ und MCM7⁸⁾ als Phosphoproteine verzeichnet. Ferner ist in der Datenbank unter dem entsprechenden Eintrag für MCM2, MCM3, MCM4 und MCM7 die Modifizierung mindestens eines Serin- bzw. Threoninrestes eines entsprechenden Ser/Thr-Pro-Motivs zu einem Phosphoserin- bzw. Phosphothreoninrest gekennzeichnet.

In einem weiteren *GST-pull-down*-Experiment konnten alle sechs Proteine des MCM2-7-Komplexes mit spezifischen Anti-MCM-Antikörpern in der Elution von GST-Pin1 nachgewiesen werden. Eine unspezifische Wechselwirkung der MCM-Proteine mit GST wurde nicht detektiert (ABBILDUNG 3). Diese Ergebnisse zeigen eine direkte Interaktion von Pin1 mit dem MCM2-7-Komplex *in vitro*.

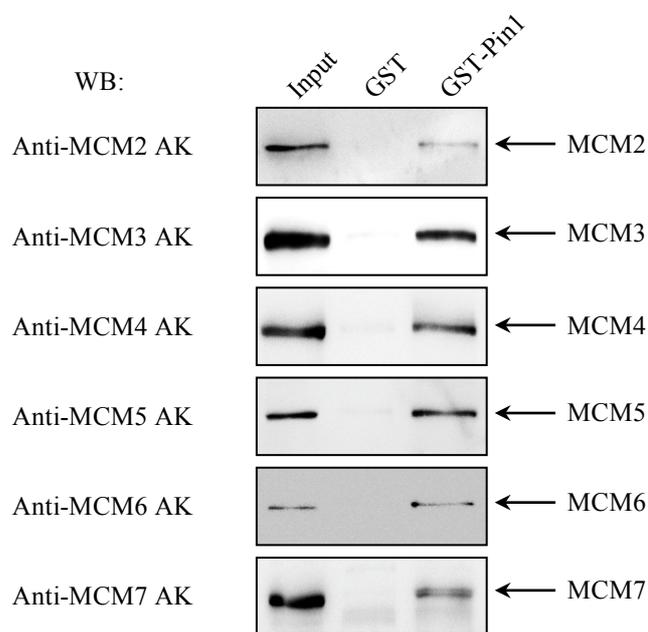


ABBILDUNG 3: PULL-DOWN VON MCM-PROTEINEN MIT GST-PIN1. Glutathion-Sepharose wurde mit *E. coli*-Lysat inkubiert, welches GST (Kontrolle) bzw. GST-Pin1 enthält. Nach dreimaligem Waschen mit Puffer wurde die Glutathion-Sepharose mit HeLa-Zellysate inkubiert. Nach einem Waschschritt mit Puffer folgte die Elution mit einer Glutathion-Lösung (50 mM). Der Input und die beiden Elutionsfraktionen (GST und GST-Pin1) wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot (WB) unter Verwendung von spezifischen Anti-MCM Antikörpern (Anti-MCM AK) analysiert. Ladekontrolle siehe ABBILDUNG 46A im Anhang.

Um festzustellen, mit welchen Komponenten des MCM2-7-Komplexes Pin1 interagiert, sollten Interaktionsanalysen unter Bedingungen durchgeführt werden, in denen die MCM-Proteine nicht miteinander wechselwirken. Es wurde bereits gezeigt, dass bei einer Kaliumchloridkonzentration von 1 M in Puffer die MCM-Proteine nicht komplexiert vorliegen [238]. Daher wurden *pull-down*-Experimente bei verschiedenen Kaliumchlorid-Konzentrationen in Puffer durchgeführt. Unter Bedingungen von 1 M Kaliumchlorid in Puffer konnte lediglich eine Interaktion des Proteins MCM3 mit Pin1 nachgewiesen werden (ABBILDUNG 4). Dies deutet darauf hin, dass unter diesen Bedingungen eine direkte Interaktion von MCM3 mit Pin1 existiert und dass die Interaktion zwischen Pin1 und dem MCM2-7-Komplex durch MCM3 vermittelt wird. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die hohe Ionenstärke direkte Interaktionen zwischen Pin1 und anderen MCM-Proteinen verhindert. Zur Überprüfung der

³⁾ online verfügbar unter <http://www.uniprot.org/uniprot/>

⁴⁾ *UniProt*-Eintrag P49736 (MCM2_HUMAN), <http://www.uniprot.org/uniprot/P49736> (08.12.2014)

⁵⁾ *UniProt*-Eintrag P25205 (MCM3_HUMAN), <http://www.uniprot.org/uniprot/P25205> (08.12.2014)

⁶⁾ *UniProt*-Eintrag P33991 (MCM4_HUMAN), <http://www.uniprot.org/uniprot/P33991> (08.12.2014)

⁷⁾ *UniProt*-Eintrag Q14566 (MCM6_HUMAN), <http://www.uniprot.org/uniprot/Q14566> (08.12.2014)

⁸⁾ *UniProt*-Eintrag P33993 (MCM7_HUMAN), <http://www.uniprot.org/uniprot/P33993> (08.12.2014)

Hypothese einer direkten Interaktion von Pin1 mit MCM3 sollte untersucht werden, ob Pin1 mit MCM3 in Abwesenheit der anderen MCM-Proteine interagieren kann. Dazu wurde die codierende DNA-Sequenz des humanen MCM3-Proteins in den Vektor pCMV-Tag2b kloniert. Der dadurch generierte Vektor pFLAG-MCM3 lässt sich zur Generierung von MCM3 mit einer aminoterminalen FLAG-Fusion (FLAG-MCM3) in eukaryotischen Zellen nutzen.

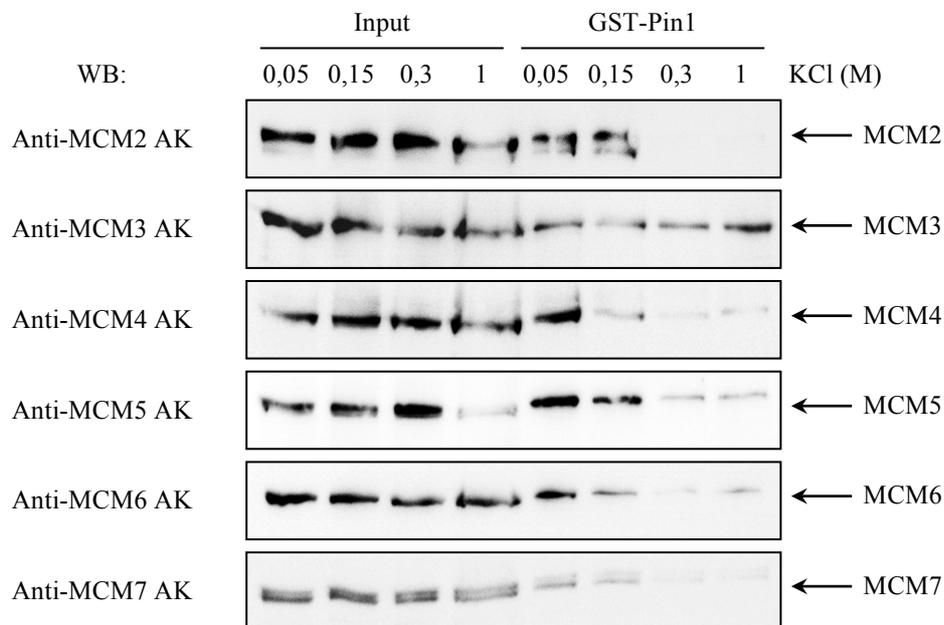


ABBILDUNG 4: PULL-DOWN VON MCM-PROTEINEN BEI UNTERSCHIEDLICHEN KCl-KONZENTRATIONEN MIT GST-PIN1. Glutathion-Sepharose wurde mit *E. coli*-Lysat inkubiert, welches GST-Pin1 enthielt. Nach dreimaligem Waschen mit Puffer wurde die Glutathion-Sepharose mit HeLa-Zelllysat in Puffer mit KCl inkubiert. Nach einem Waschschrift mit Puffer folgte die Elution mit einer Glutathion-Lösung (50 mM). Der Input und die Elutionsfraktionen (GST-Pin1, unterschiedliche KCl-Konzentrationen) wurden mittels SDS-PAGE und anschließend Western Blot (WB) unter Verwendung von spezifischen Anti-MCM Antikörpern (Anti-MCM AK) analysiert. Ladekontrolle siehe ABBILDUNG 46B.

HeLa-Zellen wurden mit dem Vektor pFLAG-MCM3 transfiziert und das in diesen Zellen hergestellte Protein FLAG-MCM3 wurde mithilfe einer Anti-FLAG-Affinitätsmatrix unter nativen Bedingungen gereinigt. Die Analyse des gereinigten Proteins mittels SDS-PAGE zeigt ABBILDUNG 5A. Um auszuschließen, dass bei der Proteinreinigung weitere Komponenten des MCM-Komplexes, aufgrund von Komplexbildung, zusammen mit dem Protein FLAG-MCM3 von der Anti-FLAG-Affinitätsmatrix eluiert wurden, erfolgte eine Analyse auf die Anwesenheit von MCM5 und MCM7. Diese beiden Proteine sind im Heterohexamer direkt benachbart zu MCM3 [184, 189-191]. MCM5 und MCM7 waren mittels Immunodetektion in der Elution der Anti-FLAG-Affinitätsmatrix nicht nachweisbar (ABBILDUNG 5B). Durch Immunodetektion mit phosphorylierungsspezifischen Antikörpern (Anti-pThr-Pro Antikörper) konnte Phosphorylierung an mindestens einem Threonin-Prolin-Motiv im gereinigten Protein FLAG-MCM3 nachgewiesen werden (ABBILDUNG 5B). Bei der Immunodetektion von MCM3 mit spezifischen Anti-MCM3 Antikörpern fällt ein Laufunterschied im SDS-PA-Gel (7,5 %) zwischen dem gereinigten FLAG-MCM3 und dem authentischen MCM3 aus HeLa-Zellen auf (ABBILDUNG 5B). Dieser Laufunterschied kann durch das Vorhandensein der 2,2 kDa großen

N-terminalen FLAG-Fusion im gereinigten FLAG-MCM3 erklärt werden. Das gereinigte Protein FLAG-MCM3 aus HeLa-Zellen wurde für ein GST-*pull-down*-Experiment verwendet. Dabei interagierte das Protein mit GST-Pin1, jedoch nicht mit GST (ABBILDUNG 5C). Dies stellt einen Nachweis für eine direkte Interaktion zwischen Pin1 und FLAG-MCM3 dar und ist damit ein weiteres Indiz dafür, dass die Interaktion von Pin1 mit dem MCM2-7-Komplex über MCM3 vermittelt wird.

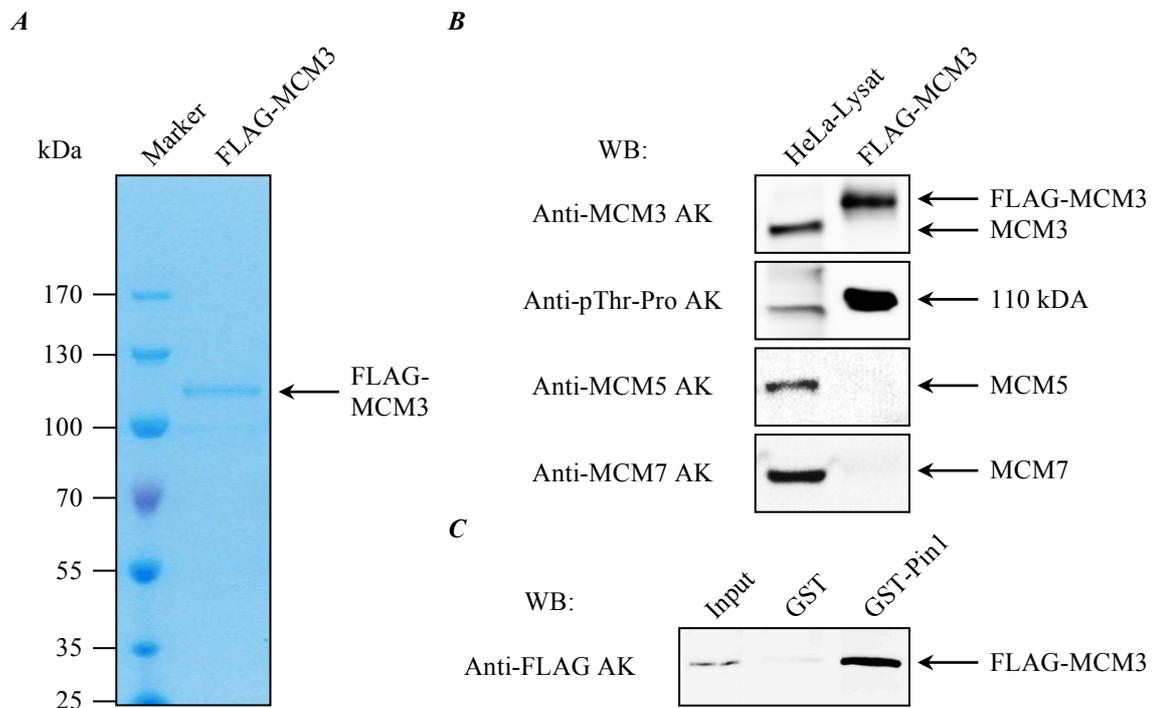


ABBILDUNG 5: ANALYSE VON GEREINIGTEM FLAG-MCM3 AUS HELa-ZELLEN UND DESSEN PULL-DOWN MIT GST-PIN1. HeLa-Zellen wurden mit dem Vektor pFLAG-MCM3 transfiziert und 60 h nach Transfektion geerntet und lysiert. Eine Anti-FLAG-Affinitätsmatrix wurde mit dem Zelllysat beladen, gewaschen und anschließend eluiert. Die Elutionsfraktion (FLAG-MCM3) wurde zusammen mit einem Proteingrößenmarker (Marker) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das SDS-PA-Gel (7,5 %) wurde einer Coomassie-Färbung unterzogen (A). Weiterhin wurde die Elutionsfraktion (FLAG-MCM3) zusammen mit HeLa-Zelllysat nicht transfizierter Zellen (HeLa-Lysat) als Kontrolle, mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot (WB) unter Verwendung spezifischer Antikörper (AK) analysiert (B). Glutathion-Sepharose wurde mit *E. coli*-Lysat inkubiert, welches GST (Kontrolle) bzw. GST-Pin1 enthielt. Nach dreimaligem Waschen mit Puffer wurde die Glutathion-Sepharose mit gereinigtem FLAG-MCM3 aus HeLa-Zellen inkubiert. Nach einem Waschschrift mit Puffer folgte die Elution mit einer Glutathion-Lösung (50 mM). Der Input und die beiden Elutionsfraktionen (GST und GST-Pin1) wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot (WB) unter Verwendung von spezifischen Anti-FLAG Antikörpern (Anti-FLAG AK) analysiert (C). Ladekontrolle siehe ABBILDUNG 46C im Anhang.

Anschließend sollte untersucht werden, welcher Bereich für die Interaktion von Pin1 mit MCM3 verantwortlich ist. Dazu wurde mithilfe der zielgerichteten Mutagenese Mutationen in der codierenden DNA-Sequenz von Pin1 in dem Vektor pGST-Pin1 eingeführt und die Vektoren pGST-Pin1_W34A, pGST-Pin1_K63A und pGST-Pin1_R68/69A hergestellt. Die Mutagenesen führen in den Proteinen an den entsprechenden Stellen zu Aminosäuresubstitutionen gegen Alanin. GST-Pin1 W34A weist einen Aminosäureaustausch in der WW-Domäne von Pin1 auf, GST-Pin1 K63A hingegen besitzt einen Aminosäureaustausch in der PPIase-Domäne von Pin1. In der Proteinvariante GST-Pin1 R68/69A sind die beiden Reste

Arg⁶⁸ und Arg⁶⁹ der PPIase-Domäne von Pin1 durch Alaninreste ersetzt. Nach Expression der Gene in *E. coli* ließen sich GST-Pin1 und die entsprechenden Proteinvarianten jeweils über Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie reinigen. Die Analyse der Proteinreinigungen erfolgte mittels SDS-PAGE (ABBILDUNG 45A). Eine densitometrische Analyse der Gelspuren ergab für das jeweilige Protein einen Reinheitsgrad > 90 % (nicht gezeigt). Die PPIase-Aktivitäten der gereinigten Fusionsproteine wurden im proteasefreien PPIase-Assay bestimmt (ABBILDUNG 45B, C). Die erhaltenen Ergebnisse sind in TABELLE 12 zusammengefasst.

TABELLE 12: PPIASE-AKTIVITÄT DER GST-PIN1-VARIANTEN.

GST-Pin1-Variante	mutierte Pin1-Domäne	PPIase-Aktivität in $k_{cat}/K_M (\times 10^6 M^{-1} s^{-1})$	PPIase-Aktivität (% GST-Pin1)
GST-Pin1	–	4,35 ± 0,26	100,0 ± 6,0
GST-Pin1 W34A	WW-Domäne	4,30 ± 0,12	98,9 ± 2,8
GST-Pin1 K63A	PPIase-Domäne	0,22 ± 0,01	5,1 ± 0,2
GST-Pin1 R68/69A	PPIase-Domäne	0,13 ± 0,01	3,0 ± 0,2

Die Messungen der PPIase-Aktivitäten von GST-Pin1 bzw. GST-Pin1-Varianten (W34A, K63A oder R68/69A) erfolgten mithilfe des proteasefreien PPIase-Assays in 35 mM HEPES-Puffer pH 7,8 in Anwesenheit von 60 µM Substrat Suc-Ala-Glu-Pro-Phe-pNA bei einer Temperatur von 10 °C. Die Konzentrationen der GST-Pin1-Varianten wurden variiert. Die angegebenen Werte entsprechen Mittelwerten mit den dazugehörigen Standardabweichungen aus drei Einzelmessungen.

GST-Pin1 und die Proteinvariante GST-Pin1 W34A weisen gleiche katalytische Aktivitäten gegenüber Peptidsubstrat auf. Dies stimmt gut mit Literaturwerten für Aktivitätsvergleiche der entsprechenden Proteine überein [92, 114]. Die Proteinvarianten GST-Pin1 K63A und GST-Pin1 R68/69A haben hingegen im Vergleich zu GST-Pin1, wie bereits beschrieben, eine deutlich verminderte PPIase-Aktivität, was auf die Aminosäureaustausche im katalytischen Zentrum der PPIase-Domäne von Pin1 zurückgeführt werden kann [114].

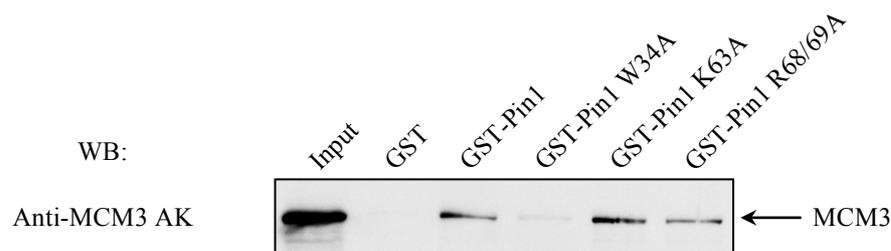


ABBILDUNG 6: PULL-DOWN VON MCM3 MIT GST-PIN1-VARIANTEN. Glutathion-Sepharose wurde mit *E. coli*-Lysat inkubiert, welches GST (Kontrolle), GST-Pin1 oder GST-Pin1-Variante (W34A, K63A bzw. R68/69A) enthielt. Nach dreimaligem Waschen mit Puffer wurde die Glutathion-Sepharose mit HeLa-Zelllysate inkubiert. Nach einem Waschschriff mit Puffer folgte die Elution mit einer Glutathion-Lösung (50 mM). Der Input und die verschiedenen Elutionsfraktionen (GST, GST-Pin1 und GST-Pin1-Varianten) wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot (WB) unter Verwendung von spezifischen Anti-MCM3 Antikörpern (Anti-MCM3 AK) analysiert. Ladekontrolle siehe ABBILDUNG 46D im Anhang.

Die GST-Pin1-Varianten wurden durch GST-pull-down-Experimente auf ihre Fähigkeit untersucht, mit MCM3 zu interagieren. Dazu wurden GST, GST-Pin1 bzw. GST-Pin1-Varianten an Glutathion-Sepharose-Matrizes immobilisiert und nach einem Waschschriff mit Puffer mit HeLa-Zelllysaten inkubiert. Nach Waschen mit Puffer wurden GST bzw. die ent-

sprechenden GST-Fusionsproteine von den jeweiligen Matrices spezifisch eluiert. MCM3 konnte mit spezifischen Anti-MCM3 Antikörpern in der Elution von GST-Pin1 und den Elutionen der beiden Varianten mit defizienter PPIase-Domäne (GST-Pin1 K63A und GST-Pin1 R68/69A) nachgewiesen werden (ABBILDUNG 6). MCM3 zeigte hingegen keine Affinität zu der Pin1-Variante mit defizienter WW-Domäne (GST-Pin1 W34A). Damit scheint hauptsächlich die WW-Domäne von Pin1 für die Interaktion mit MCM3 verantwortlich zu sein.

Um dies weiter zu untersuchen, wurden die separaten Domänen von Pin1 (WW-Domäne und PPIase-Domäne) im GST-pull-down-Experiment auf Bindung an MCM3 getestet (ABBILDUNG 7). Auch bei diesem Versuch konnte neben der Interaktion von MCM3 mit dem Fusionsprotein GST-Pin1, welches beide Domänen von Pin1 beinhaltet, nur eine Interaktion mit der isolierten WW-Domäne von Pin1 (GST-Pin1 WW) nachgewiesen werden. Für die isolierte PPIase-Domäne von Pin1 (GST-Pin1 PPIase) war bei diesem Versuch hingegen keine Interaktion mit MCM3 nachweisbar.

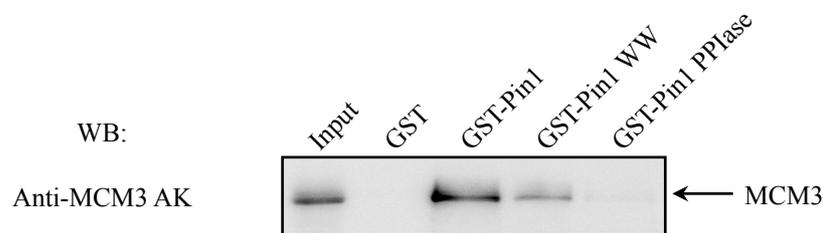


ABBILDUNG 7: PULL-DOWN VON MCM3 MIT GST-FUSIONIERTEN DOMÄNEN VON PIN1. Glutathion-Sepharose wurde mit *E. coli*-Lysat inkubiert, welches GST (Kontrolle), GST-Pin1, GST-fusionierte WW-Domäne von Pin1 (GST-Pin1 WW) oder GST-fusionierte PPIase-Domäne von Pin1 (GST-Pin1 PPIase) enthielt. Nach dreimaligem Waschen mit Puffer wurde die Glutathion-Sepharose mit HeLa-Zelllysat inkubiert. Nach einem Waschschriff mit Puffer folgte die Elution mit einer Glutathion-Lösung (50 mM). Der Input und die verschiedenen Elutionsfraktionen (GST, GST-Pin1, GST-Pin1 WW und GST-Pin1 PPIase) wurden mittels SDS-PAGE und anschließend Western Blot (WB) unter Verwendung von spezifischen Anti-MCM3 Antikörpern (Anti-MCM3 AK) analysiert. Ladekontrolle siehe ABBILDUNG 46E im Anhang.

3.1.2 Untersuchungen zum Einfluss der Phosphorylierung von MCM3 auf die Interaktion mit Pin1

Das humane Protein MCM3 ist aus 808 Aminosäureresten aufgebaut. Eine schematische Darstellung des Proteins zeigt ABBILDUNG 8. Die für dieses Protein charakteristische MCM-Domäne wird von den Aminosäureresten 295 bis 502 gebildet. Das Protein besitzt zwei Ser-Pro-Motive an den Positionen Ser¹¹²-Pro¹¹³ und Ser⁶¹¹-Pro⁶¹². Daneben gibt es zwei Thr-Pro-Motive an den Positionen Thr⁴⁶⁴-Pro⁴⁶⁵ und Thr⁷²²-Pro⁷²³.

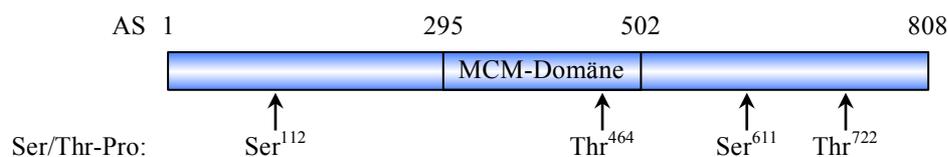


ABBILDUNG 8: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VON MCM3. Das humane MCM3 ist aus 808 Aminosäureresten (AS) aufgebaut. Die Aminosäurereste 295-502 bilden die MCM-Domäne. MCM3 besitzt zwei Ser-Pro- und zwei Thr-Pro-Motive. UniProt-Eintrag P25205 (MCM3_HUMAN), <http://www.uniprot.org/uniprot/P25205> (08.12.2014)

Um die Phosphorylierungsspezifität der Interaktion zwischen den Proteinen MCM3 und Pin1 weiter zu untersuchen wurde ein GST-*pull-down*-Experiment durchgeführt, bei dem das eingesetzte HeLa-Zellysate vorher mit Lambda-Proteinphosphatase behandelt wurde. Lambda-Proteinphosphatase zeigt Aktivität gegenüber phosphorylierten Serin-, Threonin- und Thyrosinresten in Proteinen [239]. Nach der Phosphatasebehandlung sollten die Serin- bzw. Threoninseitenketten der Ser/Thr-Pro-Motive in den Proteinen des HeLa-Zellysats keine Seitenkettenphosphorylierung mehr tragen. Als Kontrolle für das Experiment diente HeLa-Zellysate, dem anstelle der Phosphatase Phosphataseinhibitor zugesetzt wurde. Im Ergebnis zeigte sich, dass die Phosphatasebehandlung des HeLa-Zellysats die Interaktion zwischen MCM3 und GST-Pin1 verhindert (ABBILDUNG 9). Dies offenbart eine phosphorylierungsabhängige Interaktion zwischen Pin1 und MCM3.

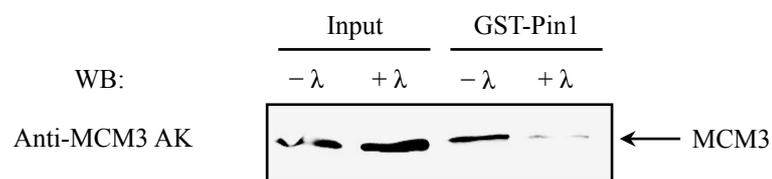


ABBILDUNG 9: PULL-DOWN VON MCM3 MIT GST-PIN1 NACH PHOSPHATASEBEHANDLUNG DES HELa-ZELLYSATS. Glutathion-Sepharose wurde mit *E. coli*-Lysat inkubiert, welches GST (Kontrolle) bzw. GST-Pin1 enthielt. Nach dreimaligem Waschen mit Puffer wurde die Glutathion-Sepharose mit HeLa-Zellysate inkubiert. Das HeLa-Zellysate wurde vorher entweder mit Phosphatase-Inhibitor (-λ) oder mit Lambda-Proteinphosphatase (+λ) behandelt. Nach einem Waschschrift mit Puffer folgte die Elution mit einer Glutathion-Lösung (50 mM). Der Input und die Elutionsfraktionen (GST-Pin1) wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot (WB) unter Verwendung von spezifischen Anti-MCM3 Antikörpern (Anti-MCM3 AK) analysiert. Ladekontrolle siehe ABBILDUNG 47A im Anhang.

Um weiter zu untersuchen, welche der seitenkettenphosphorylierten Serin- bzw. Threoninreste der vier existierenden Serin/Threonin-Prolin-Motive in MCM3 für die Interaktion mit Pin1 verantwortlich sind, wurden mithilfe der ortsgerichteten Mutagenese Mutationen in dem Vektor pFLAG-MCM3 eingeführt und die Vektoren pFLAG-MCM3_S112A, pFLAG-MCM3_T464A, pFLAG-MCM3_S611A und pFLAG-MCM3_T722A hergestellt. Diese Vektoren wurden in HeLa-Zellen transfiziert. Die Expression führte zu aminoterminal FLAG-fusionierten MCM3-Proteinen, in denen jeweils einer der Serin- bzw. Threoninreste der Serin/Threonin-Prolin-Motive in MCM3 gegen einen Alaninrest substituiert war. Im GST-*pull-down*-Experiment wurde die Bindung dieser FLAG-MCM3-Varianten an GST-Pin1 untersucht. Im Vergleich zum Protein FLAG-MCM3 Wildtyp, in dem alle Ser/Thr-Pro-Reste von MCM3 vollständig vorhanden sind, zeigten die beiden Proteinvarianten FLAG-MCM3 S112A und FLAG-MCM3 T722A eine deutlich verminderte Bindung an GST-Pin1. Ein Einfluss auf die Interaktion von MCM3 mit GST-Pin1 durch den Austausch des Aminosäurerestes Thr⁴⁶⁴ bzw. Ser⁶¹¹ gegen Alanin in MCM3 war hingegen nicht erkennbar (ABBILDUNG 10). Dieses Experiment zeigt, dass die beiden Aminosäurereste Ser¹¹² und Thr⁷²², welche beide jeweils den Teil eines Ser-Pro- bzw. Thr-Pro-Motivs in MCM3 bilden, die Bindung an Pin1 beeinflussen.

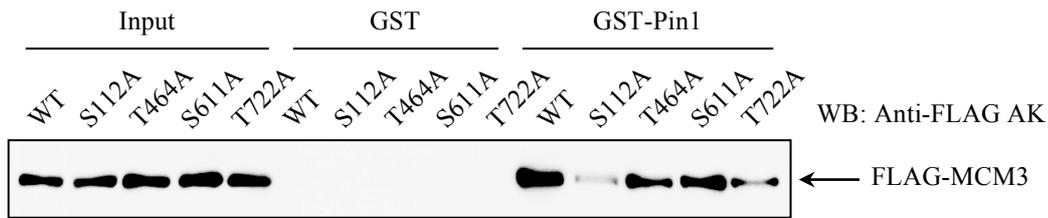


ABBILDUNG 10: PULL-DOWN VON FLAG-MCM3-VARIANTEN MIT GST-PIN1. Glutathion-Sepharose wurde mit *E. coli*-Lysat inkubiert, welches GST (Kontrolle) bzw. GST-Pin1 enthielt. Nach dreimaligem Waschen mit Puffer wurde die Glutathion-Sepharose mit HeLa-Zellysate inkubiert, in welchem FLAG-MCM3-Wildtyp (WT) oder FLAG-MCM3-Variante (S112A, T464A, S611A bzw. T722A) vorlag. Nach einem Waschschriff mit Puffer folgte die Elution mit einer Glutathion-Lösung (50 mM). Der Input und die verschiedenen Elutionsfraktionen (GST und GST-Pin1) wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot (WB) unter Verwendung von spezifischen Anti-FLAG Antikörpern (Anti-FLAG AK) analysiert. Ladekontrolle siehe **ABBILDUNG 47B** im Anhang.

3.1.3 Untersuchungen zur Interaktion von Pin1 mit chromatinassoziiertem MCM3

Da MCM3 aufgrund seiner Funktion sowohl nicht chromatinassoziiert (frei) als auch chromatinassoziiert in Zellen vorliegt, wurde untersucht ob Pin1 prinzipiell auch chromatinassoziiertes MCM3 binden kann.

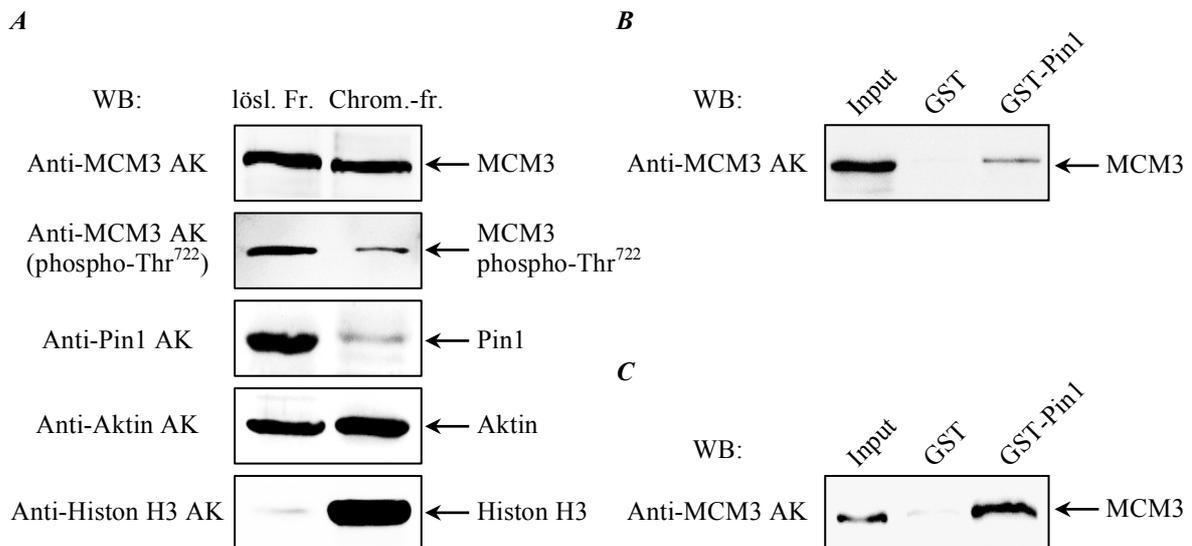


ABBILDUNG 11: PULL-DOWN VON LÖSLICHEM MCM3 UND MCM3 AUS DER CHROMATINFRAKTION MIT GST-PIN1. HeLa-Lysat wurde in lösliche Fraktion (lösl. Fr.) und Chromatinfraction (Chrom.-fr.) separiert und mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot (WB) unter Verwendung spezifischer Antikörper (AK) analysiert (**A**). Als Ladekontrolle diente Aktin. Histon H3 wurde als spezifisch chromatinassoziiertes Protein untersucht. Glutathion-Sepharose wurde mit *E. coli*-Lysat inkubiert, welches GST (Kontrolle) bzw. GST-Pin1 enthielt. Nach dreimaligem Waschen mit Puffer wurde die Glutathion-Sepharose entweder mit HeLa-Proteinen aus der löslichen Fraktion (**B**) oder der Chromatinfraction (**C**) inkubiert. Nach einem Waschschriff mit Puffer folgte die Elution mit einer Glutathion-Lösung (50 mM). Der Input und die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot (WB) unter Verwendung von spezifischen Anti-MCM3 Antikörpern (Anti-MCM3 AK) analysiert. Ladekontrollen siehe **ABBILDUNG 47C, D** im Anhang.

Hierfür wurde mittels Chromatinfractionierung das freie MCM3 vom chromatingebundenen MCM3 separiert. In beiden Fraktionen war MCM3 und darüber hinaus MCM3 mit

Phosphorylierung an Position Thr⁷²² nachweisbar. Dabei war die Menge an chromatingebundenem MCM3 mit dieser Phosphorylierung kleiner als die Menge an freiem MCM3 mit Phosphorylierung an dieser Position. Pin1 wurde in großer Menge in der löslichen Fraktion, jedoch nur in äußerst geringer Menge in der Chromatinfraction nachgewiesen (ABBILDUNG 11A). Sowohl die lösliche Fraktion als auch die Chromatinfraction wurden durch ein GST-pull-down-Experiment auf die Eigenschaft zur Bindung an GST-Pin1 untersucht. MCM3 konnte mit spezifischen Anti-MCM3 Antikörpern in den Elutionen von GST-Pin1 beider Fraktionen, aber nicht in den Elutionen der jeweiligen Kontrollen nachgewiesen werden (ABBILDUNG 11B, C). Damit besitzt sowohl freies als auch chromatinassoziiertes MCM3 prinzipiell die Fähigkeit zur Interaktion mit Pin1.

3.1.4 Untersuchungen zur Interaktion von Pin1 mit MCM3 im Verlauf des Zellzyklus

Untersuchungen an Mäusen haben gezeigt, dass die Menge an Pin1-mRNA in verschiedenen Geweben nahezu identisch ist und die spezifischen Pin1-Aktivitäten in diesen Geweben sehr ähnliche Werte aufweisen [240]. Mehrfach wurde beschrieben, dass die Pin1-Menge im Laufe des Zellzyklus von HeLa-Zellen konstant bleibt [84, 223]. Allerdings variiert die PPlase-Aktivität von Pin1 im Verlauf des Zellzyklus von HeLa-Zellen [241]. Die Expression des Gens *MCM3* wird in HeLa-Zellen zellzyklusabhängig reguliert [242]. Für WI-38-Zellen wurde beschrieben, dass die Proteinmenge an MCM4 in der S-Phase ihr Maximum erreicht, in HeLa-Zellen verläuft die *MCM4*-Expression jedoch zellzyklusunabhängig [243].

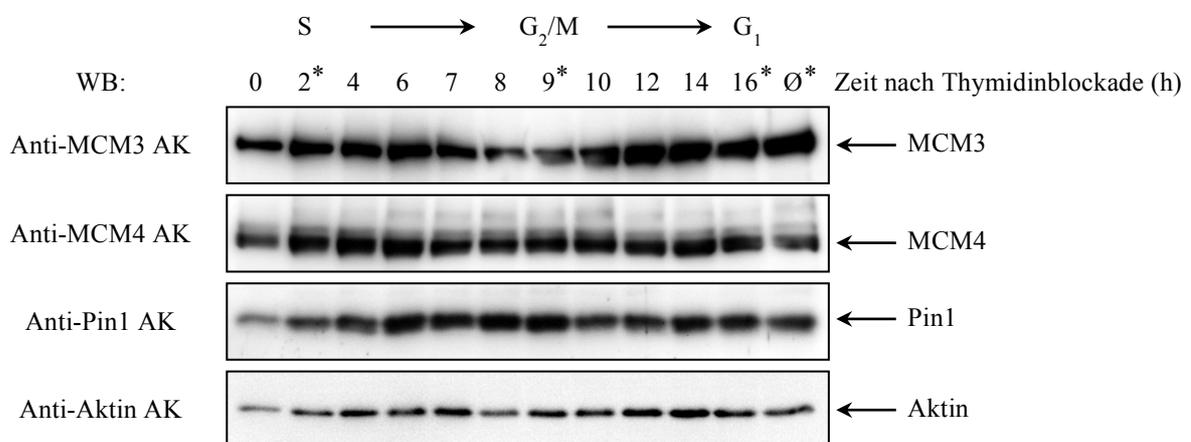


ABBILDUNG 12: ANALYSE VON MCM3 UND MCM4 IN SYNCHRONISIERTEN HELa-ZELLEN ZU VERSCHIEDENEN ZEITPUNKTEN IM ZELLYKLUS. HeLa-Zellen wurden mittels Thymidin blockiert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aufhebung der Blockade geerntet und lysiert. Als Kontrolle wurden unsynchronisierte HeLa-Zellen (Ø) geerntet und lysiert. Die Zellysate wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot (WB) unter Verwendung von proteinspezifischen Antikörpern (AK) analysiert. Als Ladekontrolle wurde Aktin analysiert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach Aufhebung der Blockierung (*) durchlaufen die Zellen die S-Phase (S), G₂/M-Phase (G₂/M) und G₁-Phase (G₁) des Zellzyklus.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht inwieweit sich die vorhandene Proteinmenge an MCM3 und MCM4 in HeLa-Zellen beim Durchlaufen des Zellzyklus verändert. Dafür wurden HeLa-Zellen mittels Thymidinblockade am Beginn der S-Phase synchronisiert. Nach

Aufhebung der Blockade wurden die Zellen anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und die relative Proteinmenge an MCM3, MCM4 und Pin1 mittels Western Blot untersucht (ABBILDUNG 12). Im Verhältnis zur Ladekontrolle Aktin weist Pin1 keine starken Variationen in der Proteinmenge beim Durchlaufen des Zellzyklus auf. Die Proteinmengen an MCM3 und MCM4 zeigen hingegen 8 h nach Aufhebung der Thymidinblockade Minima und erreichen Maxima etwa 4 h und 14 h nach Aufhebung der Thymidinblockade. Zusammen mit einer Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aufhebung der Thymidinblockade lassen sich diese Zeitpunkte verschiedenen Zellzyklusphasen zuordnen. Als Kontrolle dienten dabei Zellen, die nicht mittels Thymidinblockade synchronisiert wurden. Die Zeitpunkte 2 h, 9 h und 16 h nach Aufhebung der Thymidinblockade entsprechen etwa dem Durchlaufen der S-, G₂/M- bzw. der G₁-Phase des Zellzyklus (siehe ABBILDUNG 13). Da Pin1 an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist [71, 223], wurde untersucht inwieweit die Interaktion zwischen Pin1 und MCM3 dem Verlauf des Zellzyklus unterliegt. Hierfür wurden HeLa-Zellen mittels Thymidinblockade synchronisiert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aufhebung der Blockade geerntet und lysiert. Als Kontrolle dienten unsynchronisierte Zellen. Die Zeitpunkte für die Ernte der Zellen wurden dabei so gewählt, dass die resultierenden Zelllysate jeweils Anreicherungen in bestimmten Zellzyklusphasen repräsentieren. Diese ließen sich durch Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS) ermitteln (ABBILDUNG 13).

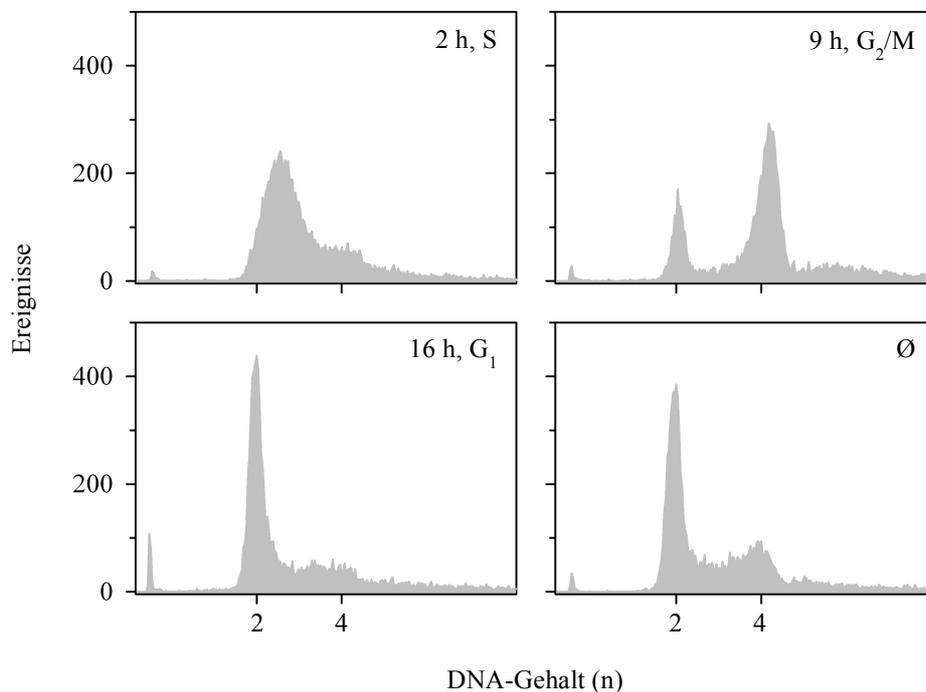


ABBILDUNG 13: ANALYSE SYNCHRONISierter HELa-ZELLEN MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE ZU VERSCHIEDENEN ZEITPUNKTEN IM ZELLYKLUS. HeLa-Zellen wurden mittels Thymidin blockiert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aufhebung der Blockade (2 h, 9 h und 16 h) geerntet, mit Ethanol fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Als Kontrolle wurden unsynchronisierte HeLa-Zellen (Ø) gleich behandelt. Die Zellen wurden anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert, dabei wurden jeweils 10000 Ereignisse aufgenommen. Die Zeitpunkte nach Aufhebung der Blockade wurden anhand der Histogramme der synchronisierten Zellen den entsprechenden Zellzyklusphasen S, G₂/M bzw. G₁ zugeordnet.

Die verschiedenen Zelllysate wurden nun für GST-pull-down-Experimente eingesetzt und die Interaktion von Pin1 mit MCM3 aus diesen Zelllysaten untersucht (ABBILDUNG 14). Dabei war ersichtlich, dass Pin1 mit MCM3 aus Lysaten aller getesteten Zellzyklusphasen interagiert. Hinsichtlich der Intensität der Interaktion zeigten sich jedoch Unterschiede. Es scheint, dass Pin1 am stärksten mit MCM3 aus den Zellen interagiert welche 9 h nach Thymidinblockade geerntet wurden. Dieser Zeitpunkt repräsentiert die G₂/M-Phase des Zellzyklus der HeLa-Zellen. Im Vergleich dazu zeigt MCM3 aus Zellen, die zum Zeitpunkt 2 h und 16 h nach der Thymidinblockade geerntet wurden und damit repräsentativ für die S- bzw. G₁-Phase des Zellzyklus sind, geringere Affinität zu Pin1.

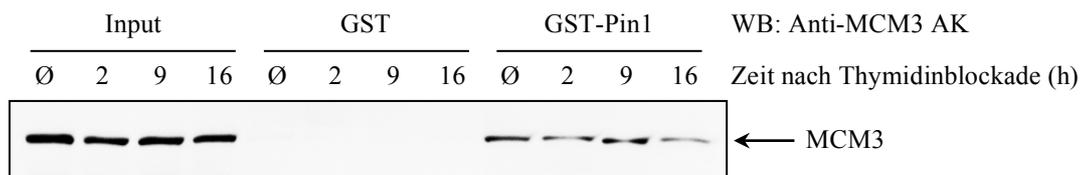


ABBILDUNG 14: PULL-DOWN VON MCM3 MIT GST-PIN1 ZU VERSCHIEDENEN ZEITPUNKTEN IM ZELLYKLUS. Glutathion-Sepharose wurde mit *E. coli*-Lysat inkubiert, welches GST (Kontrolle) bzw. GST-Pin1 enthielt. Nach dreimaligem Waschen mit Puffer wurde die Glutathion-Sepharose mit HeLa-Zelllysaten inkubiert. Die Zelllysate stammten von unsynchronisierten HeLa-Zellen (Ø) bzw. von HeLa-Zellen, welche mittels Thymidin blockiert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aufhebung der Blockade (2 h, 9 h oder 16 h) geerntet wurden. Nach einem Waschschriff mit Puffer folgte die Elution mit einer Glutathion-Lösung (50 mM). Der Input und die verschiedenen Elutionsfraktionen (GST und GST-Pin1) wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot (WB) unter Verwendung von spezifischen Anti-MCM3 Antikörpern (Anti-MCM3 AK) analysiert. Ladekontrolle siehe ABBILDUNG 47E im Anhang.

Aufgrund dieser Ergebnisse sollte die Lokalisierung von Pin1 und MCM3 in HeLa-Zellen sowohl zu einem Interphase- als auch zu einem Mitosezeitpunkt untersucht werden. Hierfür wurden HeLa-Zellen zunächst mit dem Leervektor (pEGFP-C1) oder mit dem Vektor pEGFP-Pin1 transfiziert. In den jeweiligen transfizierten Zellen konnte die Biosynthese von eGFP bzw. von Pin mit einer N-terminalen eGFP-Fusion (eGFP-Pin1) durch Western Blot nachgewiesen werden. Als Kontrolle dienten dabei nicht transfizierte HeLa-Zellen (ABBILDUNG 48 im Anhang). Einzelne transfizierte HeLa-Zellen wurden im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. Das Fusionsprotein eGFP-Pin1 konnte aufgrund seiner Eigenfluoreszenz gut detektiert werden. Die gleichzeitige Detektion von MCM3 in diesen Zellen erfolgte über spezifische Antikörper. Während der Interphase (ABBILDUNG 15A) ist das Protein eGFP-Pin1 bevorzugt im Nukleus der Zelle lokalisiert. Dabei fällt die für Pin1 typische Akkumulation in Substrukturen innerhalb des Nukleus auf, welche als *nuclear speckles* bezeichnet werden [71] und als leuchtende grüne Punkte zu erkennen sind. MCM3 zeigt während der Interphase ebenso eine Lokalisierung im Nukleus. Eine deutliche Kolo-kalisation beider Proteine ist dabei nicht zu erkennen. Eher scheint es, dass MCM3 vor allem in Regionen innerhalb des Nukleus lokalisiert ist, in denen Pin1 unterrepräsentiert auftritt. Dies zeigt sich am deutlichsten in Bereichen der *nuclear speckles*. Trotzdem ist aufgrund der nuklearen Lokalisierung beider Proteine eine kurzfristige Interaktion zwischen diesen denkbar. Die Lokalisierung beider Proteine wurde auch in mitotischen Zellen untersucht (ABBILDUNG 15B). Während der Mitose zeigt Pin1 eine deutliche Lokalisierung in den Zentrosomen (ABBILDUNG

15B, C). MCM3 ist während der Mitose ebenfalls in den Zentrosomen lokalisiert [219] und beide Proteine kolokalisieren während der Mitose in den Zentrosomen.

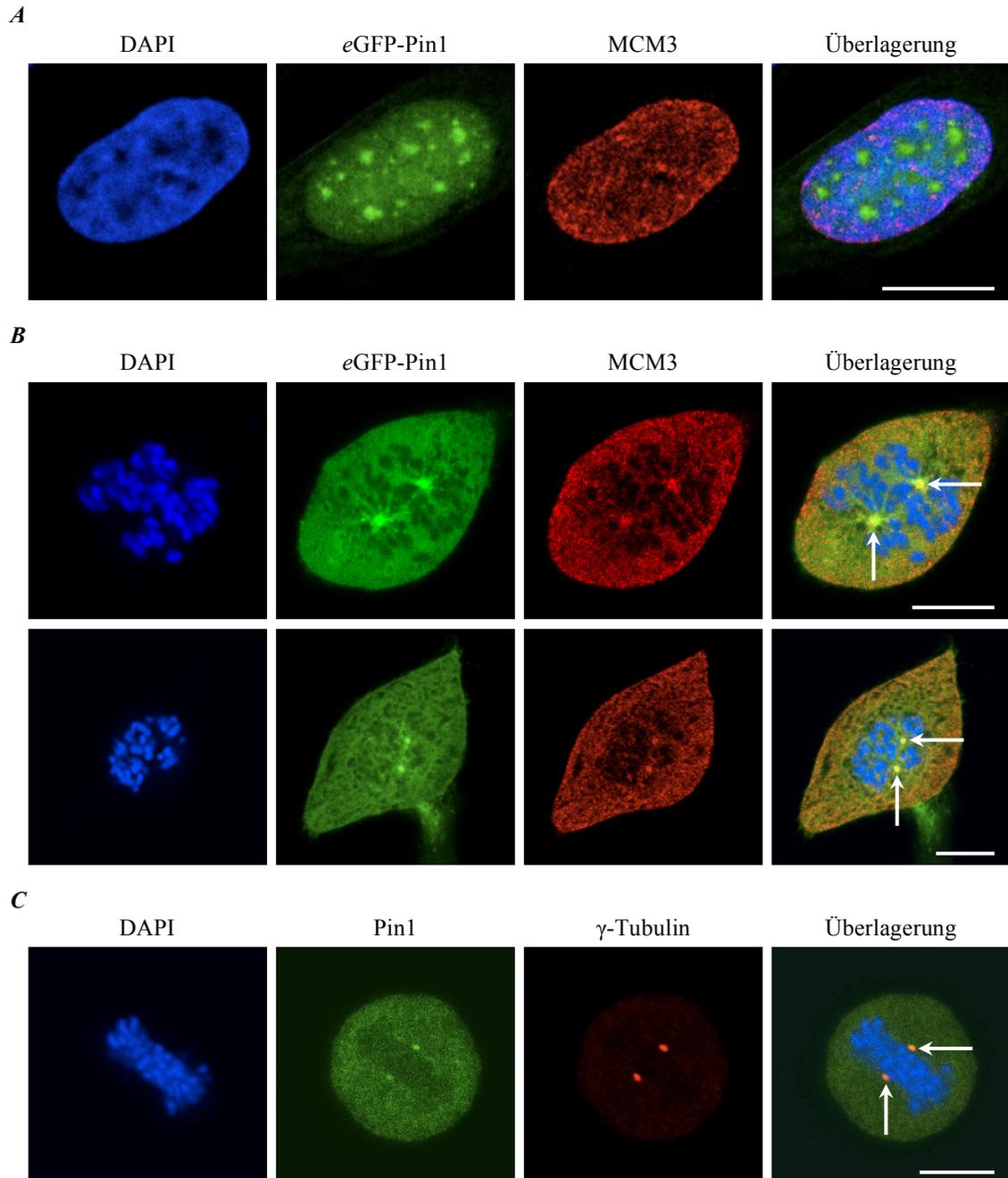
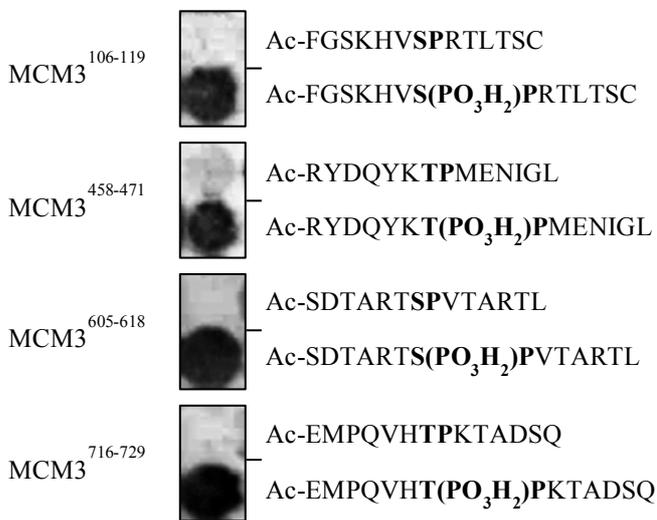


ABBILDUNG 15: LOKALISIERUNG VON PIN1 UND MCM3 IN HELa-ZELLEN. **A, B)** HeLa-Zellen wurden mit dem Vektor pEGFP-Pin1 transfiziert und 48 h danach mit Methanol und Formaldehyd fixiert. Die Färbung der DNA erfolgte mit DAPI. MCM3 wurde mit spezifischen Anti-MCM3 Antikörpern und Texas Red-Anti-Ziege IgG gefärbt. **C)** In nicht transfizierten HeLa-Zellen wurde Pin1 mit spezifischen Anti-Pin1 Antikörpern und FITC-Anti-Maus IgG gefärbt. Die Färbung von γ -Tubulin erfolgte mit spezifischen Anti- γ -Tubulin Antikörpern und Rhodamin Red-X-Anti-Kaninchen IgG. Die Detektion erfolgte an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop bei 600facher Vergrößerung. Die weißen Pfeile zeigen auf die Kolokalisierung von eGFP-Pin1 und MCM3 (**B**) bzw. Pin1 und γ -Tubulin (**C**) in den Zentrosomen zu Mitosezeitpunkten. Die weißen Balken entsprechen jeweils 10 μ m. γ -Tubulin diente als Zentrosomenmarker. Die Bilder wurden in Kooperation mit Dr. S. MATHEA aufgenommen.

3.2 Untersuchungen von MCM3-abgeleiteten Peptidderivaten

Um die Bindestellen von Pin1 in MCM3 zu charakterisieren, wurden aus der Aminosäuresequenz von MCM3 vier tetradekamer Peptide abgeleitet, welche Sequenzabschnitte von MCM3 repräsentierten und jeweils eines von vier Ser/Thr-Pro-Motiven aus MCM3 enthielten. Die entsprechenden Ser/Thr-Pro-Reste befanden sich dabei in der Mitte der Peptide, flankiert von jeweils sechs amino- und carboxyterminalen Aminosäuren. Die Peptide und ihre am Serin- bzw. Threoninrest phosphorylierten Analoga wurden durch Dr. M. MALEŠEVIĆ als Peptidspots auf eine Zellulosemembran synthetisiert. Nach Inkubation der Membran mit Pin1 wurde die Membran einem Elektrotransfer auf Nitrozellulosemembranen unterzogen und mittels Immunodetektion auf die Bindung der PPIase an die Peptidspots untersucht. Pin1 band dabei alle vier abgeleiteten Peptide, jedoch nur wenn diese eine Seitenkettenphosphorylierung an den entsprechenden Serin- bzw. Threoninresten aufwiesen (ABBILDUNG 16).



IB: Anti-Pin1 AK

ABBILDUNG 16: INTERAKTIONSSTUDIE VON PIN1 MIT MEMBRANGEBUNDENEN PEPTIDEN, ABGELEITET VON DER AMINOSÄURESEQUENZ VON MCM3. Aminoterminal acetylierte tetradekamer Peptide mit Ser-Pro- bzw. Thr-Pro-Motiven und ihre seitenkettenphosphorylierten Analoga wurden als Peptidspots auf eine Zellulosemembran synthetisiert. Als linker zwischen den Peptiden und der Zellulosemembran diente β -Ala- β -Ala. Nach Inkubation der Membran mit 10 μ M Pin1 wurde die Membran gewaschen. Die Detektion des gebundenen Proteins erfolgte nach Immunoblot (IB) der Membran mit Anti-Pin1 Antikörper (Anti-Pin1 AK). Dunkelfärbungen zeigen Signale an.

MCM3

<i>Homo sapiens</i>	LEGSFGSKHVS ¹¹² PRTLTLTSCFL.....PQVH--T ⁷²² PKTADS-----QETK
<i>Pan troglodytes</i>	LEGSFGSKHVS ¹¹² PRTLTLTSCFL.....PQVH--T ⁷²² PKTADS-----QETK
<i>Rattus norvegicus</i>	LEGSFGSKHVS ¹¹² PRTLTLTSCFL.....PQVH--T ⁷²¹ PKTDDSQEKTDESQETQ
<i>Mus musculus</i>	LEGSFGSKHVS ¹¹² PRTLTLTSCFL.....PQVH--T ⁷¹⁹ PKTDDSQEKTDDSQETQ
<i>Bos taurus</i>	LEGSFGSKHVS ¹¹² PRTLTLTSCFL.....PQVH--T ⁷²² PKATDS-----QETK
<i>Sus scrofa</i>	LEGSFGSKHVS ¹⁴⁵ PRTLTLTSCFL.....PQVH--T ⁷⁵⁵ PKAPDS-----QETK
<i>Gallus gallus</i>	LEGSFGSKHVS ¹¹³ PRTLTLTACFL.....PEVQAHT ⁷²⁶ PKTPE-----SSATG
<i>S. cerevisiae</i>	FKGSFGAHALS ¹⁶⁷ PRTLTLTAQHL.....PLTEVGT ⁸⁶⁸ PRLPNVSSAGQDDEQQQ
	::*****:: :* *****: .* * .. * *: :

ABBILDUNG 17: AUSSCHNITTE DES VERGLEICHS VON AMINOSÄURESEQUENZEN MCM3-HOMOLOGER PROTEINE VERSCHIEDENER SPEZIES. Der Sequenzvergleich erfolgte online unter <http://www.uniprot.org/align/>. Vollständig konservierte Aminosäurereste (*) und Aminosäurereste mit stark (:) bzw. schwach (.) ähnlichen Eigenschaften sind gekennzeichnet. Für den Sequenzvergleich wurden die Proteine mit den UniProt-Einträgen P25205, H2QT66, D3ZFP4, P25206, A4FUD9, I3L7E5, Q5ZMN2 und P24279 verwendet.

Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion von Pin1 und MCM3 phosphorylierungsabhängig ist. Eine Spezifität für eines der vier unterschiedlichen Peptide konnte jedoch mit dieser Methode nicht ermittelt werden. Legt man die unter *KAPITEL 3.1.2* beschriebenen Experimente zugrunde, so verläuft die Interaktion zwischen Pin1 und MCM3 über die beiden phosphorylierten Motive Ser¹¹²-Pro¹¹³ und Thr⁷²²-Pro⁷²³ in MCM3 (vgl. *ABBILDUNG 10*). Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen von MCM3-homologen Proteinen verschiedener Organismen lässt sich die Konservierung dieser Motive erkennen (*ABBILDUNG 17*). Ausgehend von der Aminosäuresequenz von MCM3 wurden Peptidderivate abgeleitet und synthetisiert, die zum Teil eine Seitenkettenphosphorylierung im Serin- bzw. Threoninrest dieser Ser/Thr-Pro-Motive tragen. Diese wurden für nachfolgende Experimente unterschiedlicher Art eingesetzt. Die Sequenzen der hergestellten Peptidderivate und die zugehörige Aminosäuresequenz in MCM3 sind in *TABELLE 13* zusammengestellt.

TABELLE 13: BEZEICHNUNGEN UND SEQUENZEN DER VON MCM3 ABGELEITETEN PEPTIDDERIVATE.

Name	Peptidderivat	Aminosäuresequenz in MCM3
P1	Ac-FGSKHVS(PO₃H₂)PRTLTS-NH ₂	MCM3 ¹⁰⁶⁻¹¹⁹
P2	Ac-EMPQVHT(PO₃H₂)PKTADSQ-NH ₂	MCM3 ⁷¹⁶⁻⁷²⁹
P3	Abz-AEPRY(NO ₂)-NH ₂	–
P4	Abz-HVSPRTY(NO ₂)-NH ₂	MCM3 ¹¹⁰⁻¹¹⁵
P5	Abz-HVS(PO₃H₂)PRTY(NO ₂)-NH ₂	MCM3 ¹¹⁰⁻¹¹⁵
P6	Abz-VHTPKTY(NO ₂)-NH ₂	MCM3 ⁷²⁰⁻⁷²⁵
P7	Abz-VHT(PO₃H₂)PKTY(NO ₂)-NH ₂	MCM3 ⁷²⁰⁻⁷²⁵
P8	Abz-VKT(PO₃H₂)PKTY(NO ₂)-NH ₂	–
P9	Abz-VAT(PO₃H₂)PKTY(NO ₂)-NH ₂	–
P10	Abz-VET(PO₃H₂)PKTY(NO ₂)-NH ₂	–
P11	Abz-VKT(PO₃H₂)PHTY(NO ₂)-NH ₂	–

Die Namen der Peptidderivate und die Ser/Thr-Pro-Motive sind hervorgehoben.

In den beiden Peptidderivaten **P1** und **P2** ist das entsprechende seitenkettenphosphorylierte Ser/Thr-Pro-Motiv bezogen auf die Aminosäurekette zentral angeordnet. Um zunächst Informationen über den Gehalt an Sekundärstrukturelementen innerhalb dieser Peptidderivate gewinnen zu können, wurden beide Peptidderivate mittels CD-Spektroskopie im Fern-UV-Bereich untersucht (*ABBILDUNG 18*). Im Vergleich zeigen beide Peptidderivate sehr ähnliche Fern-UV-CD-Spektren, jedoch lieferte **P1** ein Signal mit höherer Intensität. Die beiden Fern-UV-CD-Spektren sind typisch für ungefaltete Polypeptidketten. Geordnete Sekundärstrukturen sind nicht vorhanden. Dabei repräsentieren die Spektren auch nicht das charakteristische Fern-UV-CD-Spektrum für *random coil* [244]. Die Fern-UV-CD-Spektren weisen negative Absorptionsmaxima bei 200 nm (**P1**) bzw. 199 nm (**P2**) auf. Die beiden Spektren besitzen Ähnlichkeiten zu Fern-UV-CD-Spektren von α -Synuclein und des vom Protein Tau abgeleiteten Peptids K12, einem Konstrukt aus verschiedenen Domänen des Tau-Proteins [245, 246].

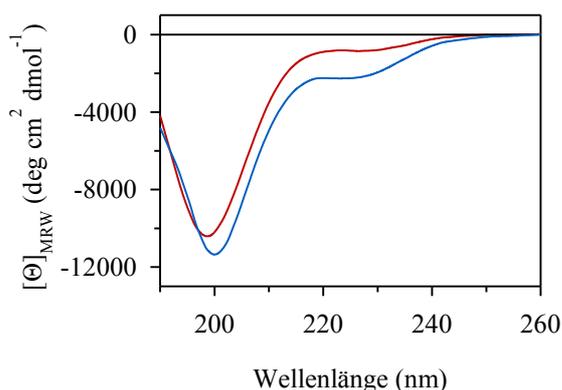


ABBILDUNG 18: ANALYSE DER SEKUNDÄRSTRUKTUR VON **P1** (—) UND **P2** (—) MITTELS FERN-UV-CD-SPEKTROSKOPIE. Die Messungen erfolgten in Puffer 5 mM Natriumphosphat pH 7,5 bei einer Temperatur von 20 °C. Die Peptidkonzentration betrug jeweils 100 μM .

Um Aussagen über die Affinität treffen zu können, wurden die Interaktionen von Pin1 und Pin1 WW mit den Peptidderivaten **P1** sowie **P2** mithilfe der Methode der isothermen Titrationskalorimetrie untersucht (ABBILDUNG 19 bzw. ABBILDUNG 20). Pin1 und dessen separierte WW-Domäne (Pin1 WW) interagierten mit beiden Peptidderivaten. Beim Vergleich der Bindungsaffinitäten zeigte Peptidderivat **P2**, welches die Primärstruktur im Bereich des seitenkettenphosphorylierten Thr⁷²²-Pro⁷²³-Motivs von MCM3 repräsentiert, deutlich höhere Affinitäten zu den Proteinen. Für diese Bindungen wurden für **P2** Dissoziationskonstanten K_D von 30,8 μM gegenüber Pin1 bzw. von 19,9 μM gegenüber Pin1 WW ermittelt (ABBILDUNG 20). Sowohl für die Interaktion von Pin1 mit **P2** als auch für die Interaktion von Pin1 WW mit **P2** wurde eine Stöchiometrie des Komplexes von $N \approx 1$ ermittelt. Beide Interaktionen gehen mit einer Entropieabnahme einher und sind enthalpisch getrieben.

Im Vergleich dazu unterscheiden sich die Bindungen von **P1** zu Pin1 bzw. Pin1 WW in ihrer Affinität stark und sind deutlich niedriger affin. Aufgrund dieser Gegebenheit ließen sich mithilfe der verwendeten Methode die Dissoziationskonstanten für diese Bindungen nicht exakt bestimmen. Durch Extrapolationen konnten dennoch Werte für die Dissoziationskonstanten K_D abgeschätzt werden. Je nach Auftragung wurden für diese Interaktionen dabei Werte für **P1** von 6,9 mM und 5,7 mM gegenüber Pin1 bzw. von ca. 0,8 mM und 0,9 mM gegenüber Pin1 WW abgeschätzt (ABBILDUNG 19). Mithilfe der isothermen Titrationskalorimetrie ließ sich unter entsprechenden Messbedingungen weder für **P1** noch für **P2** eine Interaktion mit der separierten PPIase-Domäne von Pin1 (Pin1 PPIase) nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Phosphorylierte Ser/Thr-Pro-Motive stellen für Pin1 typische Substrate dar [100]. Aufgrund dessen katalytischer Aktivität besteht die Möglichkeit, dass MCM3 ein Proteinsubstrat für dieses Enzym bildet und innerhalb eines oder beider als Pin1-Interaktionsstellen detektierten Motive Ser¹¹²-Pro¹¹³ und Thr⁷²²-Pro⁷²³ enzymkatalysierte *cis/trans*-Isomerisierungen der Peptidyl-Prolylbindungen stattfinden. Die von MCM3 abgeleiteten und synthetisch hergestellten Peptidderivate **P4** bis **P7** bilden die Pin1-Interaktionsstellen als Hexapeptide ab. Dabei tragen sie das entsprechende Ser/Thr-Pro-Motiv entweder mit oder ohne Seitenkettenphosphorylierung.

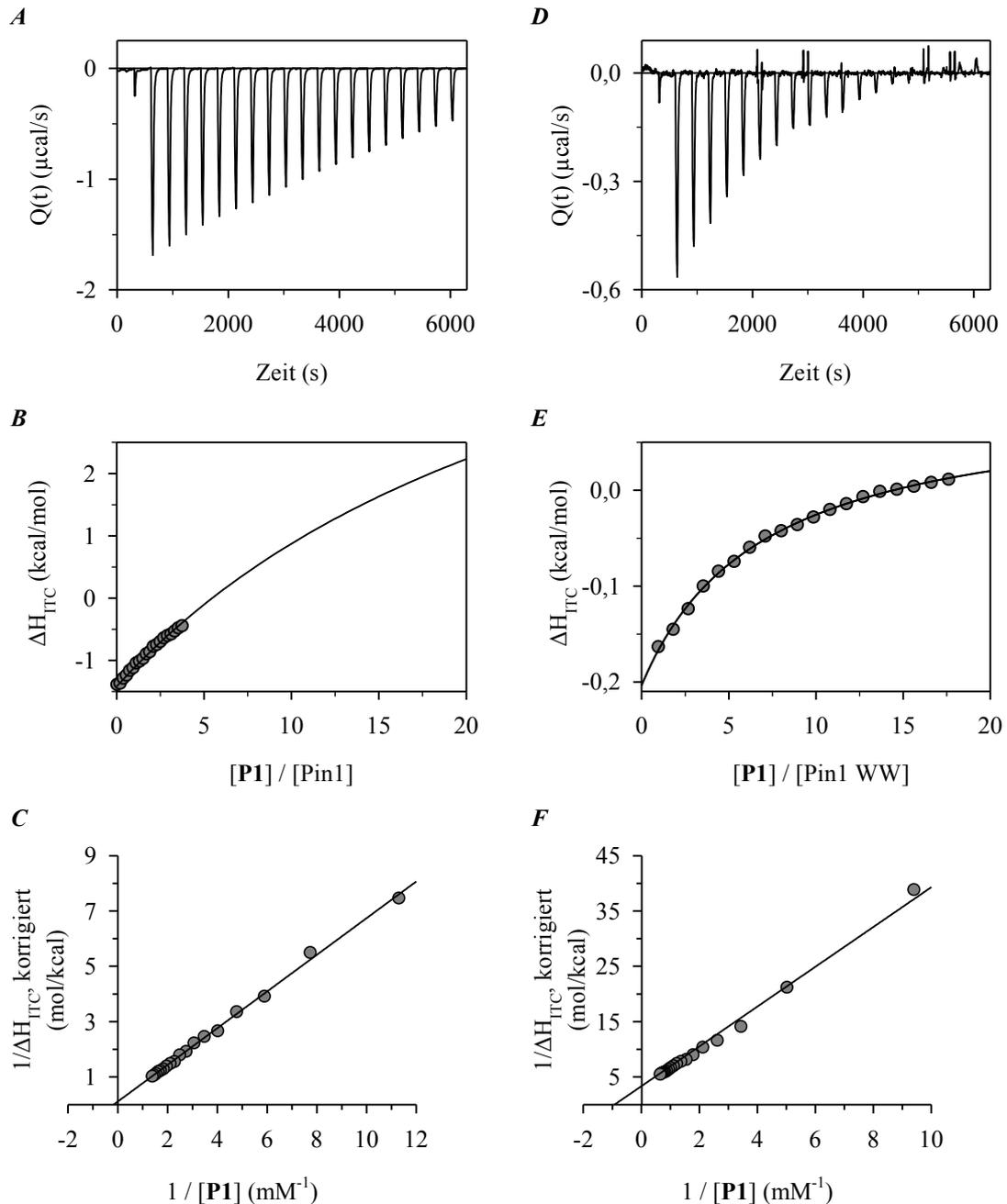


ABBILDUNG 19: ISOTHERME TITRATIONS-KALORIMETRIE DES PEPTIDDERIVATES **P1** MIT **PIN1** BZW. **PIN1 WW**. Die Messungen erfolgten in Puffer 35 mM HEPES pH 7,8 bei einer Temperatur von 20 °C. Eine Lösung von 4 mM bzw. 9 mM **P1** wurde in Schritten von je 15 µl zu 1,4 ml einer Lösung von 236 µM Pin1 (**A**) oder 113 µM Pin1 WW (**D**) in der Messzelle titriert und die sich dabei ergebenden Titrationpeaks gegen die Messzeit aufgetragen. Die Titration von **P1** gegen Puffer wurde hierfür als Referenz jeweils separat aufgenommen und vom entsprechenden Thermogramm subtrahiert. Die integrierten Titrationpeaks wurden gegen das stöchiometrische Verhältnis von **P1** zu Pin1 (**B**) bzw. Pin1 WW (**E**) aufgetragen. Bei der Titration von **P1** zu Pin1 oder Pin1 WW wurde keine Sättigung von Pin1 bzw. Pin1 WW mit Ligand erreicht. Die nichtlineare Regression der Datenpunkte nach einem Ein-Seiten-Bindemodell ergab nach Extrapolation eine Dissoziationskonstante $K_D = 6,9$ mM (**B**) bzw. $K_D = 780$ µM (**E**). Durch lineare Regression nach doppelt-reziproker Auftragung wurde eine Dissoziationskonstante $K_D = 5,7$ mM (**C**) bzw. $K_D = 920$ µM (**F**) ermittelt.

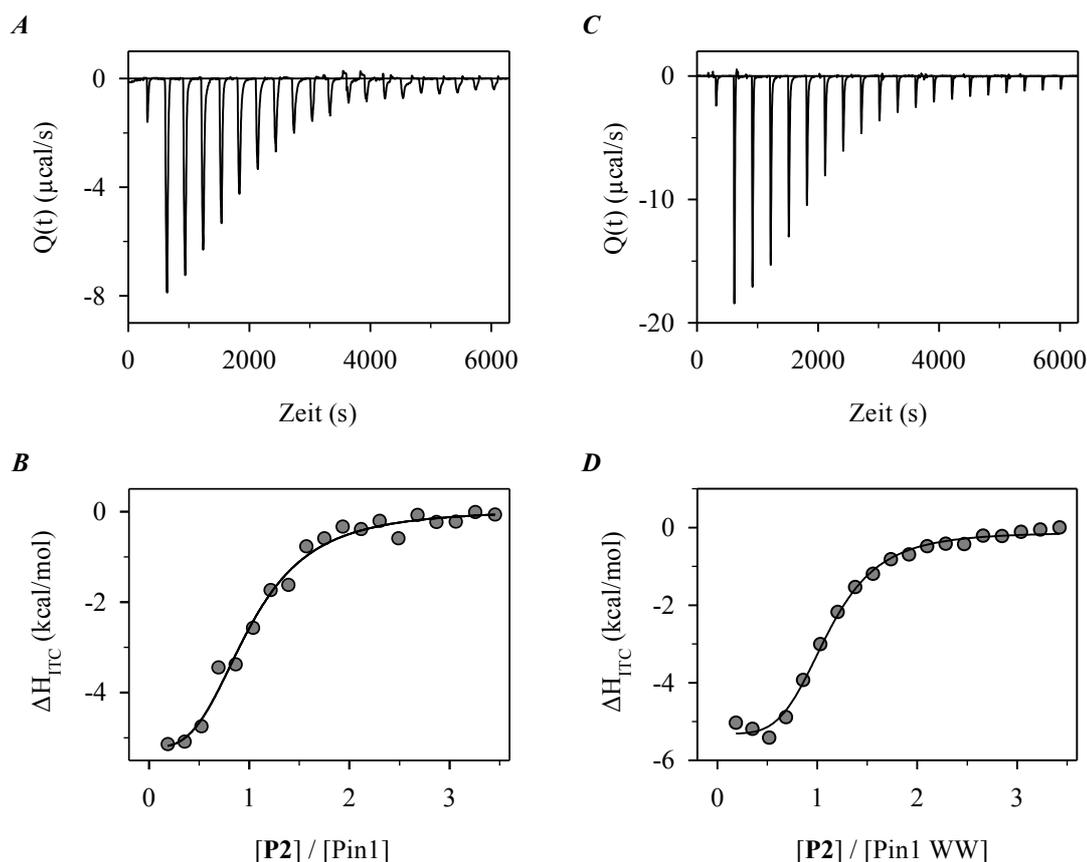


ABBILDUNG 20: ISOTHERME TITRATIONS-KALORIMETRIE DES PEPTIDDERIVATES **P2** MIT **PIN1** BZW. **PIN1 WW**. Die Messungen erfolgten in Puffer 35 mM HEPES pH 7,8 bei einer Temperatur von 20 °C. Eine Lösung von 3,747 mM bzw. 4 mM **P2** wurde in Schritten von je 15 µl zu 1,4 ml einer Lösung von 239,7 µM Pin1 (**A**) oder 258 µM Pin1 WW (**C**) in der Messzelle titriert und die sich dabei ergebenden Titrationpeaks gegen die Messzeit aufgetragen. Die Titration von **P2** gegen Puffer wurde hierfür als Referenz jeweils separat aufgenommen und vom entsprechenden Thermogramm subtrahiert. Die integrierten Titrationpeaks wurden gegen das stöchiometrische Verhältnis von **P2** zu Pin1 (**B**) bzw. Pin1 WW (**D**) aufgetragen. Für die Titration von **P2** zu Pin1 ergab die nicht-lineare Regression der Datenpunkte nach einem Ein-Seiten-Bindemodell eine Assoziationskonstante $K_A = (3,25 \pm 0,70) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Dissoziationskonstante $K_D = 30,8 \text{ µM}$), eine Stöchiometrie des Komplexes von $N = 0,97 \pm 0,04$, eine Reaktionsenthalpie $\Delta H = -6,3 \pm 0,3 \text{ kcal mol}^{-1}$ und eine Reaktionsentropie $\Delta S = -0,69 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (**B**). Für die Titration von **P2** zu Pin1 WW ergab die nichtlineare Regression der Datenpunkte nach einem Ein-Seiten-Bindemodell eine Assoziationskonstante $K_A = (5,02 \pm 0,98) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Dissoziationskonstante $K_D = 19,9 \text{ µM}$), eine Stöchiometrie des Komplexes von $N = 1,08 \pm 0,03$, eine Reaktionsenthalpie $\Delta H = -5,9 \pm 0,2 \text{ kcal mol}^{-1}$ und eine Reaktionsentropie $\Delta S = -1,27 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (**D**).

Die Peptidstrukturen wurden bei der Synthese den Erfordernissen angepasst, um in einem fluoreszenzbasierten PPIase-Assay als Substrate detektierbar zu sein (siehe *ABBILDUNG 49* im Anhang). Die Messungen der spezifischen katalytischen Aktivitäten von Pin1 gegenüber diesen Peptiden lieferte Auskunft über deren Substratcharakter. Ausgewählte Ergebnisse sind in *ABBILDUNG 21* dargestellt. Eine genaue Zusammenstellung aller Messergebnisse liefert *TABELLE 14*. Die Peptide **P3** bis **P7** weisen einen niedrigen *cis*-Anteil von $\leq 10\%$ auf. Die Seitenkettenphosphorylierung hat dabei nur einen geringen Einfluss auf das *cis/trans*-Verhältnis. Mithilfe der Seitenkette des Glutamatrestes sollte im Peptid **P3** ein seitenkettenphosphoryliertes Ser-Pro-Motiv im Peptid strukturell nachgeahmt werden. Die Messwerte dieses Peptids sollen als Referenz dienen.

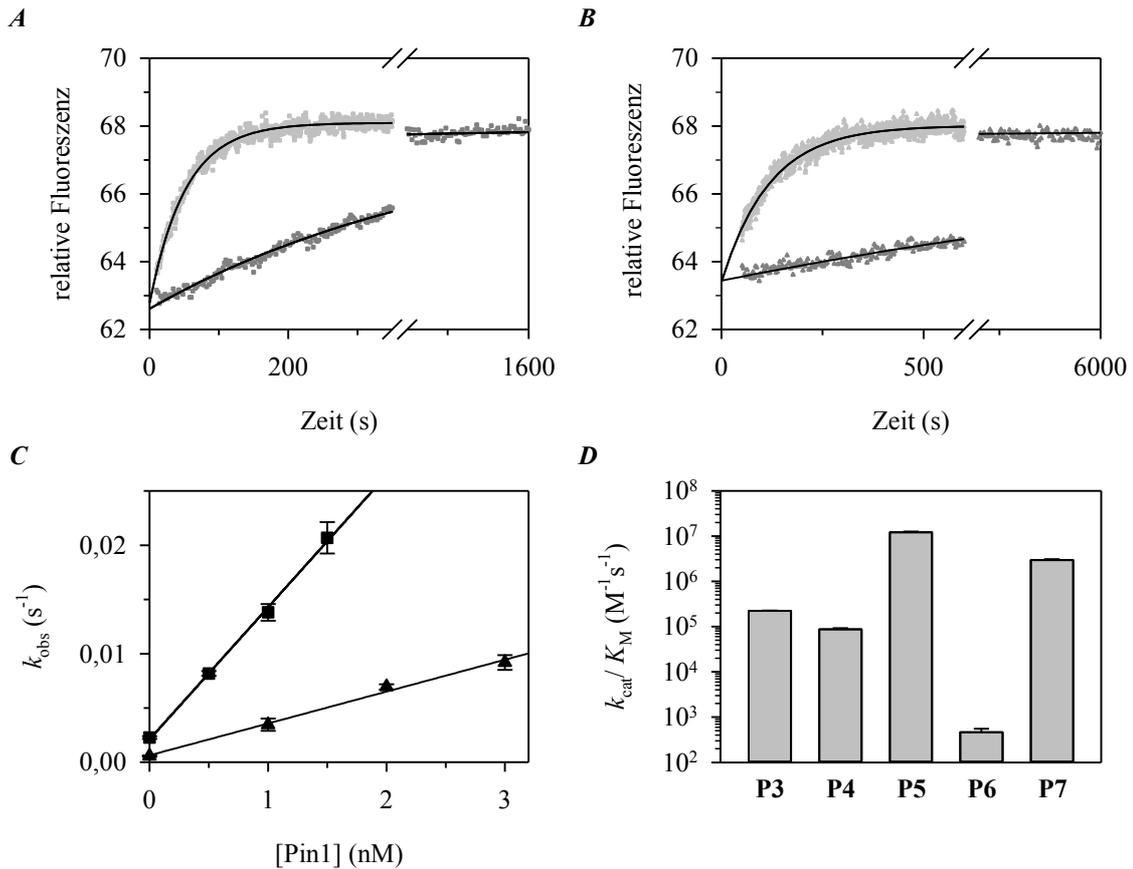


ABBILDUNG 21: KATALYTISCHE EFFIZIENZEN VON PIN1 GEGENÜBER MCM3-ABGELEITETEN PEPTIDDERIVATEN. Die Messungen erfolgten fluoreszenzbasiert im proteasegekoppelten PPIase-Assay in Puffer 35 mM HEPES pH 7,8. Als isomerspezifische Protease diente 1 mg/ml Trypsin. Die angegebenen Werte entsprechen Mittelwerten und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen. **A)** Die *cis*→*trans*-Isomerisierung des Peptidderivates **P5** wurde ohne Enzym (dunkelgraue Messpunkte) bzw. in Anwesenheit von 1,5 nM Pin1 (hellgraue Messpunkte) bei einer Emissionswellenlänge von 420 nm verfolgt (Anregungswellenlänge: 320 nm). Nichtlineare Regressionen der Messpunkte nach der Funktion für Reaktionen 1. Ordnung (schwarze Linien) ergeben Geschwindigkeitskonstanten von $k_{0(ct)} = 2,18 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ bzw. $k_{\text{obs}(ct)} = 19,26 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. **B)** Wie unter **A** beschrieben, jedoch wurde **P7** als Substrat verwendet. Nach Auswertung ergeben sich Geschwindigkeitskonstanten von $k_{0(ct)} = 0,52 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (ohne Enzym) bzw. $k_{\text{obs}(ct)} = 8,84 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (3 nM Pin1). Für die Darstellung wurden die Fluoreszenzsignale normiert. **C)** Die Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} der *cis*→*trans*-Isomerisierungen von **P5** (■), bzw. **P7** (▲) wurden gegen die entsprechenden Konzentrationen an Pin1 aufgetragen. Die Datenpunkte repräsentieren das arithmetische Mittel und die dazugehörigen Standardabweichungen aus jeweils drei Einzelmessungen. Lineare Regressionen der Datenpunkte (schwarze Linien) führt zu katalytischen Effizienzen von Pin1 von $k_{\text{cat}}/K_M = (1,22 \pm 0,03) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ gegenüber **P5** bzw. $k_{\text{cat}}/K_M = (2,94 \pm 0,12) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ gegenüber **P7**. **D)** Vergleich der katalytischen Effizienzen von Pin1 gegenüber den Peptidderivaten **P3** – **P7**.

Betrachtet man die Werte für die spezifische katalytische Aktivität von Pin1 gegenüber diesen Peptiden, zeigt sich, dass Pin1 deutlich höhere katalytische Effizienzen gegenüber Peptiden mit phosphorylierter Seitenkette im Ser/Thr-Pro-Motiv (**P5** und **P7**) aufweist, im Vergleich zu deren nichtphosphorylierter Analoga (**P4** bzw. **P6**). Die katalytische Effizienz von Pin1 gegenüber **P3** liegt über den Werten für **P4** und **P6**, jedoch weit unter den ermittelten Werten für **P5** bzw. **P7**. Die Betrachtung der Werte für die unkatalysierten *cis*→*trans*-Isomerisierungen der Prolylbindungen innerhalb der Peptidderivate **P3** bis **P7** zeigt einen Einfluss der Seitenkettenphosphorylierung auf die Geschwindigkeitskonstanten $k_{0(ct)}$ der Reaktionen (TABELLE 14). **P4** und **P6** weisen deutlich höhere Werte auf, im Vergleich zu deren sei-

tenkettenphosphorylierten Analoga **P5** bzw. **P7**. Für das Peptid mit Phosphorylierungsmimikry (**P3**) wurde ein ähnlicher Wert ermittelt wie für das Peptid mit seitenkettenphosphoryliertem Ser-Pro-Motiv (**P5**). Interessanterweise ist die Geschwindigkeitskonstante für die *cis*→*trans*-Isomerisierung der pThr-Pro-Bindung von **P7** extrem niedrig.

TABELLE 14: KINETISCHE KONSTANTEN DER PEPTIDYL-PROLYL-ISOMERISIERUNG VON *CIS* NACH *TRANS* MCM3-ABGELEITETER PEPTIDDERIVATE UND DIE KATALYTISCHEN EFFIZIENZEN VON PIN1 GEGENÜBER DIESEN DERIVATEN BEI 10 °C.

Name	Sequenz	[<i>cis</i>] (%)	$k_{0(cis)}$ ^{d)} (10 ⁻³ s ⁻¹)	$k_{0(trans)}$ ^{e)} (10 ⁻³ s ⁻¹)	$k_{(cis+trans)}$ ^{f)} (10 ⁻³ s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹)
P3	Abz-AEPRY(NO ₂)-NH ₂ ^{a)}	10,0	2,24 ± 0,18	0,25	2,49	223 ± 3
P4	Abz-HVSPRTY(NO ₂)-NH ₂ ^{a)}	7,6	6,51 ± 0,40	0,54	7,05	88 ± 3
P5	Abz-HVS(PO ₃ H ₂)PRTY(NO ₂)-NH ₂ ^{a)}	7,7	2,28 ± 0,13	0,19	2,47	12200 ± 270
P6	Abz-VHTPKTY(NO ₂)-NH ₂ ^{a)}	5,7	7,16 ± 0,32	0,43	7,59	0,7 ± 0,1
P7	Abz-VHT(PO ₃ H ₂)PKTY(NO ₂)-NH ₂ ^{a)}	6,5	0,57 ± 0,06	0,04	0,61	2940 ± 120
P8	Abz-VKT(PO ₃ H ₂)PKTY(NO ₂)-NH ₂ ^{b)}	n. b.	n. b.	n. b.	4,44 ± 0,52 ^{g)}	n. b.
P9	Abz-VAT(PO ₃ H ₂)PKTY(NO ₂)-NH ₂ ^{a)}	18,0	0,48 ± 0,05	0,11	0,59	n. b.
P10	Abz-VET(PO ₃ H ₂)PKTY(NO ₂)-NH ₂ ^{a)}	7,0	1,42 ± 0,01	0,11	1,53	n. b.
P11	Abz-VKT(PO ₃ H ₂)PHTY(NO ₂)-NH ₂ ^{c)}	n. b.	n. b.	n. b.	4,17 ± 0,36 ^{g)}	n. b.

Die Messungen wurden fluoreszenzbasiert in Puffer 35 mM HEPES pH 7,8 durchgeführt. Die Messungen erfolgten entweder ^{a)} im proteasegekoppelten PPIase-Assay mit 1 mg/ml Trypsin als isomerspezifischer Protease oder im proteasefreien PPIase-Assay über ^{b)} Lösungsmittelsprung (**P8** in 0,5 M LiCl/TFE zu 35 mM HEPES pH 7,8) bzw. ^{c)} pH-Sprung von kationischer Form (**P11** in 50 mM H₃PO₄, pH 2,1) zu zwitterionischer Form (35 mM HEPES pH 7,8). ^{d)} Direkt gemessene Geschwindigkeitskonstante $k_{0(cis)}$ für die *cis*→*trans*-Isomerisierung in Puffer. ^{e)} Berechnete Geschwindigkeitskonstante $k_{0(trans)}$ für die *trans*→*cis*-Isomerisierung aus $k_{0(cis)}$ und der Gleichgewichtskonstante $K (= k_{0(trans)} / k_{0(cis)})$. ^{f)} Berechnete makroskopische Geschwindigkeitskonstante $k_{(cis+trans)}$ ($= k_{0(cis)} + k_{0(trans)}$). ^{g)} Im proteasefreien PPIase-Assay gemessene apparente Geschwindigkeitskonstante. Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen ergeben sich aus drei Messungen, (n. b.: nicht bestimmt).

Um dies weiter zu untersuchen, wurden ausgehend von der Aminosäuresequenz von **P7** die Peptide **P8** bis **P11** angefertigt und die Geschwindigkeitskonstanten für deren Isomerisierungen bestimmt (TABELLE 14). Der Aminosäureaustausch des Histidins in **P7** gegen ein ebenfalls positiv geladenes Lysin führt zum Peptid **P8** und geht mit einer etwa achtfach höheren intrinsischen Isomerisierungsgeschwindigkeit einher. Die Substitution mit einem Alanin (**P9**) führt erstaunlicherweise zu einer nochmals um 16 % niedrigeren Isomerisierungsgeschwindigkeit dieses Peptids gegenüber **P7**. Obwohl eine negativ geladene Seitenkette an dieser Position (**P10**) zwar eine etwa dreifach höhere intrinsische Isomerisierungsgeschwindigkeit gegenüber **P9** zur Folge hat, ist der Wert immer noch deutlich kleiner als der Wert für **P8**. Unter den Peptiden **P7** bis **P11** besitzt **P9** den höchsten *cis*-Gehalt. Durch einen weiteren Aminosäureaustausch des dem Prolin nachfolgenden Lysins gegen Histidin gelangt man von **P8** zu **P11**. Die intrinsische Isomerisierungsgeschwindigkeit verändert sich dadurch kaum. Für die Peptide **P3** bis **P7** wurden die Geschwindigkeitskonstanten für die unkatalysierten *cis*→*trans*-Isomerisierungen der Peptidyl-Prolylbindungen in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt (ABBILDUNG 22). Die anhand von EYRING-Plots ermittelten thermodynamischen Konstanten dieser Isomerisierungen sind in TABELLE 15 zusammengestellt.

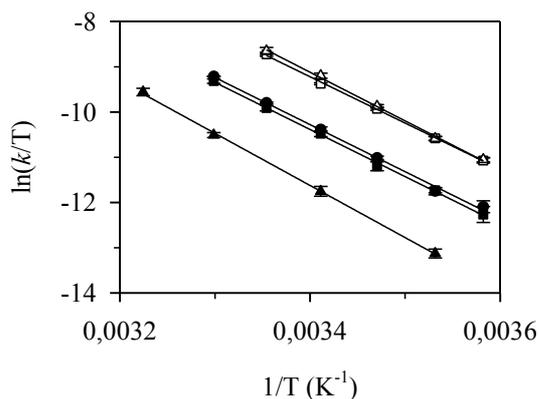


ABBILDUNG 22: ABHÄNGIGKEIT DER PEPTIDYL-PROLYL-ISOMERISIERUNG VON CIS NACH TRANS MCM3-ABGELEITETER PEPTIDDERIVATE VON DER TEMPERATUR. Die Messungen erfolgten fluoreszenzbasiert im proteasegekoppelten PPIase-Assay in Puffer 35 mM HEPES pH 7,8 mit P3 (●), P4 (□), P5 (■), P6 (△) bzw. P7 (▲) als Substrat. Als isomerspezifische Protease diente 1 mg/ml Trypsin. Die Datenpunkte entsprechen Mittelwerten und Standardabweichungen aus jeweils drei unabhängigen Messungen. Die Linien entsprechen den am besten an die jeweiligen Daten angepassten linearen Funktionen.

Die nichtphosphorylierten Peptide **P4** und **P6** unterscheiden sich in den Werten für die Änderung der Aktivierungsenthalpie und Aktivierungsentropie, zeigen aber insgesamt ähnliche Werte für $\Delta G_{(ct) 25^\circ\text{C}}^\ddagger$. Im Vergleich dazu sind die $\Delta G_{(ct) 25^\circ\text{C}}^\ddagger$ -Werte der phosphorylierten Analoga (**P5** bzw. **P7**) und des Peptids mit Phosphorylierungsmimikry (**P3**) höher. Die ermittelten Aktivierungsparameter von **P3** und vom Peptid mit phosphorylierter Serinseitenkette (**P5**) unterscheiden sich nicht. **P6** und **P7** zeigen keinen Unterschied in der Änderung der Aktivierungsentropie, unterscheiden sich aber signifikant (*t*-Test, Überschreitungswahrscheinlichkeit $p = 0,046$) im Wert für $\Delta G_{(ct) 25^\circ\text{C}}^\ddagger$. Die pThr-Pro-Bindung von **P7** besitzt damit die energetisch höchste Rotationsbarriere der untersuchten Peptide.

TABELLE 15: THERMODYNAMISCHE KONSTANTEN DER PEPTIDYL-PROLYL-ISOMERISIERUNG MCM3-ABGELEITETER PEPTIDDERIVATE.

Name	$\Delta S_{(ct)}^\ddagger$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	$\Delta H_{(ct)}^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta G_{(ct) 25^\circ\text{C}}^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta G_{(ct) 10^\circ\text{C}}^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta G_{10^\circ\text{C}}^0$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta G_{(tc) 10^\circ\text{C}}^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)
P3	11 ± 5	86,5 ± 1,5	83,2 ± 3,1	83,4 ± 3,0	5,2	88,6
P4	15 ± 5	85,1 ± 1,4	80,6 ± 2,8	80,8 ± 2,8	5,9	86,7
P5	10 ± 5	86,5 ± 1,6	83,4 ± 3,2	83,6 ± 3,1	5,9	89,5
P6	30 ± 5	89,3 ± 1,4	80,3 ± 2,8	80,7 ± 2,8	6,6	87,3
P7	31 ± 4	95,7 ± 1,2	86,4 ± 2,4	86,8 ± 2,3	6,3	93,1

Die Messungen erfolgten fluoreszenzbasiert im proteasegekoppelten PPIase-Assay in 35 mM HEPES pH 7,8. Als isomerspezifische Protease diente 1 mg/ml Trypsin. Für die Berechnung wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Messungen herangezogen. Die Berechnungen von $\Delta G_{(ct) 25^\circ\text{C}}^\ddagger$ und $\Delta G_{(ct) 10^\circ\text{C}}^\ddagger$ erfolgten nach GLEICHUNG 7. $\Delta G_{10^\circ\text{C}}^0$ wurde nach GLEICHUNG 8 berechnet. $\Delta G_{(tc) 10^\circ\text{C}}^\ddagger = \Delta G_{(ct) 10^\circ\text{C}}^\ddagger + \Delta G_{10^\circ\text{C}}^0$; *cis*→*trans*-Isomerisierung (*ct*), *trans*→*cis*-Isomerisierung (*tc*).

Um zu untersuchen, welche Rolle die Phosphorylierung der Threoninseitenkette und deren Protonierungsgrad im Thr-Pro-Motiv für die Konformation der Prolylbindung in **P7** spielt, wurde die Geschwindigkeitskonstante der *cis*→*trans*-Isomerisierung bei pH-Werten zwischen 9,5 und 4,5 bestimmt. Der bei einem pH-Wert von 9,5 gemessene Wert lag etwa um den Faktor 4 niedriger, im Vergleich zur Geschwindigkeitskonstante die bei einem pH-Wert von 4,5 bestimmt wurde (ABBILDUNG 23). Unter identischen Messbedingungen hatte der pH-Wert auf die Geschwindigkeitskonstante der *cis*→*trans*-Isomerisierung der nichtphosphorylierten Threonyl-Prolylbindung im Derivat **P6** keinen erkennbaren Einfluss. Dieses Experiment liefert einen Hinweis, dass der Protonierungsgrad der Phosphorylierung der Threoninseitenkette bei der Isomerisierung der Peptidyl-Prolylbindung von **P7** eine Rolle spielt und zu einer Er-

niedrigung der Geschwindigkeitskonstante der *cis*→*trans*-Isomerisierung nach der Verringerung der Anteile der protonierten Spezies des Phosphatrestes führt. Aus Regressionen der Datenpunkte von **P7** wurde mithilfe von *GLEICHUNG 9* ein Übergangspunkt von 6,06 ermittelt, der einem pK_s -Wert der phosphorylierten Threoninseitenkette entspricht.

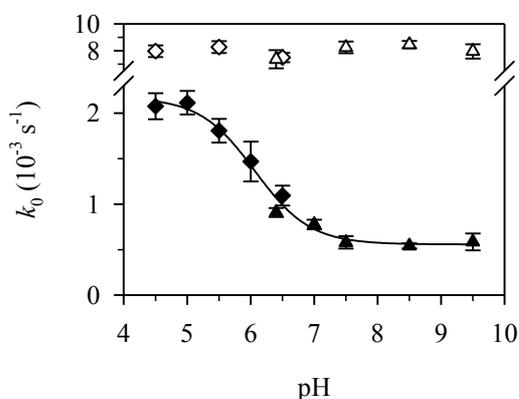


ABBILDUNG 23: ABHÄNGIGKEIT DER PEPTIDYL-PROLYL-ISOMERISIERUNG VON CIS NACH TRANS MCM3-ABGELEITETER PEPTIDDERIVATE VOM PH-WERT. Die Messungen erfolgten fluoreszenzbasiert im proteasegekoppelten PPIase-Assay. Als isomerspezifische Protease diente 1 mg/ml Trypsin. Als Puffer wurde 35 mM Kaliumcitrat ($4,5 \leq \text{pH} \leq 6,5$; Quadrate) bzw. 35 mM BIS-TRIS-Propan ($6,4 \leq \text{pH} \leq 9,5$; Dreiecke) verwendet. Die Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 10 °C mit **P6** (\diamond , \triangle) bzw. **P7** (\blacklozenge , \blacktriangle) als Substrat. Die Datenpunkte entsprechen Mittelwerten und Standardabweichungen aus jeweils drei Messungen. Die Linie entspricht einer Anpassung der Datenpunkte an *GLEICHUNG 9* basierend auf der HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung und liefert einen Übergangspunkt (pK_s) von $6,06 \pm 0,08$.

Um Informationen zu erhalten, inwieweit die Seitenkettenphosphorylierung Einfluss auf die Struktur der Peptidderivate nimmt, wurden Fern-UV-CD-Spektren der Peptidderivate **P6** und **P7** bei verschiedenen pH-Werten aufgenommen (ABBILDUNG 24A). Bei einem pH-Wert von 6,4 zeigen die Fern-UV-CD-Spektren im Vergleich hohe Ähnlichkeit. Sie weisen Absorptionsmaxima im negativen Bereich bei 201 nm und im positiven Bereich bei 224 nm auf und repräsentieren damit typische Fern-UV-CD-Spektren für *random coil* [244].

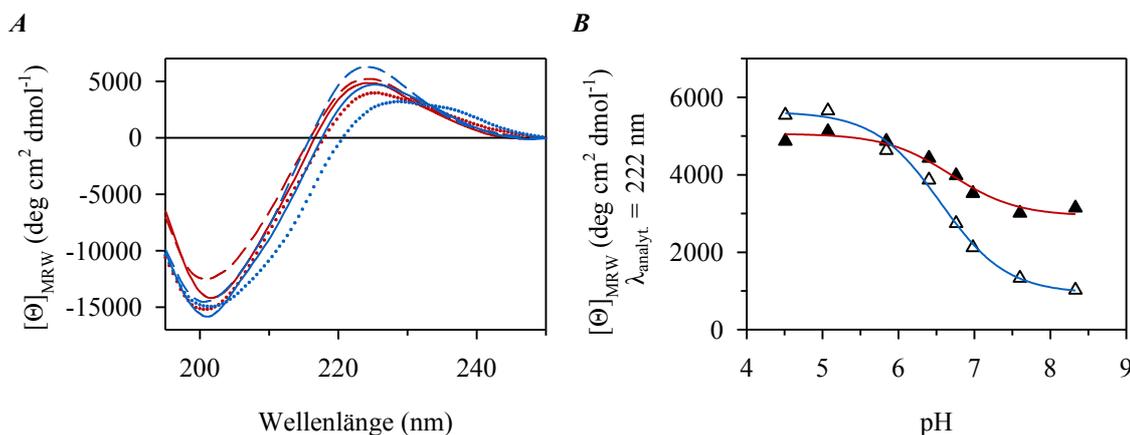


ABBILDUNG 24: PH-ABHÄNGIGKEIT DER SEKUNDÄRSTRUKTUR DER PEPTIDDERIVATE **P6** UND **P7**. **A**) Fern-UV-CD-Spektren der Peptidderivate **P6** (blaue Kurven) und **P7** (rote Kurven) wurden bei verschiedenen pH-Werten im pH-Intervall von pH 3,6 bis pH 8,3 aufgenommen. Die Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 10 °C in Zitronensäure-Phosphat-Puffer. Die Peptidkonzentrationen betragen jeweils 100 μM . Repräsentativ sind jeweils die CD-Spektren bei pH 3,6 (---), pH 6,4 (—) und pH 8,3 (·····) gezeigt. **B**) Die Messpunkte von **P6** (\triangle) bzw. **P7** (\blacktriangle) bei einer Wellenlänge λ_{analyt} von 222 nm wurden gegen die entsprechenden pH-Werte aufgetragen. Anpassungen der Datenpunkte an *GLEICHUNG 9* basierend auf der HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung liefern Übergangspunkte (pK_s) bei pH-Werten von $6,6 \pm 0,1$ (blaue Linie) und $6,7 \pm 0,1$ (rote Linie).

Die Erhöhung des pH-Wertes führte bei beiden Peptiden zu einer Verschiebung der positiven Absorptionsmaxima der Fern-UV-CD-Spektren in Richtung größerer Wellenlängen. Die Senkung des pH-Wertes wirkte sich auf die Fern-UV-CD-Spektren in entgegengesetzter Richtung aus. Dabei fällt auf, dass sich die Änderungen im Fern-UV-CD-Spektrum in Abhängigkeit des pH-Wertes im Peptidderivat **P6** deutlich stärker manifestieren als im Peptidderivat **P7**. Die Auftragungen der jeweiligen Signale bei einer Wellenlänge von 222 nm in Abhängigkeit der pH-Werte veranschaulichen dies sehr deutlich (*ABBILDUNG 24B*). Aus Regressionen der Datenpunkte mithilfe von *GLEICHUNG 9* konnten Übergangspunkte bei pH 6,6 (**P6**) und pH 6,7 (**P7**) ermittelt werden.

3.3 Untersuchungen zum Einfluss von Pin1 auf MCM3

Um die Bedeutung der physikalischen Interaktion von Pin1 und MCM3 für die Zelle zu verstehen, wurden Untersuchungen zur Physiologie dieser Interaktion durchgeführt. Hierfür wurde in Zellen die Menge an intrazellulärem Pin1 variiert. Eine Erniedrigung des intrazellulären Pin1-Gehaltes erfolgte über *RNA-silencing*. Zusätzliche Herstellung von rekombinanten Pin1 in den Zellen resultierte in der Erhöhung des intrazellulären Pin1-Gehaltes. Beide Möglichkeiten wurden im Rahmen dieser Arbeit genutzt und verliefen über Transfektion der Zellen mit entsprechenden Vektoren. Der Vektor pSuper-Pin1 wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und führte 60 h nach Transfektion der HeLa-Zellen dort zu einer um etwa 90 % verminderten Menge an endogenem Pin1 (*RNAi* gegen *PINI*) im Vergleich zu HeLa-Zellen die mit dem entsprechenden Leervektor transfiziert wurden (*ABBILDUNG 50*). Der Vektor pHisMax-Pin1 führt nach Transfektion von HeLa-Zellen zur Biosynthese von Pin1 mit einer N-terminalen Hexahistidin-Fusion (Herstellung von His₆-Pin1) und erhöht dadurch die Menge an intrazellulärem Pin1 etwa um den Faktor zehn (*ABBILDUNG 50*).

3.3.1 Untersuchungen zur Biosynthese von MCM3

Zunächst wurde untersucht inwieweit die Anwesenheit von Pin1 den Gehalt an MCM3 in HeLa-Zellen beeinflusst. Hierfür wurde durch die oben beschriebenen Methoden die Menge von intrazellulärem Pin1 in HeLa-Zellen variiert und die relative Menge an intrazellulärem MCM3 im Vergleich zu Kontrollzellen über Western Blot bestimmt. *ABBILDUNG 25* zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung. Weder bei Verminderung noch bei Erhöhung der intrazellulären Pin1-Menge war ein Einfluss auf den MCM3-Gehalt detektierbar. Bei weiteren Untersuchungen konnte auch kein Einfluss des zellulären Pin1-Gehaltes auf die Menge der anderen MCM-Proteine des MCM2-7-Komplexes in HeLa-Zellen festgestellt werden (*ABBILDUNG 51*).

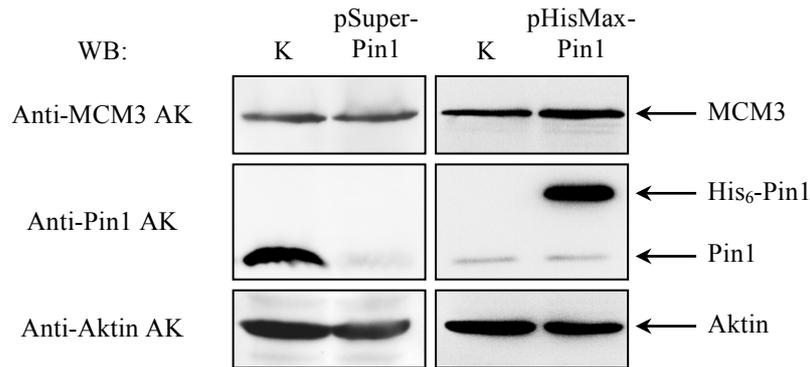


ABBILDUNG 25: EINFLUSS DER INTRAZELLULÄREN PIN1-MENGE AUF DEN MCM3-GEHALT VON HELa-ZELLEN. HeLa-Zellen wurden mit dem entsprechenden Leervektor als Kontrolle (K) oder mit dem Vektor pSuper-Pin1 bzw. pHisMax-Pin1 transfiziert. Die Zellen wurden 60 h nach der Transfektion geerntet und lysiert. Die Zellysate wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot (WB) unter Verwendung spezifischer Antikörper (AK) analysiert. Als Ladekontrolle diente Aktin. Die Entwicklungszeiten bei den Immunodetektionen mit Anti-Pin1 Antikörpern unterscheiden sich in beiden Western Blots, um ein Überstrahlen des rekombinanten His₆-Pin1 zu vermeiden. So erscheinen die Mengen des authentischen Pin1 beider Kontrollen unterschiedlich, dennoch sollten sie sich nicht unterscheiden (vgl. *ABBILDUNG 50*).

3.3.2 Untersuchungen zur Stabilität von MCM3

Da bekannt ist, dass Pin1 die Stabilität einer Vielzahl phosphorylierter zellulärer Proteine reguliert [116], wurde untersucht, ob Pin1 den *turnover* von MCM3 beeinflusst. Die Substanz Cycloheximid inhibiert die Proteinsynthese in HeLa-Zellen [247] und eignet sich dadurch zur Untersuchung des *turnover* eines Zielproteins [248]. Zur Variierung der intrazellulären Pin1-Menge wurden HeLa-Zellen zunächst mit dem Vektor pSuper-Pin1 oder pHisMax-Pin1 bzw. mit dem entsprechenden Leervektor als Kontrolle transfiziert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit Cycloheximid. Danach wurden zu definierten Zeitpunkten Lysate dieser Zellen hergestellt und die relative Menge an intrazellulärem MCM3 im Vergleich zu den Kontrollzellen über Western Blot bestimmt. *ABBILDUNG 26* zeigt das Ergebnis dieses Experiments. Sechzehnstündige Inkubation mit Cycloheximid führt in Kontrollzellen zu einer deutlich reduzierten Menge an authentischem Pin1 und MCM3. HeLa-Zellen die 48 Stunden nach Transfektion mit dem Vektor pSuper-Pin1 oder pHisMax-Pin1 eine deutlich reduzierte Menge an authentischem Pin1 aufweisen (*A*) bzw. zusätzliches His₆-Pin1 beinhalten (*B*) zeigen nach sechzehnständiger Inkubation mit Cycloheximid ebenfalls eine deutlich reduzierte Menge an MCM3. Nach vierständiger Inkubation der Zellen mit Cycloheximid kann noch in keiner der Proben eine Verminderung in der MCM3-Menge im Vergleich zur jeweiligen Ausgangsmenge festgestellt werden. In den mit pSuper-Pin1 bzw. pHisMax-Pin transfizierten Zellen wird im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen der *turnover* von MCM3 nicht erkennbar beeinflusst. So scheinen weder ein Mangel an Pin1 noch ein Überschuss an Pin1 Einfluss auf die Stabilität von MCM3 in HeLa-Zellen zu nehmen.

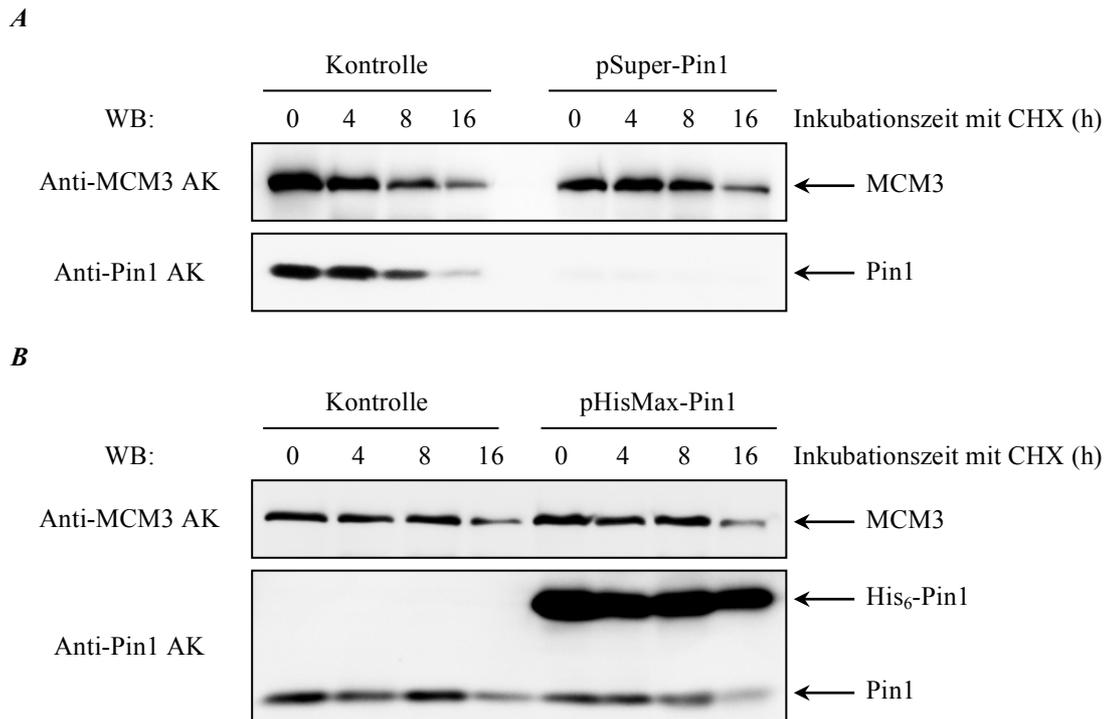


ABBILDUNG 26: EINFLUSS DER INTRAZELLULÄREN PIN1-MENGE AUF DIE STABILITÄT VON MCM3. HeLa-Zellen wurden mit dem entsprechenden Leervektor als Kontrolle oder mit dem Vektor pSuper-Pin1 (**A**) bzw. pHisMax-Pin1 (**B**) transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit 200 µg/ml Cycloheximid (CHX) inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und lysiert. Die Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE und anschließend Western Blot (WB) analysiert. MCM3 und Pin1 wurden mithilfe spezifischer Anti-MCM3 Antikörper (Anti-MCM3 AK) bzw. Anti-Pin1 Antikörper (Anti-Pin1 AK) detektiert. Als Ladekontrollen dienten Ponceau S-Färbungen (siehe **ABBILDUNG 52**).

3.3.3 Untersuchungen zur Proteolyse von MCM3 bei Apoptose

Apoptose ist eine Form des regulierten Zelltods die von Caspasen abhängig ist und durch intrinsische oder extrinsische Stimuli ausgelöst werden kann [249, 250]. Die spezifische proteolytische Spaltung einer Vielzahl von Proteinen ist ein Schlüsselereignis im Verlauf der Apoptose [250, 251]. MCM3 unterliegt dieser Spaltung durch Caspase-3 und Caspase-7 [252]. In apoptotischen Zellen wurde als Spaltstelle für Caspase-3 die Aminosäuresequenz Asp⁶⁹⁸-Ala-Lys-Asp⁷⁰¹ in MCM3 ermittelt [252]. Dabei entsteht aus dem Protein, welches in der SDS-PAGE eine apparente molekulare Masse von 105 kDa zeigt, ein spezifisches proteolytisches Spaltprodukt mit einer apparenten molekularen Masse von 98 kDa in der SDS-PAGE [253]. Um zu untersuchen, ob Pin1 Einfluss auf dieses Ereignis nimmt, wurde die Pin1-Menge in HeLa-Zellen variiert und in diesen Zellen Apoptose induziert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit dem Vektor pSuper-Pin1 oder pHisMax-Pin1 bzw. mit dem entsprechenden Leervektor als Kontrolle transfiziert. Die Induktion der Apoptose erfolgte durch Inkubation der Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen an Staurosporin. Danach wurden Lysate dieser Zellen hergestellt und die relative Menge an intrazellulärem MCM3 und spezifisch proteolytisch gespaltenem MCM3 im Vergleich zu den Kontrollzellen über Western Blot bestimmt. Die Induktion der Apoptose in den Zellen wurde durch Analyse von Caspase-7 überprüft (**ABBILDUNG 27**). Vierstündige Inkubation mit Staurosporin in Konzentrationen zwischen 0,25 µM und 4 µM löst in Kontrollzellen Apoptose aus, die mit proteolytischer Spaltung von

MCM3 einhergeht. HeLa-Zellen die 60 Stunden nach Transfektion mit dem Vektor pSuper-Pin1 oder pHisMax-Pin1 eine deutlich reduzierte Menge an authentischem Pin1 aufweisen (A) bzw. zusätzliches His₆-Pin1 beinhalten (B), zeigen nach vierstündiger Inkubation mit Staurosporin in diesem Konzentrationsbereich ebenfalls Apoptose und proteolytisch gespaltenes MCM3. Weder der Mangel an intrazellulärem Pin1 noch der Überschuss an Pin1 (ABBILDUNG 27B) scheint einen Einfluss auf die spezifische proteolytische Degradation von MCM3 bei der Staurosporin-induzierten Apoptose in HeLa-Zellen zu nehmen.

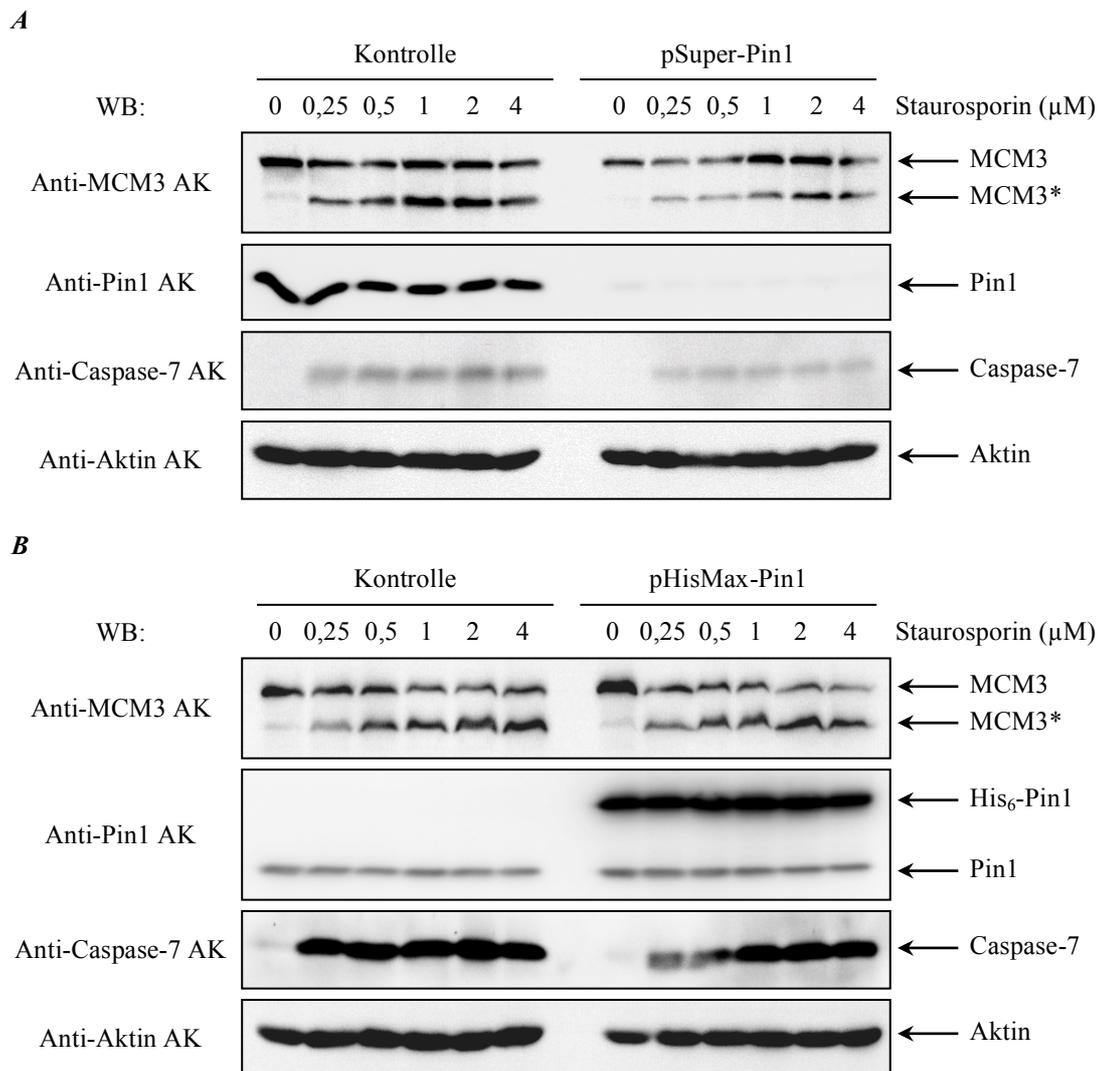


ABBILDUNG 27: EINFLUSS DER INTRAZELLULÄREN PIN1-MENGE AUF MCM3 BEI APOPTOSE. HeLa-Zellen wurden mit Leervektor als Kontrolle oder mit dem Vektor pSuper-Pin1 (A) bzw. pHisMax-Pin1 (B) transfiziert. Um in den Zellen Apoptose auszulösen, wurden diese 60 h nach der Transfektion für 4 h mit verschiedenen Konzentrationen an Staurosporin behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot (WB) unter Verwendung spezifischer Antikörper (AK) analysiert. Sowohl MCM3 als auch das spezifische Proteolyseprodukt von MCM3 in apoptotischen Zellen (MCM3*) wurden detektiert [253]. Als Kontrollmarker für Apoptose diente die Analyse von Caspase-7, die Procaspase-7 wurde nicht gezeigt. Als Ladekontrolle wurde Aktin analysiert.

3.3.4 Untersuchungen zur Assemblierung des MCM2-7-Komplexes

Die Ausbildung des heterohexameren MCM2-7-Komplexes findet in eukaryotischen Zellen während der M-Phase des Zellzyklus statt, in einer Phase mit hoher Kinaseaktivität von Cyclin B/CDK1 [202]. Bei der Assemblierung des MCM2-7-Komplexes treten die Proteine MCM5 und MCM7 in direkte Interaktion zu MCM3 und sind im ringförmigen Komplex damit direkt benachbart [184, 189-191]. Die Phosphorylierungen an den Aminosäureresten Ser¹¹² und Thr⁷²² der Ser/Thr-Pro-Motive sind dabei für die Assemblierung dieses Komplexes bzw. für dessen Regulation wichtig [201, 202]. Die Unterbindung der Phosphorylierung an Ser¹¹² durch einen Aminosäureaustausch gegen Alanin an dieser Position, inhibiert in FLAG-fusioniertem MCM3 die Assoziation zu MCM5 und MCM7 in NIH 3T3-Zellen [202]. Um den Einfluss von Pin1 in diesem Zusammenhang zu untersuchen wurden HeLa-Zellen mit dem Vektor pFLAG-MCM3 und dem Vektor pSuper-Pin1 bzw. entsprechendem Leervektor co-transfiziert. Dies führte zur Expression der codierenden DNA-Sequenz von FLAG-MCM3 bei unterschiedlichen Pin1-Mengen in diesen Zellen. Nach Immunpräzipitation des FLAG-MCM3's wurden die Proben auf die daran gebundenen Proteine MCM5 und MCM7 untersucht. In Zellen mit verringerter Pin1-Menge ist im Vergleich zur Kontrolle auch die Menge von sowohl co-immunpräzipitiertem MCM5 als auch MCM7 geringer (ABBILDUNG 28). FLAG-MCM3 aus diesen Zellen hat also weniger MCM5 und MCM7 gebunden. Dieses Ergebnis liefert einen Hinweis auf einen Einfluss von Pin1 bei der Assemblierung des MCM2-7-Komplexes.

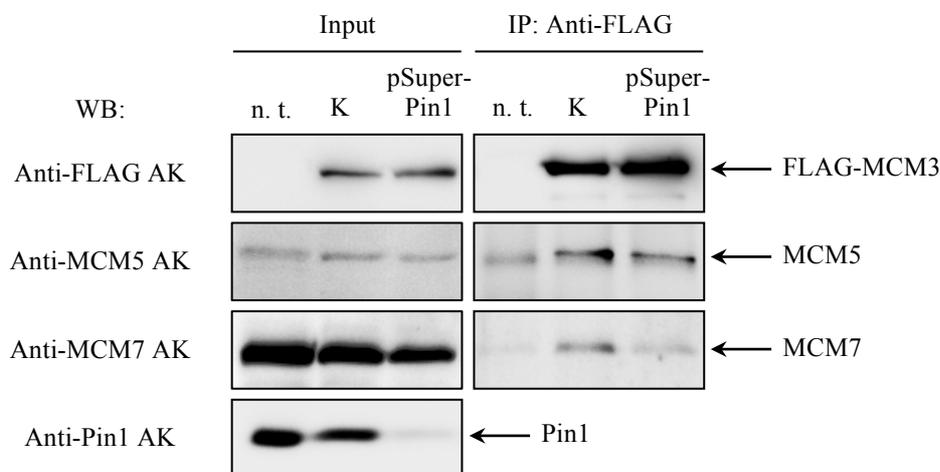


ABBILDUNG 28: EINFLUSS VON PIN1 AUF DIE ASSEMBLIERUNG DES KOMPLEXES MCM2-7. HeLa-Zellen wurden mit dem Vektor pFLAG-MCM3 und zusätzlich mit dem Vektor pSuper-Pin1 bzw. mit Leervektor als Kontrolle (K) transfiziert. 60 h nach Transfektion erfolgte die Präzipitation von FLAG-MCM3 aus den Lysaten dieser Zellen. Zellysate nicht transfizierter Zellen (n. t.) wurde gleichbehandelt. Der Input und die Präzipitationsfraktionen (IP) wurden mittels SDS-PAGE und anschließend Western Blot (WB) unter Verwendung von spezifischen Antikörpern (AK) analysiert.

Es sollte untersucht werden, ob dieser Effekt auf einer veränderten subzellulären Lokalisierung von MCM3 oder seiner im MCM2-7-Komplex direkt benachbarten Interaktionspartner MCM5 bzw. MCM7 beruht. Hierfür wurde zunächst in HeLa-Zellen MCM3 mit einer N-terminalen eGFP-Fusion (eGFP-MCM3) generiert und die Anwesenheit dieses Proteins mittels Western Blot nachgewiesen (ABBILDUNG 53). Nach zusätzlicher Verringerung der int-

razellulären Pin1-Menge wurde die Lokalisierung von *eGFP-MCM3* in einzelnen Zellen im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht (*ABBILDUNG 29*).

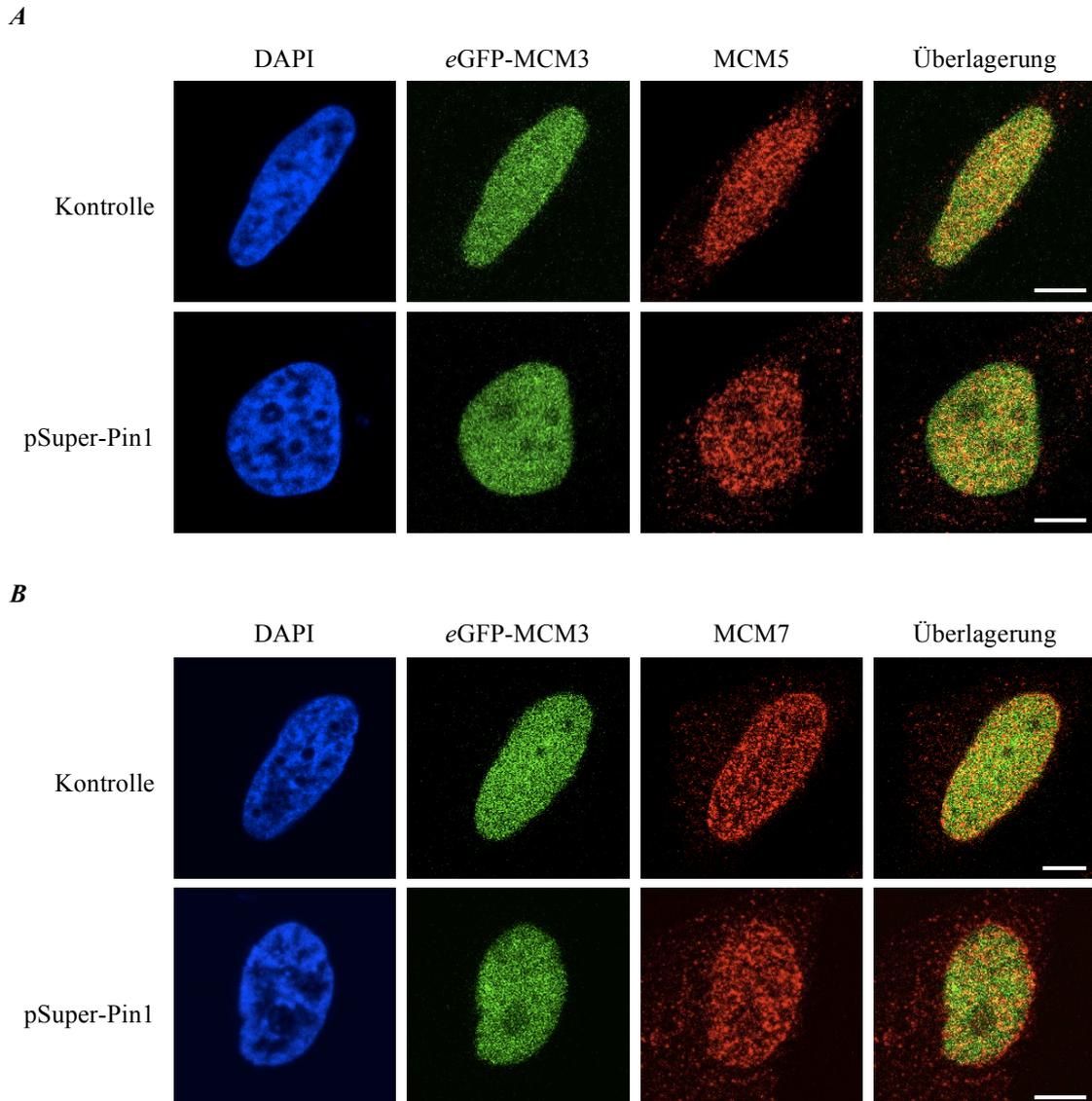


ABBILDUNG 29: LOKALISIERUNG VON *EGFP-MCM3* UND *MCM5* (A) BZW. *MCM7* (B) IN HE₂L₃-ZELLEN ZU EINEM INTERPHASEZEITPUNKT. HeLa-Zellen wurden mit dem Vektor pEGFP-MCM3 (Kontrolle) oder mit dem Vektor pEGFP-MCM3 und zusätzlich mit dem Vektor pSuper-Pin1 (pSuper-Pin1) transfiziert und 48 h danach mit Methanol und Formaldehyd fixiert. Die Färbung der DNA erfolgte mit DAPI. MCM5 bzw. MCM7 wurden mit spezifischen Anti-MCM5 oder Anti-MCM7 Antikörpern und Alexa-Fluor 546-Anti-Maus IgG bzw. Rhodamin Red-X-Anti-Kaninchen IgG gefärbt. Die Detektion erfolgte an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop bei 600facher Vergrößerung. Der weiße Balken entspricht 10 μ m. Zur besseren Erkennbarkeit ist DAPI in der Überlagerung nicht gezeigt.

Die gleichzeitige Detektion von MCM5 (A) bzw. MCM7 (B) in diesen Zellen erfolgte über spezifische Antikörper. Als Kontrollen dienten Zellen mit unverändertem Pin1-Gehalt, welche *eGFP-MCM3* enthielten. In HeLa-Zellen, die sich in der Interphase befinden, zeigt MCM3 mit N-terminaler *eGFP*-Fusion, unabhängig von der intrazellulären Pin1-Menge, die für das Protein typische Lokalisierung im Nukleus. Auch die Proteine MCM5 und MCM7 sind hauptsächlich im Zellkern lokalisiert. Die intrazelluläre Pin1-Menge scheint die nukleäre

Lokalisierung von *eGFP-MCM3*, MCM5 und MCM7 nicht zu beeinflussen. Sowohl MCM5 als auch MCM7 zeigen mit *eGFP-MCM3* Kollokalisierungen im Nukleus, die ebenfalls vom intrazellulären Pin1-Gehalt unbeeinflusst zu sein scheinen.

3.3.5 Untersuchungen zur Chromatinbeladung von MCM3

Die Beladung des Chromatins mit dem MCM-Komplex ereignet sich in der späten M-Phase und G₁-Phase des Zellzyklus vor der DNA-Replikationsinitiation [201]. Da die Inhibition von Serin/Threonin-Kinasen die Beladung des Chromatins mit *Xenopus* MCM3 unterbinden kann [214-216] und die Unterdrückung der Phosphorylierung von MCM3 an Ser/Thr-Pro-Motiven die Chromatinassoziation inhibiert [201, 202], scheint also die Phosphorylierung von MCM3 an diesen Motiven für die Beladung des Chromatins eine wichtige Rolle zu spielen. Um dies näher zu untersuchen, wurde in HeLa-Zellen N-terminal FLAG-fusioniertes MCM3 bzw. N-terminal FLAG-fusionierte MCM3-Varianten generiert, die Aminosäureaustausche des Serins bzw. Threonins gegen Alanin in je einem der vier Ser/Thr-Pro-Motive von MCM3 aufweisen. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Chromatinbeladung dieser Proteine. Alle N-terminal FLAG-fusionierten Proteine konnten mittels Western Blot nach Chromatinfractionierungen der Zelllysate in den entsprechenden Chromatinfractionen nachgewiesen werden. FLAG-MCM3 T722A zeigte im Vergleich zum entsprechenden Wildtypprotein eine deutlich verringerte Chromatinassoziation (ABBILDUNG 30).

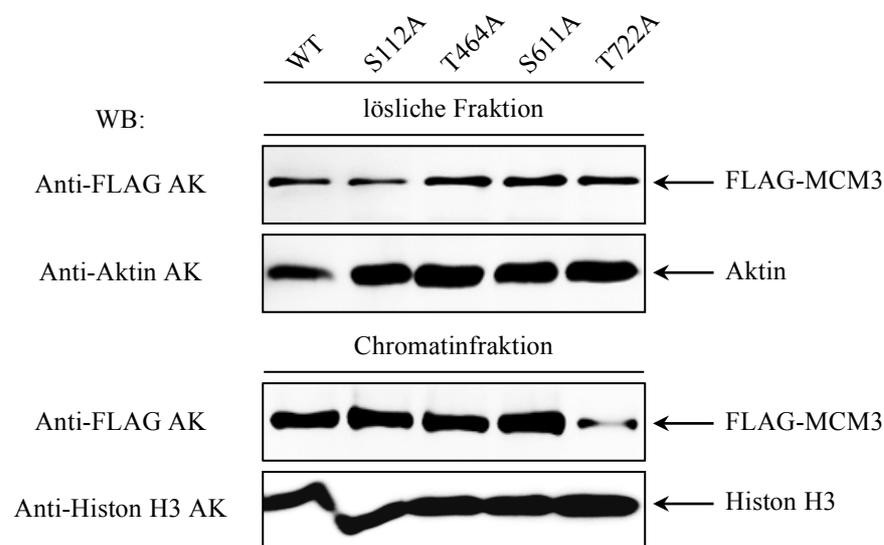


ABBILDUNG 30: CHROMATINBELADUNG VON FLAG-MCM3-VARIANTEN. HeLa-Zelllysate, welches FLAG-MCM3-Wildtyp (WT) bzw. FLAG-MCM3-Variante (S112A, T464A, S611A bzw. T722A) enthielt, wurde in lösliche Fraktion und Chromatinfraction separiert und mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot (WB) unter Verwendung von spezifischen Antikörpern (AK) analysiert. Als Ladekontrollen dienten Aktin und Histon H3.

Die Mengen der übrigen chromatingebundenen FLAG-MCM3-Varianten unterscheiden sich nicht erkennbar von der Kontrolle. Die Ergebnisse zusammengenommen, scheint auch in HeLa-Zellen die Phosphorylierung von MCM3 an Thr⁷²² für die Chromatinassoziation des Proteins von besonderer Bedeutung zu sein. Damit ist es von Interesse eine Involvierung von Pin1 in diesem Zusammenhang zu prüfen. Hierfür wurden HeLa-Zellen mit unterschiedlichen

intrazellularen Pin1-Mengen zu verschiedenen Zellzykluszeitpunkten blockiert und die Chromatinassoziation des MCM3 der Zellen untersucht (ABBILDUNG 31).

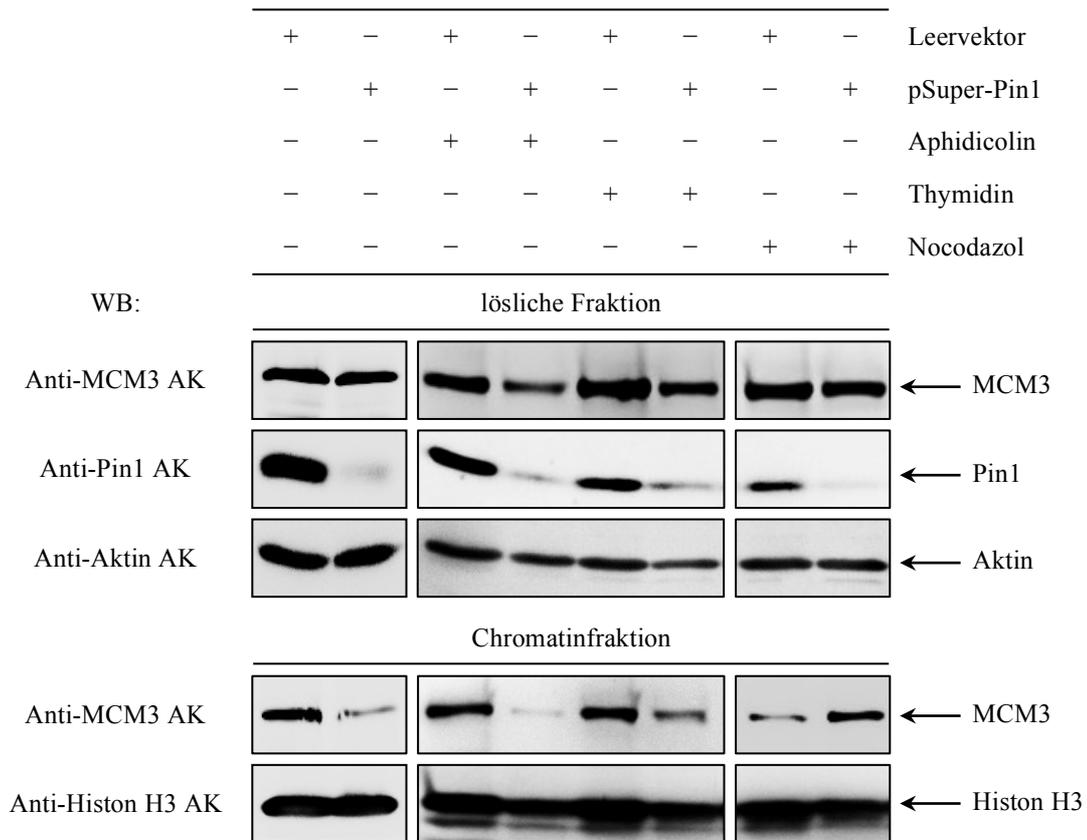


ABBILDUNG 31: EINFLUSS VON PIN1 AUF DIE CHROMATINBELADUNG VON MCM3. HeLa-Zellen wurden mit Leervektor als Kontrolle oder mit dem Vektor pSuper-Pin1 transfiziert. Danach wurden die Zellen zur Blockierung des Zellzyklus mit Aphidicolin, Thymidin bzw. Nocodazol inkubiert, anschließend geerntet und lysiert. Als Kontrolle wurden unsynchronisierte HeLa-Zellen geerntet und lysiert. Die Lysate dieser Zellen wurden in lösliche Fraktionen und Chromatinfractionen separiert und mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot (WB) unter Verwendung spezifischer Antikörper (AK) analysiert. Als Ladekontrollen wurden Aktin und Histon H3 analysiert.

Zur Blockierung der HeLa-Zellen innerhalb der S-Phase des Zellzyklus wurden diese mit Aphidicolin oder Thymidin behandelt. HeLa-Zellen wurden mit Nocodazol inkubiert um diese in der M-Phase des Zellzyklus zu blockieren. Als Kontrolle dienten unsynchronisierte Zellen. Sowohl unsynchronisierte Zellen mit verringertem Pin1-Gehalt als auch Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befanden und einen verringerten Pin1-Gehalt hatten, wiesen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen eine deutlich verminderte Menge an chromatingebundenem MCM3 auf. HeLa-Zellen mit verringertem Pin1-Gehalt, die durch Behandlung mit Nocodazol in der M-Phase des Zellzyklus blockiert waren, zeigten hingegen eine erhöhte Menge an chromatinassoziiertem MCM3 gegenüber gleichbehandelten Zellen mit normalem Pin1-Gehalt. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurden HeLa-Zellen mit unterschiedlichen intrazellularen Pin1-Mengen durch Thymidinbehandlung synchronisiert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aufhebung der Blockierung die Chromatinassoziation des MCM3's der Zellen untersucht (ABBILDUNG 32). Die Zeitpunkte wurden dabei so gewählt, dass die Zellen das Durchschreiten der G₂/M-Phase des Zellzyklus repräsentieren. Bei den

Kontrollzellen war dabei im Zeitverlauf eine deutliche Verringerung des chromatingebundenen MCM3's zu verzeichnen. Zellen mit verringertem Pin1-Gehalt wiesen hingegen im untersuchten Zeitsegment eine konstante Menge an chromatingebundenem MCM3 auf.

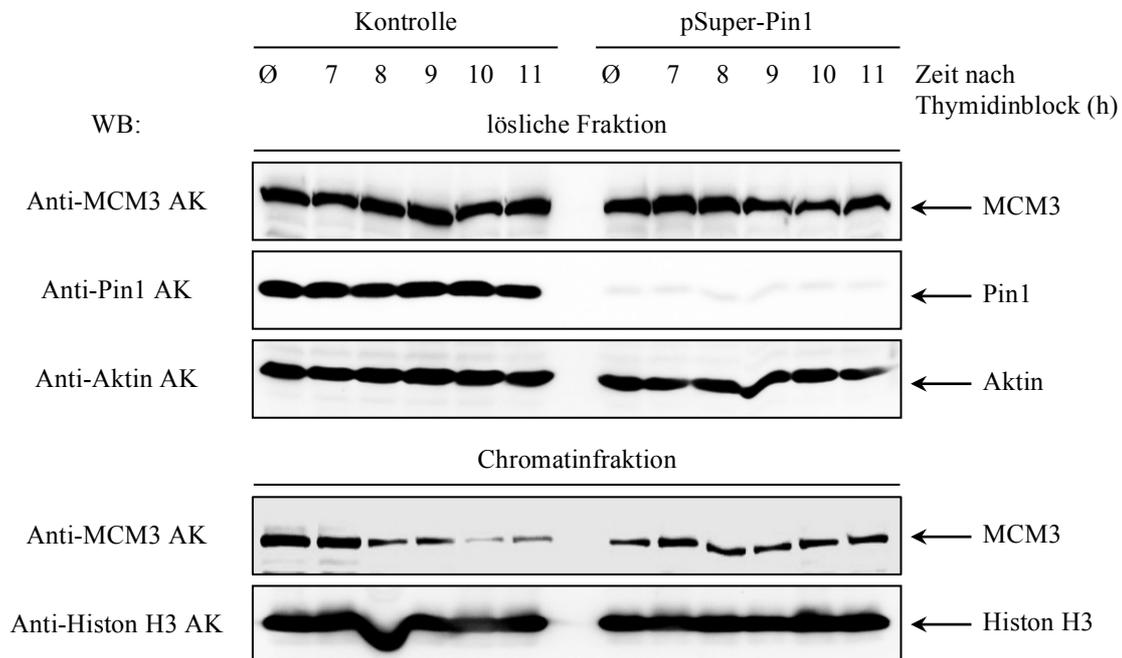


ABBILDUNG 32: EINFLUSS VON PIN1 AUF DIE CHROMATINBELADUNG VON MCM3 IN DER G_2/M -PHASE DES ZELLYKLUS. HeLa-Zellen wurden mit Leervektor als Kontrolle oder mit dem Vektor pSuper-Pin1 transfiziert. Danach wurden die Zellen mittels Thymidin blockiert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aufhebung der Blockade geerntet und lysiert. Als Kontrolle wurden auch unsynchronisierte HeLa-Zellen (\emptyset) geerntet und lysiert. Die Lysate der Zellen wurden in lösliche Fraktionen und Chromatinfractionen separiert und mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot (WB) unter Verwendung spezifischer Antikörper (AK) analysiert. Als Ladekontrollen wurden Aktin und Histon H3 analysiert.

3.3.6 Untersuchungen zur Phosphorylierung von MCM3

Die Einflussnahme von Pin1 auf den Phosphorylierungsstatus von dessen Interaktionspartnern wurde bereits vielfach beschrieben [113, 114, 254]. Zunächst wurde untersucht, ob Pin1 Einfluss auf die Phosphorylierung von MCM3 an Position Thr⁷²² nimmt. Dazu wurden Lysate von HeLa-Zellen mit unterschiedlichem Pin1-Gehalt auf die Phosphorylierung an dieser Position untersucht (ABBILDUNG 33). Der Nachweis der Phosphorylierung an dieser Position erfolgte dabei im Western Blot mit spezifischen Antikörpern. Sowohl in Kontrollzellen als auch in Zellen mit einer verringerten Pin1-Menge ließ sich mithilfe dieses Antikörpers eine Phosphorylierung von Thr⁷²² nachweisen. Allerdings war kein Einfluss einer verringerten Pin1-Menge in HeLa-Zellen auf die Phosphorylierung an der entsprechenden Position erkennbar.

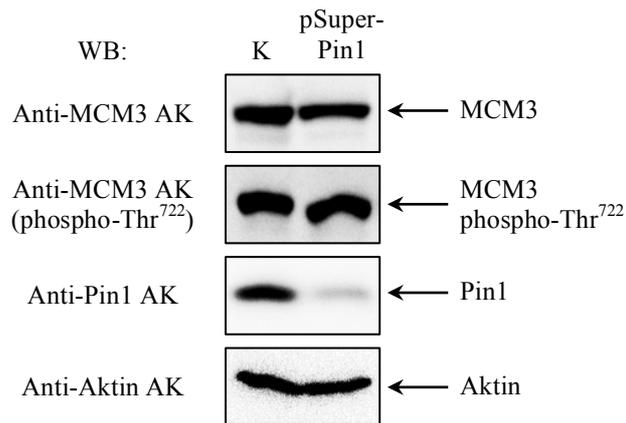


ABBILDUNG 33: EINFLUSS VON PIN1 AUF DIE PHOSPHORYLIERUNG VON MCM3 AN POSITION THR⁷²². HeLa-Zellen wurden mit dem Vektor pSuper-Pin1 bzw. mit Leervektor als Kontrolle (K) transfiziert. Die Zellen wurden 60 h nach der Transfektion geerntet und lysiert. Die Zellysate wurden mittels SDS-PAGE und anschließend Western Blot (WB) unter Verwendung spezifischer Antikörper (AK) analysiert. Als Ladekontrolle diente Aktin.

Für weitergehende Untersuchungen wurde der Vektor pFLAG2-MCM3 hergestellt, der zur Generierung von MCM3 mit modifizierter N-terminaler FLAG-Fusion (FLAG2-MCM3) führt. Die Co-Transfektion von HeLa-Zellen mit diesem Vektor und dem Vektor pSuper-Pin1 bzw. entsprechendem Leervektor ermöglichte die Herstellung von FLAG2-MCM3 bei unterschiedlichen Pin1-Mengen in diesen Zellen. Nach Immunpräzipitation des FLAG2-MCM3's wurde das Protein mittels Western Blot auf Phosphorylierungen an Thr-Pro-Motiven untersucht. Die Ergebnisse des Experiments sind in *ABBILDUNG 34* dargestellt.

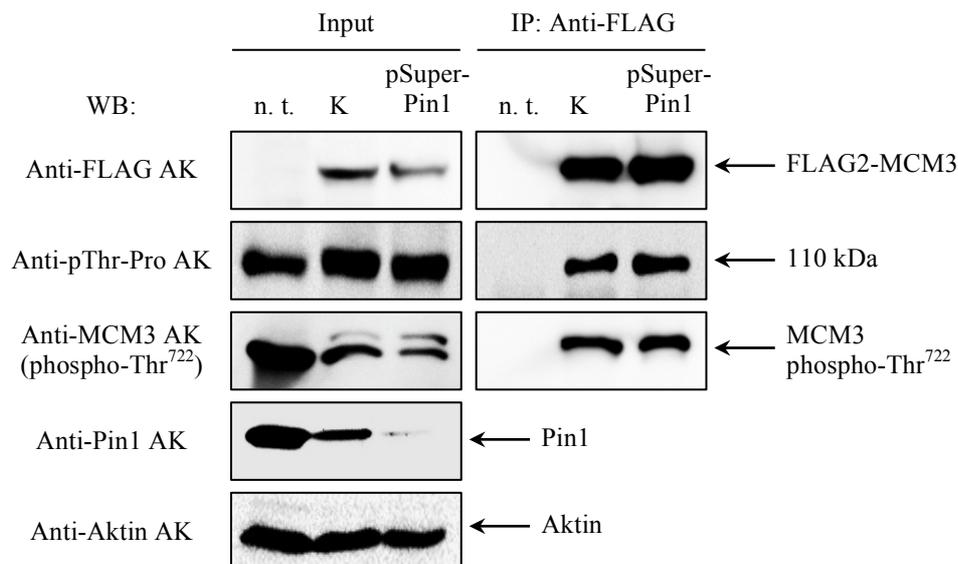


ABBILDUNG 34: EINFLUSS VON PIN1 AUF DIE PHOSPHORYLIERUNG VON MCM3 MIT N-TERMINALER FLAG2-FUSION. HeLa-Zellen wurden mit dem Vektor pFLAG2-MCM3 und zusätzlich mit dem Vektor pSuper-Pin1 bzw. mit Leervektor als Kontrolle (K) transfiziert. 60 h nach Transfektion erfolgte die Präzipitation von FLAG2-MCM3 aus den Lysaten dieser Zellen. Zellysat nicht transfizierter Zellen (n. t.) wurde gleichbehandelt. Der Input und die Präzipitationsfraktionen (IP) wurden mittels SDS-PAGE und anschließend Western Blot (WB) unter Verwendung von spezifischen Antikörpern (AK) analysiert. Als Ladekontrolle diente Aktin.

Zunächst ließ sich sowohl in Kontrollzellen als auch in Zellen mit einer verringerten Pin1-Menge eine Phosphorylierung von Thr⁷²² in FLAG2-MCM3 nachweisen. Eine deutlich verringerte Pin1-Menge in HeLa-Zellen scheint jedoch weder einen erkennbaren Einfluss auf die gesamte Phosphorylierungsmenge an Thr-Pro-Motiven von MCM3, noch spezifisch auf die Phosphorylierung der Position Thr⁷²² zu nehmen. Wie bereits beschrieben besitzt MCM3

aufgrund seiner Aminosäuresequenz sowohl zwei Ser-Pro-Motive als auch zwei Thr-Pro-Motive (vgl. *ABBILDUNG 8*). Die für die Detektion der Phosphorylierung verwendeten Anti-pThr-Pro Antikörper haben die Eigenschaft, auch pSer-Pro-Motive zu binden.⁹⁾ Aufgrund dieser Besonderheit ist nicht eindeutig ersichtlich, welches dieser Motive von FLAG2-MCM3, neben dem Motiv Thr⁷²²-Pro⁷²³, noch im phosphorylierten Zustand vorliegt. Außerdem kann keine Aussage über die Verteilung der Phosphorylierung an diesen Motiven getroffen werden. Da kein Einfluss von Pin1 auf die Phosphorylierung von MCM3 detektiert werden konnte, wurden die übrigen Ser/Thr-Pro-Motive nicht näher auf Phosphorylierung untersucht.

3.3.7 Untersuchungen zum Zellzyklusverlauf

Die Verminderung des MCM3-Gehaltes führt in U20S-Zellen zu einer Arretierung dieser Zellen in der Mitose und kann durch die Biosynthese von MCM3, aber nicht durch Biosynthese der Variante MCM3 S112A, aufgehoben werden [202]. Die Biosynthese von zusätzlichem MCM3, aber nicht die Biosynthese der Variante MCM3 T722A, inhibiert in HeLa-Zellen den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus [201]. Da die Phosphorylierung von MCM3 an den beiden Aminosäureresten Ser¹¹² und Thr⁷²² offensichtlich den Zellzyklusverlauf beeinflusst, wurde die Rolle von Pin1 insbesondere bei der Replikation untersucht. Hierfür wurde der Einfluss des Pin1-Gehaltes auf den Einbau des Thymidinanalogons 5-Bromo-2-deoxyuridin (BrdU) in die DNA bei der DNA-Replikation in HeLa-Zellen untersucht. BrdU wird in neu synthetisierte DNA-Stränge in aktiv proliferierende Zellen eingebaut. Zunächst wurden HeLa-Zellen mit dem Vektor pSuper-Pin1 oder mit entsprechendem Leervektor als Kontrolle transfiziert und nach 48 Stunden für zwei Stunden mit BrdU inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Zytometrie, Western Blot und Konfokalmikroskopie analysiert (*ABBILDUNG 35*). Die Transfektion mit dem Vektor pSuper-Pin1 führte in den entsprechenden HeLa zu einer deutlichen Verminderung des intrazellulären Pin1-Gehaltes im Vergleich zu den Kontrollzellen (*ABBILDUNG 35D*). Die zytometrische Zellzyklusanalyse präsentierte eine Anreicherung der Zellen mit vermindertem Pin1-Gehalt in der G₁-Phase des Zellzyklus und einen verminderten Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus im Vergleich mit Kontrollzellen (*ABBILDUNG 35A-C*). Mittels Konfokalmikroskopie konnten in HeLa-Zellen mit verringertem Pin1-Gehalt und in den Kontrollzellen diskrete Replikationsfoci detektiert werden (*ABBILDUNG 35E*). Beim Vergleich der Zellen sind keine phänotypisch erkennbaren Unterschiede im Einbau von BrdU sichtbar.

⁹⁾ NEW ENGLAND BIOLABS, Ipswich, https://www.neb.ca/newlab_detail.php?id=9391 (08.02.2015)

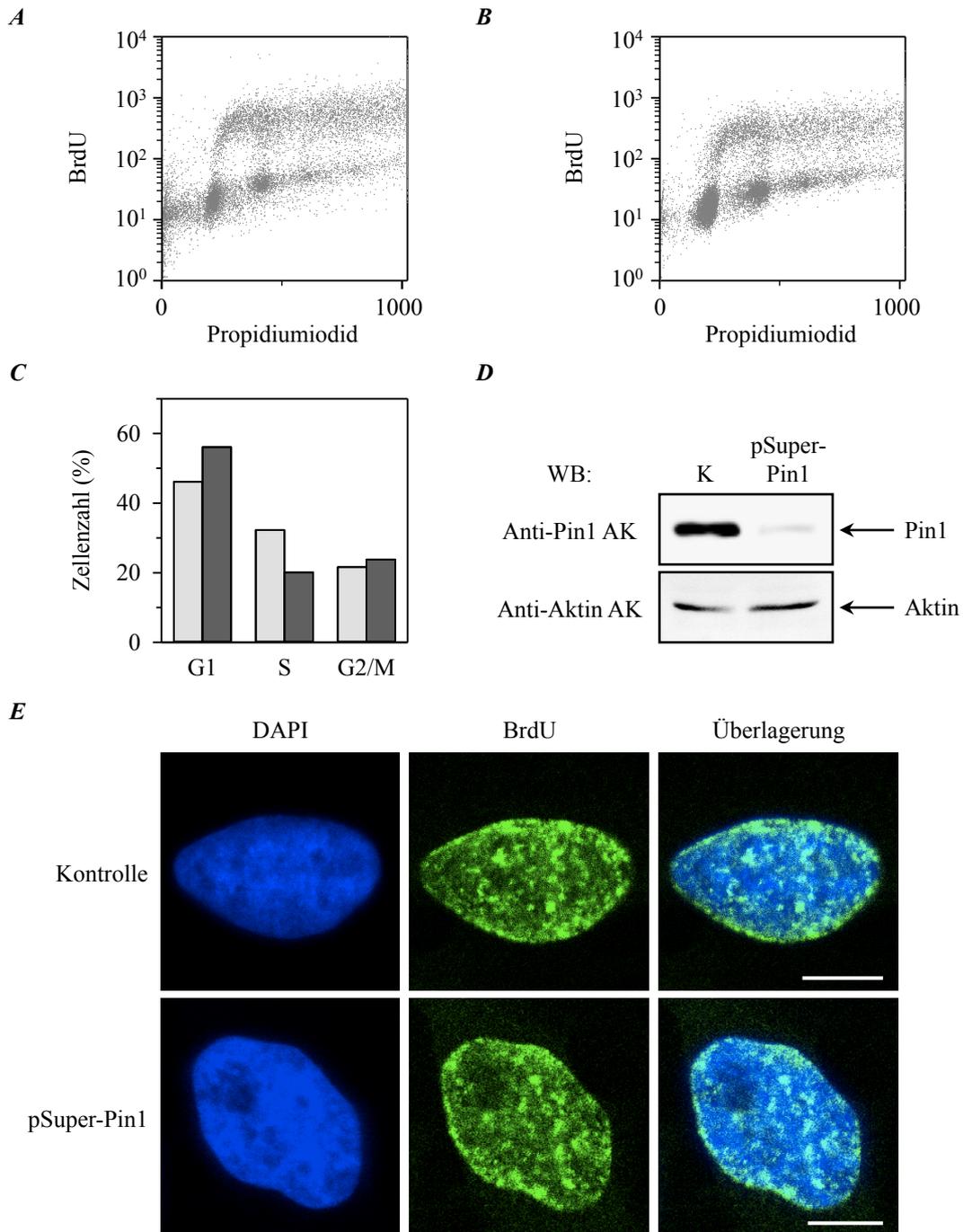
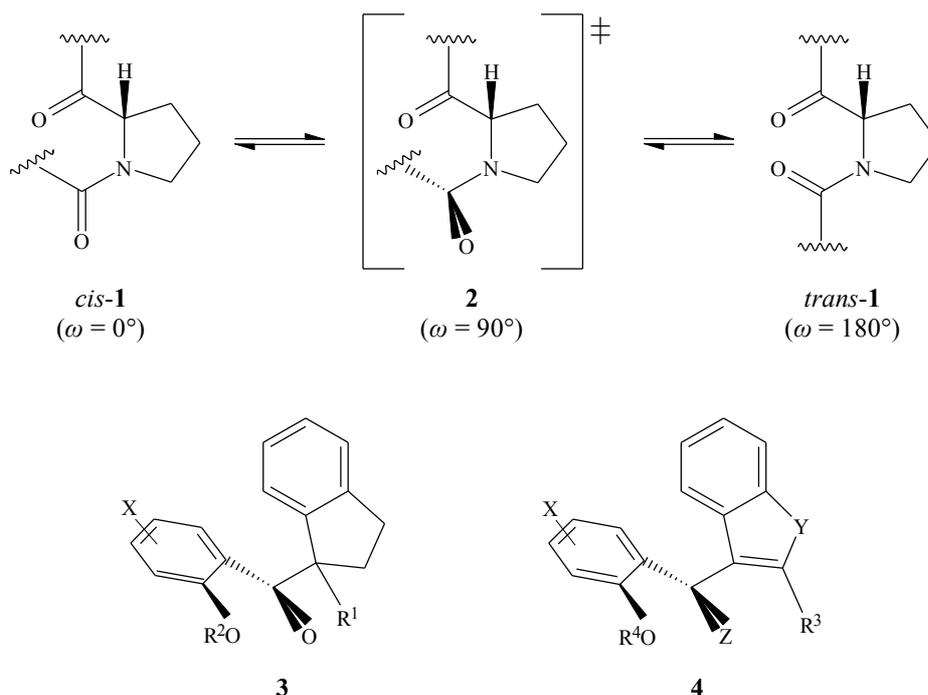


ABBILDUNG 35: EINFLUSS VON PIN1 AUF DEN ZELLYCYKLUS VON HELA-ZELLEN. HeLa-Zellen wurden mit dem Vektor pSuper-Pin1 transfiziert und nach 48 h für 2 h mit 20 μ M BrdU inkubiert. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte HeLa-Zellen gleichbehandelt. Für Analysen mittels Durchflusszytometrie (FACS) wurden die Kontrollzellen (**A**) bzw. die mit pSuper-Pin1 transfizierten Zellen (**B**) geerntet, mit Ethanol fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. BrdU wurde mit spezifischen Anti-BrdU Antikörpern und FITC-Anti-Maus IgG gefärbt. Es wurden jeweils 15000 Zellen analysiert. **C**) Für die Auswertung der FACS-Analyse der Kontrollzellen (hellgraue Balken) bzw. der mit pSuper-Pin1 transfizierten Zellen (dunkelgraue Balken) wurden nur mononukleäre Zellen betrachtet. **D**) Die Analyse der Zelllysate erfolgte mittels Western Blot (WB). Als Ladekontrolle diente Aktin. **E**) Für mikroskopische Analysen wurden die Zellen geerntet und anschließend mit Methanol und Formaldehyd fixiert. Die Färbung der DNA erfolgte mit DAPI. BrdU wurde mit spezifischen Anti-BrdU Antikörpern und FITC-Anti-Maus IgG gefärbt. Die Detektion erfolgte an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop bei 600facher Vergrößerung. Der weiße Balken entspricht 10 μ m.

3.4 Untersuchungen niedermolekularer Substanzen als Pin1-Inhibitoren

Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. BRAUN erfolgte am Institut für Organische und Makromolekulare Chemie der Universität Düsseldorf die Synthese von niedermolekularen Substanzen (BRAUN-Verbindungen) welche auf eine inhibierende Wirkung der PPIase-Aktivität von Pin1 untersucht wurden. Die chemischen Grundstrukturen dieser Substanzen sind in *ABBILDUNG 36* dargestellt.



*ABBILDUNG 36: VERBINDUNGEN MIT STRUKTURELLER ÄHNLICHKEIT ZUM ÜBERGANGSZUSTAND DER PEPTIDYL-PROLYLBINDUNG WÄHREND DER CIS/TRANS-ISOMERISIERUNG. Die cis/trans-Isomerisierung zweier Peptidyl-Prolyl-Isomere (1) verläuft im Modell über einen Übergangszustand (2) mit rechtwinkliger Anordnung der Substituenten an der Amidbindung („verdrilltes Amid“). Aryldanylylketone bzw. Biaryldanylylketone (3) sowie Arylhetarylketone, Biarylhetarylketone und Thioketone (4) zeigen aufgrund ihrer nicht planaren Geometrien strukturelle Analogien zu diesem Übergangszustand (2). Abbildung nach HEDIGER *et al.*, 2012, verändert [255].*

Im Modell können die beiden Peptidyl-Prolyl-Isomere (*cis-1* und *trans-1*) durch *cis/trans*-Isomerisierung ineinander überführt werden, indem sie einen orthogonalen Übergangszustand (2) durchlaufen. Aryldanylylketone bzw. Biaryldanylylketone (3) werden als Substanzen angesehen, die diesen Zustand des „verdrillten Amids“ strukturell nachahmen [180]. Bei diesen Verbindungen bilden ein Aryl- bzw. Biaryl- und ein an der C₁-Position verbundener Indanylrest die chemischen Reste eines Ketons. Die Grundstruktur dieser Substanzen weist strukturelle Ähnlichkeiten zur Carbonylgruppe auf. Einige Vertreter dieser Substanzklasse haben sich bereits als starke Pin1-Inhibitoren erwiesen [180]. Durch weitere Untersuchungen wurden bei diesen Verbindungen nicht nur die potenten Cyclophilin-inhibierenden Wirkungen, sondern interessanterweise auch deren Isoformspezifitäten gegenüber dieser PPIase-Familie erkannt [16].

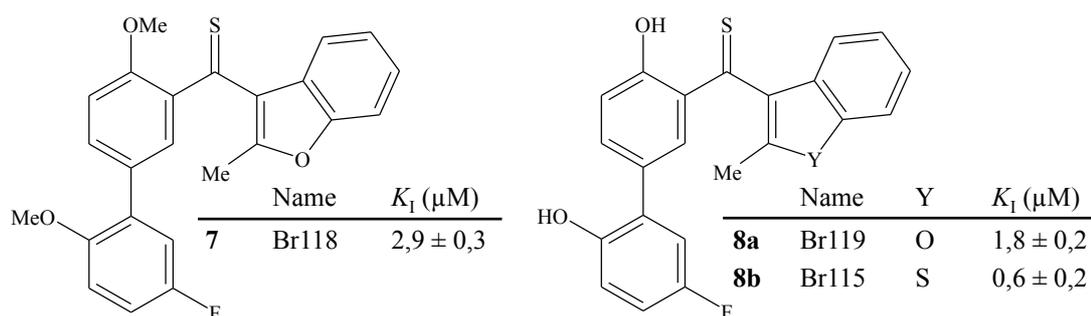
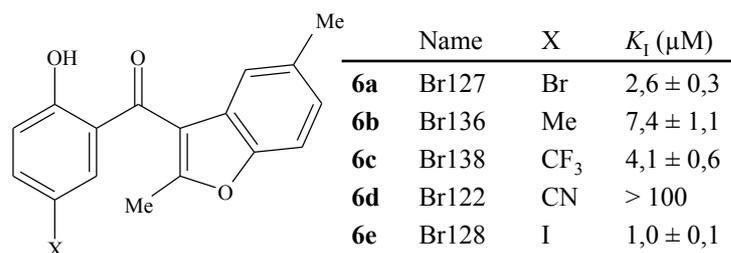
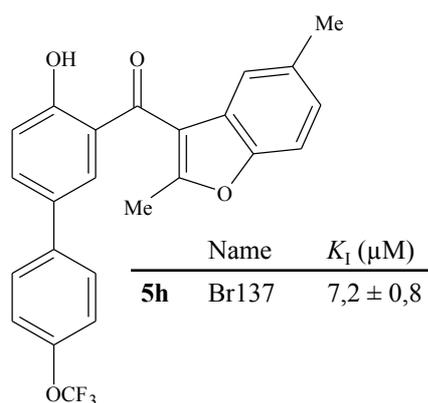
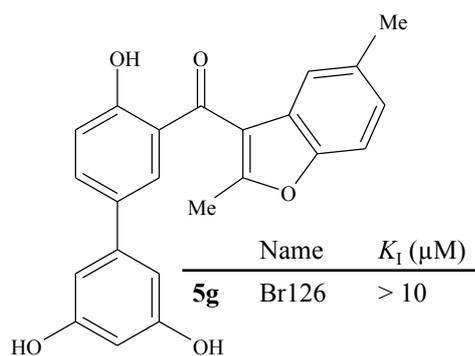
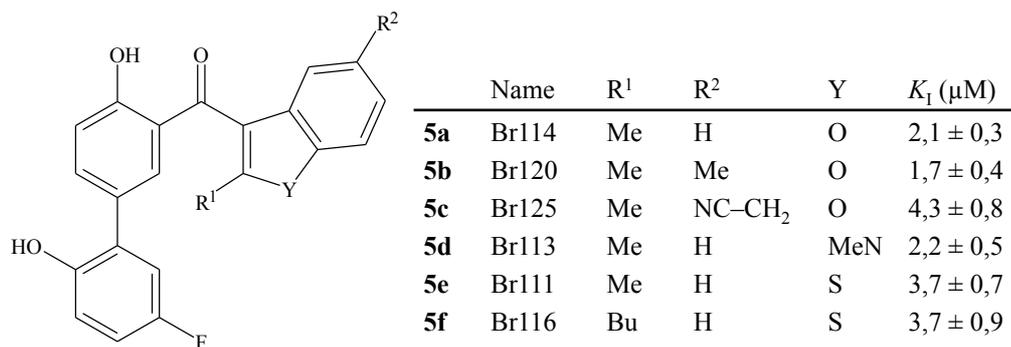


ABBILDUNG 37: CHEMISCHE STRUKTUREN UND INHIBITIONSKONSTANTEN K_I GEGENÜBER PIN1 EINIGER BIARYLHETARYLKETONE (**5a** – **5h**), MONOARYLHETARYLKETONE (**6a** – **6e**) UND THIOKETONE (**7**, **8a** UND **8b**). Die Messungen wurden mithilfe eines proteasefreien PPIase-Assays mit 10 nM Pin1 in Puffer 35 mM HEPES pH 7,8, 100 nM BSA und 60 μM Suc-Ala-Glu-Pro-Phe-*p*NA als Substrat bei einer Temperatur von 10 °C durchgeführt. Die Ergebnisse entsprechen arithmetischen Mitteln und Standardabweichungen aus jeweils zwei Messungen.

Die inhibitorische Aktivität enantiomerenreiner Verbindungen ist im Vergleich zu deren entsprechenden racemischen Gemischen höher [180]. Die Chiralität der Verbindungen beruht dabei auf dem tetrahedralen Kohlenstoffatom an der C₁-Position des Indanylrestes (**3**). Allerdings racemisieren einige enantiomerenreine Substanzen unter den Bedingungen der Inhibitionsmessungen [256]. Um dies zu verhindern wurden Arylhetarylketone bzw. Biarylhetarylketone und Thioketone (**4**) ohne Stereozentrum synthetisiert. Um eine möglichst starke Inhibitionswirkung zu erzielen, wurde dabei versucht, Substanzen zu generieren, die aufgrund ihrer nicht planaren Geometrie dem Konzept der Nachahmung des Übergangszustands der Peptidyl-Prolylbindung bei der *cis/trans*-Isomerisierung (**2**) genügen. In *ABBILDUNG 37* sind die chemischen Strukturen und die ermittelten Inhibitionskonstanten K_1 gegenüber Pin1 einer Auswahl der getesteten Substanzen für vergleichende Betrachtungen dargestellt. Es handelt sich dabei um Biarylhetarylketone (**5a – 5h**), Monoarylhetarylketone (**6a – 6e**) und Thioketone (**7**, **8a** und **8b**). Eine Liste aller untersuchten Substanzen und deren chemische Strukturen sowie deren Inhibitionskonstanten K_1 bzw. IC_{50} -Werte gegenüber Pin1 befindet sich im Anhang (*TABELLE 19*). Die Inhibition der PPIase-Aktivität von Pin1 durch die entsprechenden Verbindungen wurde mittels proteasefreiem PPIase-Assay unter Verwendung von Suc-Ala-Glu-Pro-Phe-*p*NA als Substrat bestimmt [234]. *ABBILDUNG 38* zeigt repräsentativ eine Verlaufskurve einer solchen Inhibitionsmessung.

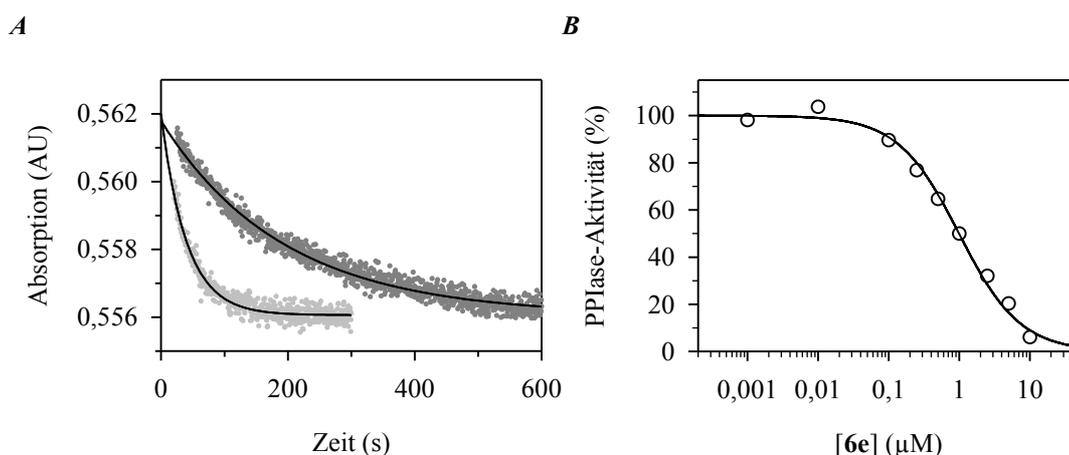


ABBILDUNG 38: INHIBITION VON PIN1 MIT DEM MONOARYLHETARYLKETON 6e. Die Messungen erfolgten im proteasefreien PPIase-Assay in Puffer 35 mM HEPES pH 7,8, 100 nM BSA und 60 μM Suc-Ala-Glu-Pro-Phe-*p*NA als Substrat bei Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen des Monoarylhetarylketons **6e**. Die Temperatur betrug 10 °C und die Pin1-Konzentration 10 nM. *A*) Die *cis/trans*-Isomerisierung des Substrates wurde bei einer Wellenlänge von 330 nm in Anwesenheit von Pin1 und 0,001 μM **6e** (hellgraue Punkte) bzw. 10 μM **6e** (dunkelgraue Punkte) verfolgt. Nichtlineare Regressionen der Messpunkte nach der Funktion für Reaktionen 1. Ordnung (schwarze Linien) ergeben Geschwindigkeitskonstanten von $k_{\text{obs}} = 25,03 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ bzw. $k_{\text{obs}} = 5,20 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Für die Darstellung wurden die Absorptionen normiert. *B*) Die Geschwindigkeitskonstanten k_{enz} der Reaktionen (in % der Kontrolle) wurden gegen die entsprechenden Konzentrationen an **6e** aufgetragen. Die Datenpunkte stellen jeweils arithmetische Mittel einer Zweifachbestimmung dar. Die Linie entspricht der nichtlinearen Regression der Messwerte nach *GLEICHUNG 4*. Es ergibt sich für das Monoarylhetarylketon **6e** eine Inhibitionskonstante $K_1 = 1,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$ gegenüber Pin1.

Mit Ausnahme von zwei Verbindungen (**5g** und **6d**) inhibierten alle hier beschriebenen Substanzen (**5-8**) die PPIase-Aktivität von Pin1 mit K_I -Werten im einstelligen mikromolaren Bereich. Im Vergleich der 1-Benzofuranderivate (**5a – 5c**) besitzt **5b** den niedrigsten K_I -Wert gegenüber Pin1. Die Derivate **5e** und **5f** besitzen unterschiedliche Alkylreste R^1 , haben jedoch gleiche Inhibitionskonstanten. Die Substanzen **5a**, **5d** und **5e** unterscheiden sich im Heteroatom des Heterozyklus, besitzen jedoch im Vergleich miteinander sehr ähnliche K_I -Werte gegenüber Pin1. Von den drei Biarylhetarylketonen **5b**, **5g** und **5h** mit unterschiedlichen Biarylresten zeigt **5b** die höchste, **5g** jedoch keine Aktivität.

Innerhalb der fünf getesteten Monoarylhetarylketone (**6a – 6e**) zeigte lediglich das Benzotrinderivat (**6d**) keine Inhibitorwirkung. Substitution der Cyanogruppe in dieser Substanz gegen Br (**6a**) oder I (**6e**) führte zu Monoarylhetarylketonen mit bemerkenswert niedrigen K_I -Werten gegenüber Pin1. Interessanterweise hatten auch die getesteten Thioketone **7**, **8a** und **8b** gute inhibierende Eigenschaften. Bei den Thioketonen **8a** und **8b** ist im Kontrast zu den Substanzen **5a**, **5d** und **5e** ein stärkerer Einfluss des Heteroatoms des Heterozyklus auf die inhibitorische Aktivität zu beobachten. Das Keton **5a** zeigte in Gegenüberstellung mit dem entsprechenden Thioketon **8a** eine leicht schwächere inhibitorische Aktivität. Ein deutlich größerer Unterschied in der Inhibitorwirkung war zwischen dem Keton **5e** und dem entsprechenden Thioketon **8b** zu verzeichnen. Im Vergleich zu **5e** besitzt **8b** mit einem K_I -Wert von $0,6 \mu\text{M}$ einen sechsfach niedrigeren K_I -Wert gegenüber Pin1 und zeigte damit die beste inhibierende Wirkung dieser Inhibitorgruppe. Die Thioketone **8a** und **8b** inhibierten mit IC_{50} -Werten von $3,1 \pm 0,4 \mu\text{M}$ bzw. $3,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$ auch die PPIase-Aktivität von humanem CypA.

Durch Prof. Dr. W. FRANK wurde am Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie der Universität Düsseldorf die Kristallstruktur des Biarylhetarylketons **5b** gelöst. Die Röntgenstrukturanalyse ergab, dass der 1-Benzofuranring und der Phenylrest an der Keto-Gruppe nicht planar in einer Ebene liegen. Die Ebenen beider Reste sind zueinander um einen Torsionswinkel von ca. 53° verdreht und die Ketogruppe liegt dabei in keiner der beiden Ebenen [255].

3.5 Isolierung und Analyse von PPIasen unter Verwendung immobilisierter Inhibitoren

Für die Experimente zur Immobilisierung von Inhibitoren wurden durch Dr. M. MALEŠEVIĆ die CsA-Derivate **9** und **11** und durch Dr. V. KAHLERT das CsA-Derivat **10** synthetisiert. *ABBILDUNG 54* im Anhang zeigt die chemischen Strukturen der verwendeten CsA-Derivate. Die beiden neuen CsA-Derivate **9** und **10** tragen jeweils einen Biotinrest der über einen hydrophilen *linker* mit der CsA-Ringstruktur verknüpft ist. Substanz **11** besitzt eine Inhibitionskonstante K_I von $1,3 \pm 0,2$ nM gegenüber CypA und wurde als starker Inhibitor extrazellulärer Cyclophiline hergestellt, der eine höhere Löslichkeit in wässrigen Lösungen verglichen mit CsA und anderen CsA-Derivaten aufweist [69]. Zunächst wurden auch die inhibierenden Eigenschaften der beiden CsA-Derivate **9** und **10** untersucht. Wie auch CsA selbst, sind beide Derivate in der Lage, die PPIase-Aktivität von CypA zu inhibieren. CsA, **9** und **10** zeigen mit IC_{50} -Werten zwischen 8 nM und 11 nM unter identischen Bedingungen sehr ähnliche Inhibitionswirkung gegenüber CypA (*ABBILDUNG 39A*). **9** inhibiert auch die PPIase-Aktivität von CypB und CypC mit IC_{50} -Werten im einstelligen nanomolaren Bereich (*ABBILDUNG 55*).

Humanes Blutserum gesunder Probanden weist durch das Vorhandensein von Cyclophilinen PPIase-Aktivität auf [236]. Im verwendeten Gemisch humanen Serums vier gesunder Probanden ließen sich die typischen zellulären Proteine Hsp70 und β -Tubulin mittels Western Blot nicht nachweisen (*ABBILDUNG 56*). Um festzustellen, ob beide Derivate in der Lage sind mit Cyclophilinen aus humanem Serum zu interagieren, wurde zuerst die PPIase-Aktivität des präparierten Serums bestimmt und anschließend versucht diese Aktivität mit CsA als Kontrollsubstanz oder mit **9** bzw. **10** zu inhibieren. Die PPIase-Aktivität des Serums steigt in linearer Abhängigkeit mit der Serumkonzentration an (*ABBILDUNG 39B*). Ausgehend von dieser Messung liefert *GLEICHUNG 6* mit der Geschwindigkeitskonstante der *cis*→*trans*-Isomerisierung für die unkatalysierte Reaktion des verwendeten Substrates von $k_0 = (7,8 \pm 0,1) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ einen Aktivitätsfaktor $K = 15,3$ RE pro Milliliter Serum. Legt man der PPIase-Aktivität in Serum vollständig die katalytische Effizienz von rekombinant hergestelltem CypA ($k_{\text{cat}}/K_M = 1,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) zugrunde, läßt sich für die Serumprobe eine enthaltene Konzentration von 13,8 nM CypA-äquivalenter PPIase ermitteln. Sowohl CsA als auch die beiden Derivate **9** und **10** waren in der Lage, diese PPIase-Aktivität zu inhibieren. Allerdings blieb bei der höchsten gemessenen Inhibitorkonzentration von 10 μM bei allen drei Inhibitoren eine Restaktivität zwischen 2 % und 5 % der Kontrolle vorhanden (*ABBILDUNG 39C*). Somit ließen sich für die Substanzen über Inhibitionskurven lediglich extrapolierte IC_{50} -Konzentrationen bestimmen (*ABBILDUNG 39D*). Für **9** und **10** liegen diese Werte nur wenig unter den IC_{50} -Werten, die für die Inhibierung von rekombinantem CypA durch diese entsprechenden Derivate ermittelt wurden. CsA zeigte allerdings im Vergleich zur Inhibierung von rekombinantem CypA gegenüber Serum einen um Faktor 1,7 höheren IC_{50} -Wert.

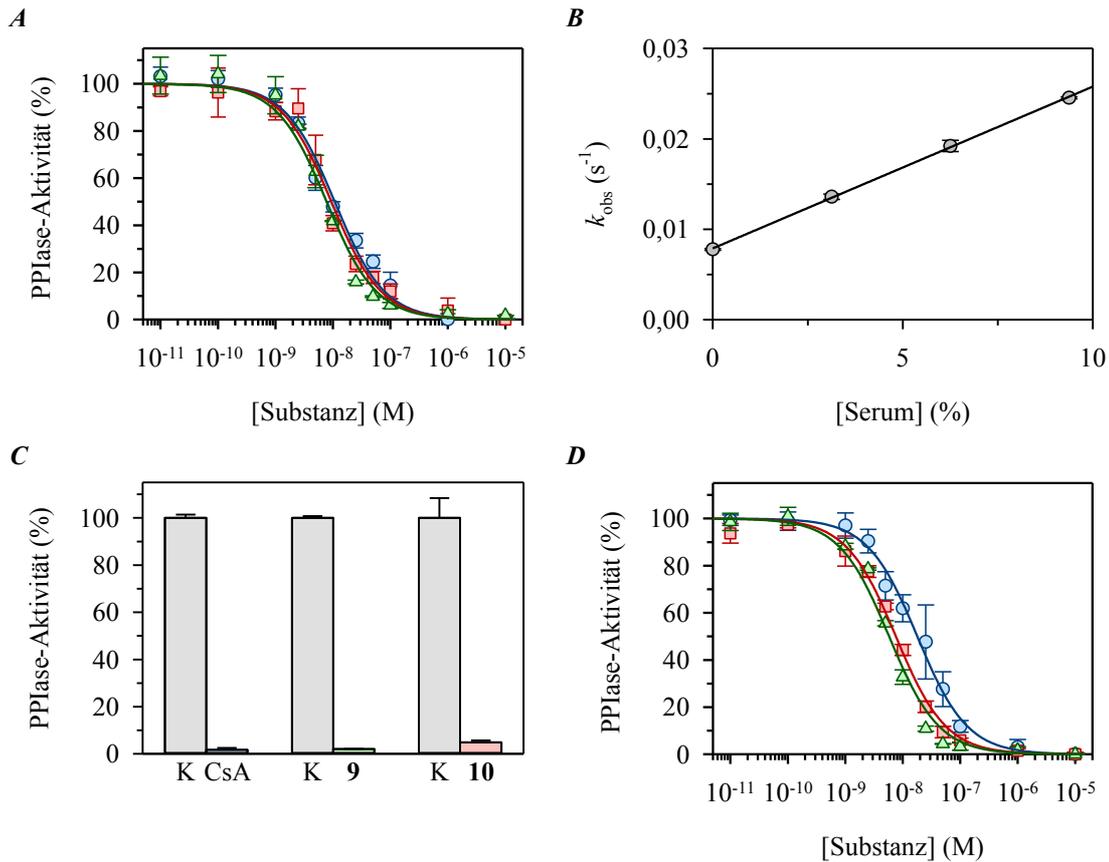


ABBILDUNG 39: INHIBIERUNGEN VON PPIASE-AKTIVITÄTEN MIT CSA-DERIVATEN. **A)** Inhibierung der PPIase-Aktivität von 0,5 nM CypA durch die Inhibitoren CsA (○), **9** (△) bzw. **10** (□). Die Geschwindigkeitskonstanten k_{enz} der Reaktionen (in % der Kontrolle) wurden gegen die entsprechenden Inhibitorkonzentrationen aufgetragen. Durch nichtlineare Regressionen der Messwerte nach *GLEICHUNG 5* ergeben sich IC_{50} -Werte von $10,7 \pm 1,0$ nM (CsA, blaue Linie), $7,8 \pm 0,7$ nM (**9**, grüne Linie) bzw. $9,4 \pm 0,9$ nM (**10**, rote Linie). **B)** Bestimmung der PPIase-Aktivität von humanem Serum. Die Geschwindigkeitskonstanten k_{enz} der Reaktionen wurden gegen die entsprechenden Serumkonzentrationen aufgetragen. Die durchgezogene Linie (Geradengleichung: $y = 0,00179x + 0,00789$) ergibt sich aus der linearen Regression der Messwerte. **C)** Inhibierung der PPIase-Aktivität (in % der Kontrolle) humanen Serums durch 10 μM der Inhibitoren CsA, **9** bzw. **10**. Als Kontrolle (K) diente die PPIase-Aktivität von Serum in Abwesenheit des jeweiligen Inhibitors. **D)** Inhibierung der PPIase-Aktivität humanen Serums durch die Inhibitoren CsA (○), **9** (△) bzw. **10** (□). Die Geschwindigkeitskonstanten k_{enz} der Reaktionen (in % der Kontrolle) wurden gegen die entsprechenden Inhibitorkonzentrationen aufgetragen. Die verbleibende Restaktivität bei einer Inhibitorkonzentration von 10 μM wurde von allen Werten korrigiert. Durch nichtlineare Regressionen der Messwerte nach *GLEICHUNG 5* ergeben sich extrapolierte IC_{50} -Werte von $17,9 \pm 1,3$ nM (CsA, blaue Linie), $5,8 \pm 0,6$ nM (**9**, grüne Linie) bzw. $7,6 \pm 0,5$ nM (**10**, rote Linie). Alle Messungen erfolgten im proteasegekoppelten PPIase-Assay in Puffer 10 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl und 53,4 μM Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA als Substrat. Als isomerspezifische Protease diente α -Chymotrypsin. Die Serumkonzentration für Inhibitionsmessungen betrug jeweils 25 % (v/v). Die Datenpunkte entsprechen arithmetischen Mitteln und den dazugehörigen Standardabweichungen aus jeweils drei Messungen.

Da die neuen CsA-Derivate **9** und **10** starke inhibierende Wirkung sowohl gegenüber rekombinantem CypA als auch gegenüber der PPIasese-Aktivität von Serum zeigten und diese auf hohe Affinitäten gegenüber Cyclophilinen hinweisen, wurde untersucht, inwieweit **9** und **10** in immobilisierten Formen als spezifische Cyclophilin-Affinitätsmatrizes fungieren. Zunächst wurden die Substanzen **9** und **10** über die in den Strukturen vorhandenen Biotinreste an Streptavidin-Agarose-Matrizes immobilisiert. Mithilfe der beiden so hergestellten CsA-

Derivat-Matrizes (**9**-Matrix und **10**-Matrix), jedoch nicht mit einer Kontrollmatrix, an der kein CsA-Derivat immobilisiert wurde, konnte anschließend in Form eines *pull-down*-Experiments rekombinantes CypA aus einer CypA-Lösung in den Elutionen angereichert werden (**ABBILDUNG 40A**).

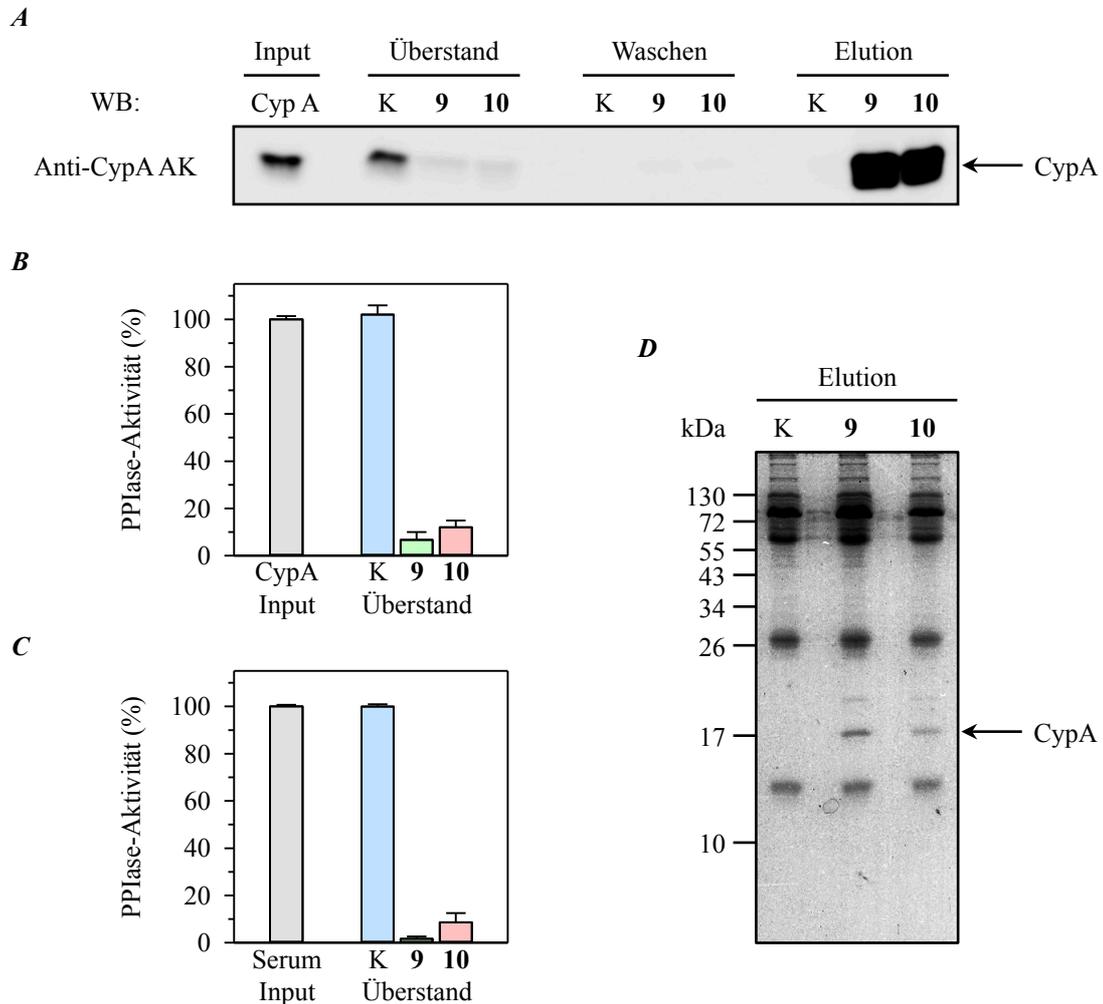


ABBILDUNG 40: PULL-DOWN VON CYP A MIT IMMOBILISIERTEN CSA-DERIVATEN. Streptavidin-Agarose wurde mit dem CsA-Derivat **9** bzw. **10** beladen. Als Kontrolle (K) diente unbeladene Streptavidin-Agarose. Nach zweimaligem Waschen mit Puffer erfolgte die Inkubation der Streptavidin-Agarose entweder mit rekombinant hergestelltem CypA in Puffer oder mit humanem Serum. Nach einem Waschschrift mit Puffer erfolgte die Elution mit SDS-Probenpuffer. **A**) Der Input (CypA), die Überstände nach Inkubation der Streptavidin-Agarose mit CypA, die nachfolgenden Waschschrift und die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot (WB) unter Verwendung von spezifischen Anti-CypA Antikörpern (Anti-CypA AK) analysiert. **B**) Bestimmung der PPIase-Aktivität des Inputs und der Überstände nach Inkubation der Streptavidin-Agarose mit CypA. Die Messungen erfolgten im proteasegekoppelten PPIase-Assay in Puffer 10 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl und 53,4 μ M Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA als Substrat. Als isomerspezifische Protease diente α -Chymotrypsin. Die Datenpunkte entsprechen arithmetischen Mitteln und den dazugehörigen Standardabweichungen. Die Werte wurden auf die Aktivität des Inputs normiert. **C**) Bestimmung der PPIase-Aktivität des Inputs und der Überstände nach Inkubation der Streptavidin-Agarose mit Serum. Die Messungen erfolgten im Prinzip wie unter **B** beschrieben. Die Serumkonzentration betrug jeweils 6,25 % (v/v). **D**) Die Elutionsfraktionen nach Inkubation der Streptavidin-Agarose mit Serum wurden mittels SDS-PAGE (15 %) und anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Durch Analyse der entsprechenden Gelfragmente wurde CypA massenspektrometrisch in den Elutionen **9** und **10** jedoch nicht in der Kontrolle (K) nachgewiesen.

Mittels Western Blot wurden in den Überständen nach Inkubation der CypA-Lösung mit **9**-Matrix bzw. **10**-Matrix im Vergleich zum Input deutlich reduzierte Mengen CypA detektiert, während sich im Überstand der Kontrollmatrix CypA in unveränderter Menge nachweisen ließ. In den Waschfraktionen konnte CypA nicht detektiert werden. Parallel zum *pull-down*-Experiment wurden die PPIase-Aktivitäten des CypA-Inputs und der Überstände nach Inkubation der CypA-Lösung mit den Matrices im PPIase-Assay untersucht. Die Überstände der CsA-Derivat-Matrices zeigten jeweils lediglich noch ca. 10 % der PPIase-Aktivität des CypA-Inputs. Die PPIase-Aktivität des Überstandes der Kontrollmatrix änderte sich im Vergleich zur PPIase-Aktivität des CypA-Inputs nicht (ABBILDUNG 40B). Die Waschfraktionen wiesen keine PPIase-Aktivität auf (ABBILDUNG 57A im Anhang). In einem analog durchgeführten *pull-down*-Experiment, in dem jedoch Serum anstelle von rekombinant hergestelltem CypA als Input zur Anwendung kam, wurde ein entsprechendes Resultat erzielt (ABBILDUNG 40C). Im Rahmen dieses Experiments konnte authentisches CypA in den Elutionen der CsA-Derivat-Matrices, jedoch nicht in der Elution der Kontrollmatrix, sowohl im SDS-PA-Gel mittels Coomassie-Färbung (ABBILDUNG 40D) und mittels Western Blot (ABBILDUNG 57B im Anhang) als auch eindeutig durch eine massenspektrometrische Analyse der entsprechenden Gelfragmente nachgewiesen werden.

Allerdings wiesen die Elutionen aller Matrices (auch die Kontrollmatrix) eine große Menge an Serumproteinen auf. Die Ursache dafür beruht offenbar auf unspezifischer Interaktion dieser Proteine mit der verwendeten Streptavidin-Agarose-Matrix. Durch Untersuchungen der Immobilisierung von **9** an die verwendete Streptavidin-Agarose mittels HPLC (ABBILDUNG 58) konnte eine Bindekapazität der **9**-Matrix von ca. 200 nmol CsA-Derivat **9** pro Milliliter Suspension abgeschätzt werden.¹⁰⁾

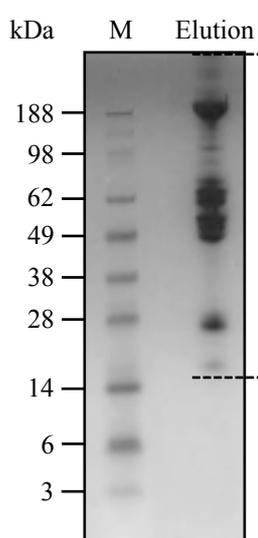


ABBILDUNG 41: AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE VON SERUMPROTEINEN MIT IMMOBILISIERTEM CSA-DERIVAT **9**. Eine Streptavidin-Agarose-Säule wurde mit dem CsA-Derivat **9** beladen. Die Säule wurde mit Puffer gewaschen und danach mit humanem Serum beladen. Anschließend wurde die Säule erneut mit Puffer gewaschen und mit einer Lösung von 1 mM CsA-Derivat **11** in Puffer eluiert. Die Elutionsfraktion wurden mittels TCA-Fällung konzentriert und zusammen mit einem Proteingrößenmarker (M) mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Der Bereich zwischen den gestrichelten Linien wurde einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen.

¹⁰⁾ Die verwendete Streptavidin-Agarose besitzt laut Hersteller eine Bindkapazität von > 85 nmol freiem Biotin pro Milliliter Suspension; http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Streptavidin-Agarose,EMD_BIO-69203 (15.02.2015).

Derivat **9** wurde zur Untersuchung des Serums nach weiteren darin enthaltenen Cyclophilinen herangezogen. Hierfür wurde **9** erneut an einer Streptavidin-Agarose-Matrix immobilisiert. Das humane Serum wurde, unter Verwendung dieser **9**-Matrix, mittels Säulenchromatographie einer Affinitätsreinigung unterzogen. Die Chromatographiesäule wurde zur Elution mit einer Lösung von 1 mM CsA-Derivat **11** gespült um in der Elutionsfraktion die Menge an Proteinen zu vermindern, die unspezifisch mit der Streptavidin-Agarose-Matrix interagierten. Bei dieser kompetitiven Elution kamen der hydrophile Charakter und die damit verbundene gute Löslichkeit in wässrigen Pufferlösungen dieses Inhibitors sowie dessen hohe Affinität zu Cyclophilinen zum Tragen und stellt den Neuwert bei dieser Methode dar. Die eluierten Proteine wurden nach TCA-Fällung mittels SDS-PAGE separiert (*ABBILDUNG 41*). Der Bereich der Elution im SDS-PA-Gel mit sichtbaren Coomassie-Banden wurde ausgeschnitten und durch Dr. C. H. IHLING einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Durch Abgleich der erhaltenen Daten mit Proteindatenbanken konnten in der Serumprobe acht Cyclophiline eindeutig identifiziert werden. Neben den drei Cyclophilinen CypA, CypB und CypC, die bereits als extrazellulär vorkommende Cyclophiline beschrieben sind [37], fanden sich die Cyclophiline Cyclophilin D (CypD), Cyclophilin E (CypE), Cyclophilin-40 (Cyp40), Cyclophilin H (CypH) und *Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase-like 1* (PPIL1) in der Serumprobe (*TABELLE 16*). Innerhalb der gefundenen PPIasen wurde nach Proteinmodifizierungen gesucht. Dabei wurden die Peptide CypA³⁸⁻⁴⁹, CypA¹³²⁻¹⁴⁴ und CypA¹⁵⁵⁻¹⁶⁵ mit N^ε-Acetylierung an den Positionen Lys⁴⁴, Lys¹³³ bzw. Lys¹⁵⁵ detektiert. Außerdem wurde das Peptid CypA²⁻¹⁹ mit N^α-Acetylierung an Position Val² identifiziert. Daneben wurden diese Peptide auch ohne die jeweilige Modifizierung detektiert.

TABELLE 16: MASSENSPEKTROMETRISCH IDENTIFIZIERTE CYCLOPHILINE AUS HUMANEM SERUM NACH AFFINITÄTS-CHROMATOGRAPHIE MIT IMMOBILISIERTEM CSA-DERIVAT 9.

<i>UniProt</i> -Eintrag ^{a)}	Name	Molekülmasse	detektierte Peptide	Sequenzabdeckung
P62937 (PPIA_HUMAN)	CypA	18012	14 ^{b)}	87 % ^{b)}
P23284 (PPIB_HUMAN)	CypB	23743	18 ^{b)}	69 % ^{b)}
P45877 (PPIC_HUMAN)	CypC	22763	5 ^{b)}	21 % ^{b)}
P30405 (PPIF_HUMAN)	CypD	22040	3	10 %
Q9UNP9 (PPIE_HUMAN)	CypE	33431	3	11 %
Q08752 (PPID_HUMAN)	Cyp40	40764	5	19 %
O43447 (PIIH_HUMAN)	CypH	19208	7	31 %
Q9Y3C6 (PPIL1_HUMAN)	PPIL1	18237	6	43 %

^{a)} Eintrag in der Datenbank *UniProtKB* (<http://www.uniprot.org/uniprot/>), 08.12.2014. ^{b)} Protein wurde mehrfach detektiert, Angabe bezieht sich auf die größte Anzahl detektierter Peptide bzw. auf die höchste Sequenzabdeckung.

4 DISKUSSION

4.1 MCM3 als neuer Proteininteraktionspartner von Pin1

Die vorliegenden Untersuchungen präsentieren MCM3 als neuen Interaktionspartner von Pin1. Das Protein wurde initial über *GST-pull-down*-Experimente von GST-Pin1 und Lysat humaner Zellen identifiziert. Bei diesen Experimenten wurden insgesamt 68 eukaryotische Proteine als potentielle Pin1-Interaktionspartner erfasst. Über 90 % dieser Proteine tragen mindestens ein Ser/Thr-Pro-Motiv in ihrer Primärstruktur (*TABELLE 18*), ein bedeutendes regulatorisches Phosphorylierungsmotiv in Zellen [111]. Sie stellen damit potentielle Substrate für die Superfamilie der Prolin-gerichteten Proteinkinasen dar, die für die Phosphorylierung dieser Motive verantwortlich sind [111]. Sowohl die WW-Domäne als auch die PPIase-Domäne von Pin1 interagieren mit pSer/Thr-Pro-Motiven von Proteinen [92, 100]. Der in dieser Arbeit gewählte methodische Ansatz zur Identifizierung neuer Pin1-Interaktionspartner wird dabei durch die Tatsache unterstützt, dass für über 15 % der gefundenen Proteine bereits Wechselwirkungen mit Pin1 in der Literatur verzeichnet sind (*TABELLE 18*).

Durch die *GST-pull-down*-Experimente wurden neben MCM3 auch alle weiteren Untereinheiten des MCM2-7-Komplexes als neue Interaktionspartner von Pin1 identifiziert. Jedes MCM-Protein des heterohexameren Komplexes enthält in seiner entsprechenden Primärstruktur Ser/Thr-Pro-Motive. Der MCM2-7-Komplex ist Teil des eukaryotischen DNA-Helikasekomplexes [184]. Für Pin1 wurden bereits Interaktionen mit den ATP-abhängigen RNA-Helikasen DDX3X, DDX5, DDX17, DDX24 und DHX15 gefunden [257]. Für die PPIase ist auch eine Interaktion mit der DNA-Topoisomerase II α beschrieben, ein Enzym, welches an der Veränderung der Topologie der DNA-Moleküle beteiligt ist und eine wichtige Rolle für den Verlauf des Zellzyklus spielt [258]. Experimente mit dissoziiertem MCM2-7-Komplex und affinitätsgereinigtem Protein zeigen insbesondere eine Interaktion von Pin1 mit dem Protein MCM3 (*ABBILDUNG 4*, *ABBILDUNG 5*), einer Untereinheit des MCM2-7-Komplexes, die im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert wurde. Möglicherweise interagieren die anderen MCM-Proteine des Komplexes nur indirekt über ihre Anbindung an MCM3 mit Pin1. Eine direkte Interaktion von Pin1 mit den anderen Untereinheiten des MCM2-7-Komplexes kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da diese in Zellen Phosphorylierungen durch diverse Proteinkinasen unterliegen [209-212, 259].

Die Interaktion zwischen Pin1 und MCM3 wird über die WW-Domäne von Pin1 vermittelt (*ABBILDUNG 6*). Die enzymatische Aktivität der PPIase-Domäne beeinflusst diese Interaktion nicht (*ABBILDUNG 7*). Die Interaktion zwischen Pin1 und MCM3 erfordert die Phosphorylierung von MCM3 (*ABBILDUNG 9*). Die Interaktion wird über die Motive Ser¹¹²-Pro¹¹³ und Thr⁷²²-Pro⁷²³ von MCM3 vermittelt. Der Austausch von Ser¹¹² bzw. Thr⁷²² gegen einen nichtphosphorylierbaren Aminosäurerest verhinderte die Bindung von Pin1 an MCM3 (*ABBILDUNG 10*). Es ist bekannt, dass die Serin- bzw. Threoninseitenkette dieser Ser/Thr-Pro-Motive in MCM3 *in vivo* durch Cyclin B/CDK1 bzw. Cyclin E/CDK2 phosphoryliert werden [201, 202]. Auch die Seitenkette von Ser⁶¹¹ kann *in vitro* durch Cyclin B/CDK1, Cyclin A/CDK2 und Cyclin E/CDK2 phosphoryliert werden [202], allerdings wurde für die Motive Thr⁴⁶⁴-Pro⁴⁶⁵ und Ser⁶¹¹-Pro⁶¹² nach dem Kenntnisstand des Autors *in vivo* bislang keine

Phosphorylierung des entsprechenden Threonin- bzw. Serinrestes nachgewiesen. Aminosäureaustausche an diesen Motiven innerhalb von MCM3 beeinflussen auch die Interaktion des Proteins mit Pin1 nicht (*ABBILDUNG 10*).

Phosphorylierung des Serin- bzw. Threoninrestes der Motive Ser¹¹²-Pro¹¹³ und Thr⁷²²-Pro⁷²³ in MCM3 reguliert in Zellen die Chromatinassemblierung von MCM3. Aminosäureaustausche an diesen Positionen, die eine Phosphorylierung an ebendiesen Positionen verhindern, gehen mit einer reduzierten Menge an chromatinassoziiertem MCM3 einher [201, 202]. Für chromatinassoziiertes MCM3 konnte Phosphorylierung an Thr⁷²² gezeigt werden, allerdings war der Anteil an MCM3 pThr⁷²² in der löslichen Fraktion deutlich größer (*ABBILDUNG 11A*). Phosphorylierung von MCM3 an Position Ser¹¹² konnte nicht untersucht werden, da für die Position ein entsprechender Antikörper nicht verfügbar war. Diese Ergebnisse weisen in ihrer Gesamtheit stark auf Phosphorylierung an den Seitenketten der relevanten Aminosäurereste von MCM3 sowohl im chromatinassoziierten Zustand als auch im löslichen Protein hin. Damit kann eine Pin1-Interaktion mit zellulärem MCM3 aus der Chromatinfraction (*ABBILDUNG 11C*) und aus der löslichen Fraktion (*ABBILDUNG 11B*) möglich sein. Für das Motiv Ser¹⁹-Pro²⁰ von MCM6 aus *Saccharomyces cerevisiae* ist Phosphorylierung sowohl von freiem als auch von chromatinassoziiertem Protein beschrieben [210]. Allerdings deutet eine sehr geringe Menge von Pin1 in der Chromatinfraction (*ABBILDUNG 11A*) *in vivo* eine potentielle Interaktion beider Proteine mit transientem Charakter an.

Die Kinase-Aktivität des Cyclin B/CDK1-Komplexes wird in der späten G₂-Phase des Zellzyklus aktiviert [260]. Sie induziert den Eintritt der Zellen in die Mitose [261]. Der abrupte Abbau von Cyclin B über das Ubiquitinsystem steuert in Zellen das Verlassen der Mitosephase [262]. Der Cyclin E/CDK2-Komplex ist innerhalb des Zellzyklus am G₁/S-Übergang aktiv [263]. LIN *et al.* konnten zeigen, dass die Akkumulierung von phosphoryliertem MCM3 *in vivo* im Verlauf der G₁-Phase des Zellzyklus beginnt, an der G₁-S-Grenze ihr Maximum erreicht und über die S-Phase bis zur M-Phase des Zellzyklus erhalten bleibt [202]. Insbesondere MCM3 mit Seitenkettenphosphorylierung an Ser¹¹² akkumuliert in der S- und M-Phase des Zellzyklus [202]. Die einzelnen Cyclin/CDK-Komplexe sind zu verschiedenen Zeitintervallen innerhalb des Zellzyklus aktiv. An Ser/Thr-Pro-Motiven phosphoryliertes MCM3 liegt damit offenbar über einen weiten Zeitraum innerhalb des Zellzyklus in Säugerzellen vor. Vermutlich verändert sich jedoch im Zeitverlauf das Phosphorylierungsmuster des Proteins. Dies kann die zellzyklusabhängige Pin1-Interaktion von MCM3 erklären, deren Minimum der G₁-Phase zugeordnet werden kann und die ihr Maximum während der G₂/M-Phase des Zellzyklus erreicht (*ABBILDUNG 14*). Typischerweise interagiert Pin1 in der Mitosephase des Zellzyklus mit einer Vielzahl an phosphorylierten Proteinen [100, 223]. Während dieser Zellzyklusphase wurde in HeLa-Zellen auch eine Kolo-kalisierung von Pin1 und MCM3 insbesondere in den Zentrosomen nachgewiesen (*ABBILDUNG 15*). Die subzelluläre Lokalisierung von Pin1 wird dabei durch die WW-Domäne der PPIase bestimmt [83, 84]. Lokalisierung von Pin1 in Zentrosomen ist in NIH 3T3-Zellen ausdrücklich für Zellen während der Interphase, jedoch nicht für Zellen während der Mitose gezeigt [125]. Möglicherweise ist die Lokalisierung von Pin1 in Zentrosomen im Verlauf des Zellzyklus abhängig von der untersuchten Zelllinie. Proteine in den Zentrosomen können auch während der Mitosephase phosphoryliert sein [127, 264-267]. Das mitotische Phosphoprotein Cep55 (*centrosome protein 55 kDa*) ist beispiels-

weise im Zentrosom lokalisiert [127] und wurde bereits als Pin1-Substrat beschrieben [126]. Für einige Replikationsproteine, einschließlich MCM3 sowie weiteren Untereinheiten des MCM2-7-Komplexes, wurde bereits eine partielle Zentrosomenassoziation nachgewiesen [219, 221, 222, 268, 269].

4.2 Pin1 interagiert mit MCM3-abgeleiteten Peptidderivaten

Zur Charakterisierung der Bindestellen von Pin1 in MCM3 wurde die Interaktion der PPIase mit an eine Zellulosemembran gebundenen tetradekameren Modellpeptiden untersucht, die sich aus der Primärstruktur von MCM3 ableiten. Allgemein sind membrangebundene Peptide zur Detektion von Bindemotiven mit Affinitäten im mikro- bis millimolaren Bereich geeignet [270]. Die Peptide repräsentieren die vier Ser/Thr-Pro-Motive mit den zugehörigen flankierenden Aminosäuresequenzen sowie deren entsprechende seitenkettenphosphorylierte Analoga. Experimentell wurden alle vier untersuchten Modellpeptide MCM3¹⁰⁶⁻¹¹⁹, MCM3⁴⁵⁸⁻⁴⁷¹, MCM3⁶⁰⁵⁻⁶¹⁸ und MCM3⁷¹⁶⁻⁷²⁹, die das entsprechende Ser/Thr-Pro-Motiv Ser¹¹²-Pro¹¹³, Thr⁴⁶⁴-Pro⁴⁶⁵, Ser⁶¹¹-Pro⁶¹² bzw. Thr⁷²²-Pro⁷²³ der MCM3-Primärstruktur tragen, als Pin1-Interaktionsstellen detektiert (ABBILDUNG 16). Dabei erforderte die Interaktion eine Phosphorylierung des Peptids an der Seitenkette des Serin- bzw. Threoninrestes innerhalb des jeweiligen Motivs. Die entsprechenden nichtphosphorylierten Peptide zeigten keine Bindung von Pin1. Untersuchungen zur Sequenzspezifität von Pin1 durch YAFFE *et al.* mithilfe einer Peptidbibliothek, die ein fixiertes pSer-Pro-Motiv und davon ausgehend zudem je drei amino- und carboxyterminale variable Aminosäurereste enthielt, ergab für die PPIase eine begünstigte Akzeptanz für Arg oder aromatische Aminosäurereste in den Positionen -1 und +1 ausgehend vom pSer-Pro-Motiv [100]. Als günstig erwiesen sich außerdem aromatische Aminosäurereste an der Position -3, Phe oder Ile an der Position -2 und Leu oder Ile an der Position +2 [100]. Nur MCM3¹⁰⁶⁻¹¹⁹ trägt mit Arg¹¹⁴ an Position +1, ausgehend vom Motiv Ser¹¹²-Pro¹¹³, einen derartigen, die Bindung von Pin1 unterstützenden Aminosäurerest an der entsprechenden Position. MCM3⁷¹⁶⁻⁷²⁹ trägt mit Lys⁷²⁴ an Position +1, ausgehend vom Motiv Thr⁷²²-Pro⁷²³ einen Aminosäurerest mit positiver Ladung. Neben den von Hefe bis zum Menschen vollständig konservierten Motiven Ser¹¹²-Pro¹¹³ und Thr⁷²²-Pro⁷²³ ist Arg¹¹⁴ ebenfalls konserviert (ABBILDUNG 17). Für Lys⁷²⁴ gilt dies zumindest auch in höheren Säugern (ABBILDUNG 17).

Bei der gewählten Untersuchungsmethode sind die an die Zellulosemembran gebundenen Modellpeptide für den Interaktionspartner nicht durch die Einbindung in eine dreidimensionale Struktur sterisch eingeschränkt. In nativen Proteinen gibt es oft sterische Hinderungen, die eine Interaktion zweier Proteine unterbinden. Bis heute existiert keine vollständige Struktur des Proteins MCM3, was eine exakte Aussage über die Zugänglichkeit der pSer/Thr-Pro-Motive in MCM3 erschwert. MCM3 wird *in vivo* an Ser¹¹² und Thr⁷²² phosphoryliert [201, 202]. Die Kinasen CDK1 und CDK2 sind in der Lage auch Ser⁶¹¹ *in vitro* zu phosphorylieren [202]. Somit kann man davon ausgehen, dass diese drei Stellen für eine Proteininteraktion sterisch zugänglich sind. Obwohl die Eigenschaften der membrangebundenen, seitenketten-

phosphorylierten Modellpeptide MCM3⁴⁵⁸⁻⁴⁷¹ und MCM3⁶⁰⁵⁻⁶¹⁸ eine Interaktion mit Pin1 zu lassen, sind diese Binderegionen mit den entsprechenden Motiven Thr⁴⁶⁴-Pro⁴⁶⁵ bzw. Ser⁶¹¹-Pro⁶¹² für eine Wechselwirkung im nativen Protein offenbar nicht relevant. Die Pin1-Interaktion mit MCM3 ist nicht gestört, wenn Thr⁴⁶⁴ oder Ser⁶¹¹ gegen einen nichtphosphorylierbaren Rest ausgetauscht werden (*ABBILDUNG 10*).

Untersuchungen zur Bindungsstärke von Pin1 mit Peptiden, die die Regionen um die Motive Ser¹¹²-Pro¹¹³ und Thr⁷²²-Pro⁷²³ repräsentieren, wurden mit den löslichen Peptidderivaten **P1**, **P2** und **P4** bis **P7** durchgeführt. Literaturdaten zu Affinitätsuntersuchungen von Pin1 sowie von dessen isolierter WW-Domäne mit Peptiden, die von der Primärstruktur bekannter Interaktionspartner abgeleitet waren, zeigten für die Mehrheit der Komplexe Dissoziationskonstanten im zweistelligen mikromolaren Bereich [93, 94, 271]. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Dissoziationskonstanten der Komplexe aus Pin1 bzw. Pin1 WW mit **P2** ($K_D = 30,8 \mu\text{M}$ bzw. $K_D = 19,9 \mu\text{M}$, *ABBILDUNG 20*), wobei **P2** den Bereich MCM3⁷¹⁶⁻⁷²⁹ repräsentiert, liegen damit in einem Bereich, der für Interaktionen mit vergleichbaren Peptiden beschrieben ist. Der Verlauf der Titrationskurve und eine ermittelte Stöchiometrie des Komplexes von $N \approx 1$ für die Titration von **P2** zu Pin1 deuten darauf hin, dass mithilfe der Methode der isothermen Titrationskalorimetrie die Interaktion von lediglich einer der beiden Pin1-Domänen mit **P2** detektiert wird. Es handelt sich dabei vermutlich um die WW-Domäne, da für die Titration von **P2** zur isolierten WW-Domäne eine Dissoziationskonstante in derselben Größenordnung ermittelt wurde wie bei der Titration von **P2** zu Pin1. Die Bindungen von **P2** zu Pin1 und zu dessen isolierter WW-Domäne sind enthalpisch getrieben und entropisch ungünstig und damit unter thermodynamischen Gesichtspunkten übereinstimmend. Eine in der Literatur beschriebene Untersuchung der Bindung von Pin1 mit einem peptidbasierten Liganden mit seitenkettenphosphoryliertem Thr-Pro-Motiv lieferte ähnliche thermodynamische Parameter [272].

Im Vergleich zu **P2** sind zwar Interaktionen von **P1** zu Pin1 und Pin1 WW mit isothermer Titrationskalorimetrie detektierbar, mit geschätzten Dissoziationskonstanten im millimolaren Bereich in ihrer Affinität aber deutlich niedriger (*ABBILDUNG 19*). Eine so geringe Affinität ist erstaunlich, da **P1** mit Arg an +1 ausgehend vom pSer-Pro-Motiv einen für die Affinität bereits als wichtig beschriebenen Aminosäurerest trägt [100], während das bei **P2** nicht der Fall ist. Außerdem wirkt sich die Verhinderung der Phosphorylierung des durch **P1** repräsentierten Motivs Ser¹¹²-Pro¹¹³ in MCM3 besonders deutlich auf die Bindung von Pin1 aus (*ABBILDUNG 10*). **P1** und **P2** haben dieselbe Anzahl von Aminosäureresten, unterscheiden sich aber in der Aminosäuresequenz. **P1** repräsentiert den Bereich MCM3¹⁰⁶⁻¹¹⁹ und trägt ein zentrales seitenkettenphosphoryliertes Ser-Pro-Motiv, während **P2** ein zentrales seitenkettenphosphoryliertes Thr-Pro-Motiv besitzt. Beide Peptide unterscheiden sich im Fern-UV-CD-Spektrum kaum, was auf sehr ähnliche Sekundärstrukturmerkmale schließen lässt (*ABBILDUNG 18*). Für die beiden Peptidderivate **P5** und **P7**, die verkürzten Varianten von **P1** bzw. **P2** entsprechen, wurden *cis*-Gehalte von $< 10 \%$ bestimmt (*TABELLE 14*). Da in **P1** und **P5** bzw. in **P2** und **P7** die flankierenden Aminosäurereste am pSer/Thr-Pro-Motiv jeweils gleich sind, ist davon auszugehen, dass auch **P1** und **P2** ähnliche *cis*-Gehalte aufweisen.

Mittels isothermer Titrationskalorimetrie konnte bei der Titration von **P1** bzw. **P2** zur isolierten PPIase-Domäne keine signifikante Wärmeänderung detektiert werden. Somit kann

von einer sehr geringen Affinität sowohl von **P1** als auch von **P2** zur PPIase-Domäne ausgegangen werden. Die PPIase-Domäne von Pin1 zeigt zu vergleichbaren Peptiden, die Abschnitte der Primärstruktur bekannter Interaktionspartner repräsentieren, ebenfalls keine messbaren oder deutlich geringere Affinitäten als die WW-Domäne [93, 271, 273].

Aus Literaturwerten lässt sich eine Erhöhung der katalytischen Effizienzen von Pin1-Substraten mit phosphorylierten Ser/Thr-Pro-Motiven gegenüber deren nichtphosphorylierter Analoga bis zu einem Faktor von 2800 ableiten [100]. Die Betrachtung der Werte für die spezifischen katalytischen Aktivitäten von Pin1 gegenüber den Peptiden **P4** bis **P7** präsentiert auch die für das Enzym typische Umsatzsteigerung bei Peptiden mit phosphorylierter Seitenkette im Ser/Thr-Pro-Motiv (**P5** und **P7**) im Vergleich zu den jeweiligen nichtphosphorylierten Analoga (**P4** bzw. **P6**) (TABELLE 14). Die Phosphorylierung der entsprechenden Seitenkette bewirkt eine Steigerung der Umsatzrate um den Faktor 140 (vgl. **P4** und **P5**) bzw. sogar um den Faktor 4200 (vgl. **P6** und **P7**). Die katalytische Effizienz von Pin1 gegenüber **P3**, einem Referenzpeptidsubstrat für Pin1, das als Mimikry eines phosphorylierten Restes einen Glutamatrest N-terminal zum Prolinrest besitzt, ist höher als die katalytische Effizienz gegenüber **P4** und **P6**. Sie reicht jedoch in der Größenordnung nicht an die Werte für die phosphorylierten Analoga **P5** bzw. **P7** heran. Für Pin1 wurde mit $k_{\text{cat}}/K_M = 2,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ gegenüber dem zu **P3** ähnlichen Peptidsubstrat Ala-Ala-Glu-Pro-Phe-*p*NA ein sehr ähnlicher Wert bestimmt [100]. Im Vergleich dazu liegen die Werte für die beiden Peptide **P7** und **P5** eine bzw. zwei Größenordnungen über dem Wert für das Referenzpeptid **P3**. **P5** und **P7** stellen damit sehr gute Substrate für Pin1 dar. Der k_{cat}/K_M von $1,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für Pin1 gegenüber **P5** liegt nur wenig unter dem Wert von $2,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ gegenüber dem optimalen Peptidsubstrat Trp-Phe-Tyr-Ser(PO₃H₂)-Pro-Arg-*p*NA, das Substrat, demgegenüber Pin1 den größten k_{cat}/K_M -Wert der bislang untersuchten Substrate besitzt [100].

In linearen Peptiden verändert die Einführung eines negativ geladenen Restes durch Phosphorylierung der Seitenkette des Serin- bzw. Threoninrestes in Ser/Thr-Pro-Motiven den *cis*-Anteil der Prolylbindung und reduziert deren intrinsische Isomerisierungsgeschwindigkeit [168, 274]. Die beiden von MCM3 abgeleiteten Peptidderivate mit phosphorylierten Ser/Thr-Pro-Motiven (**P5** und **P7**) zeigen im Vergleich zu den jeweiligen nichtphosphorylierten Analoga (**P4** bzw. **P6**) geringe Verschiebungen der *cis/trans*-Gleichgewichte zugunsten der *cis*-Anteile (TABELLE 14). Eine Erhöhung des *cis*-Anteils nach Phosphorylierung der Serinseitenkette von Ser-Pro-Motiven ist vom Protonierungsgrad des Phosphatrestes unabhängig und wurde sowohl für lineare Peptide [274] als auch für kurze zyklische Peptide beschrieben [275]. Für ein lineares Peptid mit pThr-Pro-Motiv wurde eine Abhängigkeit des *cis*-Gehaltes vom Protonierungsgrad der Seitenkette beobachtet [274].

Die Phosphorylierung der Serin- bzw. Threoninseitenkette behindert die *cis/trans*-Isomerisierung der Ser/Thr-Pro-Bindungen [274]. Die Geschwindigkeitskonstante der unkatalysierten Isomerisierung vermindert sich bei **P5** gegenüber **P4** etwa um den Faktor 3, bei **P7** gegenüber **P6** interessanterweise sogar um den Faktor 14. Diese äußerst niedrige intrinsische Isomerisierungsgeschwindigkeit von **P7** liegt damit in einem Bereich, der für die *cis/trans*-Isomerisierung von Thioxopeptidyl-Prolylbindungen beschrieben ist [276]. Eine elektrostatische Wechselwirkung der durch die Phosphorylierung negativ geladenen Threoninseitenkette mit der bei diesem pH-Wert positiv geladenen Seitenkette des benachbarten Histidinrestes in

P7 ist denkbar. Sie kann jedoch die äußerst langsame Isomerisierungsgeschwindigkeit von **P7** nicht hinreichend erklären, da **P9**, bei dem der Histidinrest gegen einen Alaninrest ausgetauscht ist, eine Geschwindigkeitskonstante für die unkatalysierte *cis*→*trans*-Isomerisierung in derselben Größenordnung aufweist. Beim Vergleich verschiedener Peptide mit pSer/Thr-Pro-Motiven zeigt das in der Sequenz zu **P9** ähnliche Peptid Ac-Ala-Thr(PO₃H₂)-Pro-Lys-pNA mit einer Geschwindigkeitskonstante von $k_{0(cis)} = 1,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ den niedrigsten Wert dieser Reihe [274].

Es ist bereits bekannt, dass die Seitenkette des N-terminal zum Prolinrest gelegenen Aminosäurerestes sowohl das *cis/trans*-Gleichgewicht als auch die Geschwindigkeit der *cis/trans*-Isomerisierung der Peptidyl-Prolylbindung beeinflusst [277]. Dabei induzierten besonders Reste aromatischer Aminosäuren in dieser Position einen hohen Anteil an *cis*-Konformer der Prolylbindung, während ein Histidinrest in entsprechender Position zu einer hohen Isomerisierungsgeschwindigkeit beitragen kann [277]. Hier konnte jedoch zusätzlich gezeigt werden, dass die Aminosäureseitenkette an direkter Position vor dem pThr-Pro-Motiv großen Einfluss auf die Isomerisierungsgeschwindigkeit der in dieser Arbeit untersuchten Peptide **P7** bis **P11** hat (TABELLE 14). Das Einführen eines Alaninrestes an dieser Position (**P9**) verursachte eine Steigerung des *cis*-Gehaltes auf 18 %. Offenbar beeinflusst auch der Aminosäurerest N-terminal zur Phosphorylierungsstelle das *cis/trans*-Gleichgewicht. Bezogen auf die Primärstruktur von MCM3 ist der an der entsprechenden Position befindliche Histidinrest, der His⁷²¹ in humanem MCM3 entspricht, bei verschiedenen Säugern konserviert (vgl. ABBILDUNG 17). Die negative Ladung, die eine Phosphorylierung mit sich bringt, ändert den elektrostatischen Zustand im Phosphoprotein und kann zu strukturellen und energetischen Veränderungen führen [274].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden thermodynamische Parameter für die *cis/trans*-Isomerisierungen der Peptidyl-Prolylbindungen von **P3** bis **P7** anhand von EYRING-Plots bestimmt (ABBILDUNG 22, TABELLE 15). Die ermittelten Werte für ΔG^\ddagger des Peptids mit Phosphorylierungsmimikry (**P3**) und des Peptids mit phosphorylierter Serinseitenkette (**P5**) zeigen gute Übereinstimmung mit dem Wert, der für das Peptidderivat Ala-Ala-Ser(PO₃H₂)-Pro-Phe-pNA bereits beschrieben wurde [274]. Die Ser-Pro-Bindung in **P4** und die Thr-Pro-Bindung in **P6** zeigen sehr ähnliche energetische Rotationsbarrieren. Die Phosphorylierung der Serin- und Threoninseitenkette in den Peptidderivaten **P5** bzw. **P7** geht mit einer deutlichen Vergrößerung der energetischen Rotationsbarriere für die Ser/Thr-Pro-Bindung durch Mitwirkung eines Enthalpiebeitrags einher, der im Falle der Phosphorylierung der Thr-Pro-Bindung (**P7**) deutlich größer ist. Sehr ähnliche Beobachtungen wurden auch für Peptide der Form Ala-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA (Xaa = Ser/Thr, pSer/Thr) gemacht [274]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass prolingerichtete Phosphorylierungen in flexiblen Bereichen von Proteinen, abhängig vom Aminosäurerest N-terminal zur Phosphorylierungsstelle, verschiedene Auswirkungen auf das Protein, entweder hinsichtlich seiner Struktur oder aber seiner Flexibilität haben kann.

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Isomerisierungsgeschwindigkeiten seitenkettenphosphorylierter Ser/Thr-Pro-Bindungen wurde bereits für verschiedene Peptidderivate gezeigt [274]. Der Protonierungsgrad des Phosphatrestes spielt dabei eine maßgebliche Rolle. Insbesondere erhöhte sich die Geschwindigkeitskonstante für die *cis*→*trans*-Isomerisierung nach Erhöhung des Anteils an protonierter Spezies des Seitenkettenphosphatrestes [274]. Für

das Peptidderivat Ala-Ala-Thr(PO₃H₂)-Pro-Phe-*p*NA wurde durch isomerspezifische Proteolyse eine Erhöhung der Geschwindigkeitskonstante für die *cis*→*trans*-Isomerisierung der pThr-Pro-Bindung um den Faktor drei von pH 10,0 zu pH 5,5 bestimmt [274]. Die Geschwindigkeitskonstante der *cis*→*trans*-Isomerisierung der pThr-Pro-Bindung von **P7** steigerte sich im Bereich von pH 9,5 zu pH 4,5 nahezu um Faktor vier (ABBILDUNG 23). Die *cis*→*trans*-Isomerisierungsgeschwindigkeit der seitenkettenphosphorylierten Thr-Pro-Bindung von **P7** reagiert damit, genau wie andere pSer/Thr-Pro-Bindungen, sehr sensitiv auf Änderungen des pH-Wertes im physiologischen Bereich [274]. Ein pK_S-Wert von 6,06 ± 0,08 für die phosphorylierte Threoninseitenkette von **P7** ist sehr ähnlich zu dem über isomerspezifische Proteolyse ermittelten pK_S-Wert von 6,1 ± 0,1 für die entsprechende Seitenkette des ähnlichen Peptidderivates Ala-Ala-Thr(PO₃H₂)-Pro-Phe-*p*NA [274]. Da sich im untersuchten pH-Bereich auch der Ionisierungsgrad von His änderte, wurde im Vergleich die pH-Abhängigkeit des nichtphosphorylierten Peptids **P6** untersucht. Bei Abwesenheit der Seitenkettenphosphorylierung (**P6**) ist die Sensitivität gegenüber pH-Wert-Änderungen im untersuchten Bereich aufgehoben (ABBILDUNG 23). Somit hat der Ionisierungsgrad der Histidinseitenkette keinen Einfluss auf die *cis*→*trans*-Isomerisierungsgeschwindigkeit. Isomerisierungen einiger anderer nichtphosphorylierter Peptidyl-Prolylbindungen zeigen ebenfalls eine Unabhängigkeit vom pH-Wert in ähnlichen pH-Wert-Bereichen [274, 278, 279].

Mit der Erhöhung des pH-Wertes im Bereich von pH 3,6 bis pH 8,3 ändert sich im Peptidderivat **P6** lediglich der Protonierungsgrad der Histidinseitenkette. Somit repräsentieren die Messpunkte für **P6** in ABBILDUNG 24B eine pH-Titration der Histidinseitenkette des Peptidderivates. Der ermittelte Übergangspunkt von pH 6,6 kann damit als pK_S-Wert für die Seitenkette des Histidinrestes angenommen werden und liegt über dem in der Literatur beschriebenen pK_S-Wert von 6,08 ± 0,01 der Seitenkette des Histidins [280]. Für das *cis*-Isomer und für das *trans*-Isomer des Peptids Suc-Ala-His-Pro-Phe-*p*NA wurden pK_S-Werte von 6,4 bzw. 6,9 für den Imidazolring des Histidins beobachtet [279]. Die Sekundärstruktur von **P6** ändert sich offensichtlich in Abhängigkeit der Protonierung des Imidazolringes der Histidinseitenkette. In **P7** fällt diese Strukturänderung deutlich geringer aus (ABBILDUNG 24B). Im untersuchten pH-Wert-Bereich ändert sich in **P7** von hohen zu niedrigen pH-Werten der Protonierungsgrad des Histidinrestes und zusätzlich auch der Protonierungsgrad des Seitenkettenphosphatrestes des direkt benachbarten Threoninrestes. Offenbar kann ein deprotonierter, negativ geladener Phosphatrest an der Threoninseitenkette von **P7** die bei der Protonierung des Histidinrestes entstehende positive Ladung über elektrostatische Wechselwirkungen kompensieren. Die pH-abhängige Änderung des Protonierungsgrades der Histidinseitenkette führt dadurch zu einer weniger stark ausgeprägten Veränderung der Sekundärstruktur von **P7** im Vergleich zu **P6**. Der Protonierungsgrad der Histidinseitenkette hat jedoch keinen erkennbaren Einfluss auf die *cis*→*trans*-Isomerisierungsgeschwindigkeit der Peptidderivate, da diese in **P6** in Abhängigkeit des pH-Wertes nicht beeinflusst wird (vgl. ABBILDUNG 23).

Die Untersuchungen zeigen nicht nur die Auswirkungen der Seitenkettenphosphorylierung von Ser/Thr-Pro-Motiven auf die *cis/trans*-Isomerisierungen der Prolylbindungen in diesen Motiven im Allgemeinen, sondern weisen konkret auf eine deutliche Verminderung der Isomerisierungskonstanten nach Seitenkettenphosphorylierung der beiden Motive Ser¹¹²-Pro¹¹³ und Thr⁷²²-Pro⁷²³ in MCM3 hin. Dabei gilt dem phosphorylierten Motiv Thr⁷²²-Pro⁷²³

besonderes Augenmerk, welches eine außerordentlich niedrige Isomerisierungskonstante mit starker pH-Abhängigkeit besitzt. Pin1, und dabei insbesondere die WW-Domäne des Enzyms, vermittelt die Bindung zu diesem Motiv. Durch die Seitenkettenphosphorylierungen der Aminosäurereste Ser¹¹² und Thr⁷²² können in MCM3 Motive für die PPIase Pin1 generiert werden, dessen katalytische Aktivität speziell bei Substraten mit niedriger unkatalysierter Isomerisierungsgeschwindigkeit besondere Bedeutung erlangt. Gegenüber beiden seitenkettenphosphorylierten Motiven zeigt Pin1 hohe katalytische Effizienzen. Die katalytisch aktive PPIase-Domäne des Enzyms ist dafür verantwortlich. Damit werden Funktionen dieser Motive als molekulare Schalter in MCM3 denkbar.

4.3 Pin1 beeinflusst MCM3 *in vivo*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die physiologische Bedeutung der Interaktion zwischen Pin1 und MCM3 in HeLa-Zellen untersucht. Dabei traten wichtige Funktionen von Pin1 in der Assemblierung des MCM2-7-Komplexes und dessen Assoziation mit dem Chromatin zu Tage, die höchstwahrscheinlich über eine direkte Interaktion zwischen Pin1 und MCM3 vermittelt werden.

Die Experimente zum *turnover* von MCM3 zeigen die hohe Stabilität des Proteins und stimmen gut mit einer vorherigen Untersuchung überein, bei der nach fünfstündiger Inkubation von HeLa-Zellen mit Cycloheximid noch keine Verminderung in der MCM3-Menge detektiert werden konnte, jedoch die Menge an MCM3 nach sechzehnständiger Inkubation noch 20-30 % der Kontrolle betrug [281]. Pin1 beeinflusst offenbar den *turnover* des Proteins nicht (ABBILDUNG 26), obwohl die PPIase auf die Degradierung von Proteinen Einfluss nehmen kann [116].

Da MCM3 die Rekrutierung des Cdt1-MCM2-7-Komplexes an den ORC-Cdc6-Komplex vermittelt, ist die Erhaltung der Stabilität des hexameren MCM2-7-Komplexes für die Formierung des Präreplikationskomplexes von Bedeutung [282]. Untersuchungen von COSTER *et al.* zur Stabilität des MCM2-7-Komplexes aus Hefe zeigen, dass Mutationen in den Motiven Walker A aller MCM-Proteine, mit Ausnahme von MCM5, die Stabilität des MCM-Komplexes beeinflussen [282]. Varianten von MCM3 und MCM7 zeigen dabei den stärksten Effekt [282]. Die Affinität von MCM3 zu den im MCM2-7-Komplex direkt benachbarten Proteinen MCM5 und MCM7 wird auch durch einen Mangel an Pin1 beeinträchtigt (ABBILDUNG 28). Die Auswirkungen eines Pin1-Mangels scheinen sich bei der Interaktion zu MCM7 stärker zu manifestieren. Offenbar unterstützt Pin1 damit die Stabilität des MCM2-7-Komplexes. Neuere Untersuchungen offenbaren, unabhängig von der Stabilisierung des MCM-Hexamers, eine wichtige Rolle der ATP-Bindung im *replication licensing*, dem Prozess der die einmalige Replikation der Chromosomen pro Zellzyklus sicherstellt [282]. Cdt1 induziert in MCM2-7 eine strukturelle Änderung und unterstützt die Interaktion zwischen ORC-Cdc6 und MCM2-7 [283]. Die Assoziation des initialen ORC-Cdc6-Cdt1-MCM2-7-Komplexes erfolgt sehr schnell [283]. Neben der Nukleotidbindung der MCM-Untereinheiten

beeinflussen auch andere Faktoren wie Proteinkonzentration, Temperatur und Ionenstärke die Stabilität des MCM-Komplexes [282].

Nach KUIPERS *et al.* koexistieren zwei Populationen von MCM-Molekülen in der eukaryotischen Zelle: eine ungebundene Population mit frei diffundierenden Molekülen sowie eine immobile gebundene Population [197]. Zwischen beiden Populationen wurde kein Austausch beobachtet [197]. Die Beladung des Chromatins mit dem MCM2-7-Komplex beginnt in der frühen G₁-Phase des Zellzyklus und die gebundene Population steigt in dieser Zellzyklusphase bis zum Beginn der S-Phase graduell an [197]. Die MCM-Komplexproteine gehen mit fortschreitender S-Phase wieder in die freie Population über, sodass diese in der G₂-Phase und während der M-Phase des Zellzyklus in ungebundener Form in der eukaryotischen Zelle vorliegen [197]. Der Übergang von der gebundenen zur ungebundenen Population erfordert dabei zwingend Replikation [197].

Die Chromatinbeladung von MCM3 wird in Zellen durch Phosphorylierung des Serin- bzw. Threoninrestes der Motive Ser¹¹²-Pro¹¹³ und Thr⁷²²-Pro⁷²³ in MCM3 reguliert. Ein Aminosäureaustausch des entsprechenden Serin- bzw. Threoninrestes gegen einen Alaninrest führt zu einer reduzierten Menge an chromatinassoziiertem MCM3 [201, 202]. Eine deutlich verringerte Chromatinassoziation von FLAG-MCM3 T722A im Vergleich zum Wildtyp-Protein (ABBILDUNG 30) ist mit dem Ergebnis von LI *et al.* konform [201]. In Abweichung zu bekannten Ergebnissen [201, 202] zeigen die übrigen chromatingebundenen FLAG-MCM3-Varianten im Vergleich zur Kontrolle keine Unterschiede in der Chromatinassoziation (ABBILDUNG 30). Das Motiv Thr⁷²²-Pro⁷²³ hat damit im Vergleich zu den übrigen Ser/Thr-Pro-Motiven in MCM3 vermutlich die größte Bedeutung für die Chromatinassoziation. HeLa-Zellen, die sich in definierten Zellzyklusphasen befinden, zeigen in Abhängigkeit des Pin1-Gehaltes und der entsprechenden Zellzyklusphase Unterschiede in der chromatinassoziierten MCM3-Menge. Zellen mit niedrigem Pin1-Gehalt weisen dabei zu Beginn der S-Phase eine deutlich niedrigere chromatinassoziierte MCM3-Menge im Vergleich zu entsprechenden Kontrollzellen auf (ABBILDUNG 31). Dieses Ergebnis kann mit einer verminderten Beladung des Chromatins mit MCM3 im Verlauf der G₁-Phase des Zellzyklus erklärt werden. Das Protein Cdc6 beeinflusst ebenfalls die Beladung des Chromatins mit MCM-Proteinen und Verringerung von Cdc6 in Zellen geht mit deren Arretierung in der G₁-Phase des Zellzyklus einher [284]. Zellzyklusarretierung in der G₁-Phase wurde bereits für kultivierte Zellen mit Pin1-Defizienz beschrieben [285]. Eine erhöhte Anzahl an BrdU-behandelten HeLa-Zellen mit reduzierter Pin1-Menge in der G₁-Phase zeigt eine zeitliche Ausdehnung dieser Zellzyklusphase oder Arretierung der Zellen in dieser Phase und kann den Grund für die verminderte Anzahl dieser Zellen in der S-Phase bilden (ABBILDUNG 35C). Zellen mit niedrigem Pin1-Gehalt tragen in der M-Phase des Zellzyklus eine erhöhte chromatinassoziierte MCM3-Menge im Vergleich zu entsprechenden Kontrollzellen (ABBILDUNG 31). Die Ursache lässt sich in einer verminderten Entladung von MCM3 vom Chromatin nach dem Durchlaufen der S-Phase des Zellzyklus vermuten. Ein Mangel an Pin1 in HeLa-Zellen, die nach einer Blockierung des Zellzyklus am Beginn der S-Phase die nachfolgende G₂/M-Phase durchlaufen, führt, im Vergleich zu entsprechenden Kontrollzellen, zur verminderten Freisetzung von chromatinassoziiertem MCM3 in die ungebundene MCM3-Population (ABBILDUNG 32).

Obwohl Pin1 den Phosphorylierungszustand von Zielproteinen beeinflussen kann [113, 114, 254], reguliert das Enzym die Assemblierung des MCM2-7-Komplexes und die Chromatinassoziation von MCM3 jedoch offenbar nicht über eine Veränderung des Phosphorylierungszustandes von Thr-Pro-Motiven, insbesondere dem Motiv Thr⁷²²-Pro⁷²³ in MCM3 (ABBILDUNG 33, ABBILDUNG 34).

Die hier dargestellten Ergebnisse lassen in ihrer Gesamtheit eine Rolle von Pin1 als Regulator in der Chromatinassoziation von MCM3 erkennen, die anhand eines stark vereinfachten Modells verdeutlicht werden soll (ABBILDUNG 42). In diesem Modell unterstützt Pin1 nicht nur die Beladung des Chromatins mit MCM3 in der G₁-Phase des Zellzyklus, sondern auch die Rückführung des chromatinassoziierten MCM3's in die freie Population in der späten S-Phase des Zellzyklus sowie die spätere Ausbildung eines neuen MCM2-7-Komplexes für die Replikation im nachfolgenden Zellzyklusdurchgang.

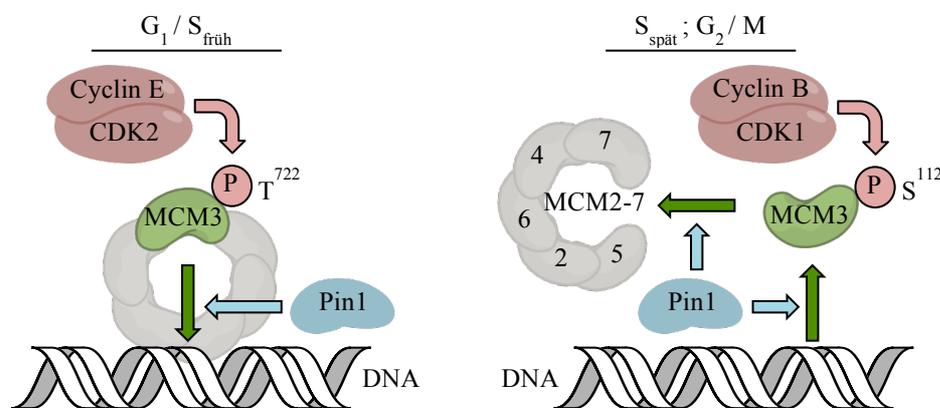


ABBILDUNG 42: HYPOTHETISCHES MODELL ZUR WIRKUNG VON PIN1 AUF MCM3 IM ZELLYKLUS. Die Aktivitäten der Kinasekomplexe Cyclin E/CDK2 und Cyclin B/CDK1 führen zur Phosphorylierung von MCM3 an Thr⁷²² bzw. Ser¹¹² zu verschiedenen Zeitpunkten im Zellzyklus. Pin1 unterstützt daraufhin, durch Katalyse der *cis/trans*-Isomerisierung von Prolylbindungen phosphorylierter Ser/Thr-Pro-Motive, zellzyklusabhängig die Assemblierung (G₁/S_{früh}) oder Disassemblierung (S_{spät}) der DNA mit MCM3 bzw. die Ausbildung des MCM2-7-Komplexes (G₂/M).

Pin1 ist in der Lage durch Katalyse von *cis/trans*-Isomerisierungen der Prolylbindungen phosphorylierter Ser/Thr-Pro-Motive in Zielproteinen konformationelle Änderungen zu induzieren und kann so als „molekularer Zeitschalter“ die zeitliche Abfolge und Dauer zellulärer Prozesse regeln [111, 116, 286]. Der gesamte Beladungsprozess der DNA mit einem MCM2-7-Doppelhexamer ist bislang nicht vollständig aufgeklärt. Neuere Untersuchungen mit Proteinen aus *Saccharomyces cerevisiae* belegen die Existenz eines Beladungsintermediates aus insgesamt vierzehn Proteinen, dem sogenannten ORC-Cdc6-Cdt1-MCM2-7-Komplex [191]. Die Ausbildung eines stabilen ORC-Cdc6-MCM2-7-Komplexes, die Basis für die Assemblierung eines MCM2-7-Doppelhexamers, verläuft über einen mehrstufigen Prozess und geht mit strukturellen Änderungen im MCM2-7-Komplex einher [283]. Im Gegensatz zur Assoziation des initialen ORC-Cdc6-Cdt1-MCM2-7-Komplexes ist die DNA-Beladung mit dem MCM2-7-Doppelhexamer ein langsamer Prozess [283]. Beladungsexperimente mit MCM-Proteinen aus Hefe legen eine Dauer zwischen fünf und fünfzehn Minuten für die Beladung zugrunde [282]. Die Beseitigung des replikativen Helikasekomplexes (Cdc45-MCM-GINS-Komplex, CMG-Komplex) vom Chromatin ist hingegen weit weniger erforscht. Aktuelle Arbeiten zur

Termination der Replikation zeigen in *Saccharomyces cerevisiae* und *Xenopus laevis* einen Ubiquitinierungsmechanismus von MCM7, der zur Entladung des CMG-Komplexes vom Chromatin an Replikationsterminationsstellen führt [287, 288]. Es ist anzunehmen, dass Pin1 die Prozesse der Be- und Entladung des Chromatins mit MCM3 sowie die Ausbildung des MCM2-7-Komplexes über die Katalyse von *cis/trans*-Isomerisierungen der Prolylbindungen in den phosphorylierten Motiven Ser¹¹²-Pro¹¹³ und Thr⁷²²-Pro⁷²³ in MCM3 steuert und beschleunigt. Diese Motive könnten damit die Funktionen „molekularer Schalter“ erlangen, die durch katalytische Aktivität von Pin1 reguliert werden. Die Untersuchungen mit abgeleiteten Peptidderivaten dieser Motive (KAPITEL 3.2) unterstützen diese Hypothese. Insbesondere die *cis/trans*-Isomerisierung der Prolylbindung vom Motiv pThr⁷²²-Pro⁷²³ weist im abgeleiteten Peptidderivat **P7** eine auffallend niedrige Geschwindigkeitskonstante auf und kann durch Pin1 stark beschleunigt werden (ABBILDUNG 21B, C). Dieses Motiv von MCM3 erscheint damit als „molekularer Zeitschalter“ besonders geeignet. Für Pin1 wurde die Fähigkeit zur Modulation der DNA-Bindfähigkeit des Transkriptionsfaktors Sp1 im Verlauf des Zellzyklus bereits beschrieben [289].

4.4 Arylhetarylketone, Biarylhetarylketone und Thioketone als Pin1-Inhibitoren

Basierend auf dem Konzept, dass Arylhetarylketone und Thioketone eine nichtplanare Geometrie der aromatischen Reste an der Ketogruppe bzw. Thioketogruppe aufweisen und somit die Peptidyl-Prolylbindung im potentiellen Übergangszustand des „verdrillten Amids“ (**2**) simulieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit neue Vertreter dieser Substanzklassen auf die Fähigkeit hin untersucht, die PPIase-Aktivität von Pin1 zu inhibieren. Dabei wurden einige Vertreter der Arylhetarylketone bzw. Thioketone untersucht, die sich jeweils lediglich in einer Ringsubstituierung unterscheiden. In der Reihe der Arylindanylketone hat sich ein ringsubstituiertes Biaryl-Grundgerüst für die Inhibition von Pin1 als günstig erwiesen. Hochsubstituierte Ringsysteme können im Allgemeinen zu starken nichtpeptidischen Pin1-Inhibitoren führen [290]. Ähnliche K_I -Werte der Verbindungen **5a**, **5d** und **5e** gegenüber Pin1 lassen schlussfolgern, dass das Heteroatom im Heterozyklus dieser Verbindungen wenig Einfluss auf die inhibitorische Wirkung hat. In der Reihe der 1-Benzofuranderivate (**5a – 5c**) scheint ein lipophiler Rest R² gegenüber eines polaren Restes die inhibitorische Aktivität zu steigern. Wie die Derivate **5e**, mit einem Methylrest in Position R¹ und **5f**, mit einem Butylrest in Position R¹ zeigen, hat die Größe des Alkylrestes R¹ offenbar keinen Einfluss auf die Aktivität der Substanzen. Innerhalb der Biarylfunktion ist zur Steigerung des Inhibitorpotentials von Biarylhetarylketonen ein Fluorophenolrest (**5b**) deutlich besser geeignet als drei phenolische OH-Gruppen als Substituenten (**5g**) oder ein CF₃O-Substituent (**5h**). Da nur eines (**6d**) der fünf getesteten Monoarylhetarylketone (**6a – 6e**) keine Inhibitorwirkung zeigte, scheint der Monoarylrest für die inhibierende Wirkung dieser Reihe von Substanzen hinreichend zu sein. Das Monoarylhetarylketon **6e** besitzt einen K_I -Wert von 1 μ M gegenüber Pin1

und offenbart, dass ein Biarylrest an der Ketogruppe nicht von essentieller Bedeutung für die Pin1-Inhibition ist. Die meisten publizierten Monoaryldanylketone inhibierten Pin1 in derselben Größenordnung wie die hier beschriebenen Monoarylhetarylketone (**6a** – **6c**, **6e**), doch weisen innerhalb der publizierten Aryldanylketone die Verbindungen mit einem Biarylrest gegenüber Verbindungen mit einem Monoarylrest teilweise sehr stark verbesserte Pin1-Inhibition auf [180]. Basierend auf den Biarylhetarylketonen wurden durch Austausch der Ketogruppe gegen eine Thioketogruppe die Thioketone **7**, **8a** und **8b** erzeugt, die bemerkenswerte Pin1-Inhibitoren darstellen. Dabei zeigt **8b** mit einem K_I -Wert im nanomolaren Bereich von den hier näher betrachteten Verbindungen (**5** – **8**) die höchste Inhibitoraktivität gegenüber Pin1. Auch hier erweist sich ein Fluorophenolrest in der Biarylfunktion als günstig für die Inhibitoraktivität. Der niedrigste K_I -Wert eines Aryldanylketons gegenüber Pin1 liegt mit 0,2 μ M damit in derselben Größenordnung wie der K_I -Wert von **8b** [180].

Insgesamt inhibierte die Mehrheit aller hier gemessenen Substanzen die PPIase-Aktivität von Pin1. Darunter sind einige Vertreter, die Inhibitionskonstanten bzw. IC_{50} -Werte gegenüber Pin1 im ein- bis zweistelligen mikromolaren Bereich aufweisen. Die meisten publizierten Aryldanylketone weisen gegenüber Pin1 ebenfalls K_I -Werte im mikromolaren Bereich auf [180]. CypA und Pin1 besitzen keine gemeinsame Faltungseinheit, dennoch sind die räumlichen Anordnungen einiger Reste in ihren aktiven Zentren ähnlich [23]. Bei deren Vergleich durch Überlagerung sind vier Reste mit räumlicher Identität sowie zwei Reste mit spiegelsymmetrischer Anordnung erkennbar [23]. So ist es nicht ungewöhnlich, dass die getesteten Thioketone auch inhibitorische Wirksamkeit gegenüber CypA aufweisen. Für einige Aryldanylketone sind inhibitorische Effekte in Verbindung mit bemerkenswerter Selektivität gegenüber Isoenzymen der Cyclophilinfamilie beschrieben [16].

In ihrer Gesamtheit können die Befunde Hinweise sein, dass die hier untersuchten Substanzen auch dem oben genannten Konzept genügen. Diese Aussage wird durch die Kristallstruktur des repräsentativen Biarylhetarylketons **5b** unterstützt, bei dem die Ebenen der Reste an der CO-Gruppe einen Torsionswinkel von ca. 53° aufweisen [255]. Dieser ermittelte Wert weicht stark von dem Torsionswinkel von 92° eines vergleichbaren Aryldanylketons [180] und dem orthogonalen Übergangszustand einer Peptidyl-Prolylbindung (**2**) ab. Trotzdem wird deutlich, dass die Reste an der CO-Gruppe nicht planar in einer Ebene liegen, sondern dass deren Ebenen eine zueinander verdrillte Anordnung aufweisen.

Im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit wurden die Reversibilität der Inhibierung und die Zellpermeabilität der einzelnen Substanzen nicht untersucht. Für die Weiterentwicklung und Verwendung derartiger Substanzen als Pin1-Inhibitoren sind diese weitergehenden Charakterisierungen jedoch unabdingbar. Untersuchungen mit einem biotinylierten Aryldanylketon demonstrieren eine nichtkovalente Interaktion dieser Substanz mit Pin1 und die Reversibilität des Inhibitors und beweisen, dass die Inaktivierung der PPIase nicht auf irreversibler Denaturierung und Aggregation des Enzyms beruht [180, 291]. Hier muss nochmals auf die biologische Wirksamkeit einiger Aryl-1-indanylketone hingewiesen werden [180]. Einige Verbindungen inhibierten konzentrationsabhängig und entsprechend ihres inhibitorischen Potentials die Aktivität eines p53-Reportergens in Etoposid-behandelten Brustkrebszellen der Zelllinie MCF-7 [180]. Die Aktivität dieses p53-Reportergens setzt in den Zellen eine physikalische Interaktion von endogenem Pin1 mit p53 voraus und beruht auf der daraus resultierenden Sta-

bilität und Aktivität des Transkriptionsfaktors als Folge DNA-schädigender Einflüsse [131-133]. Pin1 reguliert in Tumorzellen den *turnover* von β -Catenin [118]. So führte die Inkubation von SH-SY5Y-Tumorzellen mit verschiedenen Aryl-1-indanylketonen zur Verringerung der Menge an intrazellulärem β -Catenin [180], welche direkt mit der PPIase-Aktivität von Pin1 korreliert [118]. Aryl-1-indanylketone besitzen hohe strukturelle Ähnlichkeiten zu den in dieser Arbeit beschriebenen Verbindungen. Für die aktiven Arylhetarylketone bzw. Thioketone ist deshalb eine biologische Wirksamkeit anzunehmen, die jedoch noch experimentell bewiesen werden muss. Die hier untersuchten Arylhetarylketone und Thioketone stellen Substanzen mit relativ einfachen chemischen Strukturen dar, deren Synthese gut etabliert ist [255]. Dafür weisen einige Vertreter dieser Substanzklassen ein deutliches inhibitorisches Potential nicht nur gegenüber Pin1, sondern auch gegenüber CypA auf. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte können diese Substanzen als Basis für weitergehende biochemische Charakterisierungen bezüglich Zellgängigkeit und PPIase-inhibierender Eigenschaften *in vivo* dienen.

4.5 Analyse von Cyclophilinen aus humanem Serum

CsA-Derivate bieten eine Möglichkeit der Anreicherung von Cyclophilinen durch Affinitätschromatographie [292]. In dieser Arbeit wurde humanes Serum gesunder Probanden auf Cyclophiline untersucht und dafür die Affinität dieser PPIasen zu neuen CsA-Derivaten genutzt. Humanes Serum sollte dabei initial als Mimetikum eines biologischen Systems dienen und dessen physiologischen Charakter simulieren. Die Immobilisierung der CsA-Derivate **9** und **10** an Streptavidin-Matrizes erfolgte über einen Biotinrest an einem hydrophilen Bereich. Der *linker* ist in **9** mit Aminosäurerest 8 und in **10** mit Aminosäurerest 1 des CsA-Grundgerüsts verknüpft (ABBILDUNG 54). Im Gegensatz zu einem bereits publizierten CsA-Derivat, welches für Affinitätschromatographie Verwendung fand [292], ist davon auszugehen, dass der für die Cyp-Bindung verantwortliche Bereich in **9** aufgrund dessen chemischer Struktur nach Bindung an die Streptavidin-Matrix sterisch unbeeinflusst bleibt. Die Anwesenheit des hydrophilen Biotin-*linkers* scheint bei **9** und **10** die inhibierende Wirkung der Substanzen gegenüber der PPIase-Aktivität von rekombinantem CypA im Vergleich zu CsA leicht zu verstärken. Diese Wirkung erscheint bei einer Verknüpfung des *linkers* an Rest 8 im CsA-Derivat stärker zu sein als bei einer Verknüpfung des *linkers* an Rest 1 im CsA-Derivat. Dies kann sterische Gründe haben, da Rest 1 von CsA an der Formierung der Cyclophilin-Bindedomäne von CsA beteiligt ist und für die Interaktion im katalytischen Zentrum von CypA eine wichtige Rolle spielt [27-29]. Trotzdem handelt es sich dabei um äußerst geringe Effekte, da der IC_{50} -Wert von **9** nur geringfügig kleiner ist als der IC_{50} -Wert von CsA.

Die PPIase-Aktivität in humanem Serum gegenüber Peptidsubstrat zeigt die Präsenz von wenigstens einer katalytisch aktiven humanen PPIase in der Serumprobe. Die PPIase-Aktivität der Serumprobe liegt innerhalb des Bereichs der Standardabweichung einer gemittelten PPIase-Aktivität in Serum siebzehn gesunder Spender gegenüber einem ähnlichen Peptidsubstrat [58]. Der Befund, dass weniger als 5 % der gesamten PPIase-Aktivität des Serums

nicht durch CsA bzw. durch dessen Derivate inhibierbar war (vgl. *ABBILDUNG 39C*), lässt neben Cyclophilinen als typische CsA-sensitive Enzyme auf einen lediglich geringen Anteil an sonstigen katalytisch aktiven PPIasen in Serum schließen, die zur PPIase-Aktivität gegenüber dem verwendeten Peptidsubstrat beitragen. Es ist also zu vermuten, dass diese Restaktivität von extrazellulären PPIasen hervorgerufen wird, die nicht der Cyclophilin-Familie angehören. Dazu kann beispielsweise FKBP12 zählen, das in Serum vorhanden ist [293] und gegenüber dem verwendeten Substrat noch eine spezifische Aktivität aufweist [178], jedoch nicht durch CsA inhibiert wird [13].

Die untersuchten CsA-Derivate **9** und **10** inhibierten die PPIase-Aktivität in Serum mit extrapolierten IC_{50} -Werten von $5,8 \pm 0,6$ nM und $7,6 \pm 0,5$ nM in sehr ähnlicher Weise wie die Aktivität von rekombinantem CypA (extrapolierter IC_{50} -Wert von $7,8 \pm 0,7$ nM bzw. $9,4 \pm 0,9$ nM, *ABBILDUNG 39*). Dies deutet auf einen hohen Anteil an CypA bzw. CypA-ähnlichen PPIasen in der Serumprobe hin. Der etwas größere Unterschied zwischen dem IC_{50} -Wert von CsA gegenüber rekombinantem CypA ($IC_{50} = 10,7 \pm 1,0$ nM) im Vergleich zum extrapolierten IC_{50} -Wert von CsA gegenüber Serum (extrapolierter $IC_{50} = 17,9 \pm 1,3$ nM) könnte durch hydrophobe Interaktion von CsA mit Serumproteinen im Vergleich zu den sonst verwendeten Messbedingungen zustande kommen.¹¹⁾ Die CsA-Derivate sind in Gegenüberstellung mit CsA hydrophiler, möglicherweise werden so derartige Effekte kompensiert. Auch andere CsA-Derivate inhibierten die Serumprobe und rekombinantes CypA mit IC_{50} -Werten in derselben Größenordnung (nicht gezeigt).

Die neuen CsA-Derivate wurden über die Biotin-Streptavidin-Interaktion an Agarosematrizes immobilisiert und als CsA-Derivat-Matrizes für die Anreicherung von Cyclophilinen aus Serumproben verwendet. Die Bindungsaffinitäten der Cyclophiline zu diesen CsA-Derivaten bilden dabei die Grundlage dieser Methode. Beide CsA-Derivat-Matrizes sind als Affinitätsmatrizes für rekombinant hergestelltes CypA und authentisches CypA aus humanem Serum insbesondere zur Anreicherung dieser Enzyme geeignet. Authentisches CypA aus humanem Serum erscheint in den Elutionen beider CsA-Derivat-Matrizes jeweils als hervortretende, spezifisch angereicherte Bande im SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassiefärbung (*ABBILDUNG 40D*). Die Detektion von rekombinantem CypA im Western Blot und die zusätzliche parallele Bestimmungen der PPIase-Aktivitäten separater Fraktionen der *pull-down*-Experimente lässt die Schlussfolgerung einer quantitativen Bindung von CypA an die CsA-Derivat-Matrizes zu. Weder rekombinantes CypA noch authentisches CypA aus humanem Serum zeigt unspezifische Interaktion zur verwendeten Streptavidin-Agarose. Unspezifische Interaktionen einiger Proteine mit Affinitätsmatrizes sind typisch für komplexe Medien wie Serum [294, 295]. Der Verlust von über 90 % der PPIase-Aktivität in beiden Überständen der Serumproben nach Inkubation mit den CsA-Derivatmatrizes (*ABBILDUNG 40C*) deutet darauf hin, dass auch andere, im Serum vorhandene Cyclophiline, Affinität zu den CsA-Derivatmatrizes zeigen, mit diesen interagieren und so angereichert werden können. Ein vollständiger Verlust der PPIase-Aktivität in beiden Überständen der Serumproben nach Inkuba-

¹¹⁾ Messungen in Serum wurden im Vergleich zu sonstigen Inhibitionsmessungen bei fünffach höherer α -Chymotrypsin-Konzentration im Messansatz durchgeführt (siehe *KAPITEL 2.4.6*). Serum weist außerdem eine sehr hohe Proteinkonzentration auf. Beides trägt zu einer veränderten Viskosität im Messansatz von Serummessungen im Vergleich zu sonstigen Inhibitionsmessungen bei.

tion mit den CsA-Derivatmatrizes ist nicht zu erwarten, da CsA bzw. **9** oder **10** die PPIase-Aktivität in Serum auch nicht vollständig inhibieren können (vgl. *ABBILDUNG 39C*).

Matrixgebundene Proteine können mithilfe des hydrophilen CsA-Derivates **11** von der **9**-Matrix spezifisch eluiert werden (*ABBILDUNG 41*). Kompetetion um CsA-Bindestellen bildet hierfür die theoretische Grundlage. Proteine, die unspezifisch mit der verwendeten Matrix interagieren, lassen sich so von den spezifischen Interaktionspartnern abreichern. **11** besitzt gegenüber CsA als mögliches Elutionsmittel den Vorteil einer deutlich höheren Löslichkeit in wässrigen Pufferlösungen. Damit steht eine Methode zur Verfügung, die zur Anreicherung sowie zur umfassenden Analyse von CsA-Interaktionspartnern, insbesondere von Cyclophilinen aus biologischen Proben, optimiert ist.

Von den drei bekannten extrazellulären Cyclophilinen CypA, CypB und CypC [37] wurde CypB in Serum gesunder Probanden als konstant präsent beschrieben [296]. Die massenspektrometrische Analyse von Serum nach Affinitätschromatographie mit einer Matrix, die mit **9** immobilisiert war, bestätigte neben CypA, CypB und CypC die Präsenz fünf weiterer humaner Cyclophiline, namentlich CypD, CypE, Cyp40, CypH und PPIL1. Alle hier detektierten Cyclophiline weisen als rekombinante Proteine PPIase-Aktivität auf, die durch CsA inhibiert werden kann [16, 297, 298]. Bis auf zwei humane Cyclophiline (PPIAL4B¹²⁾ und PPWD1¹³⁾) wurden alle humanen Cyclophiline detektiert, die beim Vergleich der Primärstrukturen einen Tryptophanrest an der jeweiligen Position besitzen, welche in CypA Trp¹²¹ entspricht [24]. Dieser konservierte Tryptophanrest trägt in erheblichem Maße zur Sensitivität von Cyclophilinen gegenüber CsA bei [299]. Humanes Cyp40 trägt an der entsprechenden Position einen Histidinrest (His¹⁴¹), wird aber durch CsA mit einer Inhibitionskonstante im nanomolaren Bereich inhibiert.¹⁴⁾ Sekretion oder Zellyse kann zum Vorhandensein der Cyclophiline im Serum führen. Bis auf CypB ist für keines der hier detektierten Cyclophiline ein sekretorischer Transportweg beschrieben. Ein Vergleich des Cyclophilin-Musters bzw. des Musters posttranslationaler Modifikationen der Cyclophiline zwischen Serum und Blutzellen kann zur Diskrimination zwischen Sekretion und Zellyse beitragen. Unter der Voraussetzung die Proteine bzw. posttranslationalen Modifikationen sind in Serum hinreichend stabil, wäre bei der Sekretion eine Verschiebung der Muster zu erwarten. Bei der Zellyse sollten die Muster demnach identisch sein.

Da posttranslationale Modifikation oft die Proteinsekretion beeinflusst [45], unterstützen die detektierten Modifizierungen an CypA entsprechende Mechanismen für diese PPIase. Die Notwendigkeit der Acetylierung der Seitenketten der Aminosäurereste Lys⁸² und Lys¹²⁵ in CypA wurde bereits für einen Sekretionsweg beschrieben [43]. N^ε-Acetylierung von CypA an den Positionen Lys¹³³ bzw. Lys¹⁵⁵ wurde nach dem Kenntnisstand des Autors bisher noch nicht beschrieben. Jedoch wird für das Protein auf Basis von Sequenzvergleichen eine N^ε-Acetylierung an Position Lys¹³³ postuliert.¹⁵⁾ Acetylierung von Lysinseitenketten trägt zur Regulation vieler Proteine in diversen zellulären Prozessen bei [300]. Acetylierung von Lys¹²⁵ in CypA beeinflusst die katalytische Aktivität des Enzyms und dessen Bindung zu CsA [301].

¹²⁾ UniProt-Eintrag Q9Y536 (PAL4A_HUMAN), <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y536> (03.03.2015)

¹³⁾ UniProt-Eintrag Q96BP3 (PPWD1_HUMAN), <http://www.uniprot.org/uniprot/Q96BP3> (03.03.2015)

¹⁴⁾ $K_I = 247$ nM, Dr. C. SCHIENE-FISCHER, persönliche Mitteilung

¹⁵⁾ UniProt-Eintrag P62937 (PPIA_HUMAN), <http://www.uniprot.org/uniprot/P62937> (04.08.2014)

Viele Proteine sind aminoterminal acetyliert, allerdings ist die physiologische Bedeutung dieser Modifizierung weitestgehend unbekannt. Untersuchungen von ROPE *et al.* untermauern jedoch die prinzipielle biologische Wichtigkeit der N-terminalen Acetylierung und der für die Katalyse dieser Modifizierung verantwortlichen N-terminalen Acetyltransferasen [302, 303]. CypA-Modifizierung durch Proteolyse des initialen N-terminalen Methioninrestes (Met¹) und N^α-Acetylierung des nachfolgenden Val²-Restes wurde für Brustkrebszellen nach Behandlung mit Gammastrahlung [44], im *human immunodeficiency virus* Typ 1 [304] und in humanen T-Helferzellen [305] beschrieben. N-terminale Acetylierung kann die Proteinstabilität, die zelluläre Lokalisierung und die Formierung von Proteinkomplexen beeinflussen [303, 306]. Post- und cotranslationale Modifizierungen sowie die Formierung von Multiproteinkomplexen kann die katalytische Aktivität von Cyclophilin beeinflussen [301, 307]. Die angewendete Methode zur Isolierung der Cyclophiline lässt weder eine Aussage darüber zu, wie hoch die spezifischen PPIase-Aktivitäten der einzelnen Vertreter dieser PPIase-Familie in Serum sind, noch inwieweit die Modifizierungen von CypA dessen spezifische PPIase-Aktivität in Serum beeinflussen.

Die hier dargestellten Experimente zeigen in ihrer Gesamtheit eine einfache und effiziente Methode zur Isolierung und Analyse von Cyclophilinen aus biologischen Proben, die insbesondere zur Aufklärung post- bzw. cotranslationaler Modifizierungen dieser Enzyme geeignet ist. Im dargestellten Fall offenbaren die Ergebnisse die Anwesenheit weiterer Cyclophiline neben CypA, CypB und CypC im untersuchten humanen Serum. Das deutet darauf hin, dass auch weitere Cyclophiline eine funktionale Bedeutung im extrazellulären Raum einnehmen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

- Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 68 humane Proteine als potentielle Interaktionspartner der humanen Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase Pin1 gefunden, dabei wurde insbesondere MCM3, eine Untereinheit des MCM2-7-Komplexes, als direkter Pin1-Interaktionspartner identifiziert und charakterisiert.
- MCM3 interagiert *in vivo* und *in vitro* mit Pin1, wobei die Interaktion über die beiden seitenkettenphosphorylierten Motive Ser¹¹²-Pro¹¹³ und Thr⁷²²-Pro⁷²³ in MCM3 und insbesondere über die WW-Domäne von Pin1 vermittelt wird.
- Die Interaktion von Pin1 und MCM3 ist von der Zellzyklusphase abhängig und erfordert Phosphorylierung von MCM3.
- Untersuchungen der Interaktion mittels isothermer Titrationskalorimetrie von Pin1 oder dessen isolierter WW-Domäne mit einem tetradekameren Peptidderivat, das die Primärstruktur MCM3⁷¹⁶⁻⁷²⁹ repräsentiert und eine Seitenkettenphosphorylierung am entsprechenden Thr⁷²²-Pro⁷²³-Motiv trägt, ergeben Dissoziationskonstanten von $K_D = 30,8 \mu\text{M}$ bzw. $K_D = 19,9 \mu\text{M}$.
- Pin1 beschleunigt mit hoher Effizienz die Isomerisierung der Peptidyl-Prolylbindung in den seitenkettenphosphorylierten Ser-Pro- und Thr-Pro-Motiven von Peptidderivaten, die die Primärstruktur MCM3¹¹⁰⁻¹¹⁵ bzw. MCM3⁷¹⁶⁻⁷²⁹ repräsentieren.
- Im entsprechenden Peptidderivat wird die unkatalysierte Isomerisierungskonstante der Peptidyl-Prolylbindung des Motivs Thr⁷²²-Pro⁷²³ durch Seitenkettenphosphorylierung des Threoninrestes um den Faktor 14 vermindert, sie ist damit auch im physiologischen Temperaturbereich niedrig und zeigt außerdem deutliche Abhängigkeit vom pH-Wert.
- Pin1 und MCM3 kolokalisieren während der Mitose in den Zentrosomen von HeLa-Zellen.
- Pin1 unterstützt die Assemblierung des MCM2-7-Komplexes in HeLa-Zellen.
- Ein Aminosäureaustausch des Threoninrestes im Motiv Thr⁷²²-Pro⁷²³ in MCM3 gegen einen Alaninrest führt zu einer verringerten Menge an chromatinassoziiertem MCM3 im Vergleich zum Wildtyp-Protein.
- Pin1 unterstützt die Chromatinassemblierung und Chromatindisassemblierung von MCM3 in der G₁/S-Phase bzw. G₂/M-Phase des Zellzyklus in HeLa-Zellen.

- Bei der Untersuchung von insgesamt 52 niedermolekularen Substanzen auf das inhibitorische Potential gegenüber der PPIase-Aktivität von Pin1 konnten neue Arylindanylketone, Biarylindanylketone und Thioketone identifiziert werden, die gegenüber Pin1 Inhibitionskonstanten im submikromolaren Bereich aufweisen.
- Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode etabliert, die unter Verwendung immobilisierter CsA-Derivate eine Möglichkeit zur einfachen und effizienten Isolierung und Identifizierung von Cyclophilinen aus biologischen Proben bietet.
- Mithilfe eines neuen immobilisierten CsA-Derivates konnten insgesamt acht Cyclophiline, namentlich CypA, CypB, CypC, CypD, CypE, Cyp40, CypH und PPIL1 aus humanem Serum gesunder Probanden isoliert und eindeutig identifiziert werden.
- Durch massenspektrometrische Analyse einer aufgearbeiteten Probe aus humanem Serum gesunder Probanden wurden Peptide mit N^ε-Acetylierung an den Positionen Lys⁴⁴, Lys¹³³ bzw. Lys¹⁵⁵ sowie ein Peptid mit N^α-Acetylierung an der Position Val² nachgewiesen, die eindeutig CypA zugeordnet werden können.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] PAULING, L., COREY, R. B. UND BRANSON, H. R. (1951): *The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 37: 205-211.
- [2] PAULING, L. (1960): *The nature of the chemical bond and the structure of molecules and crystals: an introduction to modern structural chemistry*. Cornell University Press.
- [3] FISCHER, G. (2000): *Chemical aspects of peptide bond isomerisation*. Chemical Society Reviews, 29: 119-127.
- [4] RAMACHANDRAN, G. N. UND SASISEKHARAN, V. (1968): *Conformation of polypeptides and proteins*. Advances in Protein Chemistry, 23: 283-438.
- [5] RAMACHANDRAN, G. N. UND MITRA, A. K. (1976): *An explanation for the rare occurrence of cis peptide units in proteins and polypeptides*. Journal of Molecular Biology, 107: 85-92.
- [6] MACARTHUR, M. W. UND THORNTON, J. M. (1991): *Influence of proline residues on protein conformation*. Journal of Molecular Biology, 218: 397-412.
- [7] STEWART, D. E., SARKAR, A. UND WAMPLER, J. E. (1990): *Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures*. Journal of Molecular Biology, 214: 253-260.
- [8] WEISS, M. S., JABS, A. UND HILGENFELD, R. (1998): *Peptide bonds revisited*. Nature Structural Biology, 5: 676-676.
- [9] BRANDTS, J. F., HALVORSON, H. R. UND BRENNAN, M. (1975): *Consideration of possibility that slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues*. Biochemistry, 14: 4953-4963.
- [10] FISCHER, G., BANG, H. UND MECH, C. (1984): *[Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides]*. Biomedica Biochimica Acta, 43: 1101-1111.
- [11] FISCHER, G., WITTMANN-LIEBOLD, B., LANG, K., KIEFHABER, T. UND SCHMID, F. X. (1989): *Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins*. Nature, 337: 476-478.
- [12] TAKAHASHI, N., HAYANO, T. UND SUZUKI, M. (1989): *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin*. Nature, 337: 473-475.
- [13] SIEKIERKA, J. J., HUNG, S. H. Y., POE, M., LIN, C. S. UND SIGAL, N. H. (1989): *A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin*. Nature, 341: 755-757.
- [14] HARDING, M. W., GALAT, A., UEHLING, D. E. UND SCHREIBER, S. L. (1989): *A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase*. Nature, 341: 758-760.
- [15] RAHFELD, J. U., SCHIERHORN, A., MANN, K. UND FISCHER, G. (1994): *A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from Escherichia coli*. FEBS Letters, 343: 65-69.
- [16] DAUM, S., SCHUMANN, M., MATHEA, S., AUMÜLLER, T., BALSLEY, M. A., CONSTANT, S. L., FÉAUX DE LACROIX, B., KRUSKA, F., BRAUN, M. UND SCHIENE-FISCHER, C. (2009): *Isoform-specific inhibition of cyclophilins*. Biochemistry, 48: 6268-6277.
- [17] MORI, T., HIDAKA, M., LIN, Y. C., YOSHIZAWA, I., OKABE, T., EGASHIRA, S., KOJIMA, H., NAGANO, T., KOKETSU, M., TAKAMIYA, M. UND UCHIDA, T. (2011): *A dual inhibitor against prolyl isomerase Pin1 and cyclophilin discovered by a novel real-time fluorescence detection method*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 406: 439-443.
- [18] DREYFUSS, M., HARRI, E., HOFMANN, H., KOBEL, H., PACHE, W. UND TSCHERTER, H. (1976): *Cyclosporin A and C – New metabolites from Trichoderma polysporum (Link ex Pers.) Rifai*. European Journal of Applied Microbiology, 3: 125-133.
- [19] GAMS, W. (1971): *Tolypocladium, eine Hyphomycetengattung mit geschwollenen Phialiden*. Persoonia, 6: 185-191.
- [20] SVARSTAD, H., BUGGE, H. C. UND DHILLION, S. S. (2000): *From Norway to Novartis: cyclosporin from Tolypocladium inflatum in an open access bioprospecting regime*. Biodiversity and Conservation, 9: 1521-1541.
- [21] CALNE, R. Y., WHITE, D. J., THIRU, S., EVANS, D. B., MCMASTER, P., DUNN, D. C., CRADDOCK, G. N., PENTLOW, B. D. UND ROLLES, K. (1978): *Cyclosporin A in patients receiving renal-allografts from cadaver donors*. Lancet, 2: 1323-1327.
- [22] BOREL, J. F., FEURER, C., GUBLER, H. U. UND STAHELIN, H. (1976): *Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent*. Agents and Actions, 6: 468-475.
- [23] FANGHÄNEL, J. UND FISCHER, G. (2004): *Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl cis/trans isomerases*. Frontiers in Bioscience, 9: 3453-3478.
- [24] SCHIENE-FISCHER, C., AUMÜLLER, T. UND FISCHER, G. (2013): *Peptide bond cis/trans isomerases: a biocatalysis perspective of conformational dynamics in proteins*. Topics in Current Chemistry, 328: 35-67.

- [25] LANG, K., SCHMID, F. X. UND FISCHER, G. (1987): *Catalysis of protein folding by prolyl isomerase*. Nature, 329: 268-270.
- [26] HANDSCHUMACHER, R. E., HARDING, M. W., RICE, J., DRUGGE, R. J. UND SPEICHER, D. W. (1984): *Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A*. Science, 226: 544-547.
- [27] HUAI, Q., KIM, H. Y., LIU, Y., ZHAO, Y., MONDRAGON, A., LIU, J. O. UND KE, H. (2002): *Crystal structure of calcineurin-cyclophilin-cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin-drug complexes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99: 12037-12042.
- [28] JIN, L. UND HARRISON, S. C. (2002): *Crystal structure of human calcineurin complexed with cyclosporin A and human cyclophilin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99: 13522-13526.
- [29] PEEL, M. UND SCRIBNER, A. (2013): *Optimization of cyclophilin inhibitors for use in antiviral therapy*. In: DESAI, M. C. UND MEANWELL, N. A.: *Successful strategies for the discovery of antiviral drugs*. The Royal Society of Chemistry: 384-418.
- [30] LIU, J., FARMER, J. D., LANE, W. S., FRIEDMAN, J., WEISSMAN, I. UND SCHREIBER, S. L. (1991): *Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporine A and FKBP-FK506 complexes*. Cell, 66: 807-815.
- [31] CLIPSTONE, N. A. UND CRABTREE, G. R. (1992): *Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation*. Nature, 357: 695-697.
- [32] JAIN, J., MCCAFFREY, P. G., MINER, Z., KERPPOLA, T. K., LAMBERT, J. N., VERDINE, G. L., CURRAN, T. UND RAO, A. (1993): *The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun*. Nature, 365: 352-355.
- [33] MCCAFFREY, P. G., LUO, C., KERPPOLA, T. K., JAIN, J., BADALIAN, T. M., HO, A. M., BURGEON, E., LANE, W. S., LAMBERT, J. N., CURRAN, T. UND ET AL. (1993): *Isolation of the cyclosporin-sensitive T cell transcription factor NFATp*. Science, 262: 750-754.
- [34] PRELL, E., KAHLERT, V., RÜCKNAGEL, K. P., MALEŠEVIĆ, M. UND FISCHER, G. (2013): *Fine tuning the inhibition profile of cyclosporine A by derivatization of the MeBmt residue*. ChemBioChem, 14: 63-65.
- [35] BUKRINSKY, M. I. (2002): *Cyclophilins: unexpected messengers in intercellular communications*. Trends in Immunology, 23: 323-325.
- [36] YURCHENKO, V., CONSTANT, S., EISENMESSER, E. UND BUKRINSKY, M. (2010): *Cyclophilin-CD147 interactions: a new target for anti-inflammatory therapeutics*. Clinical and Experimental Immunology, 160: 305-317.
- [37] HOFFMANN, H. UND SCHIENE-FISCHER, C. (2014): *Functional aspects of extracellular cyclophilins*. Biological Chemistry, 395: 721-735.
- [38] JIN, Z. G., MELARAGNO, M. G., LIAO, D. F., YAN, C., HAENDELER, J., SUH, Y. A., LAMBETH, J. D. UND BERK, B. C. (2000): *Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress*. Circulation Research, 87: 789-796.
- [39] LAMOUREUX, F., GASTINEL, L. N., MESTRE, E., MARQUET, P. UND ESSIG, M. (2012): *Mapping cyclosporine-induced changes in protein secretion by renal cells using stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC)*. Journal of Proteomics, 75: 3674-3687.
- [40] PENG, H., VIJAYAKUMAR, S., SCHIENE-FISCHER, C., LI, H., PURKERSON, J. M., MALESEVIC, M., LIEBSCHER, J., AL-AWQATI, Q. UND SCHWARTZ, G. J. (2009): *Secreted cyclophilin A, a peptidylprolyl cis-trans isomerase, mediates matrix assembly of hensin, a protein implicated in epithelial differentiation*. Journal of Biological Chemistry, 284: 6465-6475.
- [41] SHERRY, B., YARLETT, N., STRUPP, A. UND CERAMI, A. (1992): *Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89: 3511-3515.
- [42] SUZUKI, J., JIN, Z. G., MEOLI, D. F., MATOBA, T. UND BERK, B. C. (2006): *Cyclophilin A is secreted by a vesicular pathway in vascular smooth muscle cells*. Circulation Research, 98: 811-817.
- [43] SOE, N. N., SOWDEN, M., BASKARAN, P., KIM, Y., NIGRO, P., SMOLOCK, E. M. UND BERK, B. C. (2014): *Acetylation of cyclophilin A is required for its secretion and vascular cell activation*. Cardiovascular Research, 101: 444-453.
- [44] CHEVALIER, F., DEPAGNE, J., HEM, S., CHEVILLARD, S., BENSIMON, J., BERTRAND, P. UND LEBEAU, J. (2012): *Accumulation of cyclophilin A isoforms in conditioned medium of irradiated breast cancer cells*. Proteomics, 12: 1756-1766.
- [45] VAN VLIET, C., THOMAS, E. C., MERINO-TRIGO, A., TEASDALE, R. D. UND GLEESON, P. A. (2003): *Intracellular sorting and transport of proteins*. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 83: 1-45.
- [46] RAMACHANDRAN, S., VENUGOPAL, A., SATHISHA, K., RESHMI, G., CHARLES, S., DIVYA, G., CHANDRAN, N. S. P., MULLASSARI, A., PILLAI, M. R. UND KARTHA, C. C. (2012): *Proteomic profiling of high glucose primed monocytes identifies cyclophilin A as a potential secretory marker of inflammation in type 2 diabetes*. Proteomics, 12: 2808-2821.

- [47] CHRISTOFFERSON, D. E. UND YUAN, J. (2010): *Cyclophilin A release as a biomarker of necrotic cell death*. Cell Death and Differentiation, 17: 1942-1943.
- [48] PRICE, E. R., ZYDOWSKY, L. D., JIN, M. J., BAKER, C. H., MCKEON, F. D. UND WALSH, C. T. (1991): *Human cyclophilin B: a second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 88: 1903-1907.
- [49] FEARON, P., LONSDALE-ECCLES, A. A., ROSS, O. K., TODD, C., SINHA, A., ALLAIN, F. UND REYNOLDS, N. J. (2011): *Keratinocyte secretion of cyclophilin B via the constitutive pathway is regulated through its cyclosporin-binding site*. Journal of Investigative Dermatology, 131: 1085-1094.
- [50] PRICE, E. R., JIN, M., LIM, D., PATI, S., WALSH, C. T. UND MCKEON, F. D. (1994): *Cyclophilin B trafficking through the secretory pathway is altered by binding of cyclosporin A*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91: 3931-3935.
- [51] DE CEUNINCK, F., ALLAIN, F., CALIEZ, A., SPIK, G. UND VANHOUTTE, P. M. (2003): *High binding capacity of cyclophilin B to chondrocyte heparan sulfate proteoglycans and its release from the cell surface by matrix metalloproteinases: possible role as a proinflammatory mediator in arthritis*. Arthritis & Rheumatism, 48: 2197-2206.
- [52] MAURI, P., SCARPA, A., NASCIBENI, A. C., BENAZZI, L., PARMAGNANI, E., MAFFICINI, A., DELLA PERUTA, M., BASSI, C., MIYAZAKI, K. UND SORIO, C. (2005): *Identification of proteins released by pancreatic cancer cells by multidimensional protein identification technology: a strategy for identification of novel cancer markers*. FASEB Journal, 19: 1125-1127.
- [53] YURCHENKO, V., ZYBARTH, G., O'CONNOR, M., DAI, W. W., FRANCHIN, G., HAO, T., GUO, H., HUNG, H. C., TOOLE, B., GALLAY, P., SHERRY, B. UND BUKRINSKY, M. (2002): *Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147*. Journal of Biological Chemistry, 277: 22959-22965.
- [54] MALEŠEVIĆ, M., GUTKNECHT, D., PRELL, E., KLEIN, C., SCHUMANN, M., NOWAK, R. A., SIMON, J. C., SCHIENE-FISCHER, C. UND SAALBACH, A. (2013): *Anti-inflammatory effects of extracellular cyclosporins are exclusively mediated by CD147*. Journal of Medicinal Chemistry, 56: 7302-7311.
- [55] BILLICH, A., WINKLER, G., ASCHAUER, H., ROT, A. UND PEICHL, P. (1997): *Presence of cyclophilin A in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis*. Journal of Experimental Medicine, 185: 975-980.
- [56] YANG, Y., LU, N., ZHOU, J., CHEN, Z. N. UND ZHU, P. (2008): *Cyclophilin A up-regulates MMP-9 expression and adhesion of monocytes/macrophages via CD147 signalling pathway in rheumatoid arthritis*. Rheumatology, 47: 1299-1310.
- [57] WANG, L., JIA, J. F., WANG, C. H., MA, X. K., LIAO, C. G., FU, Z. G., WANG, B., YANG, X. M., ZHU, P., LI, Y. UND CHEN, Z. N. (2013): *Inhibition of synovitis and joint destruction by a new single domain antibody specific for cyclophilin A in two different mouse models of rheumatoid arthritis*. Arthritis Research & Therapy, 15: R208.
- [58] TEGEDER, I., SCHUMACHER, A., JOHN, S., GEIGER, H., GEISSLINGER, G., BANG, H. UND BRUNE, K. (1997): *Elevated serum cyclophilin levels in patients with severe sepsis*. Journal of Clinical Immunology, 17: 380-386.
- [59] NIGRO, P., POMPILIO, G. UND CAPOGROSSI, M. C. (2013): *Cyclophilin A: a key player for human disease*. Cell Death & Disease, 4: e888.
- [60] ARORA, K., GWINN, W. M., BOWER, M. A., WATSON, A., OKWUMABUA, I., MACDONALD, H. R., BUKRINSKY, M. I. UND CONSTANT, S. L. (2005): *Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses*. Journal of Immunology, 175: 517-522.
- [61] GWINN, W. M., DAMSKER, J. M., FALAHATI, R., OKWUMABUA, I., KELLY-WELCH, A., KEEGAN, A. D., VANPOUILLE, C., LEE, J. J., DENT, L. A., LEITENBERG, D., BUKRINSKY, M. I. UND CONSTANT, S. L. (2006): *Novel approach to inhibit asthma-mediated lung inflammation using anti-CD147 intervention*. Journal of Immunology, 177: 4870-4879.
- [62] STEMMY, E. J., BALSLEY, M. A., JURJUS, R. A., DAMSKER, J. M., BUKRINSKY, M. I. UND CONSTANT, S. L. (2011): *Blocking cyclophilins in the chronic phase of asthma reduces the persistence of leukocytes and disease reactivation*. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 45: 991-998.
- [63] RAMACHANDRAN, S. UND KARTHA, C. C. (2012): *Cyclophilin-A: a potential screening marker for vascular disease in type-2 diabetes*. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 90: 1005-1015.
- [64] RAMACHANDRAN, S., VENUGOPAL, A., KUTTY, V. R., VINITHA, A., DIVYA, G., CHITRASREE, V., MULLASSARI, A., PRATAPCHANDRAN, N. S., SANTOSH, K. R., PILLAI, M. R. UND KARTHA, C. C. (2014): *Plasma level of cyclophilin A is increased in patients with type 2 diabetes mellitus and suggests presence of vascular disease*. Cardiovascular Diabetology, 13: 38.
- [65] RIDKER, P. M. (2003): *C-reactive protein: a simple test to help predict risk of heart attack and stroke*. Circulation, 108: e81-e85.
- [66] SATOH, K., FUKUMOTO, Y., SUGIMURA, K., MIURA, Y., AOKI, T., NOCHIOKA, K., TATEBE, S., MIYAMICHI-YAMAMOTO, S., SHIMIZU, T., OSAKI, S., TAKAGI, Y., TSUBURAYA, R., ITO, Y., MATSUMOTO, Y., NAKAYAMA, M., TAKEDA, M., TAKAHASHI, J., ITO, K., YASUDA, S. UND SHIMOKAWA, H. (2013): *Plasma cyclophilin A is a novel biomarker for coronary artery disease*. Circulation Journal, 77: 447-455.

- [67] SEIZER, P., GAWAZ, M. UND MAY, A. E. (2014): *Cyclophilin A and EMMPRIN (CD147) in cardiovascular diseases*. Cardiovascular Research, 102: 17-23.
- [68] ARGAUD, L., GATEAU-ROESCH, O., MUNTEAN, D., CHALABREYSSE, L., LOUFOUAT, J., ROBERT, D. UND OVIZE, M. (2005): *Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 38: 367-374.
- [69] MALEŠEVIĆ, M., KUHLING, J., ERDMANN, F., BALSLEY, M. A., BUKRINSKY, M. I., CONSTANT, S. L. UND FISCHER, G. (2010): *A cyclosporin derivative discriminates between extracellular and intracellular cyclophilins*. Angewandte Chemie International Edition, 49: 213-215.
- [70] BALSLEY, M. A., MALEŠEVIĆ, M., STEMMY, E. J., GIGLEY, J., JURJUS, R. A., HERZOG, D., BUKRINSKY, M. I., FISCHER, G. UND CONSTANT, S. L. (2010): *A cell-impermeable cyclosporine A derivative reduces pathology in a mouse model of allergic lung inflammation*. Journal of Immunology, 185: 7663-7670.
- [71] LU, K. P., HANES, S. D. UND HUNTER, T. (1996): *A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis*. Nature, 380: 544-547.
- [72] OSMANI, A. H., MCGUIRE, S. L. UND OSMANI, S. A. (1991): *Parallel activation of the NIMA and p34cdc2 cell cycle-regulated protein kinases is required to initiate mitosis in A. nidulans*. Cell, 67: 283-291.
- [73] OSMANI, S. A., PU, R. T. UND MORRIS, N. R. (1988): *Mitotic induction and maintenance by overexpression of a G2-specific gene that encodes a potential protein kinase*. Cell, 53: 237-244.
- [74] LU, K. P. UND MEANS, A. R. (1994): *Expression of the noncatalytic domain of the NIMA kinase causes a G2 arrest in Aspergillus nidulans*. EMBO Journal, 13: 2103-2113.
- [75] PU, R. T. UND OSMANI, S. A. (1995): *Mitotic destruction of the cell cycle regulated NIMA protein kinase of Aspergillus nidulans is required for mitotic exit*. EMBO Journal, 14: 995-1003.
- [76] HANES, S. D., SHANK, P. R. UND BOSTIAN, K. A. (1989): *Sequence and mutational analysis of ESS1, a gene essential for growth in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 5: 55-72.
- [77] HANI, J., STUMPF, G. UND DOMDEY, H. (1995): *PTF1 encodes an essential protein in Saccharomyces cerevisiae, which shows strong homology with a new putative family of PPIases*. FEBS Letters, 365: 198-202.
- [78] MALESZKA, R., HANES, S. D., HACKETT, R. L., DE COUET, H. G. UND MIKLOS, G. L. (1996): *The Drosophila melanogaster dodo (dod) gene, conserved in humans, is functionally interchangeable with the ESS1 cell division gene of Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93: 447-451.
- [79] KOPS, O., ECKERSKORN, C., HOTTENROTT, S., FISCHER, G., MI, H. UND TROPSCHUG, M. (1998): *Ssp1, a site-specific parvulin homolog from Neurospora crassa active in protein folding*. Journal of Biological Chemistry, 273: 31971-31976.
- [80] HUANG, H. K., FORSBURG, S. L., JOHN, U. P., O'CONNELL, M. J. UND HUNTER, T. (2001): *Isolation and characterization of the Pin1/Ess1p homologue in Schizosaccharomyces pombe*. Journal of Cell Science, 114: 3779-3788.
- [81] METZNER, M., STOLLER, G., RÜCKNAGEL, K. P., LU, K. P., FISCHER, G., LUCKNER, M. UND KÜLLERTZ, G. (2001): *Functional replacement of the essential ESS1 in yeast by the plant parvulin D1Par13*. Journal of Biological Chemistry, 276: 13524-13529.
- [82] YAO, J. L., KOPS, O., LU, P. J. UND LU, K. P. (2001): *Functional conservation of phosphorylation-specific prolyl isomerases in plants*. Journal of Biological Chemistry, 276: 13517-13523.
- [83] RIPPMANN, J. F., HOBBIE, S., DAIBER, C., GUILLIARD, B., BAUER, M., BIRK, J., NAR, H., GARIN-CHESA, P., RETTIG, W. J. UND SCHNAPP, A. (2000): *Phosphorylation-dependent proline isomerization catalyzed by Pin1 is essential for tumor cell survival and entry into mitosis*. Cell Growth & Differentiation, 11: 409-416.
- [84] LU, P. J., ZHOU, X. Z., LIU, Y. C., NOEL, J. P. UND LU, K. P. (2002): *Critical role of WW domain phosphorylation in regulating phosphoserine binding activity and Pin1 function*. Journal of Biological Chemistry, 277: 2381-2384.
- [85] LUFEL, C. C. UND CAO, X. M. (2009): *Nuclear import of Pin1 is mediated by a novel sequence in the PPIase domain*. FEBS Letters, 583: 271-276.
- [86] SUDOL, M., CHEN, H. I., BOUGERET, C., EINBOND, A. UND BORK, P. (1995): *Characterization of a novel protein-binding module – the WW domain*. FEBS Letters, 369: 67-71.
- [87] SUDOL, M. (1996): *Structure and function of the WW domain*. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 65: 113-132.
- [88] MACIAS, M. J., HYVÖNEN, M., BARALDI, E., SCHULTZ, J., SUDOL, M., SARASTE, M. UND OSCHKINAT, H. (1996): *Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide*. Nature, 382: 646-649.
- [89] RANGANATHAN, R., LU, K. P., HUNTER, T. UND NOEL, J. P. (1997): *Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent*. Cell, 89: 875-886.
- [90] SUDOL, M. UND HUNTER, T. (2000): *NeW wrinkles for an old domain*. Cell, 103: 1001-1004.
- [91] SUDOL, M., SLIWA, K. UND RUSSO, T. (2001): *Functions of WW domains in the nucleus*. FEBS Letters, 490: 190-195.

- [92] LU, P. J., ZHOU, X. Z., SHEN, M. UND LU, K. P. (1999): *Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules*. Science, 283: 1325-1328.
- [93] VERDECIA, M. A., BOWMAN, M. E., LU, K. P., HUNTER, T. UND NOEL, J. P. (2000): *Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains*. Nature Structural Biology, 7: 639-643.
- [94] JÄGER, M., ZHANG, Y., BIESCHKE, J., NGUYEN, H., DENDLE, M., BOWMAN, M. E., NOEL, J. P., GRUEBELE, M. UND KELLY, J. W. (2006): *Structure-function-folding relationship in a WW domain*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103: 10648-10653.
- [95] JÄGER, M., NGUYEN, H., DENDLE, M., GRUEBELE, M. UND KELLY, J. W. (2007): *Influence of hPin1 WW N-terminal domain boundaries on function, protein stability, and folding*. Protein Science, 16: 1495-1501.
- [96] JÄGER, M., DENDLE, M., FULLER, A. A. UND KELLY, J. W. (2007): *A cross-strand Trp-Trp pair stabilizes the hPin1 WW domain at the expense of function*. Protein Science, 16: 2306-2313.
- [97] KIER, B. L., ANDERSON, J. M. UND ANDERSEN, N. H. (2014): *Circular permutation of a WW domain: folding still occurs after excising the turn of the folding-nucleating hairpin*. Journal of the American Chemical Society, 136: 741-749.
- [98] ZARRINPAR, A. UND LIM, W. A. (2000): *Converging on proline: the mechanism of WW domain peptide recognition*. Nature Structural Biology, 7: 611-613.
- [99] TANG, H. C., LIN, Y. J. UND HORNG, J. C. (2014): *Modulating the folding stability and ligand binding affinity of Pin1 WW domain by proline ring puckering*. Proteins, 82: 67-76.
- [100] YAFFE, M. B., SCHUTKOWSKI, M., SHEN, M., ZHOU, X. Z., STUKENBERG, P. T., RAHFELD, J. U., XU, J., KUANG, J., KIRSCHNER, M. W., FISCHER, G., CANTLEY, L. C. UND LU, K. P. (1997): *Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism*. Science, 278: 1957-1960.
- [101] UCHIDA, T., FUJIMORI, F., TRADLER, T., FISCHER, G. UND 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: 278-282.
- [102] NAMANJA, A. T., WANG, X. J., XU, B., MERCEDES-CAMACHO, A. Y., WILSON, B. D., WILSON, K. A., ETZKORN, F. A. UND PENG, J. W. (2010): *Toward flexibility-activity relationships by NMR spectroscopy: dynamics of Pin1 ligands*. Journal of the American Chemical Society, 132: 5607-5609.
- [103] NAMANJA, A. T., WANG, X. J., XU, B., MERCEDES-CAMACHO, A. Y., WILSON, K. A., ETZKORN, F. A. UND PENG, J. W. (2011): *Stereospecific gating of functional motions in Pin1*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108: 12289-12294.
- [104] WILSON, K. A., BOUCHARD, J. J. UND PENG, J. W. (2013): *Interdomain interactions support interdomain communication in human Pin1*. Biochemistry, 52: 6968-6981.
- [105] LEE, T. H., CHEN, C. H., SUIZU, F., HUANG, P., SCHIENE-FISCHER, C., DAUM, S., ZHANG, Y. J., GOATE, A., CHEN, R. H., ZHOU, X. Z. UND LU, K. P. (2011): *Death-associated protein kinase 1 phosphorylates Pin1 and inhibits its prolyl isomerase activity and cellular function*. Molecular Cell, 42: 147-159.
- [106] ECKERDT, F., YUAN, J. P., SAXENA, K., MARTIN, B., KAPPEL, S., LINDENAU, C., KRAMER, A., NAUMANN, S., DAUM, S., FISCHER, G., DIKIC, I., KAUFMANN, M. UND STREBHARDT, K. (2005): *Polo-like kinase 1-mediated phosphorylation stabilizes Pin1 by inhibiting its ubiquitination in human cells*. Journal of Biological Chemistry, 280: 36575-36583.
- [107] PAWSON, T. UND SCOTT, J. D. (2005): *Protein phosphorylation in signaling – 50 years and counting*. Trends in Biochemical Sciences, 30: 286-290.
- [108] LU, K. P. (2004): *Pinning down cell signaling, cancer and Alzheimer's disease*. Trends in Biochemical Sciences, 29: 200-209.
- [109] LU, K. P., LIOU, Y. C. UND VINCENT, I. (2003): *Proline-directed phosphorylation and isomerization in mitotic regulation and in Alzheimer's disease*. BioEssays, 25: 174-181.
- [110] NIGG, E. A. (2001): *Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2: 21-32.
- [111] LU, K. P. UND ZHOU, X. Z. (2007): *The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and disease*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 8: 904-916.
- [112] WEIWAD, M., KÜLLERTZ, G., SCHUTKOWSKI, M. UND FISCHER, G. (2000): *Evidence that the substrate backbone conformation is critical to phosphorylation by p42 MAP kinase*. FEBS Letters, 478: 39-42.
- [113] WERNER-ALLEN, J. W., LEE, C. J., LIU, P., NICELY, N. I., WANG, S., GREENLEAF, A. L. UND ZHOU, P. (2011): *cis-Proline-mediated Ser(P)5 dephosphorylation by the RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase Ssu72*. Journal of Biological Chemistry, 286: 5717-5726.
- [114] ZHOU, X. Z., KOPS, O., WERNER, A., LU, P. J., SHEN, M., STOLLER, G., KÜLLERTZ, G., STARK, M., FISCHER, G. UND LU, K. P. (2000): *Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins*. Molecular Cell, 6: 873-883.
- [115] KIPPING, M., ZARNT, T., KIESSIG, S., REIMER, U., FISCHER, G. UND BAYER, P. (2001): *Increased backbone flexibility in threonine(45)-phosphorylated hirudin upon pH change*. Biochemistry, 40: 7957-7963.
- [116] LIOU, Y. C., ZHOU, X. Z. UND LU, K. P. (2011): *Prolyl isomerase Pin1 as a molecular switch to determine the fate of phosphoproteins*. Trends in Biochemical Sciences, 36: 501-514.

- [117] ZHOU, X. Z., LU, P. J., WULF, G. UND LU, K. P. (1999): *Phosphorylation-dependent prolyl isomerization: a novel signaling regulatory mechanism*. Cellular and Molecular Life Sciences, 56: 788-806.
- [118] RYO, A., NAKAMURA, M., WULF, G., LIOU, Y. C. UND LU, K. P. (2001): *Pin1 regulates turnover and subcellular localization of β -catenin by inhibiting its interaction with APC*. Nature Cell Biology, 3: 793-801.
- [119] YEH, E. S., LEW, B. O. UND MEANS, A. R. (2006): *The loss of PIN1 deregulates cyclin E and sensitizes mouse embryo fibroblasts to genomic instability*. Journal of Biological Chemistry, 281: 241-251.
- [120] WINKLER, K. E., SWENSON, K. I., KORNBLOTH, S. UND MEANS, A. R. (2000): *Requirement of the prolyl isomerase Pin1 for the replication checkpoint*. Science, 287: 1644-1647.
- [121] XU, Y. X. UND MANLEY, J. L. (2007): *The prolyl isomerase Pin1 functions in mitotic chromosome condensation*. Molecular Cell, 26: 287-300.
- [122] MATHUR, R., SUMAN, S., BEAUME, N., ALI, M., BHATT, A. N., CHOPRA, M., SALUJA, D., MISHRA, A. K., CHANDNA, S., KAPOOR, P. N. UND DWARAKANATH, B. S. (2010): *Interaction and structural modification of topoisomerase IIa by peptidyl prolyl isomerase, Pin1: an in silico study*. Protein & Peptide Letters, 17: 151-163.
- [123] RAGHURAM, N., STRICKFADEN, H., McDONALD, D., WILLIAMS, K., FANG, H., MIZZEN, C., HAYES, J. J., TH'NG, J. UND HENDZEL, M. J. (2013): *Pin1 promotes histone H1 dephosphorylation and stabilizes its binding to chromatin*. Journal of Cell Biology, 203: 57-71.
- [124] CUVIER, O., STANOJCIC, S., LEMAITRE, J. M. UND MECHALI, M. (2008): *A topoisomerase II-dependent mechanism for resetting replicons at the S-M-phase transition*. Genes & Development, 22: 860-865.
- [125] SUIZU, F., RYO, A., WULF, G., LIM, J. UND LU, K. P. (2006): *Pin1 regulates centrosome duplication, and its overexpression induces centrosome amplification, chromosome instability, and oncogenesis*. Molecular and Cellular Biology, 26: 1463-1479.
- [126] VAN DER HORST, A. UND KHANNA, K. K. (2009): *The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 regulates cytokinesis through Cep55*. Cancer Research, 69: 6651-6659.
- [127] FABBRO, M., ZHOU, B. B., TAKAHASHI, M., SARCEVIC, B., LAL, P., GRAHAM, M. E., GABRIELLI, B. G., ROBINSON, P. J., NIGG, E. A., ONO, Y. UND KHANNA, K. K. (2005): *Cdk1/Erk2- and Plk1-dependent phosphorylation of a centrosome protein, Cep55, is required for its recruitment to midbody and cytokinesis*. Developmental Cell, 9: 477-488.
- [128] VAN DER HORST, A., SIMMONS, J. UND KHANNA, K. K. (2009): *Cep55 stabilization is required for normal execution of cytokinesis*. Cell Cycle, 8: 3742-3749.
- [129] LI, M., STUKENBERG, P. T. UND BRAUTIGAN, D. L. (2008): *Binding of phosphatase inhibitor-2 to prolyl isomerase Pin1 modifies specificity for mitotic phosphoproteins*. Biochemistry, 47: 292-300.
- [130] SAMI, F., SMET-NOCCA, C., KHAN, M., LANDRIEU, I., LIPPENS, G. UND BRAUTIGAN, D. L. (2011): *Molecular basis for an ancient partnership between prolyl isomerase Pin1 and phosphatase inhibitor-2*. Biochemistry, 50: 6567-6578.
- [131] WULF, G. M., LIOU, Y. C., RYO, A., LEE, S. W. UND LU, K. P. (2002): *Role of Pin1 in the regulation of p53 stability and p21 transactivation, and cell cycle checkpoints in response to DNA damage*. Journal of Biological Chemistry, 277: 47976-47979.
- [132] ZACCHI, P., GOSTISSA, M., UCHIDA, T., SALVAGNO, C., AVOLIO, F., VOLINIA, S., RONAI, Z., BLANDINO, G., SCHNEIDER, C. UND DEL SAL, G. (2002): *The prolyl isomerase Pin1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults*. Nature, 419: 853-857.
- [133] ZHENG, H. W., YOU, H., ZHOU, X. Z., MURRAY, S. A., UCHIDA, T., WULF, G., GU, L., TANG, X. R., LU, K. P. UND XIAO, Z. X. J. (2002): *The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response*. Nature, 419: 849-853.
- [134] BERGER, M., STAHL, N., DEL SAL, G. UND HAUPT, Y. (2005): *Mutations in proline 82 of p53 impair its activation by Pin1 and Chk2 in response to DNA damage*. Molecular and Cellular Biology, 25: 5380-5388.
- [135] CHEHAB, N. H., MALIKZAY, A., STAVRIDIS, E. S. UND HALAZONETIS, T. D. (1999): *Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96: 13777-13782.
- [136] UNGER, T., JUVEN-GERSHON, T., MOALLEM, E., BERGER, M., VOGT SIONOV, R., LOZANO, G., OREN, M. UND HAUPT, Y. (1999): *Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2*. EMBO Journal, 18: 1805-1814.
- [137] HONDA, R., TANAKA, H. UND YASUDA, H. (1997): *Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53*. FEBS Letters, 420: 25-27.
- [138] KUBBUTAT, M. H., JONES, S. N. UND VOUSDEN, K. H. (1997): *Regulation of p53 stability by Mdm2*. Nature, 387: 299-303.
- [139] MANTOVANI, F., TOCCO, F., GIRARDINI, J., SMITH, P., GASCO, M., LU, X., CROOK, T. UND DEL SAL, G. (2007): *The prolyl isomerase Pin1 orchestrates p53 acetylation and dissociation from the apoptosis inhibitor iASPP*. Nature Structural & Molecular Biology, 14: 912-920.

- [140] BARLEV, N. A., LIU, L., CHEHAB, N. H., MANSFIELD, K., HARRIS, K. G., HALAZONETIS, T. D. UND BERGER, S. L. (2001): *Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases*. *Molecular Cell*, 8: 1243-1254.
- [141] LUO, J. Y., LI, M. Y., TANG, Y., LASZKOWSKA, M., ROEDER, R. G. UND GU, W. (2004): *Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 2259-2264.
- [142] ZHAO, Y., LU, S. L., WU, L. P., CHAI, G. L., WANG, H. Y., CHEN, Y. Q., SUN, J., YU, Y., ZHOU, W., ZHENG, Q. H., WU, M., OTTERSON, G. A. UND ZHU, W. G. (2006): *Acetylation of p53 at lysine 373/382 by the histone deacetylase inhibitor depsipeptide induces expression of p21(Waf1/Cip1)*. *Molecular and Cellular Biology*, 26: 2782-2790.
- [143] GRISON, A., MANTOVANI, F., COMEL, A., AGOSTONI, E., GUSTINCICH, S., PERSICHETTI, F. UND DEL SAL, G. (2011): *Ser46 phosphorylation and prolyl-isomerase Pin1-mediated isomerization of p53 are key events in p53-dependent apoptosis induced by mutant huntingtin*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108: 17979-17984.
- [144] GIRARDINI, J. E., NAPOLI, M., PIAZZA, S., RUSTIGHI, A., MAROTTA, C., RADAELLI, E., CAPACI, V., JORDAN, L., QUINLAN, P., THOMPSON, A., MANO, M., ROSATO, A., CROOK, T., SCANZIANI, E., MEANS, A. R., LOZANO, G., SCHNEIDER, C. UND DEL SAL, G. (2011): *A Pin1/mutant p53 axis promotes aggressiveness in breast cancer*. *Cancer Cell*, 20: 79-91.
- [145] SORRENTINO, G., MIONI, M., GIORGI, C., RUGGERI, N., PINTON, P., MOLL, U., MANTOVANI, F. UND DEL SAL, G. (2013): *The prolyl-isomerase Pin1 activates the mitochondrial death program of p53*. *Cell Death and Differentiation*, 20: 198-208.
- [146] RYO, A., LIOU, Y. C., LU, K. P. UND WULF, G. (2003): *Prolyl isomerase Pin1: a catalyst for oncogenesis and a potential therapeutic target in cancer*. *Journal of Cell Science*, 116: 773-783.
- [147] BAO, L., KIMZEY, A., SAUTER, G., SOWADSKI, J. M., LU, K. P. UND WANG, D. G. (2004): *Prevalent overexpression of prolyl isomerase Pin1 in human cancers*. *American Journal of Pathology*, 164: 1727-1737.
- [148] AKIYAMA, H., MISAWA, T., ONO, M., UCHIDA, C. UND UCHIDA, T. (2011): *Prolyl isomerase Pin1 protects mice from endotoxin shock*. *PLoS One*, 6: e14656.
- [149] MISUMI, S., INOUE, M., DOCHI, T., KISHIMOTO, N., HASEGAWA, N., TAKAMUNE, N. UND SHOJI, S. (2010): *Uncoating of human immunodeficiency virus type 1 requires prolyl isomerase Pin1*. *Journal of Biological Chemistry*, 285: 25185-25195.
- [150] PANG, R., LEE, T. K., POON, R. T., FAN, S. T., WONG, K. B., KWONG, Y. L. UND TSE, E. (2007): *Pin1 interacts with a specific serine-proline motif of hepatitis B virus X-protein to enhance hepatocarcinogenesis*. *Gastroenterology*, 132: 1088-1103.
- [151] TAKAHASHI, K., UCHIDA, C., SHIN, R. W., SHIMAZAKI, K. UND UCHIDA, T. (2008): *Prolyl isomerase, Pin1: new findings of post-translational modifications and physiological substrates in cancer, asthma and Alzheimer's disease*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65: 359-375.
- [152] LIOU, Y. C., SUN, A., RYO, A., ZHOU, X. Z., YU, Z. X., HUANG, H. K., UCHIDA, T., BRONSON, R., BING, G., LI, X., HUNTER, T. UND LU, K. P. (2003): *Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration*. *Nature*, 424: 556-561.
- [153] AYALA, G., WANG, D. G., WULF, G., FROLOV, A., LI, R., SOWADSKI, J., WHEELER, T. M., LU, K. P. UND BAO, L. (2003): *The prolyl isomerase Pin1 is a novel prognostic marker in human prostate cancer*. *Cancer Research*, 63: 6244-6251.
- [154] HE, J., ZHOU, F., SHAO, K., HANG, J., WANG, H., RAYBURN, E., XIAO, Z. X., LEE, S. W., XUE, Q., FENG, X. L., SHI, S. S., ZHANG, C. Y. UND ZHANG, S. (2007): *Overexpression of Pin1 in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its correlation with lymph node metastases*. *Lung Cancer*, 56: 51-58.
- [155] WULF, G. M., RYO, A., WULF, G. G., LEE, S. W., NIU, T. H., PETKOVA, V. UND LU, K. P. (2001): *Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1*. *EMBO Journal*, 20: 3459-3472.
- [156] KURAMOCHI, J., ARAI, T., IKEDA, S., KUMAGAI, J., UETAKE, H. UND SUGIHARA, K. (2006): *High Pin1 expression is associated with tumor progression in colorectal cancer*. *Journal of Surgical Oncology*, 94: 155-160.
- [157] WULF, G., GARG, P., LIOU, Y. C., IGLEHART, D. UND LU, K. P. (2004): *Modeling breast cancer in vivo and ex vivo reveals an essential role of Pin1 in tumorigenesis*. *EMBO Journal*, 23: 3397-3407.
- [158] RYO, A., UEMURA, H., ISHIGURO, H., SAITOH, T., YAMAGUCHI, A., PERREM, K., KUBOTA, Y., LU, K. P. UND AOKI, I. (2005): *Stable suppression of tumorigenicity by Pin1-targeted RNA interference in prostate cancer*. *Clinical Cancer Research*, 11: 7523-7531.
- [159] FUJIMORI, F., TAKAHASHI, K., UCHIDA, C. UND UCHIDA, T. (1999): *Mice lacking Pin1 develop normally, but are defective in entering cell cycle from G(0) arrest*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 265: 658-663.
- [160] XU, G. G. UND ETZKORN, F. A. (2009): *Pin1 as an anticancer drug target*. *Drug News & Perspectives*, 22: 399-407.

- [161] MOORE, J. D. UND POTTER, A. (2013): *Pin1 inhibitors: pitfalls, progress and cellular pharmacology*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 23: 4283-4291.
- [162] GUO, C., HOU, X., DONG, L., DAGOSTINO, E., GREASLEY, S., FERRE, R., MARAKOVITS, J., JOHNSON, M. C., MATTHEWS, D., MROCKZOWSKI, B., PARGE, H., VANARSDALE, T., POPOFF, I., PIRAINO, J., MARGOSIAK, S., THOMSON, J., LOS, G. UND MURRAY, B. W. (2009): *Structure-based design of novel human Pin1 inhibitors (I)*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 19: 5613-5616.
- [163] POTTER, A. J., RAY, S., GUERITZ, L., NUNNS, C. L., BRYANT, C. J., SCRACE, S. F., MATASSOVA, N., BAKER, L., DOKURNO, P., ROBINSON, D. A., SURGENOR, A. E., DAVIS, B., MURRAY, J. B., RICHARDSON, C. M. UND MOORE, J. D. (2010): *Structure-guided design of α -amino acid-derived Pin1 inhibitors*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 20: 586-590.
- [164] DONG, L., MARAKOVITS, J., HOU, X., GUO, C., GREASLEY, S., DAGOSTINO, E., FERRE, R., JOHNSON, M. C., KRAYNOV, E., THOMSON, J., PATHAK, V. UND MURRAY, B. W. (2010): *Structure-based design of novel human Pin1 inhibitors (II)*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 20: 2210-2214.
- [165] POTTER, A. J., OLDFIELD, V., NUNNS, C., FROMONT, C., RAY, S., NORTHFIELD, C. J., BRYANT, C. J., SCRACE, S. F., ROBINSON, D., MATOSSOVA, N., BAKER, L., DOKURNO, P., SURGENOR, A. E., DAVIS, B., RICHARDSON, C. M., MURRAY, J. B. UND MOORE, J. D. (2010): *Discovery of cell-active phenyl-imidazole Pin1 inhibitors by structure-guided fragment evolution*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 20: 6483-6488.
- [166] HENNIG, L., CHRISTNER, C., KIPPING, M., SCHELBERT, B., RÜCKNAGEL, K. P., GRABLEY, S., KÜLLERTZ, G. UND FISCHER, G. (1998): *Selective inactivation of parvulin-like peptidyl-prolyl cis/trans isomerases by juglone*. Biochemistry, 37: 5953-5960.
- [167] URUSOVA, D. V., SHIM, J. H., KIM, D. J., JUNG, S. K., ZYKOVA, T. A., CARPER, A., BODE, A. M. UND DONG, Z. (2011): *Epigallocatechin-gallate suppresses tumorigenesis by directly targeting Pin1*. Cancer Prevention Research, 4: 1366-1377.
- [168] ZHANG, Y., FÜSSEL, S., REIMER, U., SCHUTKOWSKI, M. UND FISCHER, G. (2002): *Substrate-based design of reversible Pin1 inhibitors*. Biochemistry, 41: 11868-11877.
- [169] WANG, X. D. J., XU, B. L., MULLINS, A. B., NEILER, F. K. UND ETZKORN, F. A. (2004): *Conformationally locked isostere of phosphoSer-cis-Pro inhibits Pin1 23-fold better than phosphoSer-trans-Pro isostere*. Journal of the American Chemical Society, 126: 15533-15542.
- [170] ZHAO, S. UND ETZKORN, F. A. (2007): *A phosphorylated prodrug for the inhibition of Pin1*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 17: 6615-6618.
- [171] XU, G. G., ZHANG, Y., MERCEDES-CAMACHO, A. Y. UND ETZKORN, F. A. (2011): *A reduced-amide inhibitor of Pin1 binds in a conformation resembling a twisted-amide transition state*. Biochemistry, 50: 9545-9550.
- [172] LIU, T., LIU, Y., KAO, H. Y. UND PEI, D. H. (2010): *Membrane permeable cyclic peptidyl inhibitors against human peptidylprolyl isomerase Pin1*. Journal of Medicinal Chemistry, 53: 2494-2501.
- [173] DUNCAN, K. E., DEMPSEY, B. R., KILLIP, L. E., ADAMS, J., BAILEY, M. L., LAJOIE, G. A., LITCHFIELD, D. W., BRANDL, C. J., SHAW, G. S. UND SHILTON, B. H. (2011): *Discovery and characterization of a nonphosphorylated cyclic peptide inhibitor of the peptidylprolyl isomerase, Pin1*. Journal of Medicinal Chemistry, 54: 3854-3865.
- [174] WILDEMANN, D., ERDMANN, F., ALVAREZ, B. H., STOLLER, G., ZHOU, X. Z., FANGHÄNEL, J., SCHUTKOWSKI, M., LU, K. P. UND FISCHER, G. (2006): *Nanomolar inhibitors of the peptidyl prolyl cis/trans isomerase Pin1 from combinatorial peptide libraries*. Journal of Medicinal Chemistry, 49: 2147-2150.
- [175] ZHANG, Y., DAUM, S., WILDEMANN, D., ZHOU, X. Z., VERDECIA, M. A., BOWMAN, M. E., LUCKE, C., HUNTER, T., LU, K. P., FISCHER, G. UND NOEL, J. P. (2007): *Structural basis for high-affinity peptide inhibition of human Pin1*. ACS Chemical Biology, 2: 320-328.
- [176] BIERER, B. E., MATTILA, P. S., STANDAERT, R. F., HERZENBERG, L. A., BURAKOFF, S. J., CRABTREE, G. UND SCHREIBER, S. L. (1990): *Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87: 9231-9235.
- [177] ROSEN, M. K., STANDAERT, R. F., GALAT, A., NAKATSUKA, M. UND SCHREIBER, S. L. (1990): *Inhibition of FKBP rotamase activity by immunosuppressant FK506: twisted amide surrogate*. Science, 248: 863-866.
- [178] ALBERS, M. W., WALSH, C. T. UND SCHREIBER, S. L. (1990): *Substrate specificity for the human rotamase FKBP: a view of FK506 and rapamycin as leucine-(twisted amide)-proline mimics*. Journal of Organic Chemistry, 55: 4984-4986.
- [179] XU, G. G. UND ETZKORN, F. A. (2010): *Convergent synthesis of α -ketoamide inhibitors of Pin1*. Organic Letters, 12: 696-699.
- [180] DAUM, S., ERDMANN, F., FISCHER, G., FÉAUX DE LACROIX, B., HESSAMIAN-ALINEJAD, A., HOUBEN, S., FRANK, W. UND BRAUN, M. (2006): *Aryl indanyl ketones: efficient inhibitors of the human peptidyl prolyl cis/trans isomerase Pin1*. Angewandte Chemie International Edition, 45: 7454-7458.

- [181] XU, G. G., SLEBODNICK, C. UND ETZKORN, F. A. (2012): *Cyclohexyl ketone inhibitors of Pin1 dock in a trans-diaxial cyclohexane conformation*. PLoS One, 7: e44226.
- [182] YEH, E. S. UND MEANS, A. R. (2007): *PIN1, the cell cycle and cancer*. Nature Reviews Cancer, 7: 381-388.
- [183] COSTA, A. UND ONESTI, S. (2008): *The MCM complex: (just) a replicative helicase?* Biochemical Society Transactions, 36: 136-140.
- [184] ONESTI, S. UND MACNEILL, S. A. (2013): *Structure and evolutionary origins of the CMG complex*. Chromosoma, 122: 47-53.
- [185] ILVES, I., PETOJEVIC, T., PESAVENTO, J. J. UND BOTCHAN, M. R. (2010): *Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins*. Molecular Cell, 37: 247-258.
- [186] AVES, S. J., LIU, Y. UND RICHARDS, T. A. (2012): *Evolutionary diversification of eukaryotic DNA replication machinery*. Subcellular Biochemistry, 62: 19-35.
- [187] LIU, Y., RICHARDS, T. A. UND AVES, S. J. (2009): *Ancient diversification of eukaryotic MCM DNA replication proteins*. BMC Evolutionary Biology, 9: 60.
- [188] FORSBURG, S. L. (2004): *Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 68: 109-131.
- [189] BOCHMAN, M. L., BELL, S. P. UND SCHWACHA, A. (2008): *Subunit organization of Mcm2-7 and the unequal role of active sites in ATP hydrolysis and viability*. Molecular and Cellular Biology, 28: 5865-5873.
- [190] COSTA, A., ILVES, I., TAMBERG, N., PETOJEVIC, T., NOGALES, E., BOTCHAN, M. R. UND BERGER, J. M. (2011): *The structural basis for MCM2-7 helicase activation by GINS and Cdc45*. Nature Structural & Molecular Biology, 18: 471-477.
- [191] SUN, J., EVRIN, C., SAMEL, S. A., FERNANDEZ-CID, A., RIERA, A., KAWAKAMI, H., STILLMAN, B., SPECK, C. UND LI, H. (2013): *Cryo-EM structure of a helicase loading intermediate containing ORC-Cdc6-Cdt1-MCM2-7 bound to DNA*. Nature Structural & Molecular Biology, 20: 944-951.
- [192] LI, H. UND STILLMAN, B. (2012): *The origin recognition complex: a biochemical and structural view*. Subcellular Biochemistry, 62: 37-58.
- [193] TSAKRAKLIDES, V. UND BELL, S. P. (2010): *Dynamics of pre-replicative complex assembly*. Journal of Biological Chemistry, 285: 9437-9443.
- [194] EVRIN, C., CLARKE, P., ZECH, J., LURZ, R., SUN, J. C., UHLE, S., LI, H. L., STILLMAN, B. UND SPECK, C. (2009): *A double-hexameric MCM2-7 complex is loaded onto origin DNA during licensing of eukaryotic DNA replication*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106: 20240-20245.
- [195] REMUS, D., BEURON, F., TOLUN, G., GRIFFITH, J. D., MORRIS, E. P. UND DIFFLEY, J. F. X. (2009): *Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing*. Cell, 139: 719-730.
- [196] FRIGOLA, J., REMUS, D., MEHANNA, A. UND DIFFLEY, J. F. X. (2013): *ATPase-dependent quality control of DNA replication origin licensing*. Nature, 495: 339-343.
- [197] KUIPERS, M. A., STASEVICH, T. J., SASAKI, T., WILSON, K. A., HAZELWOOD, K. L., MCNALLY, J. G., DAVIDSON, M. W. UND GILBERT, D. M. (2011): *Highly stable loading of Mcm proteins onto chromatin in living cells requires replication to unload*. Journal of Cell Biology, 192: 29-41.
- [198] BOCHMAN, M. L. UND SCHWACHA, A. (2007): *Differences in the single-stranded DNA binding activities of MCM2-7 and MCM467: MCM2 and MCM5 define a slow ATP-dependent step*. Journal of Biological Chemistry, 282: 33795-33804.
- [199] BOCHMAN, M. L. UND SCHWACHA, A. (2008): *The Mcm2-7 complex has in vitro helicase activity*. Molecular Cell, 31: 287-293.
- [200] BOCHMAN, M. L. UND SCHWACHA, A. (2010): *The Saccharomyces cerevisiae Mcm6/2 and Mcm5/3 ATPase active sites contribute to the function of the putative Mcm2-7 'gate'*. Nucleic Acids Research, 38: 6078-6088.
- [201] LI, J., DENG, M., WEI, Q., LIU, T., TONG, X. UND YE, X. (2011): *Phosphorylation of MCM3 protein by cyclin E/cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) regulates its function in cell cycle*. Journal of Biological Chemistry, 286: 39776-39785.
- [202] LIN, D. I., AGGARWAL, P. UND DIEHL, J. A. (2008): *Phosphorylation of MCM3 on Ser-112 regulates its incorporation into the MCM2-7 complex*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105: 8079-8084.
- [203] LABIB, K. (2010): *How do Cdc7 and cyclin-dependent kinases trigger the initiation of chromosome replication in eukaryotic cells?* Genes & Development, 24: 1208-1219.
- [204] SHEU, Y. J. UND STILLMAN, B. (2010): *The Dbf4-Cdc7 kinase promotes S phase by alleviating an inhibitory activity in Mcm4*. Nature, 463: 113-117.
- [205] DIFFLEY, J. F. X. (2004): *Regulation of early events in chromosome replication*. Current Biology, 14: R778-R786.

- [206] BLOW, J. J. UND DUTTA, A. (2005): *Preventing re-replication of chromosomal DNA*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 6: 476-486.
- [207] TANAKA, S., UMEMORI, T., HIRAI, K., MURAMATSU, S., KAMIMURA, Y. UND ARAKI, H. (2007): *CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast*. Nature, 445: 328-332.
- [208] NGUYEN, V. Q., CO, C. UND LI, J. J. (2001): *Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms*. Nature, 411: 1068-1073.
- [209] ILVES, I., TAMBERG, N. UND BOTCHAN, M. R. (2012): *Checkpoint kinase 2 (Chk2) inhibits the activity of the Cdc45/MCM2-7/GINS (CMG) replicative helicase complex*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109: 13163-13170.
- [210] RANDELL, J. C. W., FAN, A., CHAN, C., FRANCIS, L. I., HELLER, R. C., GALANI, K. UND BELL, S. P. (2010): *Mec1 is one of multiple kinases that prime the Mcm2-7 helicase for phosphorylation by Cdc7*. Molecular Cell, 40: 353-363.
- [211] CHUANG, L. C., TEIXEIRA, L. K., WOHLSCHEGEL, J. A., HENZE, M., YATES, J. R., MENDEZ, J. UND REED, S. I. (2009): *Phosphorylation of Mcm2 by Cdc7 promotes pre-replication complex assembly during cell-cycle re-entry*. Molecular Cell, 35: 206-216.
- [212] TSVETKOV, L. UND STERN, D. F. (2005): *Interaction of chromatin-associated Plk1 and Mcm7*. Journal of Biological Chemistry, 280: 11943-11947.
- [213] FITZGERALD, J., MURILLO, L. S., O'BRIEN, G., O'CONNELL, E., O'CONNOR, A., WU, K., WANG, G. N., RAINEY, M. D., NATONI, A., HEALY, S., O'DWYER, M. UND SANTOCANALE, C. (2014): *A high through-put screen for small molecules modulating MCM2 phosphorylation identifies Ryuvidine as an inducer of the DNA damage response*. PLoS One, 9: e98891.
- [214] BLOW, J. J. (1993): *Preventing re-replication of DNA in a single cell cycle: evidence for a replication licensing factor*. Journal of Cell Biology, 122: 993-1002.
- [215] CHONG, J. P., MAHBUBANI, H. M., KHOO, C. Y. UND BLOW, J. J. (1995): *Purification of an MCM-containing complex as a component of the DNA replication licensing system*. Nature, 375: 418-421.
- [216] MAIORANO, D., MOREAU, J. UND MECHALI, M. (2000): *XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in Xenopus laevis*. Nature, 404: 622-625.
- [217] DAS, M., SINGH, S., PRADHAN, S. UND NARAYAN, G. (2014): *MCM paradox: abundance of eukaryotic replicative helicases and genomic integrity*. Molecular Biology International, 2014: 574850.
- [218] KNOCKLEBY, J. W. UND LEE, H. (2010): *Same partners, different dance – Involvement of DNA replication proteins in centrosome regulation*. Cell Cycle, 9: 4487-4491.
- [219] STUERMER, A., HOEHN, K., FAUL, T., AUTH, T., BRAND, N., KNEISSL, M., PUTTER, V. UND GRUMMT, F. (2007): *Mouse pre-replicative complex proteins colocalise and interact with the centrosome*. European Journal of Cell Biology, 86: 37-50.
- [220] CHESNOKOV, I. N. (2007): *Multiple functions of the origin recognition complex*. International Review of Cytology, 256: 69-109.
- [221] FERGUSON, R. L. UND MALLER, J. L. (2008): *Cyclin E-dependent localization of MCM5 regulates centrosome duplication*. Journal of Cell Science, 121: 3224-3232.
- [222] FERGUSON, R. L., PASCREAU, G. UND MALLER, J. L. (2010): *The cyclin A centrosomal localization sequence recruits MCM5 and Orc1 to regulate centrosome reduplication*. Journal of Cell Science, 123: 2743-2749.
- [223] SHEN, M., STUKENBERG, P. T., KIRSCHNER, M. W. UND LU, K. P. (1998): *The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins*. Genes & Development, 12: 706-720.
- [224] BAYER, E., GOETTSCH, S., MUELLER, J. W., GRIEWEL, B., GUIBERMAN, E., MAYR, L. M. UND BAYER, P. (2003): *Structural analysis of the mitotic regulator hPin1 in solution: insights into domain architecture and substrate binding*. Journal of Biological Chemistry, 278: 26183-26193.
- [225] BAILEY, M. L., SHILTON, B. H., BRANDL, C. J. UND LITCHFIELD, D. W. (2008): *The dual histidine motif in the active site of Pin1 has a structural rather than catalytic role*. Biochemistry, 47: 11481-11489.
- [226] WANG, J. Z., LIN, T., TENG, T., XIE, S. S., ZHU, G. F. UND DU, L. F. (2011): *Spectroscopic studies on the irreversible heat-induced structural transition of Pin1*. Spectrochimica Acta Part A, 78: 142-147.
- [227] WANG, J. Z., LIN, T., ZHU, G. F. UND DU, L. F. (2010): *Stability of Pin1 as revealed by thermal and spectroscopic studies*. Journal of Molecular Structure, 975: 310-316.
- [228] JÄGER, M., DENDLE, M. UND KELLY, J. W. (2009): *Sequence determinants of thermodynamic stability in a WW domain – An all- β -sheet protein*. Protein Science, 18: 1806-1813.
- [229] SCHERER, W. F., SYVERTON, J. T. UND GEY, G. O. (1953): *Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix*. Journal of Experimental Medicine, 97: 695-710.
- [230] JORDAN, M. UND WURM, F. (2004): *Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate*. Methods, 33: 136-143.

- [231] GASTEIGER, E., HOOGLAND, C., GATTIKER, A., DUVAUD, S., WILKINS, M. R., APPEL, R. D. UND BAIROCH, A. (2005): *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server*. In: WALKER, J. M.: *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press: 571-607.
- [232] LAEMMLI, U. K. (1970): *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 227: 680-685.
- [233] FAIRBANKS, G., STECK, T. L. UND WALLACH, D. F. (1971): *Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane*. *Biochemistry*, 10: 2606-2617.
- [234] JANOWSKI, B., WÖLLNER, S., SCHUTKOWSKI, M. UND FISCHER, G. (1997): *A protease-free assay for peptidyl prolyl cis/trans isomerases using standard peptide substrates*. *Analytical Biochemistry*, 252: 299-307.
- [235] CHENG, Y. UND PRUSOFF, W. H. (1973): *Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction*. *Biochemical Pharmacology*, 22: 3099-3108.
- [236] KÜLLERTZ, G., LUTHE, S. UND FISCHER, G. (1998): *Semiautomated microtiter plate assay for monitoring peptidylprolyl cis/trans isomerase activity in normal and pathological human sera*. *Clinical Chemistry*, 44: 502-508.
- [237] SILVERSTEIN, T. P. (2012): *Fitting imidazole 1H NMR titration data to the Henderson-Hasselbalch equation*. *Journal of Chemical Education*, 89: 1474-1475.
- [238] PROKHOROVA, T. A. UND BLOW, J. J. (2000): *Sequential MCM/P1 subcomplex assembly is required to form a heterohexamer with replication licensing activity*. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 2491-2498.
- [239] ZHUO, S., CLEMENS, J. C., HAKES, D. J., BARFORD, D. UND DIXON, J. E. (1993): *Expression, purification, crystallization, and biochemical characterization of a recombinant protein phosphatase*. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 17754-17761.
- [240] FANGHÄNEL, J., AKIYAMA, H., UCHIDA, C. UND UCHIDA, T. (2006): *Comparative analysis of enzyme activities and mRNA levels of peptidyl prolyl cis/trans isomerases in various organs of wild type and Pin1-/- mice*. *FEBS Letters*, 580: 3237-3245.
- [241] DAUM, S. (2007): *Untersuchungen zur Modulation der humanen Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase Pin1*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- [242] WHITFIELD, M. L., SHERLOCK, G., SALDANHA, A. J., MURRAY, J. I., BALL, C. A., ALEXANDER, K. E., MATESE, J. C., PEROU, C. M., HURT, M. M., BROWN, P. O. UND BOTSTEIN, D. (2002): *Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors*. *Molecular Biology of the Cell*, 13: 1977-2000.
- [243] ISHIMI, Y., OKAYASU, I., KATO, C., KWON, H. J., KIMURA, H., YAMADA, K. UND SONG, S. Y. (2003): *Enhanced expression of Mcm proteins in cancer cells derived from uterine cervix*. *European Journal of Biochemistry*, 270: 1089-1101.
- [244] GREENFIELD, N. UND FASMAN, G. D. (1969): *Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation*. *Biochemistry*, 8: 4108-4116.
- [245] UVERSKY, V. N., LI, J. UND FINK, A. L. (2001): *Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human α -synuclein: a possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure*. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 44284-44296.
- [246] SCHWEERS, O., SCHONBRUNNHANEBECK, E., MARX, A. UND MANDELKOW, E. (1994): *Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for β -structure*. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 24290-24297.
- [247] NOY, G. P. UND WEISSBACH, A. (1977): *Hela cell DNA polymerases: the effect of cycloheximide in vivo and detection of a new form of DNA polymerase α* . *Biochimica et Biophysica Acta*, 477: 70-83.
- [248] ZHOU, P. (2004): *Determining protein half-lives*. *Methods in Molecular Biology*, 284: 67-77.
- [249] GALLUZZI, L., BRAVO-SAN PEDRO, J. M., VITALE, I., AARONSON, S. A., ABRAMS, J. M., ADAM, D., ALNEMRI, E. S., ALTUCCI, L., ANDREWS, D., ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI, M., BAEHRECKE, E. H., BAZAN, N. G., BERTRAND, M. J., BIANCHI, K., BLAGOSKLONNY, M. V., BLOMGREN, K., BORNER, C., BREDESEN, D. E., BRENNER, C., CAMPANELLA, M., CANDI, E., CECCONI, F., CHAN, F. K., CHANDEL, N. S., CHENG, E. H., CHIPUK, J. E., CIDLOWSKI, J. A., CIECHANOVER, A., DAWSON, T. M., DAWSON, V. L., DE LAURENZI, V., DE MARIA, R., DEBATIN, K. M., DI DANIELE, N., DIXIT, V. M., DYNLACHT, B. D., EL-DEIRY, W. S., FIMIA, G. M., FLAVELL, R. A., FULDA, S., GARRIDO, C., GOUGEON, M. L., GREEN, D. R., GRONEMEYER, H., HAJNOCZKY, G., HARDWICK, J. M., HENGARTNER, M. O., ICHIO, H., JOSEPH, B., JOST, P. J., KAUFMANN, T., KEPP, O., KLIONSKY, D. J., KNIGHT, R. A., KUMAR, S., LEMASTERS, J. J., LEVINE, B., LINKERMANN, A., LIPTON, S. A., LOCKSHIN, R. A., LOPEZ-OTIN, C., LUGLI, E., MADEO, F., MALORNI, W., MARINE, J. C., MARTIN, S. J., MARTINO, J. C., MEDEMA, J. P., MEIER, P., MELINO, S., MIZUSHIMA, N., MOLL, U., MUNOZ-PINEDO, C., NUNEZ, G., OBERST, A., PANARETAKIS, T., PENNINGER, J. M., PETER, M. E., PIACENTINI, M., PINTON, P., PREHN, J. H., PUTHALAKATH, H., RABINOVICH, G. A., RAVICHANDRAN, K. S., RIZZUTO, R., RODRIGUES, C. M., RUBINSZTEIN, D. C., RUDEL, T., SHI, Y., SIMON, H. U., STOCKWELL, B. R., SZABADKAI, G., TAIT, S. W., TANG, H. L., TAVERNARAKIS, N., TSUJIMOTO, Y., VANDEN BERGHE, T.,

- VANDENABEELE, P., VILLUNGER, A., WAGNER, E. F., WALCZAK, H., WHITE, E., WOOD, W. G., YUAN, J., ZAKERI, Z., ZHIVOTOVSKY, B., MELINO, G. UND KROEMER, G. (2015): *Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015*. Cell Death and Differentiation, 22: 58-73.
- [250] TAYLOR, R. C., CULLEN, S. P. UND MARTIN, S. J. (2008): *Apoptosis: controlled demolition at the cellular level*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 9: 231-241.
- [251] SHALINI, S., DORSTYN, L., DAWAR, S. UND KUMAR, S. (2015): *Old, new and emerging functions of caspases*. Cell Death and Differentiation, 22: 526-539.
- [252] SCHORIES, B., ENGEL, K., DORKEN, B., GOSSEN, M. UND BOMMERT, K. (2004): *Characterization of apoptosis-induced Mcm3 and Cdc6 cleavage reveals a proapoptotic effect for one Mcm3 fragment*. Cell Death and Differentiation, 11: 940-942.
- [253] SCHWAB, B. L., LEIST, M., KNIPPERS, R. UND NICOTERA, P. (1998): *Selective proteolysis of the nuclear replication factor MCM3 in apoptosis*. Experimental Cell Research, 238: 415-421.
- [254] RUDRABHATLA, P., ALBERS, W. UND PANT, H. C. (2009): *Peptidyl-prolyl isomerase 1 regulates protein phosphatase 2A-mediated topographic phosphorylation of neurofilament proteins*. Journal of Neuroscience, 29: 14869-14880.
- [255] HEDIGER, T., FRANK, W., SCHUMANN, M., FISCHER, G. UND BRAUN, M. (2012): *Aryl hetaryl ketones and thioketones as efficient inhibitors of peptidyl-prolyl cis-trans isomerases*. Chemistry & Biodiversity, 9: 2618-2634.
- [256] PIETRUSZKA, J., SIMON, R. C., KRUSKA, F. UND BRAUN, M. (2009): *Dynamic enzymatic kinetic resolution of methyl 2,3-dihydro-1H-indene-1-carboxylate*. European Journal of Organic Chemistry, 6217-6224.
- [257] INGHAM, R. J., COLWILL, K., HOWARD, C., DETTWILER, S., LIM, C. S., YU, J., HERSE, K., RAAIJMAKERS, J., GISH, G., MBAMALU, G., TAYLOR, L., YEUNG, B., VASSILOVSKI, G., AMIN, M., CHEN, F., MATSKOVA, L., WINBERG, G., ERNBERG, I., LINDING, R., O'DONNELL, P., STAROSTINE, A., KELLER, W., METALNIKOV, P., STARK, C. UND PAWSON, T. (2005): *WW domains provide a platform for the assembly of multiprotein networks*. Molecular and Cellular Biology, 25: 7092-7106.
- [258] MESSENGER, M. M., SAULNIER, R. B., GILCHRIST, A. D., DIAMOND, P., GORBSKY, G. J. UND LITCHFIELD, D. W. (2002): *Interactions between protein kinase CK2 and Pin1: Evidence for phosphorylation-dependent interactions*. Journal of Biological Chemistry, 277: 23054-23064.
- [259] MASAI, H., TANIYAMA, C., OGINO, K., MATSUI, E., KAKUSHO, N., MATSUMOTO, S., KIM, J. M., ISHII, A., TANAKA, T., KOBAYASHI, T., TAMAI, K., OHTANI, K. UND ARAI, K. (2006): *Phosphorylation of MCM4 by Cdc7 kinase facilitates its interaction with Cdc45 on the chromatin*. Journal of Biological Chemistry, 281: 39249-39261.
- [260] LINDQVIST, A., VAN ZON, W., KARLSSON ROSENTHAL, C. UND WOLTHUIS, R. M. (2007): *Cyclin B1-Cdk1 activation continues after centrosome separation to control mitotic progression*. PLoS Biology, 5: e123.
- [261] NURSE, P. (1990): *Universal control mechanism regulating onset of M-phase*. Nature, 344: 503-508.
- [262] GLOTZER, M., MURRAY, A. W. UND KIRSCHNER, M. W. (1991): *Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway*. Nature, 349: 132-138.
- [263] SHERR, C. J. (1993): *Mammalian G1 cyclins*. Cell, 73: 1059-1065.
- [264] DOXSEY, S., MCCOLLUM, D. UND THEURKAUF, W. (2005): *Centrosomes in cellular regulation*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 21: 411-434.
- [265] NIGG, E. A. (2002): *Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression?* Nature Reviews Cancer, 2: 815-825.
- [266] SALISBURY, J. L., D'ASSORO, A. B. UND LINGLE, W. L. (2004): *Centrosome amplification and the origin of chromosomal instability in breast cancer*. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 9: 275-283.
- [267] VANDRE, D. D., FENG, Y. UND DING, M. (2000): *Cell cycle-dependent phosphorylation of centrosomes: localization of phosphopeptide specific antibodies to the centrosome*. Microscopy Research and Technique, 49: 458-466.
- [268] HEMERLY, A. S., PRASANTH, S. G., SIDDIQUI, K. UND STILLMAN, B. (2009): *Orc1 controls centriole and centrosome copy number in human cells*. Science, 323: 789-793.
- [269] PRASANTH, S. G., PRASANTH, K. V., SIDDIQUI, K., SPECTOR, D. L. UND STILLMAN, B. (2004): *Human Orc2 localizes to centrosomes, centromeres and heterochromatin during chromosome inheritance*. EMBO Journal, 23: 2651-2663.
- [270] VOLKMER, R., TAPIA, V. UND LANDGRAF, C. (2012): *Synthetic peptide arrays for investigating protein interaction domains*. FEBS Letters, 586: 2780-2786.
- [271] DE, S., GREENWOOD, A. I., ROGALS, M. J., KOVRIGIN, E. L., LU, K. P. UND NICHOLSON, L. K. (2012): *Complete thermodynamic and kinetic characterization of the isomer-specific interaction between Pin1-WW domain and the amyloid precursor protein cytoplasmic tail phosphorylated at Thr668*. Biochemistry, 51: 8583-8596.
- [272] DAUM, S., LÜCKE, C., WILDEMANN, D. UND SCHIENE-FISCHER, C. (2007): *On the benefit of bivalency in peptide ligand/Pin1 interactions*. Journal of Molecular Biology, 374: 147-161.

- [273] GREENWOOD, A. I., ROGALS, M. J., DE, S., LU, K. P., KOVRIGIN, E. L. UND NICHOLSON, L. K. (2011): *Complete determination of the Pin1 catalytic domain thermodynamic cycle by NMR lineshape analysis*. Journal of Biomolecular NMR, 51: 21-34.
- [274] SCHUTKOWSKI, M., BERNHARDT, A., ZHOU, X. Z., SHEN, M., REIMER, U., RAHFELD, J. U., LU, K. P. UND FISCHER, G. (1998): *Role of phosphorylation in determining the backbone dynamics of the serine/threonine-proline motif and Pin1 substrate recognition*. Biochemistry, 37: 5566-5575.
- [275] MALEŠEVIĆ, M., SCHUMANN, M., JAHREIS, G., FISCHER, G. UND LÜCKE, C. (2012): *Design of cyclic peptides featuring proline predominantly in the cis conformation under physiological conditions*. ChemBioChem, 13: 2122-2127.
- [276] SCHUTKOWSKI, M., WOLLNER, S. UND FISCHER, G. (1995): *Inhibition of peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity by substrate analog structures: thioxo tetrapeptide-4-nitroanilides*. Biochemistry, 34: 13016-13026.
- [277] REIMER, U., SCHERER, G., DREWELLO, M., KRUBER, S., SCHUTKOWSKI, M. UND FISCHER, G. (1998): *Side-chain effects on peptidyl-prolyl cis/trans isomerisation*. Journal of Molecular Biology, 279: 449-460.
- [278] HARRISON, R. K. UND STEIN, R. L. (1992): *Mechanistic studies of enzymic and nonenzymic prolyl cis-trans isomerization*. Journal of the American Chemical Society, 114: 3464-3471.
- [279] REIMER, U., ELMOKDAD, N., SCHUTKOWSKI, M. UND FISCHER, G. (1997): *Intramolecular assistance of cis/trans isomerization of the histidine-proline moiety*. Biochemistry, 36: 13802-13808.
- [280] YUE, K. T., LEE, M., ZHENG, J. UND CALLENDER, R. (1991): *The determination of the pKa of histidine residues in proteins by Raman difference spectroscopy*. Biochimica et Biophysica Acta, 1078: 296-302.
- [281] SCHULTE, D., BURKHART, R., MUSAHL, C., HU, B., SCHLATTERER, C., HAMEISTER, H. UND KNIPPERS, R. (1995): *Expression, phosphorylation and nuclear localization of the human P1 protein, a homologue of the yeast Mcm 3 replication protein*. Journal of Cell Science, 108: 1381-1389.
- [282] COSTER, G., FRIGOLA, J., BEURON, F., MORRIS, E. P. UND DIFFLEY, J. F. (2014): *Origin licensing requires ATP binding and hydrolysis by the MCM replicative helicase*. Molecular Cell, 55: 666-677.
- [283] FERNANDEZ-CID, A., RIERA, A., TOGNETTI, S., HERRERA, M. C., SAMEL, S., EVRIN, C., WINKLER, C., GARDENAL, E., UHLE, S. UND SPECK, C. (2013): *An ORC/Cdc6/MCM2-7 complex is formed in a multistep reaction to serve as a platform for MCM double-hexamer assembly*. Molecular Cell, 50: 577-588.
- [284] WEINREICH, M., LIANG, C. UND STILLMAN, B. (1999): *The Cdc6p nucleotide-binding motif is required for loading Mcm proteins onto chromatin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96: 441-446.
- [285] TOKO, H., HARIHARAN, N., KONSTANDIN, M. H., ORMACHEA, L., MCGREGOR, M., GUDE, N. A., SUNDARARAMAN, B., JOYO, E., JOYO, A. Y., COLLINS, B., DIN, S., MOHSIN, S., UCHIDA, T. UND SUSSMAN, M. A. (2014): *Differential regulation of cellular senescence and differentiation by prolyl isomerase Pin1 in cardiac progenitor cells*. Journal of Biological Chemistry, 289: 5348-5356.
- [286] LU, K. P., FINN, G., LEE, T. H. UND NICHOLSON, L. K. (2007): *Prolyl cis-trans isomerization as a molecular timer*. Nature Chemical Biology, 3: 619-629.
- [287] MARIC, M., MACULINS, T., DE PICCOLI, G. UND LABIB, K. (2014): *Cdc48 and a ubiquitin ligase drive disassembly of the CMG helicase at the end of DNA replication*. Science, 346: 1253596.
- [288] MORENO, S. P., BAILEY, R., CAMPION, N., HERRON, S. UND GAMBUS, A. (2014): *Polyubiquitylation drives replisome disassembly at the termination of DNA replication*. Science, 346: 477-481.
- [289] YANG, H. C., CHUANG, J. Y., JENG, W. Y., LIU, C. I., WANG, A. H., LU, P. J., CHANG, W. C. UND HUNG, J. J. (2014): *Pin1-mediated Sp1 phosphorylation by CDK1 increases Sp1 stability and decreases its DNA-binding activity during mitosis*. Nucleic Acids Research, 42: 13573-13587.
- [290] SIEGRIST, R., ZÜRCHER, M., BAUMGARTNER, C., SEILER, P., DIEDERICH, F., DAUM, S., FISCHER, G., KLEIN, C., DANGL, M. UND SCHWAIGER, M. (2007): *A novel synthesis of highly substituted perhydroprolazines, perhydroindolizines, and pyrrolidines: inhibition of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase (PPIase) Pin1*. Helvetica Chimica Acta, 90: 217-259.
- [291] BAYER, E., THUTEWohl, M., CHRISTNER, C., TRADLER, T., OSTERKAMP, F., WALDMANN, H. UND BAYER, P. (2005): *Identification of hPin1 inhibitors that induce apoptosis in a mammalian Ras transformed cell line*. Chemical Communications, 28: 516-518.
- [292] GAITHER, L. A., BORAWSKI, J., ANDERSON, L. J., BALABANIS, K. A., DEVAY, P., JOBERTY, G., RAU, C., SCHIRLE, M., BOUWMEESTER, T., MICKANIN, C., ZHAO, S., VICKERS, C., LEE, L., DENG, G., BARYZA, J., FUJIMOTO, R. A., LIN, K., COMPTON, T. UND WIEDMANN, B. (2010): *Multiple cyclophilins involved in different cellular pathways mediate HCV replication*. Virology, 397: 43-55.
- [293] SHIRAKATA, Y., KOBAYASHI, M., OHTSUKA, K., SUGANO, M., TERAJIMA, H., IKAI, I., OKAJIMA, H., EGAWA, H., INOMATA, Y., INAMOTO, T., TANAKA, K. UND YAMAOKA, Y. (1995): *Inhibitory effect of plasma FKBP12 on immunosuppressive activity of FK506*. Transplantation, 60: 1582-1587.
- [294] KOHLER, K. UND SEITZ, H. (2012): *Validation processes of protein biomarkers in serum – A cross platform comparison*. Sensors, 12: 12710-12728.

- [295] VERMEULEN, M., HUBNER, N. C. UND MANN, M. (2008): *High confidence determination of specific protein-protein interactions using quantitative mass spectrometry*. Current Opinion in Biotechnology, 19: 331-337.
- [296] ALLAIN, F., BOUTILLON, C., MARILLER, C. UND SPIK, G. (1995): *Selective assay for CyPA and CyPB in human blood using highly specific anti-peptide antibodies*. Journal of Immunological Methods, 178: 113-120.
- [297] KIEFFER, L. J., THALHAMMER, T. UND HANDSCHUMACHER, R. E. (1992): *Isolation and characterization of a 40-kDa cyclophilin-related protein*. Journal of Biological Chemistry, 267: 5503-5507.
- [298] MI, H. F., KOPS, O., ZIMMERMANN, E., JASCHKE, A. UND TROPSCHUG, M. (1996): *A nuclear RNA-binding cyclophilin in human T cells*. FEBS Letters, 398: 201-205.
- [299] LIU, J., CHEN, C. M. UND WALSH, C. T. (1991): *Human and Escherichia coli cyclophilins: sensitivity to inhibition by the immunosuppressant cyclosporin A correlates with a specific tryptophan residue*. Biochemistry, 30: 2306-2310.
- [300] CHOUDHARY, C., KUMAR, C., GNAD, F., NIELSEN, M. L., REHMAN, M., WALTHER, T. C., OLSEN, J. V. UND MANN, M. (2009): *Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions*. Science, 325: 834-840.
- [301] LAMMERS, M., NEUMANN, H., CHIN, J. W. UND JAMES, L. C. (2010): *Acetylation regulates Cyclophilin A catalysis, immunosuppression and HIV isomerization*. Nature Chemical Biology, 6: 331-337.
- [302] ROPE, A. F., WANG, K., EVJENTH, R., XING, J., JOHNSTON, J. J., SWENSEN, J. J., JOHNSON, W. E., MOORE, B., HUFF, C. D., BIRD, L. M., CAREY, J. C., OPITZ, J. M., STEVENS, C. A., JIANG, T., SCHANK, C., FAIN, H. D., ROBISON, R., DALLEY, B., CHIN, S., SOUTH, S. T., PYSHER, T. J., JORDE, L. B., HAKONARSON, H., LILLEHAUG, J. R., BIESECKER, L. G., YANDELL, M., ARNESEN, T. UND LYON, G. J. (2011): *Using VAAST to identify an X-linked disorder resulting in lethality in male infants due to N-terminal acetyltransferase deficiency*. American Journal of Human Genetics, 89: 28-43.
- [303] STARHEIM, K. K., GEVAERT, K. UND ARNESEN, T. (2012): *Protein N-terminal acetyltransferases: when the start matters*. Trends in Biochemical Sciences, 37: 152-161.
- [304] MISUMI, S., FUCHIGAMI, T., TAKAMUNE, N., TAKAHASHI, I., TAKAMA, M. UND SHOJI, S. (2002): *Three isoforms of cyclophilin A associated with human immunodeficiency virus type 1 were found by proteomics by using two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*. Journal of Virology, 76: 10000-10008.
- [305] RAUTAJOKI, K., NYMAN, T. A. UND LAHESMAA, R. (2004): *Proteome characterization of human T helper 1 and 2 cells*. Proteomics, 4: 84-92.
- [306] HOLLEBEKE, J., VAN DAMME, P. UND GEVAERT, K. (2012): *N-terminal acetylation and other functions of Na-acetyltransferases*. Biological Chemistry, 393: 291-298.
- [307] ISHIKAWA, Y., WIRZ, J., VRANKA, J. A., NAGATA, K. UND BACHINGER, H. P. (2009): *Biochemical characterization of the prolyl 3-hydroxylase 1.cartilage-associated protein.cyclophilin B complex*. Journal of Biological Chemistry, 284: 17641-17647.
- [308] ALBERT, A., LAVOIE, S. UND VINCENT, M. (1999): *A hyperphosphorylated form of RNA polymerase II is the major interphase antigen of the phosphoprotein antibody MPM-2 and interacts with the peptidyl-prolyl isomerase Pin1*. Journal of Cell Science, 112: 2493-2500.
- [309] ZITA, M. M., MARCHIONNI, I., BOTTOS, E., RIGHI, M., DEL SAL, G., CHERUBINI, E. UND ZACCHI, P. (2007): *Post-phosphorylation prolyl isomerisation of gephyrin represents a mechanism to modulate glycine receptors function*. EMBO Journal, 26: 1761-1771.
- [310] CHU, K. L., LEW, Q. J., RAJASEGARAN, V., KUNG, J. T., ZHENG, L., YANG, Q., SHAW, R., CHEONG, N., LIOU, Y. C. UND CHAO, S. H. (2013): *Regulation of PRDX1 peroxidase activity by Pin1*. Cell Cycle, 12: 944-952.
- [311] VINAYAGAM, A., STELZL, U., FOULLE, R., PLASSMANN, S., ZENKNER, M., TIMM, J., ASSMUS, H. E., ANDRADE-NAVARRO, M. A. UND WANKER, E. E. (2011): *A directed protein interaction network for investigating intracellular signal transduction*. Science Signaling, 4: rs8.
- [312] YANG, W. W., ZHENG, Y. H., XIA, Y., JI, H. T., CHEN, X. M., GUO, F., LYSSIOS, C. A., ALDAPE, K., CANTLEY, L. C. UND LIU, Z. M. (2012): *ERK1/2-dependent phosphorylation and nuclear translocation of PKM2 promotes the Warburg effect*. Nature Cell Biology, 14: 1295-1304.
- [313] ENDOH, K., NISHI, M., ISHIGURO, H., UEMURA, H., MIYAGI, Y., AOKI, I., HIRANO, H., KUBOTA, Y. UND RYO, A. (2012): *Identification of phosphorylated proteins involved in the oncogenesis of prostate cancer via Pin1-proteomic analysis*. Prostate, 72: 626-637.

ANHANG

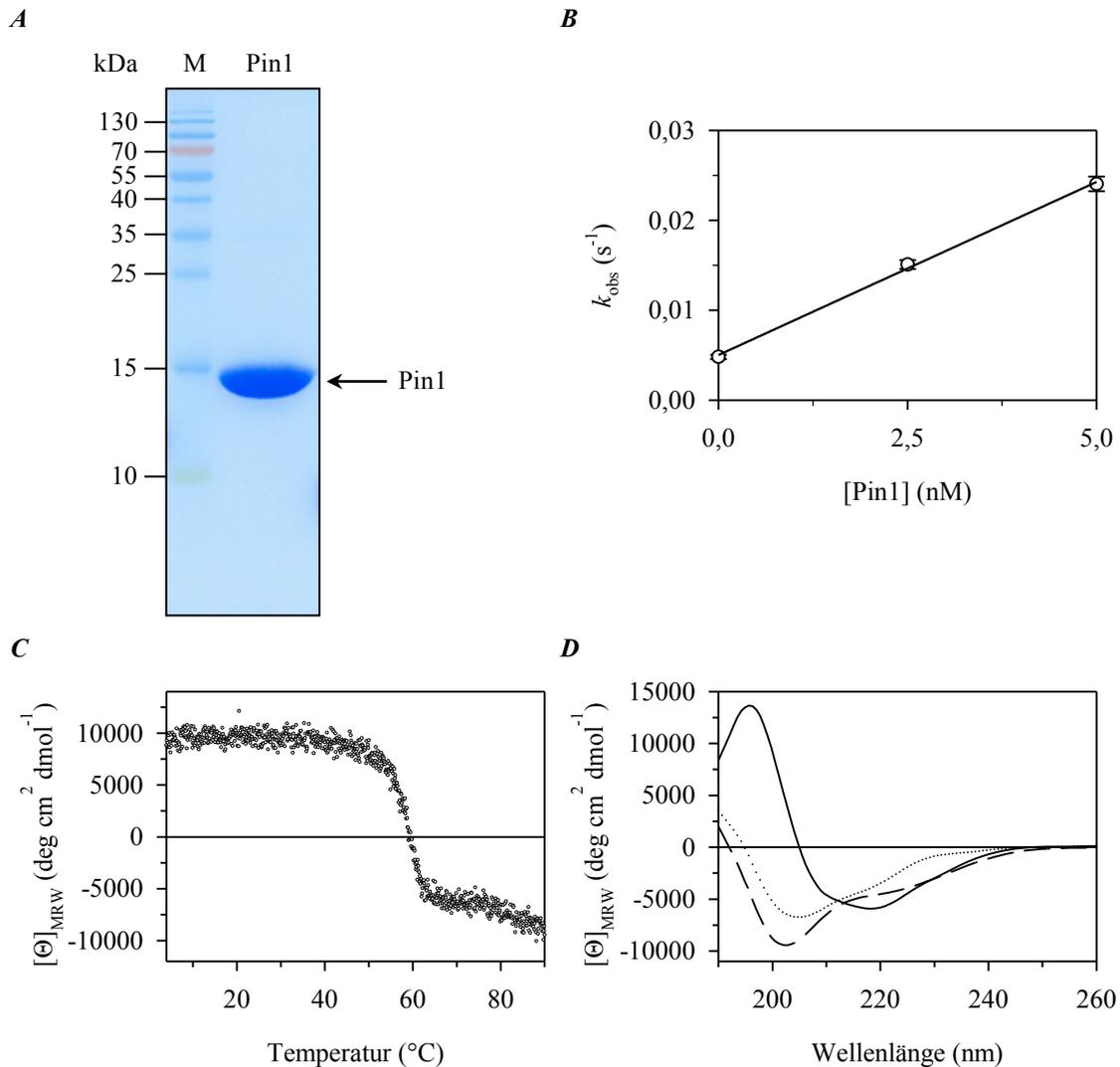


ABBILDUNG 43: ANALYSE VON REKOMBINANT HERGESTELLTEM, GEREINIGTEM PIN1 MITTELS SDS-PAGE (**A**), PPIASE-ASSAY (**B**) UND FERN-UV-CD-SPEKTROSKOPIE (**C**, **D**). **A**) Die Proteinprobe wurde zusammen mit einem Proteingrößenmarker (M) mittels SDS-PAGE (15 %) und anschließender Coomassie-Färbung untersucht. Pin1 (Pin1¹⁻¹⁶³) erscheint als einzelne Bande. Densitometrische Auswertung der Gelspur ergab einen Reinheitsgrad von Pin1 > 95 %. **B**) Die Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} der *cis/trans*-Isomerisierungen von 60 μM Suc-Ala-Glu-Pro-Phe-*p*NA wurden bei unterschiedlichen Pin1-Konzentrationen bestimmt. Die Messungen erfolgten im proteasefreien PPIase-Assay in Puffer 35 mM HEPES pH 7,8, 1 μM BSA bei einer Temperatur von 10 $^{\circ}\text{C}$. Die Messpunkte entsprechen Mittelwerten und den dazugehörigen Standardabweichungen aus drei Messungen. Durch lineare Regression (durchgezogene Linie) wurde ein $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ von $(3,85 \pm 0,15) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ermittelt. **C**) In einem Temperaturintervall von 4 $^{\circ}\text{C}$ bis 90 $^{\circ}\text{C}$ wurde die thermische Stabilität von 10 μM Pin1 verfolgt. Die Aufzeichnung der Messpunkte erfolgte bei einer Wellenlänge von 200 nm in Temperaturschritten von 0,1 $^{\circ}\text{C}$ in 5 mM Phosphatpuffer pH 7,5. Die dargestellten Messpunkte entsprechen dem arithmetischen Mittel aus drei voneinander unabhängigen Messungen. Anhand der Kurve lässt sich eine Temperatur für den Übergangspunkt von 58,6 $^{\circ}\text{C}$ ermitteln. Da der Vorgang irreversibel ist, handelt es sich dabei um einen apparenten Wert der von der Proteinkonzentration abhängig ist. Bei einer Temperatur von 4 $^{\circ}\text{C}$ (—), 90 $^{\circ}\text{C}$ (---) und nachfolgender Abkühlung auf 20 $^{\circ}\text{C}$ (·····) erfolgten Aufnahmen von Fern-UV-CD-Spektren des Proteins (**D**).

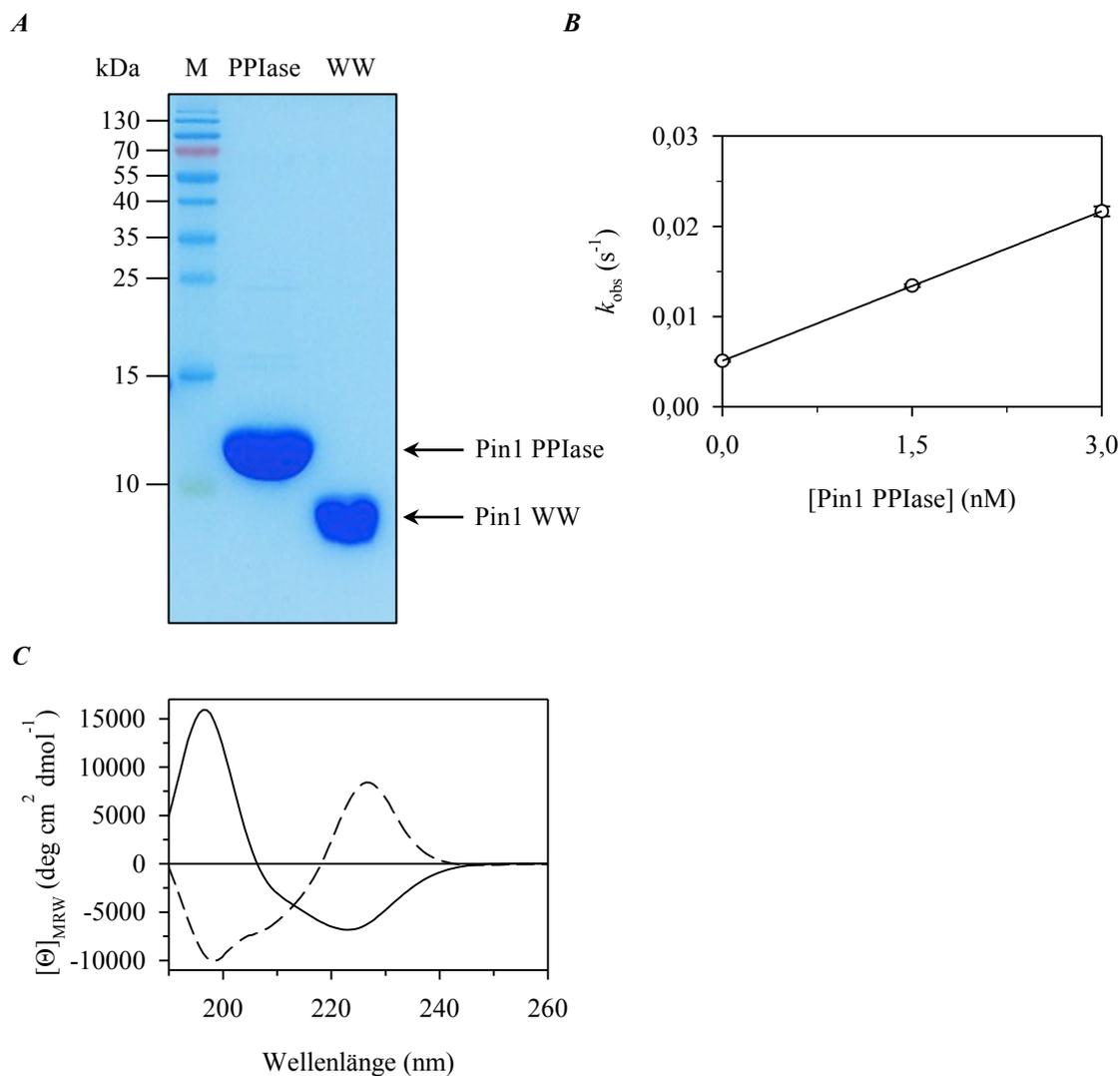


ABBILDUNG 44: ANALYSE VON REKOMBINANT HERGESTELLTEN, GEREINIGTEN PIN1-DOMÄNEN PIN1 WW UND PIN1 PPIASE. **A**) Die Proteinproben wurden zusammen mit einem Proteingrößenmarker (M) mittels SDS-PAGE (15 %) und anschließender Coomassie-Färbung untersucht. Die Pin1 WW (Pin1²⁻³⁹) und Pin1 PPIase (Pin1⁴⁵⁻¹⁶³) erscheinen als einzelne Banden. Densitometrische Auswertung der jeweiligen Gelspur ergab für das entsprechende Protein einen Reinheitsgrad > 95 %. **B**) Die Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} der *cis/trans*-Isomerisierungen von 60 μM Suc-Ala-Glu-Pro-Phe-*p*NA wurden bei unterschiedlichen Pin1 PPIase-Konzentrationen bestimmt. Die Messungen erfolgten im proteasefreien PPIase-Assay in Puffer 35 mM HEPES pH 7,8, 1 μM BSA bei einer Temperatur von 10 °C. Die Messpunkte entsprechen Mittelwerten und den dazugehörigen Standardabweichungen aus drei Messungen. Durch lineare Regression (durchgezogene Linie) wurde ein $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ von $(5,53 \pm 0,02) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ermittelt. **C**) Fern-UV-CD-Spektrum von 20 μM Pin1 WW (—) bzw. 10 μM Pin1 PPIase (- - -) in 5 mM Phosphatpuffer pH 7,5 bei einer Temperatur von 20 °C.

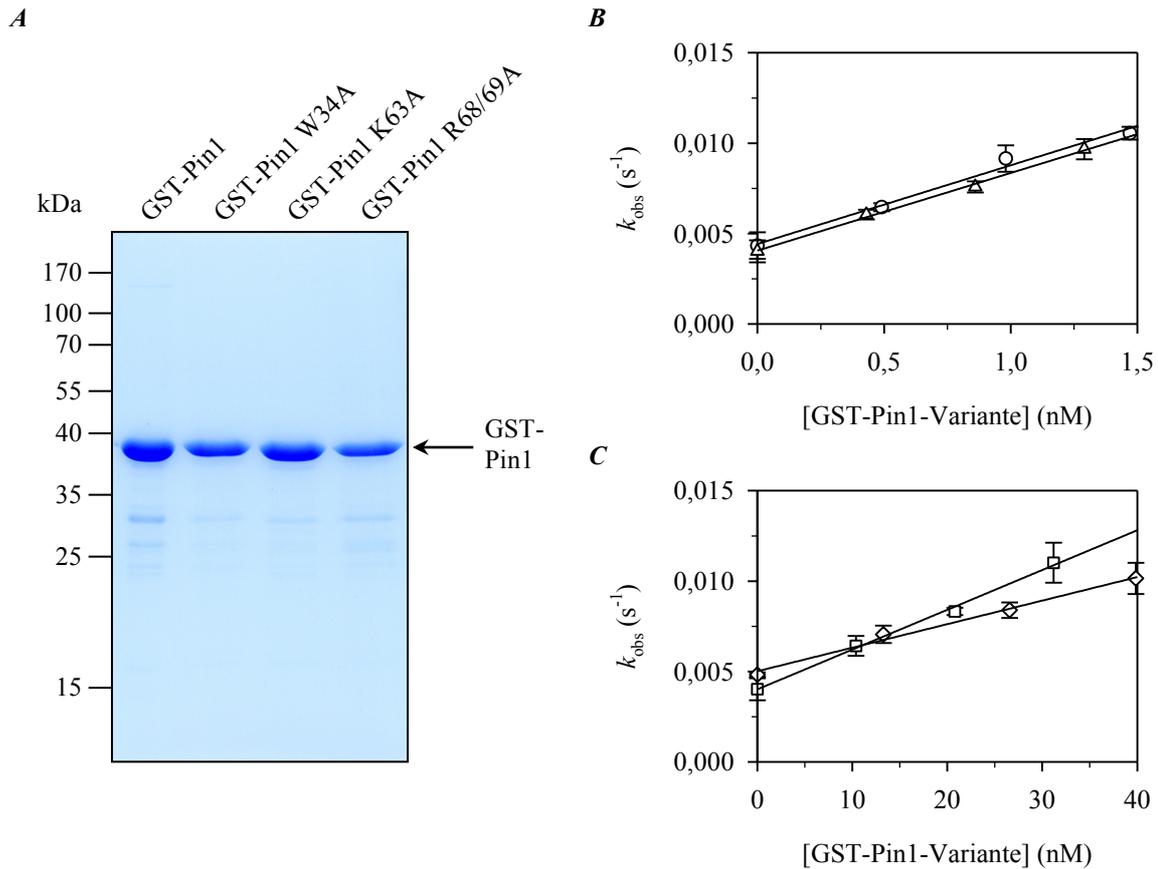


ABBILDUNG 45: ANALYSE DER GEREINIGTEN GST-PIN1-VARIANTEN, WELCHE REKOMBINANT AUS *E. COLI* GEWONNEN WURDEN. **A)** Eine Glutathion-Sepharose-Säule mit einem Säulenvolumen von 1 ml wurde mit GST-Pin1 bzw. GST-Pin1-Variante (W34A, K63A oder R68/69A) enthaltendem *E. coli*-Lysat beladen. Nach einem Waschschritt mit Puffer folgte die Elution mit einer Glutathion-Lösung (10 mM). Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE (12,5 %) und anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Densitometrische Auswertung der jeweiligen Gelspur ergab für das entsprechende Protein einen Reinheitsgrad > 90 %. **B)** Die Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} der *cis/trans*-Isomerisierungen von 60 μM Suc-Ala-Glu-Pro-Phe-*p*NA wurden bei unterschiedlichen Konzentrationen von GST-Pin1 (\circ) bzw. GST-Pin1 W34A (\triangle) bestimmt. Die Messungen erfolgten im proteasefreien PPIase-Assay in Puffer 35 mM HEPES pH 7,8, 1 μM BSA bei einer Temperatur von 10 °C. Die Messpunkte entsprechen Mittelwerten und den dazugehörigen Standardabweichungen aus jeweils drei Messungen. Durch lineare Regression (durchgezogene Linien) wurde ein $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ von $(4,35 \pm 0,26) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (GST-Pin1) bzw. $(4,30 \pm 0,12) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (GST-Pin1 W34A) ermittelt. **C)** Wie unter **B**, jedoch mit GST-Pin K63A (\square) bzw. GST-Pin R68/69A (\diamond) als Enzym. Durch lineare Regression (durchgezogene Linien) wurde ein $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ von $(0,22 \pm 0,01) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (GST-Pin1 K63A) bzw. $(0,13 \pm 0,01) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (GST-Pin1 R68/69A) ermittelt.

TABELLE 17: ERGEBNISSE MASSENSPEKTROMETRISCHER ANALYSEN DER GEREINIGTEN PROTEINE.

Protein	m/z _{theoretisch}	m/z _{bestimmt}
Pin1 (Pin1 ¹⁻¹⁶³)	18112,0 ^{a)}	18114
Pin1 PPIase (Pin1 ⁴⁵⁻¹⁶³)	13229,8 ^{a)}	13230
Pin1 WW (Pin1 ²⁻³⁹)	4467,9	4466
GST-Pin1	46348,8	46348
GST-Pin1 W34A	46233,7	46256 (Na ⁺ -Addukt)
GST-Pin1 K63A	46291,7	46318 (Na ⁺ -Addukt)
GST-Pin1 R68/69A	46178,6	46218
FLAG-MCM3	93032,8	^{b)}

^{a)} initiales Methionin fehlt, ^{b)} nur Peptidkartierung, Sequenzabdeckung: 71,5 %

TABELLE 18: MASSENSPEKTROMETRISCH IDENTIFIZIERTE PROTEINE AUS HELA-ZELLEN NACH PULL-DOWN MIT GST-PIN1.

UniProt- Eintrag ^{a)}	Proteinname ^{b)}	Molekül- masse ^{c)}	Anzahl Ser-Pro ^{d)}	Anzahl Thr-Pro ^{e)}	Referenz ^{f)}
P11021	78 kDa glucose-regulated protein	72333	0	3	^{g)}
Q9Y2D5	A-kinase anchor protein 2	94661	12	4	^{g)}
Q13085	Acetyl-CoA carboxylase 1	265554	14	9	^{g)}
P07355	Annexin A2	38604	1	2	^{g)}
O43776	Asparagine-tRNA ligase, cytoplasmic	62943	1	4	^{g)}
P53396	ATP-citrate synthase	120839	1	4	^{g)}
P27708	CAD protein	242984	3	13	^{g)}
A8K651	cDNA FLJ75700	31380	2	1	^{g)}
P53618	Coatomer subunit beta	107142	3	3	^{g)}
P35606	Coatomer subunit beta'	102487	2	2	^{g)}
O75534	Cold shock domain-containing protein E1	88885	4	2	^{g)}
A6NMQ1	DNA polymerase	166457	5	5	^{g)}
P28340	DNA polymerase delta catalytic subunit	123631	2	4	^{g)}
P49736	DNA replication licensing factor MCM2	101896	4	0	^{g)}
P25205	DNA replication licensing factor MCM3	90981	2	2	^{g)}
P33991	DNA replication licensing factor MCM4	96558	7	8	^{g)}
Q14566	DNA replication licensing factor MCM6	92889	2	2	^{g)}
P33993	DNA replication licensing factor MCM7	81308	3	1	^{g)}
P24928	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1	217176	110	20	[93, 308]
Q16643	Drebrin	71429	5	4	^{g)}
Q04637	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	175491	16	18	^{g)}
O14980	Exportin-1	123386	2	0	^{g)}
P15311	Ezrin	69413	0	1	^{g)}
Q96KU4	Gephyrin	79776	5	5	[309]
Q9HAV7	GrpE protein homolog 1, mitochondrial	24279	1	1	^{g)}
P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	70052/63937	0	1	^{g)}
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	70898	0	2	^{g)}
P09651	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	38846	1	0	^{g)}
P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	45672	1	0	^{g)}
P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	49229	2	0	[257]
P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	50976	4	0	[257]

Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	90584	2	0	[257]
P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	36006 37430	1	0	^{g)}
Q14974	Importin subunit beta-1	97170	1	0	^{g)}
A4QPBO	IQ motif containing GTPase activating protein 1	189280	5	3	^{g)}
O43813	LanC-like protein 1	45283	1	3	^{g)}
P35579	Myosin-9	226532	0	2	^{g)}
Q6IA16	NUCKS protein	18747	1	0	^{g)}
P67809	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	35924	0	0	^{g)}
P19338	Nucleolin	76614	2	8	^{g)}
Q06830	Peroxiredoxin-1	22110	0	1	[310]
P11940	Polyadenylate-binding protein 1	70671	5	1	[257]
Q6P2Q9	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	273600	6	7	[257]
Q15084	Protein disulfide-isomerase A6	48121	1	2	^{g)}
A4GYY8	Putative uncharacterized protein DKFZp686F17268	50263	2	2	^{g)}
P14618	Pyruvate kinase PKM	57937	1	0	[257, 311, 312]
Q68EM7	Rho GTPase-activating protein 17	95437	8	8	^{g)}
Q01130	Serine/arginine-rich splicing factor 2	25476	5	0	^{g)}
P37108	Signal recognition particle 14 kDa protein	14570	0	0	^{g)}
P38646	Stress-70 protein, mitochondrial	73680	1	2	^{g)}
Q9Y490	Talin-1	269767	9	3	^{g)}
O60343	TBC1 domain family member 4	146563	15	2	[257]
Q05BK6	TFG protein	40691	0	1	[257, 313]
A9CQZ8	Tight junction protein ZO-1	196815	15	12	^{g)}
Q7KZ85	Transcription elongation factor SPT6	199073	3	19	^{g)}
Q92616	Translational activator GCN1	292758	12	8	^{g)}
Q9Y5L0	Transportin-3	104203	3	1	^{g)}
Q2NKY5	TUBB6 protein	50090	1	1	^{g)}
Q71U36	Tubulin alpha-1A chain	50136	0	0	^{g)}
P68363	Tubulin alpha-1B chain	50152	0	0	^{g)}
P68366	Tubulin alpha-4A chain	48329	0	0	^{g)}
P07437	Tubulin beta chain	49671	1	1	^{g)}
P04350	Tubulin beta-4A chain	49586	1	1	^{g)}
P68371	Tubulin beta-4B chain	49831	1	1	^{g)}
Q3ZCM7	Tubulin beta-8 chain	49776	1	1	^{g)}
O75643	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	244508	5	4	[257]
Q59EM9	Ubiquitin C variant	147335	0	0	^{g)}
P08670	Vimentin	53652	1	0	^{g)}

^{a)} Eintrag in der Datenbank *UniProtKB* (<http://www.uniprot.org/uniprot/>), 08.12.2014. ^{b), c)} Angaben laut *UniProtKB* unter dem entsprechenden Eintrag (08.12.2014). ^{d), e)} Anzahl der Ser-Pro- bzw. Thr-Pro-Motive in der Primärstruktur des Proteins laut der Datenbank *ScanProsite* online abgerufen unter <http://prosite.expasy.org/scanprosite/>), 10.12.2014. Sofern mehrere Isoformen des jeweiligen Proteins existieren bezieht sich die Angabe auf die Isoform, mit „kanonischer“ Sequenz laut *UniProtKB*. ^{f)} Referenz für die Beschreibung des Proteins als Interaktionspartner von Pin1. ^{g)} Diese Arbeit.

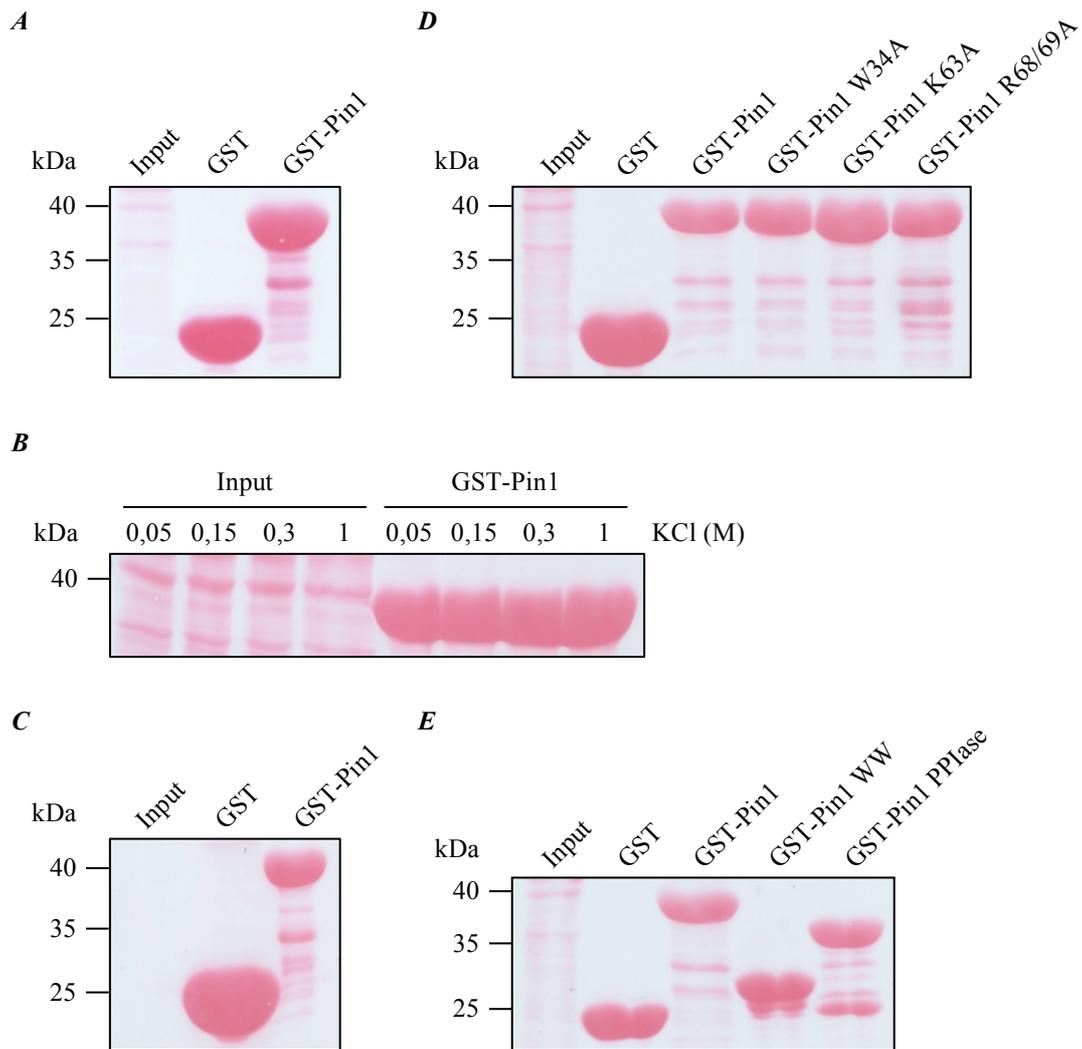


ABBILDUNG 46: LADEKONTROLLEN DIVERSEER PULL-DOWN-EXPERIMENTE (I). Die Proben wurden mittels SDS-PAGE separiert und anschließend durch Elektrotransfer auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Die Nitrocellulosemembranen wurden mit Ponceau S gefärbt. **A)** Pull-down von MCM-Proteinen mit GST-Pin1. **B)** Pull-down von MCM-Proteinen mit GST-Pin1 bei unterschiedlichen KCl-Konzentrationen. **C)** Pull-down von gereinigtem FLAG-MCM3 mit GST-Pin1. **D)** Pull-down von MCM3 mit GST-Pin1-Varianten. **E)** Pull-down von MCM3 mit GST-fusionierten Domänen von Pin1.

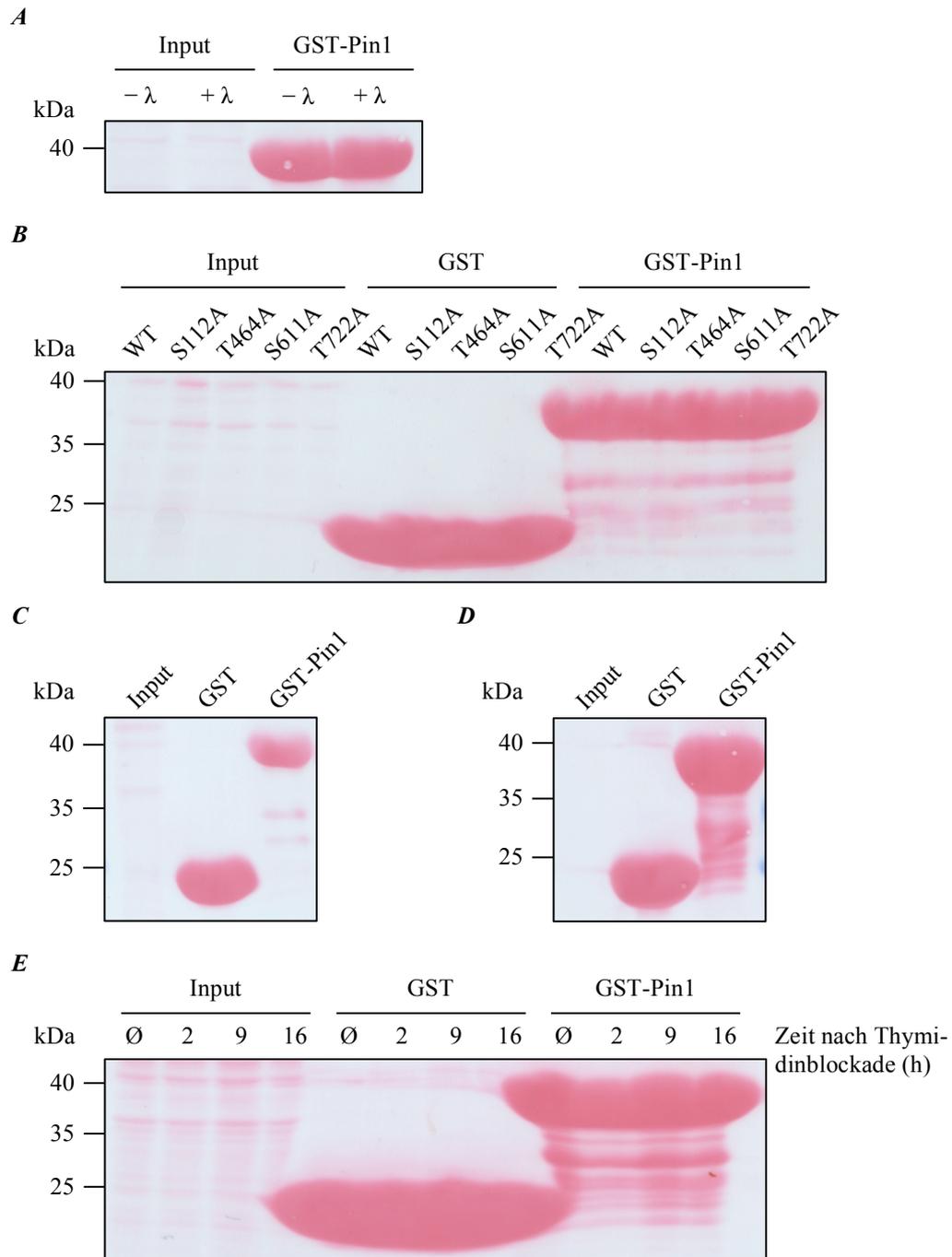


ABBILDUNG 47: LADEKONTROLLEN DIVERSER PULL-DOWN-EXPERIMENTE (II). Die Proben wurden mittels SDS-PAGE separiert und anschließend durch Elektrotransfer auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Die Nitrocellulosemembranen wurden mit Ponceau S gefärbt. **A)** Pull-down von MCM3 mit GST-Pin1 nach Phosphatasebehandlung des HeLa-Zelllysats. **B)** Pull-down von FLAG-MCM3-Varianten mit GST-Pin1. **C)** Pull-down von löslichem MCM3 mit GST-Pin1. **D)** Pull-down von chromatinassoziiertem MCM3 mit GST-Pin1. **E)** Pull-down von MCM3 mit GST-Pin1 zu verschiedenen Zeitpunkten im Zellzyklus.

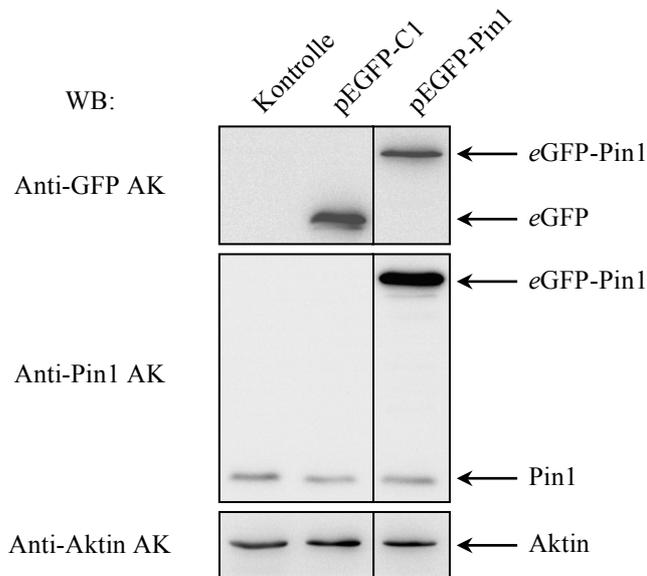


ABBILDUNG 48: ANALYSE VON REKOMBINANTEM *eGFP* UND *eGFP-PIN1* IN HELA-ZELLEN. HeLa-Zellen wurden mit dem Vektor pEGFP-C1 oder mit dem Vektor pEGFP-Pin1 transfiziert. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen mitgeführt. Die Zellen wurden 60 h nach der Transfektion geerntet und lysiert. Die Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE und anschließend Western Blot (WB) unter Verwendung spezifischer Antikörper (AK) analysiert. Als Ladekontrolle diente Aktin.

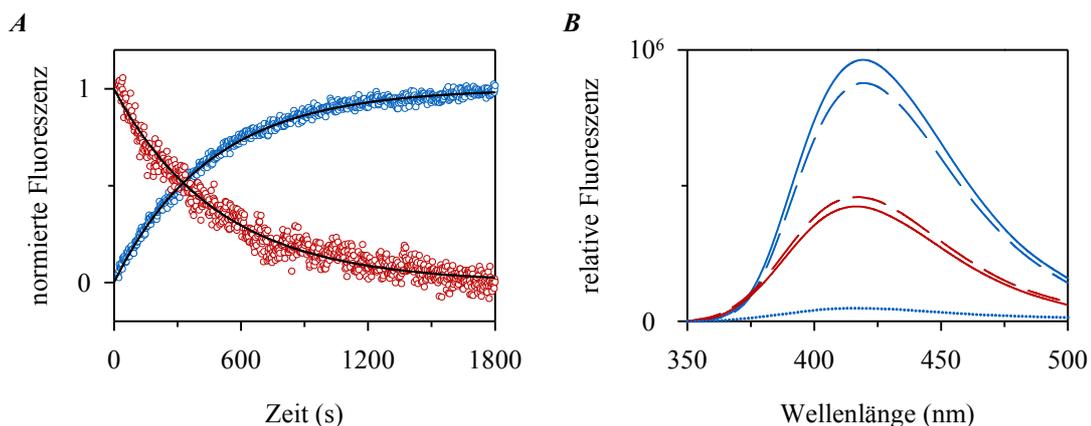


ABBILDUNG 49: FLUORESCENZBASIERTE ANALYSE DER *CIS/TRANS-ISOMERISIERUNG* VON **P3**. Die Messungen erfolgten in Messpuffer 35 mM HEPES pH 7,8 bei einer Temperatur von 10 °C mit 1 μ M **P3** im Messansatz. **A**) Die *cis/trans*-Isomerisierung von **P3** wurde mittels proteasegekoppeltem PPIase-Assay durch Proteolyse mit 1 mg/ml Trypsin als isomerspezifischer Protease (blaue Messpunkte, Anregungsspalbreite: 3 nm, Emissionsspalbreite: 5 nm) oder mittels proteasefreiem PPIase-Assay durch pH-Sprung (0,5 mM **P3** in 50 mM H_3PO_4 , pH 2,1 zu Messpuffer, rote Messpunkte, Anregungsspalbreite: 5 nm, Emissionsspalbreite: 20 nm) bei einer Emissionswellenlänge von 420 nm verfolgt (Anregungswellenlänge: 320 nm). Nichtlineare Regressionen der Messpunkte nach der Funktion für Reaktionen 1. Ordnung (schwarze Kurven) ergeben Geschwindigkeitskonstanten von $k_{0(cis)} = 2,21 \times 10^{-3} s^{-1}$ (direkt gemessene Geschwindigkeitskonstante für die *cis*→*trans*-Isomerisierung in Puffer) bzw. $k_0 = 2,03 \times 10^{-3} s^{-1}$ (im proteasefreien PPIase-Assay gemessene apparente Geschwindigkeitskonstante) **B**) Nach Anregung bei einer Wellenlänge von 320 nm wurden Fluoreszenzemissionsspektren von **P3** nach Proteolyse mit 1 mg/ml Trypsin (blaue Kurven, Anregungsspalbreite: 3 nm, Emissionsspalbreite: 5 nm) oder nach pH-Sprung (rote Kurven, Anregungsspalbreite: 5 nm, Emissionsspalbreite: 20 nm) aufgenommen. Es wurde jeweils ein Spektrum vor Proteasezugabe (·····), direkt nach Proteasezugabe bzw. pH-Auslenkung (---) und nach vollständiger Proteolyse bzw. Relaxation (—) aufgenommen. Alle Spektren wurden mit den jeweiligen Referenzspektren korrigiert.

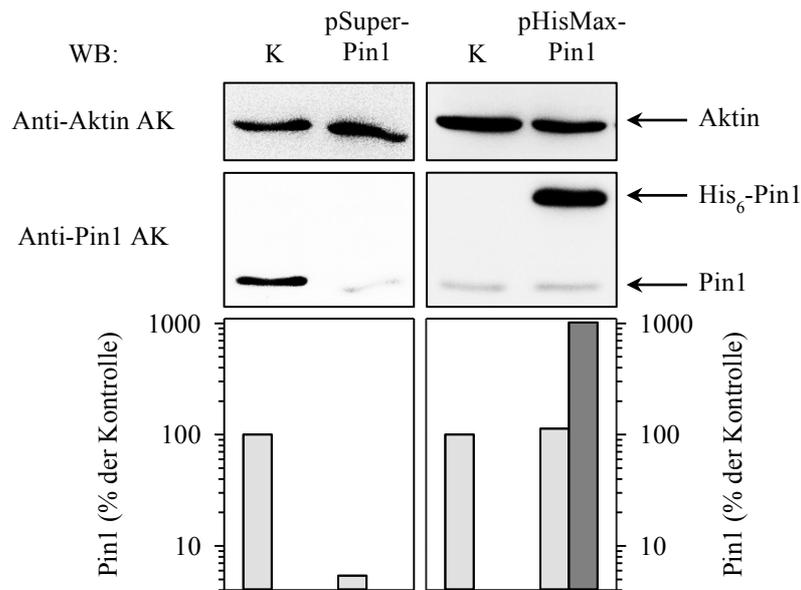


ABBILDUNG 50: ANALYSE DER VERRINGERUNG VON PIN1 DURCH RNAi BZW. DER HERSTELLUNG VON REKOMBINANTEM PIN1 IN HELA-ZELLEN. HeLa-Zellen wurden mit dem Vektor pSuper-Pin1 oder pHisMax-Pin1 bzw. mit dem entsprechenden Leervektor als Kontrolle (K) transfiziert. Die Zellen wurden 60 h nach der Transfektion geerntet und lysiert. Die Zellysate wurden mittels SDS-PAGE und anschließend Western Blot (WB) unter Verwendung von Anti-Pin1 Antikörpern (Anti-Pin1 AK) analysiert. Als Ladekontrolle diente Aktin. Die entsprechenden Banden für authentisches Pin1 (hellgraue Balken) sowie rekombinant hergestelltes Pin1 mit Hexahistidin-Fusion (His₆-Pin1, dunkelgrauer Balken) wurden densitometrisch ausgewertet und auf die Menge von authentischem Pin1 der entsprechenden Kontrolle bezogen.

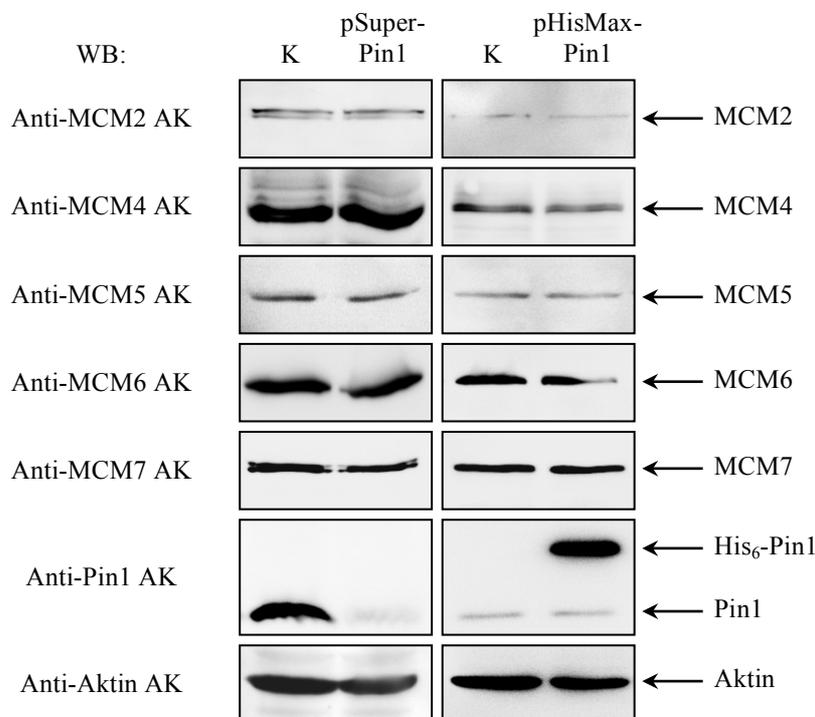


ABBILDUNG 51: EINFLUSS DER INTRAZELLULÄREN PIN1-MENGE AUF DEN MCM-PROTEINGEHALT VON HELA-ZELLEN. HeLa-Zellen wurden mit dem Vektor pSuper-Pin1 oder pHisMax-Pin1 bzw. mit dem entsprechenden Leervektor als Kontrolle (K) transfiziert. Die Zellen wurden 60 h nach der Transfektion geerntet und lysiert. Die Zellysate wurden mittels SDS-PAGE und anschließend Western Blot (WB) unter Verwendung spezifischer Antikörper (AK) analysiert. Als Ladekontrolle diente Aktin.

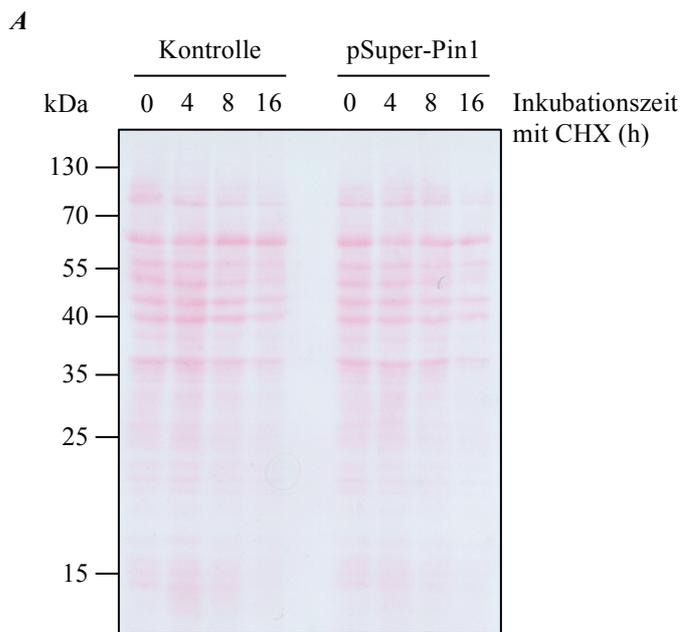


ABBILDUNG 52: EINFLUSS DER INTRAZELLULÄREN PIN1-MENGE AUF DIE STABILITÄT VON MCM3 (LADEKONTROLLEN). HeLa-Zellen wurden mit dem entsprechenden Leervektor als Kontrolle oder mit dem Vektor pSuper-Pin1 (**A**) bzw. pHisMax-Pin1 (**B**) transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit 200 µg/ml Cycloheximid (CHX) inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und lysiert. Die Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE separiert und anschließend durch Elektrotransfer auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Die Nitrocellulosemembranen wurden mit Ponceau S gefärbt. Die Abbildungen dienen als Ladekontrollen.

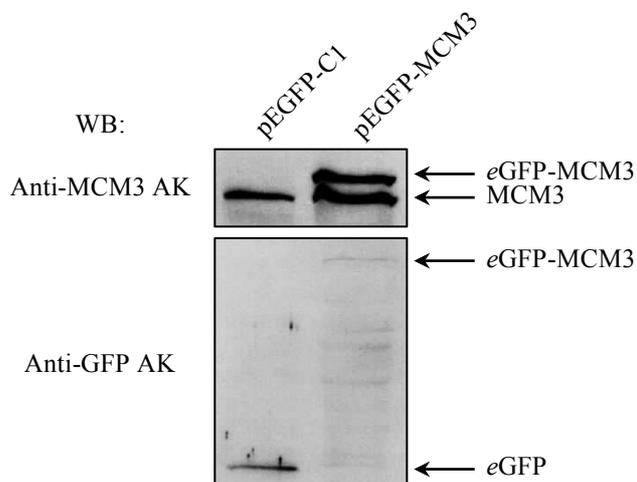
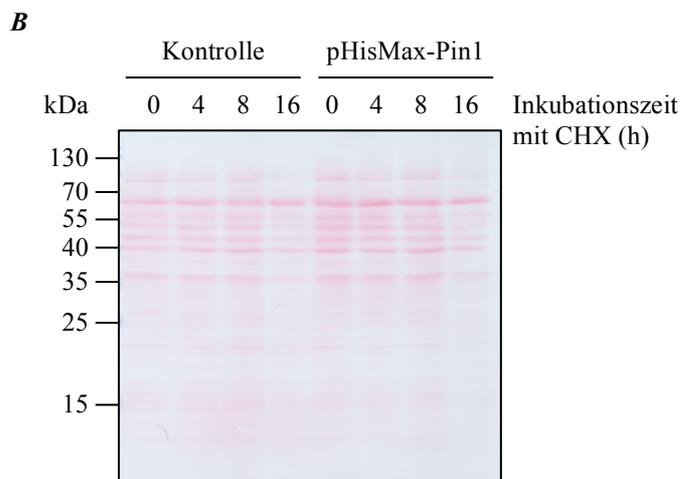
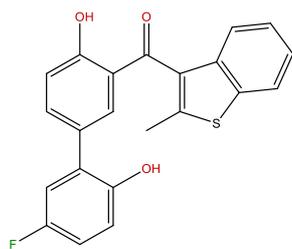


ABBILDUNG 53: ANALYSE VON REKOMBINANTEM eGFP UND eGFP-MCM3 IN HELA-ZELLEN. HeLa-Zellen wurden mit dem Vektor pEGFP-C1 oder mit dem Vektor pEGFP-MCM3 transfiziert. Die Zellen wurden 60 h nach der Transfektion geerntet und lysiert. Die Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot (WB) unter Verwendung spezifischer Antikörper (AK) analysiert.

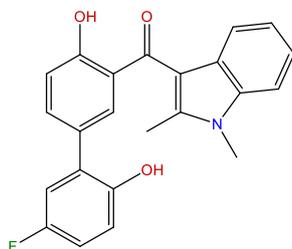
TABELLE 19: BRAUN-VERBINDUNGEN ALS PIN1-INHIBITOREN.

Name K_I , (IC_{50}) (μM)	Strukturformel	Name K_I , (IC_{50}) (μM)	Strukturformel
Br90 $4,1 \pm 0,6$		Br91 $5,9 \pm 0,7$	
Br93 $0,5 \pm 0,1$		Br101 $0,9 \pm 0,2$	
Br102 $3,7 \pm 0,8$		Br103 $(3,3 \pm 0,1)$	
Br105 $7,0 \pm 1,6$		Br106 $7,5 \pm 1,0$	
Br107 $26,7 \pm 4,7$		Br108 40 ± 9	
Br109 (S)-Enantio- mer > 100		Br110 > 100	

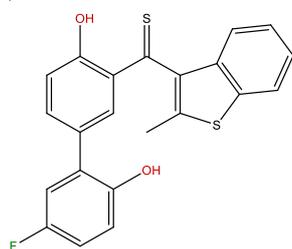
Br111
3,7 ± 0,7



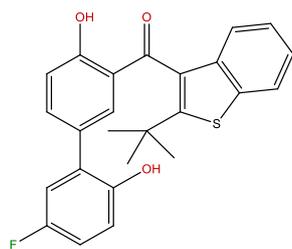
Br113
2,2 ± 0,5



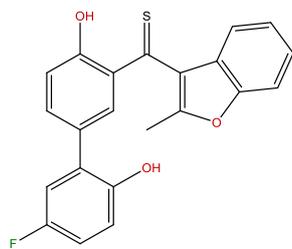
Br115
0,6 ± 0,2



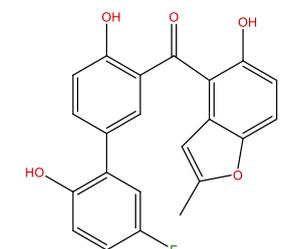
Br117
4,3 ± 0,5



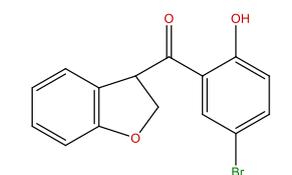
Br119
1,8 ± 0,2



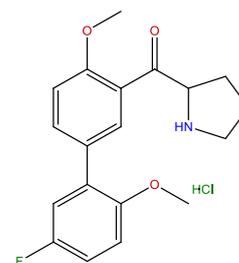
Br121
2,4 ± 0,2



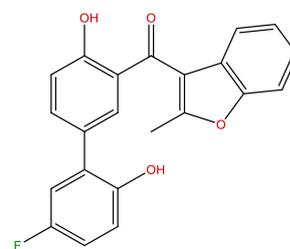
Br123
> 100



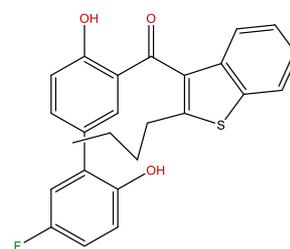
Br112
(Racemat)
> 100



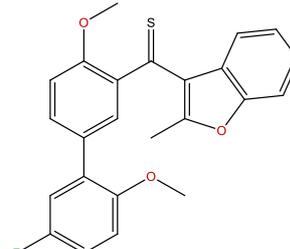
Br114
2,1 ± 0,3



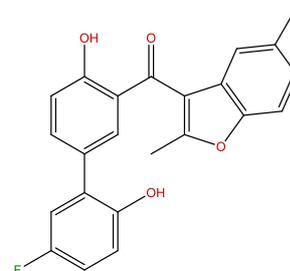
Br116
3,7 ± 0,9



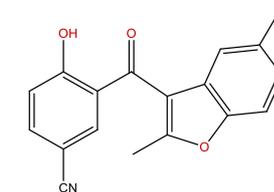
Br118
2,9 ± 0,3



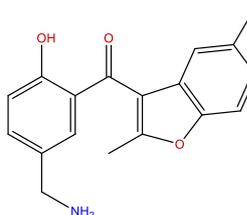
Br120
1,7 ± 0,4



Br122
> 100

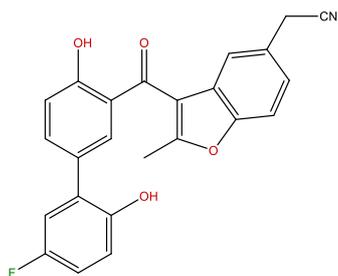


Br124
(> 100)

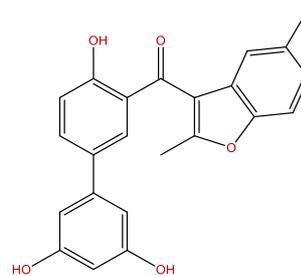


* HCl

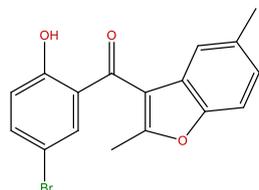
Br125
4,3 ± 0,8



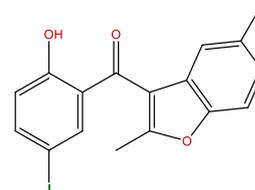
Br126
(> 10)



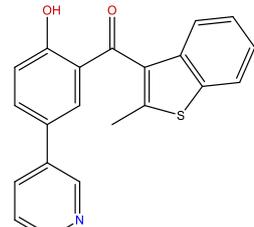
Br127
2,6 ± 0,3



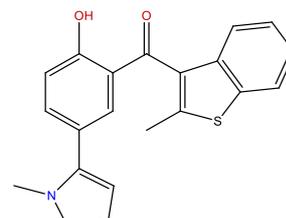
Br128
1,0 ± 0,1



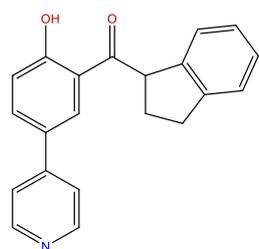
Br129
(> 10)



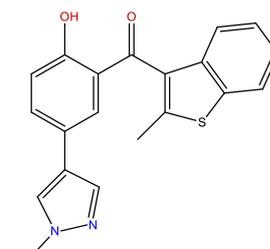
Br130
(> 10)



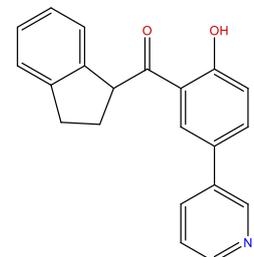
Br131
9,4 ± 0,9



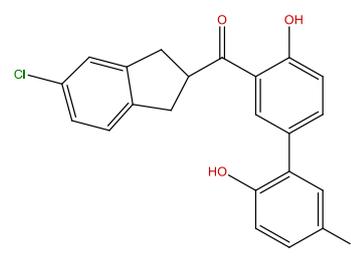
Br132
(> 10)



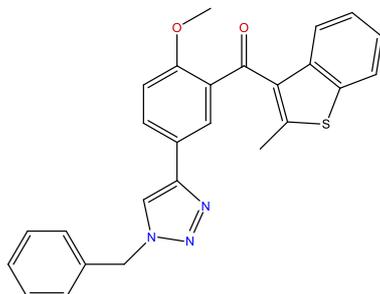
Br133
(> 10)



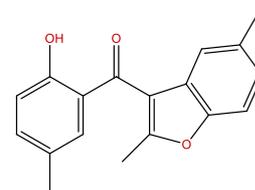
Br134
7,2 ± 0,8



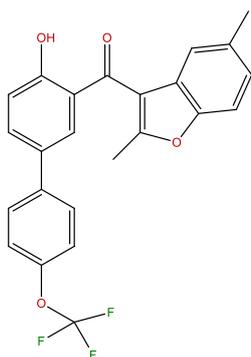
Br135
3,5 ± 0,5



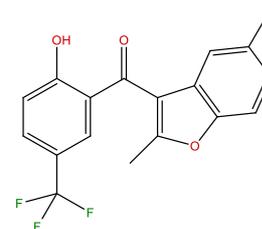
Br136
7,4 ± 1,1



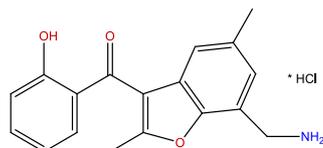
Br137
7,2 ± 0,8



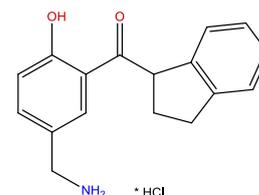
Br138
4,1 ± 0,6



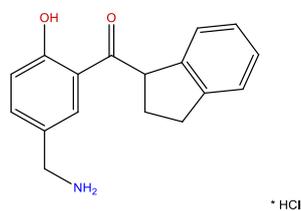
Br139
(> 100)



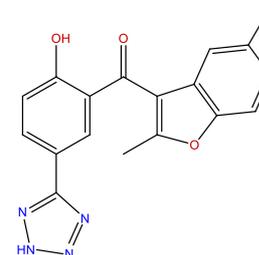
Br140
(> 100)



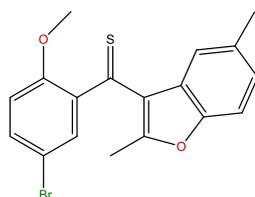
Br141
(≈ 100)



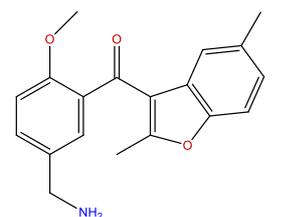
Br142
(≈ 50)



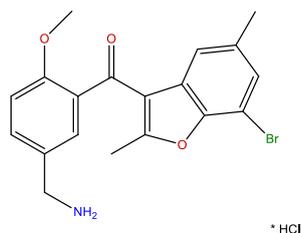
Br143
7,4 ± 1,5



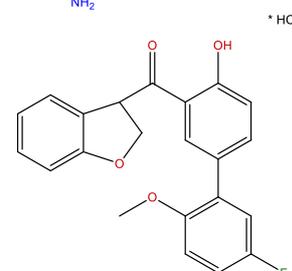
Br144
(> 100)



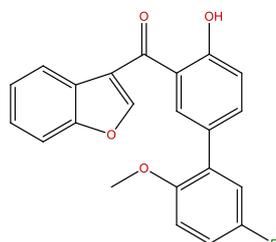
Br145
(> 100)



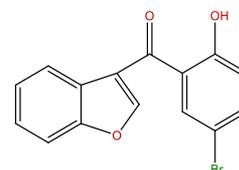
Br150
(> 10)



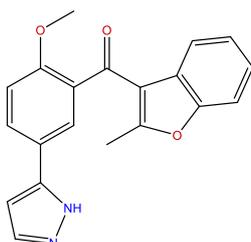
Br151
(> 10)



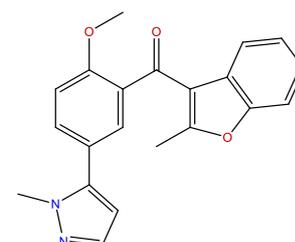
Br152
(> 10)



Br153
(> 10)



Br154
(> 10)



Namen und Strukturformeln der untersuchten niedermolekularen Substanzen (BRAUN-Verbindungen) sowie die dazugehörigen Inhibitionskonstanten K_1 bzw. IC_{50} -Werte gegenüber Pin1.

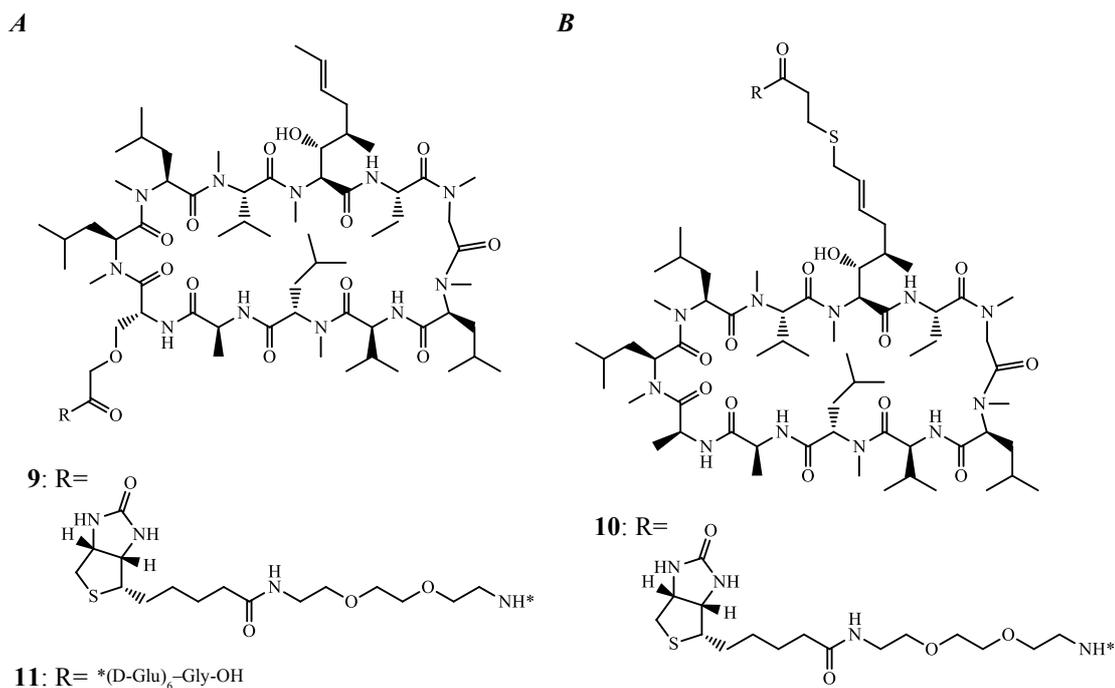


ABBILDUNG 54: CHEMISCHE STRUKTUREN DER VERWENDETEN CSA-DERIVATE **9** UND **11** (A) SOWIE **10** (B). Die Sterne kennzeichnen die Positionen an denen die Reste (R) mit den CsA-Ringstrukturen verknüpft sind.

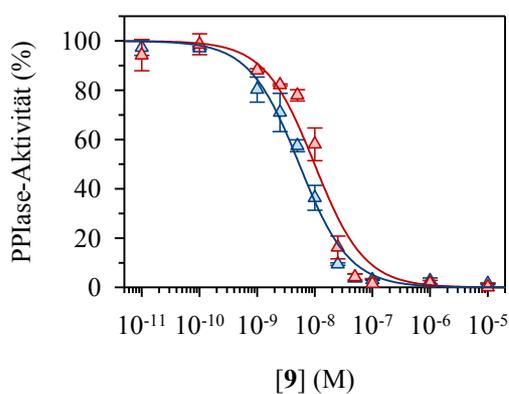


ABBILDUNG 55: INHIBIERUNG DER PPIASE-AKTIVITÄT VON CYPB BZW. CYP C MIT CSA-DERIVAT **9**. Die Geschwindigkeitskonstanten k_{enz} der Reaktionen (in % der Kontrolle) in Gegenwart von 0,5 nM CypB (blaue Dreiecke) bzw. 10 nM CypC (rote Dreiecke) wurden gegen die entsprechenden Inhibitorkonzentrationen aufgetragen. Durch nichtlineare Regressionen der Messwerte nach GLEICHUNG 5 ergeben sich IC_{50} -Werte von $5,4 \pm 0,5$ nM (CypB, blaue Linie) bzw. $9,9 \pm 1,6$ nM (CypC, rote Linie). Alle Messungen erfolgten im proteasegekoppelten PPIase-Assay in Puffer 10 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl und $53,4 \mu\text{M}$ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA als Substrat. Als isomerspezifische Protease diente α -Chymotrypsin. Die Datenpunkte entsprechen arithmetischen Mitteln und den dazugehörigen Standardabweichungen.

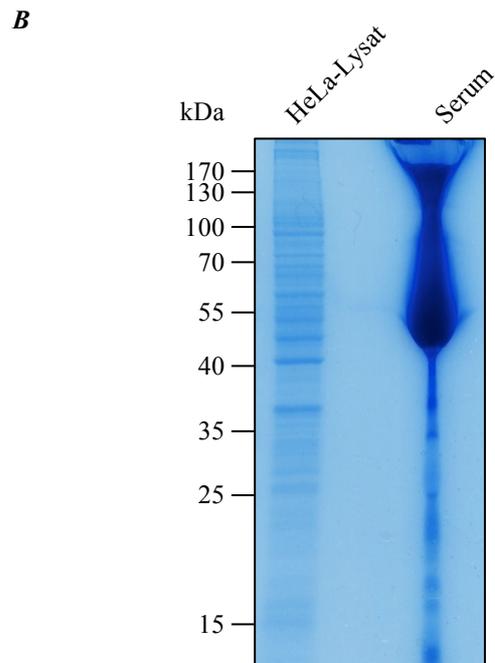
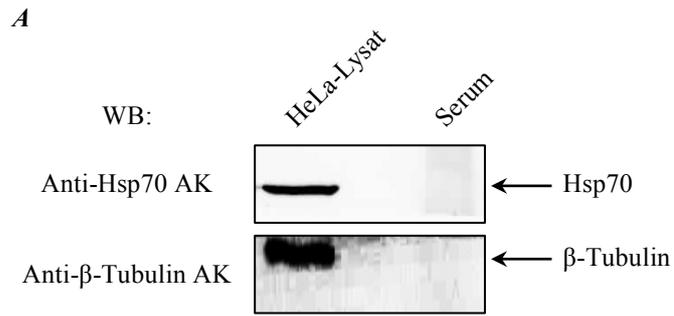


ABBILDUNG 56: ANALYSE ZELLULÄRER PROTEINE IN HUMANEM SERUM. HeLa-Lysat bzw. humanes Serum wurde mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot (WB) unter Verwendung spezifischer Antikörper (AK) auf das Vorhandensein von Hsp70 bzw. β-Tubulin analysiert (**A**). HeLa-Lysat bzw. humanes Serum wurde mittels SDS-PAGE (12,5 %) separiert. Die Coomassie-Färbung des Gels diente als Ladekontrolle (**B**).

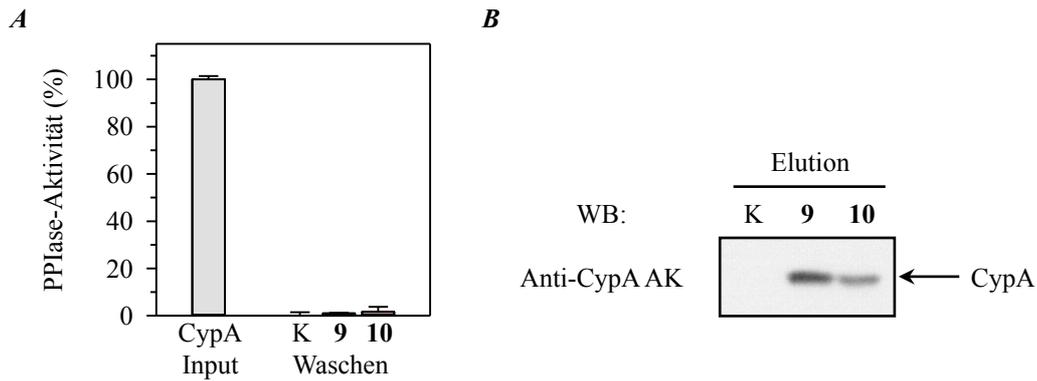


ABBILDUNG 57: PULL-DOWN VON CYP A MIT IMMOBILISIERTEN CSA-DERIVATEN. Streptavidin-Agarose wurde mit dem CsA-Derivat **9** bzw. **10** beladen. Als Kontrolle (K) diente unbeladene Streptavidin-Agarose. Nach zweimaligem Waschen mit Puffer erfolgte die Inkubation der Streptavidin-Agarose entweder mit rekombinant hergestelltem CypA in Puffer oder mit humanem Serum. Nach einem Waschschrift mit Puffer erfolgte die Elution mit SDS-Probenpuffer. **A**) Bestimmung der PPIase-Aktivität des Inputs und der Waschfraktionen nach Inkubation der Streptavidin-Agarose mit CypA. Die Messungen erfolgten im proteasegekoppelten PPIase-Assay in Puffer 10 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl und 53,4 μ M Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA als Substrat. Als isomerspezifische Protease diente α -Chymotrypsin. Die Datenpunkte entsprechen arithmetischen Mitteln und den dazugehörigen Standardabweichungen. Die Werte wurden auf die Aktivität des Inputs normiert. **B**) Die Elutionsfraktionen nach Inkubation der Streptavidin-Agarose mit Serum wurden mittels SDS-PAGE (15 %) und anschließend Western Blot (WB) unter Verwendung von spezifischen Anti-CypA Antikörpern (Anti-CypA AK) analysiert.

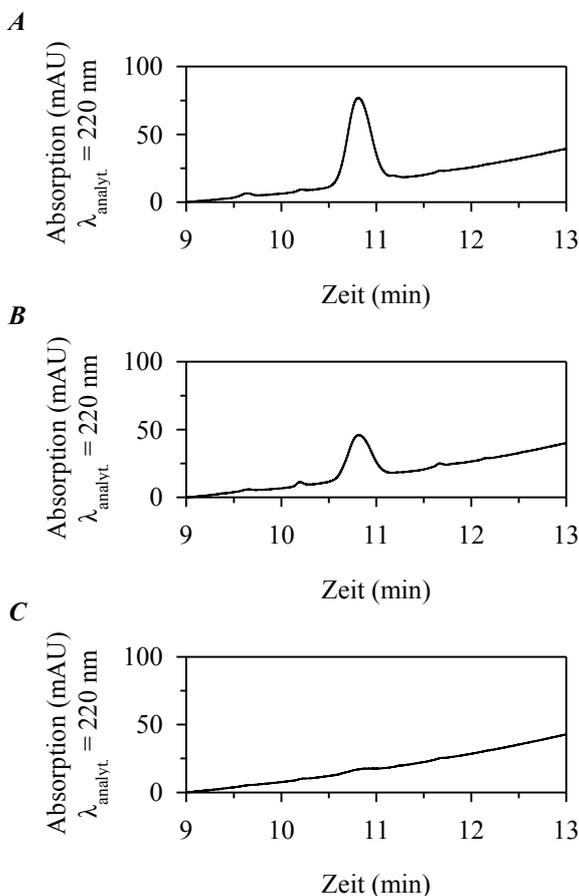


ABBILDUNG 58: UNTERSUCHUNG DER IMMOBILISIERUNG VON CSA-DERIVAT 9 AN STREPTAVIDIN-AGAROSE. Ein Volumen von 2 ml einer Lösung von 20 μ M CsA-Derivat **9** in Puffer 10 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl wurde mit 100 μ l Streptavidin-Agarose-Suspension inkubiert. Die Streptavidin-Agarose wurde anschließend mit Puffer gewaschen. Mittels HPLC wurde CsA-Derivat **9** bei einer Wellenlänge von 220 nm bei einer Retentionszeit von 10,807 min in den Lösungen vor (**A**) und nach (**B**) der Inkubation mit Streptavidin-Agarose sowie in der Lösung nach Waschen der Streptavidin-Agarose (**C**) analysiert. Die Daten wurden für die Darstellung normiert. Die Integration der Fläche des Peaks von **9** ergab eine Menge von 100 % (**A**) bzw. 48,3 % (**B**).

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. G. FISCHER danke ich, dass er mir dieses interessante Forschungsthema überlassen hat und mir ermöglichte, diese Arbeit unter exzellenten Forschungsbedingungen an der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung anzufertigen.

Frau Dr. C. SCHIENE-FISCHER danke ich für die Betreuung meiner Arbeit, für die stete Diskussionsbereitschaft, dem großen Interesse am Fortgang der Arbeit sowie etlichen Ratschlägen, die zur Fertigstellung dieser Arbeit beitrugen.

Herrn Prof. Dr. M. BRAUN und Herrn Dr. T. HEDIGER danke ich für die Synthese und Bereitstellung der Arylindanylketone, Biarylindanylketone und Thioketone.

Herrn Dr. M. MALEŠEVIĆ danke ich für die außerordentlich gute Zusammenarbeit in den verschiedenen Forschungsprojekten sowie für die Synthese und die Überlassung vieler Peptide, membrangebundener Peptidbibliotheken und CsA-Derivate.

Frau Dr. V. KAHLERT danke ich für die Synthese und Bereitstellung der CsA-Derivate und Herrn Dr. E. PRELL danke ich für die Serumpräparation.

Frau Dr. A. SCHIERHORN, Herrn Prof. Dr. W. HAEHNEL[†], Frau Prof. Dr. A. SINZ und Herrn Dr. C. H. IHLING danke ich für die massenspektrometrischen Analysen.

Herrn Dr. S. MATHEA danke ich für die Hilfe bei der Konfokalmikroskopie und Zytometrie.

Herrn PD Dr. R. GOLBIK danke ich sehr für die äußerst hilfreichen wissenschaftlichen Dialoge und kritischen Betrachtungen zur Datenauswertung.

Herrn E. HINZE danke ich freundschaftlich für die vielen Gespräche und Unterstützungen bei zahlreichen Experimenten, insbesondere bei den kalorimetrischen Messungen.

Frau Dr. M. FROST, Herrn Dr. S. DAUM, Herrn Dr. M. LIEBSCHER, Herrn Dr. T. AUMÜLLER, Herrn M. TRÄGER, Herrn M. VILLMOW sowie Herrn H. HOFFMANN danke ich für die zahlreichen Hinweise und Ratschläge im Rahmen der wissenschaftlichen Arbeit.

Frau B. KORGE, Frau T. CSERMÁK und Herrn D. TÄNZLER danke ich herzlich für die Hilfe und Unterstützung im Laboralltag.

Allen Mitgliedern der Forschungseinrichtung danke ich für das freundliche Arbeitsklima.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Frau, meinen Geschwistern und meinen Freunden, die mich während meiner Ausbildungszeit immer unterstützten und motivierten und damit die vorliegende Arbeit erst ermöglichten.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN:

Michael Georg Schumann
geboren am 03.12.1981 in Rodewisch (Sachsen)
wohnhaft in Halle (Saale)
verheiratet

SCHULBILDUNG:

08/1994 – 07/2000

Christoph-Graupner-Gymnasium in Kirchberg,
Abschluss: Abitur

GRUNDWEHRDIENST:

11/2000 – 08/2001

Versorgungskompanie 370 in Schneeberg

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG:

10/2001 – 12/2006

Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Anfertigung der Diplomarbeit an der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle (Saale) zum Thema: „Interaktion von PPIasen mit p53“,
Abschluss: Diplom-Biologe

01/2007 – 07/2015

Promotionsstudent an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Anfertigung der Dissertation an der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle (Saale) unter Anleitung von Prof. Dr. G. FISCHER zum Thema: „Untersuchungen zu Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen – Interaktionen mit Zielproteinen und Inhibitoren“

BERUFSPRAXIS:

01/2007 – 12/2012

Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle (Saale)

Halle (Saale), 01.07.2015

Michael Georg Schumann

PUBLIKATIONEN

MALEŠEVIĆ, M., GUTKNECHT, D., PRELL, E., KLEIN, C., SCHUMANN, M., NOWAK, R. A., SIMON, J. C., SCHIENE-FISCHER, C. und SAALBACH, A. (2013): *Anti-inflammatory effects of extracellular cyclosporins are exclusively mediated by CD147*. Journal of Medicinal Chemistry, 56: 7302-7311.

HEDIGER, T., FRANK, W., SCHUMANN, M., FISCHER, G. und BRAUN, M. (2012): *Aryl hetaryl ketones and thioketones as efficient inhibitors of peptidyl-prolyl cis-trans isomerases*. Chemistry & Biodiversity, 9: 2618-2634.

MALEŠEVIĆ, M., SCHUMANN, M., JAHREIS, G., FISCHER, G. und LÜCKE, C. (2012): *Design of cyclic peptides featuring proline predominantly in the cis conformation under physiological conditions*. ChemBioChem, 13: 2122-2127.

SCHUMANN, M., JAHREIS, G., KAHLERT, V., LÜCKE, C. und FISCHER, G. (2011): *Oligopeptide cyclophilin inhibitors: a reassessment*. European Journal of Medicinal Chemistry, 46: 5556-5561.

BAUM, N., SCHIENE-FISCHER, C., FROST, M., SCHUMANN, M., SABAPATHY, K., OHLENSCHLÄGER, O., GROSSE, F. und SCHLOTT, B. (2009): *The prolyl cis/trans isomerase cyclophilin 18 interacts with the tumor suppressor p53 and modifies its functions in cell cycle regulation and apoptosis*. Oncogene, 28: 3915-3925.

DAUM, S., SCHUMANN, M., MATHEA, S., AUMÜLLER, T., BALSLEY, M. A., CONSTANT, S. L., DE LACROIX, B. F., KRUSKA, F., BRAUN, M. und SCHIENE-FISCHER, C. (2009): *Isoform-specific inhibition of cyclophilins*. Biochemistry, 48: 6268-6277.

SCHUMANN, M., MALEŠEVIĆ, M., MATHEA, S., HAEHNEL, W. und SCHIENE-FISCHER, C. (2013): *Regulation of MCM3 chromatin binding by the prolyl isomerase Pin1*. Poster auf dem International symposium on cyclophilins and other foldases: cell signaling catalysts and drug targets. Halle (Saale), 19.-21. Sept. 2013.

EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden nicht benutzt. Die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde von mir an keiner anderen Einrichtung zur Bewerbung um einen Doktorgrad eingereicht. Ich habe mich bislang noch nicht um einen Doktorgrad beworben.

Halle (Saale), 01.07.2015

Michael Georg Schumann