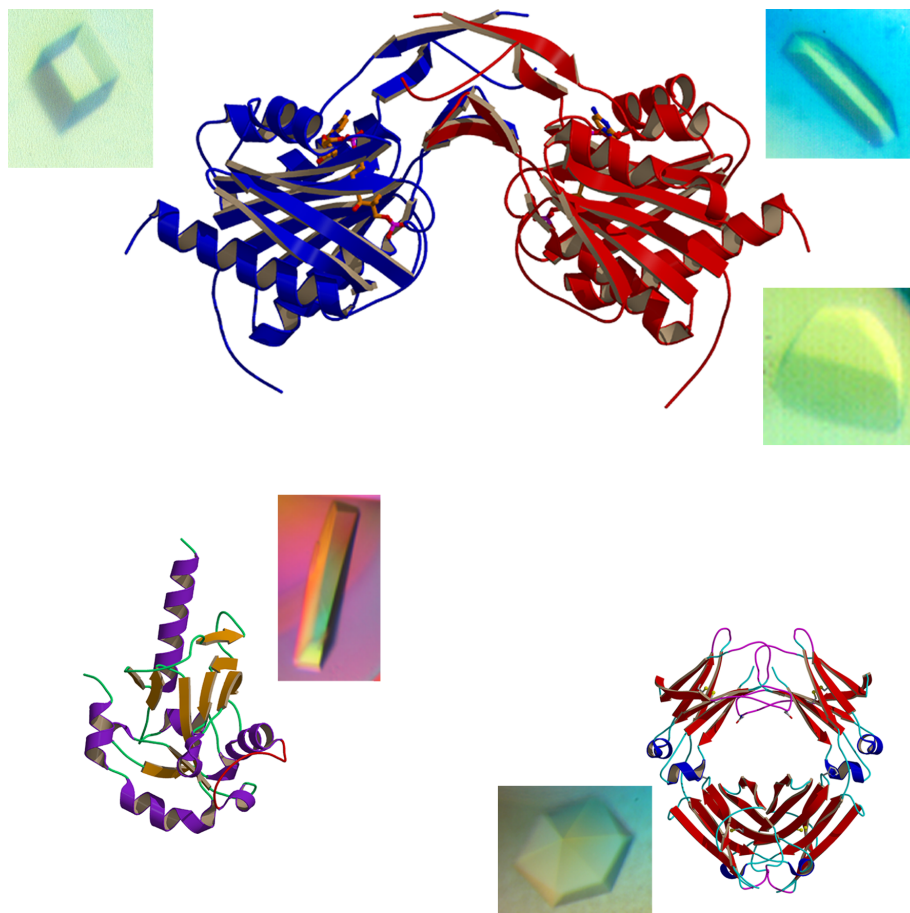


Strukturelle Charakterisierung der
PPC-Synthetase aus der Biosynthese von Coenzym A;

Röntgenstrukturanalyse des
Co-Chaperons Cns1 218-C und des
Fc-Fragments des Antikörpers MAK33 aus Maus



Susanne Stanitzek

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung

Max-Planck-Institut für Biochemie

Abteilung Strukturforschung

**Strukturelle Charakterisierung der *PPC*-Synthetase aus
der Biosynthese von Coenzym A;
Röntgenstrukturanalyse des Co-Chaperons Cns1 218-C und
des Fc-Fragments des Antikörpers MAK33 aus Maus**

Susanne Stanitzek

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der
Technischen Universität München zur Erlangung
des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. St. J. Glaser
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Dr. h.c. R. Huber
2. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Die Dissertation wurde am 23.02.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 11.05.2005 angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2003 bis März 2005 in der Abteilung für Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Anleitung von Prof. Dr. Robert Huber angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Robert Huber danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Arbeitskreis durchführen zu können, für die Unterstützung, die er mir zuteil werden ließ, sowie für die außerordentlich große wissenschaftliche Freiheit bei der Anfertigung meiner Arbeit.

Bei Priv.-Doz. Dr. Stefan Steinbacher bedanke ich mich ganz herzlich für seine tatkräftige Unterstützung, seine, wenn zum Teil auch aus der Ferne, aber jederzeit „abrufbare“ Hilfe, sowie die sehr gute Zusammenarbeit und für den großen Freiraum bei der Durchführung meiner Projekte.

Priv.-Doz. Dr. Thomas Kupke von der Universität Tübingen danke ich für die zur Verfügung gestellten CoaB-Klone.

Herrn Prof. Dr. Johannes Buchner vom Lehrstuhl für Biotechnologie an der Technischen Universität München möchte ich für die gute und angenehme Zusammenarbeit danken.

Des Weiteren gilt mein Dank den Mitarbeitern des Arbeitskreises von Prof. Buchner, die zu meiner Arbeit beigetragen haben, insbesondere Otmar Hainzl für das zur Verfügung gestellte Cns1 218-C Protein und Silvia Catharino Rodrigues für das Protein des Fc-Fragments.

Besonders dankbar bin ich Dr. Martin Augustin, der mir im ersten Jahr meiner Doktorarbeit stets mit großem Engagement mit Rat und Tat zur Seite stand.

Mein Dank gilt auch Renate Rüller und Monika Schneider für ihre immer freundliche Unterstützung bei bürokratischen Problemen sowie Werner Dersch und Otmar Paul für ihre unverdrossen Hilfe bei der Überwindung jeglicher technischer Hindernisse.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Abteilung für Strukturforschung danke ich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Dieser Dank gilt besonders Dr. Stefanie Bauer, Dr. Werner Atzenhofer, Dr. Christine Breitenlechner, Lorenz Chatwell, Dr. Iris Fritze, Dr. Stefan Gerhardt, Dr. Daniela

Jozić, Cora Keil und Rasso Willkomm.

Besonders danke ich meinen Freunden außerhalb des Labors, Johanna und Flo, für ihre Freundschaft und ihr Verständnis, besonders in der letzten Zeit...

Mein herzlicher und liebevoller Dank gilt meinen Eltern, ohne ihre große Unterstützung über die Jahre hinweg wäre ich nie so weit gekommen. Danke, für das grenzenlose Vertrauen!

Meiner Schwester Rebekka danke ich dafür, dass sie immer für mich da ist, wenn Not am Mann (bzw. Frau) ist.

Zuletzt möchte ich meinem Freund Ravindra, der stets zu mir hält und mir großen Rückhalt in jeglichen Situationen gibt, für sein immer währendes Interesse und Verständnis von ganzem Herzen danken.

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in

Stanitzek, S., Augustin, M.A., Huber, R., Thomas, T. and Steinbacher, S. (2004). Structural Basis of CTP-Dependent Peptide Bond Formation in Coenzyme A Biosynthesis Catalyzed by *Escherichia coli* PPC Synthetase. *Structure* **12**, 1977-1988.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
1.1 Phosphopantothenoylecystein Synthetase aus <i>E.coli</i> (ecCoaB)	1
1.2 Kristallstruktur von Cns1 218-C (cyclophilin seven suppressor) aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
1.3 Kristallstruktur des unglycosilierten Fc-Fragments des Antikörpers MAK33 aus Maus	3
 2 Einleitung	 5
2.1 Vitamine als Bestandteile von Coenzymen	5
2.1.1 Allgemeines über Vitamine	5
2.1.2 Vitamin B2: Pantothersäure	8
2.1.3 Phosphopantothenoylecystein Synthetase (CoaB)- Ein Enzym aus der Biosynthese von Coenzym A	9
2.2 Proteinfaltung wird <i>in vivo</i> durch Chaperone katalysiert	15
2.2.1 Cns1- ein Co-Chaperon von Hsp90 und Hsp70	16
2.3 Immunglobuline	23
2.3.1 Immunglobuline als Bestandteil des Immunsystems	23
2.3.2 Funktion und Aufbau von Immunglobulinen	24
2.3.3 Der monoklonale Antikörper MAK33 aus Maus	27
2.4 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen	28
2.4.1 Überblick	28
2.4.2 Kristalle	30
2.4.3 Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen	32
2.4.4 Lösung des Phasenproblems	37

3	Material und Methoden	45
3.1	Material	45
3.1.1	Chemikalien	45
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	45
3.1.3	Geräte	46
3.1.4	Kits	46
3.1.5	Säulenmaterial	46
3.1.6	Puffer, Stammlösungen, Antibiotika und Induktorlösungen .	47
3.1.7	Nährmedium für Bakterien	49
3.1.8	Bakterienstämme und Plasmide	50
3.2	Methoden zur Nukleinsäure-Analyse	50
3.2.1	Präparation von Plasmid DNA (Mini-Präp)	50
3.2.2	Agarosegelelektrophorese	51
3.3	Arbeitsmethoden mit Bakterien	52
3.3.1	Transformation in chemisch kompetente <i>E. coli</i> Zellen	52
3.3.2	Transformation in elektrokompente Zellen	52
3.3.3	Heterologe Expression von rekombinantem Protein in <i>E. coli</i>	52
3.3.4	Herstellung von Rohextrakten aus <i>E. coli</i>	53
3.4	Proteinchemische Methoden	53
3.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	53
3.4.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen durch Absorption bei 280 nm	54
3.4.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	54
3.4.4	Coomassie-Färbung der SDS-Polyacrylamidgele	56
3.4.5	Affinitätschromatographie an einer Metall-Chelat-Matrix . .	56
3.4.6	Ionenaustausch-Chromatographie	57
3.4.7	Gelpermeationschromatographie	57
3.4.8	Dialyse und Umpufferung von Proteinlösungen	58
3.4.9	Konzentrierung von Proteinlösungen	58
3.5	Kristallographische Methoden	59
3.5.1	Kristallisation	59
3.5.2	Datensammlung	60
3.5.3	Datenauswertung	60
3.5.4	Phasierung	61

3.5.5	Strukturlösung, Modellbau und Verfeinerung	61
3.5.6	Modellanalyse und graphische Darstellungen	62
4	Ergebnisse und Diskussion	63
4.1	Phosphopantothenoylecystein Synthetase aus <i>E. coli</i> (ecCoaB)	63
4.1.1	Expression, Reinigung und Charakterisierung des ecCoaB	63
4.1.2	Röntgenstrukturanalyse des Enzyms CoaB aus <i>E. coli</i>	70
4.1.3	Diskussion	86
4.2	Röntgenstrukturanalyse des Co-Chaperons Cns1 218-C	92
4.2.1	Kristallisation	92
4.2.2	Datensammlung und Strukturlösung	92
4.2.3	Modellbau, Verfeinerung und Qualität des Atommodells	95
4.2.4	Strukturbeschreibung und Diskussion	96
4.3	Röntgenstrukturanalyse des unglycosilierten Fc-Fragments des Antikörpers MAK33 aus Maus	103
4.3.1	Kristallisation	103
4.3.2	Datensammlung und Strukturlösung	104
4.3.3	Modellbau, Verfeinerung und Qualität des Atommodells	106
4.3.4	Strukturbeschreibung und Diskussion	107
	Abkürzungen	113
	Literaturverzeichnis	117

1 Zusammenfassung

1.1 Phosphopantothenoylcystein Synthetase aus *E.coli* (ecCoaB)

Phosphopantothenoylcystein (*PPC*) Synthetase aus *E.coli* (ecCoaB) ist ein Enzym aus der Biosynthese von Coenzym A. Es katalysiert die zweistufige Reaktionsfolge ausgehend von 4'-Phosphopantothensäure zu (*R*)-4'-Phospho-N-pantothenoylcystein (*PPC*) und bildet dabei eine Peptidbindung zwischen 4'-Phosphopantothensäure und Cystein.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig die Kristallstruktur der Phosphopantothenoylcystein Synthetase aus *E.coli* beschrieben werden. Die Struktur wurde mittels Multipler Anomaler Dispersion (MAD) an einem Selenomethionin-Derivat-Kristall gelöst. Das Protein wurde in seiner apo-Form und in Anwesenheit von Cytidin-5'-Triphosphat (CTP) sowie mit CTP und Phosphopantothensäure kokristallisiert. Im letzteren Fall entstand dabei das Acyl-Intermediat 4'-Phosphopantothenoylcytidylat *in situ*, das in der Kristallstruktur sehr gut definiert ist. Diese Intermediat-Kristalle wurden mit Cystein *gesoakt*, wobei in der Kristallstruktur des Produktkomplexes Cytidin-5'-Monophosphat (CMP) und eine Phosphatgruppe, die vom ungeordneten Reaktionsprodukt *PPC* herrührt, beobachtet werden. Alle Komplexstrukturen wurden mittels *Molecular Replacement* (MR) gelöst unter Verwendung der apo-CoaB-Struktur als PATTERSON-Suchmodell. Anhand dieser Komplexkristallstrukturen, die Momentaufnahmen entlang des Reaktionsweges von CoaB zeigen, können detaillierte Einblicke in die Substratbindung und den Reaktionsmechanismus der Peptidbindungsknüpfung gegeben werden.

PPC Synthetasen können in zwei Klassen unterteilt werden: Während eukaryotische *PPC* Synthetasen Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) abhängige Proteine repräsentie-

ren, stellen die bakteriellen Enzyme eine CTP abhängige Klasse dar. Durch die Beschreibung der ecCoaB Kristallstruktur als Prototyp dieser bakteriellen CTP abhängigen Enzymklasse kann ein Vergleich zum humanen Enzym gezogen werden. Dabei werden sowohl Ähnlichkeiten als auch Unterschiede zwischen den beiden Vertretern ihrer jeweiligen Klassen deutlich und die unterschiedliche Nukleotid-abhängigkeit kann auf struktureller Basis erklärt werden. Dies stellt ein potentielles *drug target* dar mit der Möglichkeit, selektive Inhibitoren für bakterielle Enzyme zu entwickeln und somit neue Antibiotika zu kreieren.

1.2 Kristallstruktur von Cns1 218-C (cyclophilin seven suppressor) aus *Saccharomyces cerevisiae*

Cns1 aus *Saccharomyces cerevisiae* ist ein Co-Chaperon der **Hitzeschockproteine** Hsp90 und Hsp70. Chaperone (auch molekulare „Anstandsdamen“ genannt) unterstützen die Faltung von Proteinen in der Zelle durch Unterbindung falscher Kontakte, da sich diese neu entstehenden Proteine in der räumlichen Enge der Zelle ineinander verwirren würden. Dabei bilden diese Chaperone große Multichaperonkomplexe aus. Viele zelluläre Proteinfaltungs- und Transportprozesse sowie die Aktivierung vieler Substratproteine werden von den zwei Chaperonmaschinen Hsp90 und Hsp70 bewirkt, die für das Überleben von Zellen und Organismen sehr wichtig sind. Zusätzlich ist die Interaktion mit den Chaperonen für die nachfolgende Aktivierung durch die jeweilige Signaltransduktionskette essentiell. Cns1 aus *S. cerevisiae*, das in Hefen essentiell ist, bindet an Hsp90 und Hsp70 mit vergleichbarer Affinität. Der Name „Cns“ (*cyclophilin seven suppressor*) rührt von seiner Eigenschaft als Unterdrücker eines schwerwiegenden Wachstumsdefekts her, der durch Deletion des Cyclophilin 40 Homologen aus *S. cerevisiae* Cpr7 verursacht wurde. Cns1 kann in zwei Domänen unterteilt werden: Eine N-terminale Domäne (Cns1 N-204), die über ihre TPR-(*tetratricopeptid repeat*) Domäne an die Chaperone Hsp90 und Hsp70 bindet. Der C-terminalen Domäne (Cns1 218-C) ist bisher noch kein bekanntes Sequenzmotiv zugeordnet worden. Deshalb sollte die Kristallstruktur dieser C-terminalen Domäne (Cns1 218-C) gelöst werden, um mehr In-

formationen über dieses noch recht unbekanntes Protein zu erlangen. Dazu wurde das Protein in seiner apo-Form kristallisiert und die Struktur mittels Multipler Anomaler Dispersion (MAD) an einem Selenomethionin-Derivat-Kristall gelöst. Das Atommodell wurde bei einer Auflösung von 2.0 Å auf einen R-Faktor von 18.8% und einen freien R-Faktor von 24.7 % verfeinert. Die Struktur zeigt drei deutliche Vertiefungen an der Oberfläche, die von hydrophoben Aminosäureresten gebildet und von polaren Aminosäureresten flankiert werden. Ein Vergleich mit der bereits bekannten Kristallstruktur der TRP-Domäne des Cns1 Homologen Hop aus Mensch zeigt die Peptidbindungsstelle in einer vertieften Rinne, die von der C-terminalen α -Helix flankiert wird. Die Dimensionen dieser Bindungstasche entsprechen denen der trichterförmigen Spalte I des Cns1 218-C und deuten möglicherweise auf eine potentielle Peptidbindung hin.

1.3 Kristallstruktur des unglycosylierten Fc-Fragments des Antikörpers MAK33 aus Maus

Das Immunsystem schützt Wirbeltiere vor Mikroorganismen wie Bakterien, Viren oder Parasiten durch Erkennung der fremden molekularen Einheiten, ihrer Unterscheidung von den eigenen und ihrer Zerstörung. Antikörper oder Immunglobuline sind lösliche Antigen-Rezeptoren, die als wichtiger Teil der humoralen Immunabwehr das zelluläre Immunsystem auf verschiedenen Weisen unterstützen, ohne selber antimikrobielle Eigenschaften zu besitzen. Immunglobuline sind aus mehreren kompakten Immunglobulin-Domänen aufgebaut. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das nicht-glycosylierte Fc-Fragment des Antikörpers MAK33 aus Maus kristallisiert und die Röntgenstruktur mittels *Molecular Replacement* gelöst, um den Einfluss bei Abwesenheit des Zuckers zu untersuchen. Es stellte sich heraus, dass die Region um die Glycosylierungsstelle in der Kristallstruktur flexibel ist und demzufolge durch den Zucker stabilisiert und fixiert wird. Ähnlich verhält es sich für die Fc-Rezeptorbindungsstelle; ein Vergleich mit der Komplexkristallstruktur, in der das humane IgG1 Fc-Fragment an den Fc γ -Rezeptor (Fc γ RIII) gebunden ist, ergab, dass die dort für die Bindung des Rezeptors verantwortlichen Aminosäurereste sich

1 ZUSAMMENFASSUNG

im unglycosilierten Fc-Fragment des Antikörpers aus Maus in flexiblen Regionen befinden. Es ist zu erwarten, dass sich diese flexiblen Bereiche durch Bindung an den entsprechenden Rezeptor ebenso ordnen, wie es für Regionen in der Struktur des humanen Fc-Fragment-Rezeptor-Komplexes beobachtet wurde.

2 Einleitung

2.1 Vitamine als Bestandteile von Coenzymen

2.1.1 Allgemeines über Vitamine

Vitamine gehören zu den essentiellen Nahrungsbestandteilen, d.h. sie können vom Organismus nicht oder zumindest nicht in ausreichender Menge synthetisiert werden und müssen deshalb mit der Nahrung aufgenommen werden. Im Gegensatz zu essentiellen Aminosäuren und Fettsäuren werden sie jedoch nur in sehr kleinen Mengen benötigt; der Tagesbedarf liegt zwischen 5 μg und 60 mg (Schunk and Gasteiger, 2003).

Der Name “**Vitamin**“ setzt sich zusammen aus *Vita* (Leben) und *Amin* (stickstoffhaltige, basisch reagierende organische Verbindung). Die Bezeichnung wurde zunächst für Thiamin (B1) eingeführt und erst später, aufgrund der unzutreffenden Annahme, dass es sich bei allen Vitaminen um Amine handelt, auch für die anderen Verbindungen verwendet. Die Vitamine werden aus historischen Gründen mit Großbuchstaben bezeichnet. Früher benannte man die Vitamine nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung, aber mittlerweile werden die Vitamine nach Funktion oder der chemischen Beschaffenheit benannt. Vitamine haben keine Bedeutung als Baumaterial oder Energielieferant für den Organismus, sie besitzen hauptsächlich steuernde und katalytische Eigenschaften im Stoffwechsel. Gerade deshalb sind sie für Menschen so lebensnotwendig.

Die B-Vitamine Thiamin (B1), Riboflavin (B2), Nicotinsäureamid, Pantothensäure, Folsäure, Pyridoxol (B6), Cobalamin (B12) und Biotin (H) sowie Vitamin K (Phyllochinon) sind Vorstufen wichtiger Coenzyme, die für alle Zellen lebensnotwendig sind. Vitamin A (Retinol) wird insbesondere für den Sehprozess benötigt. Vitamin

D (Calciol) wirkt als Vorstufe des Hormons Calcitriol den Calcium-Haushalt regulierend. Vitamin C (Ascorbinsäure) wird als Redox-System (vor allem bei der Kollagen-Synthese) benötigt. Vitamin E dient vermutlich in erster Linie als Radikalfänger. Die Vitamine A, C, D und E werden nur von höheren Lebewesen benötigt (Koolman and Röhm, 1994).

Strukturell gesehen stellen Vitamine eine sehr verschiedenartige Gruppe organischer Verbindungen dar. Man unterteilt sie nach ihren Eigenschaften in fett- und wasserlösliche Vitamine. Aufgrund ihrer Löslichkeit lassen sich viele ihrer biologischen Eigenschaften erklären. Fettlösliche Vitamine werden teilweise in sehr großen Mengen in Leber und im Fettgewebe eingelagert. Aus diesen Vitaminspeichern kann der Organismus auch während längerer Phasen der Unterversorgung noch mit den entsprechenden Vitaminen versorgt werden. Die hohe Speicherkapazität bei diesen Vitaminen kann durch eine entsprechende Überversorgung auch zu Hypervitaminosen (Vergiftungserscheinungen) führen (Koolman and Röhm, 1994).

Bei wasserlöslichen Vitaminen gibt es diese Speicherfunktion nicht. Vitamin B12 bildet allerdings eine Ausnahme. Eine über den Bedarf hinausgehende Versorgung wird mit dem Urin wieder ausgeschieden.

Wasserlösliche Vitamine sind:

Vitamin B1 (Thiamin)
Vitamin B2 (Riboflavin)
Vitamin B5 (Pantothensäure)
Vitamin B6 (Pyridoxin)
Vitamin B12 (Cobalamin)
Vitamin C (Ascorbinsäure)
Vitamin H (Biotin)
Folsäure
Niacin

Fettlösliche Vitamine sind:

Vitamin A (Retinol)
Vitamin D (Calciferole)
Vitamin E (Tocopherole und Tocotrienole)
Vitamin K (Phyllochinone und Menachinone)

Es gibt neben den "echten" Vitaminen einige Verbindungen, die früher als "Vitamine" bezeichnet wurden, obwohl sie nicht den oben beschriebenen Kriterien (wie essentiell und nur in kleinen Mengen nötig) entsprechen. Sie werden heute meist als "vitaminähnliche Wirkstoffe" bezeichnet. Dazu gehören Carnitin ("Vitamin T"), Cholin ("Vitamin B4"), essentielle Fettsäuren ("Vitamin F"), Flavonoide ("Vitamin P"), (myo)-Inositol, Liponsäure, Orotsäure ("Vitamin B13") und Ubichinon ("Vitamin Q").

Davon zu unterscheiden sind die "Provitamine", die Vorstufen bestimmter Vitamine sind und diese in der Nahrung teilweise ersetzen können, z.B. β -Carotin als Provitamin A (Schunk and Gasteiger, 2003).

Vorkommen

	A	B1	B2				B6	B12	C	D	E	H	K
			Ribo.	Nico.	Pant.	Fols.							
Fleisch		x	x	xx	x	x	x	x					
Leber	xx	x	xx	xx	x	xx	x	xx	x	xx	x	x	x
Fisch	x	x	x	xx	x	x	x	x		x		x	
Eier	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	xx	
Milch & Milchprodukte	x	x	xx	xx	x	x	x	x		x		x	
grüne Pflanzenteile					x	x	xx						xx
Gemüse & Kartoffeln	c	x	x	x	x	xx	xx		xx			x	
Obst	c			x	x				xx				
Planzenöle											xx		x
Vollkornprodukte		xx	x	x	x	xx	xx				x		
Hefe		xx	x	x	x	xx	x			x			
Synthese durch Darmbakterien					x			(x)				x	xx
Eigensynthese möglich				x						xx			

x in den (frischen) Nahrungsmitteln ist das Vitamin enthalten.

xx zur Vitamin-Versorgung besonders wichtig.

c enthalten β -Carotin als Provitamin.

(x) von den Darmbakterien synthetisiertes Vitamin B12 kann nicht resorbiert werden.

Der Mensch ist auf eine vitaminreiche Nahrung angewiesen, da er nur sehr wenige Vitamine in geringen Mengen selbst produzieren kann. Vitamine sind darum ein kostbares Gut in Gemüse, Obst und anderen Lebensmitteln, welches sehr empfindlich gegenüber Umwelteinflüssen ist. Durch den Einfluss von Licht, Luft und Wärme werden Vitamine zerstört und selbst bei längerer Lagerung gehen Vitamine verloren. Vitamin C ist bei der Ernte zu 100% im Gemüse enthalten. Doch schon am vierten Tag sind bei optimaler Lagerung nur noch weniger als 50% davon unzerstört. Bei falscher Lagerung z.B. bei Zimmertemperatur (20°C) sind nach zwei Tagen nur 30% der ursprünglichen Vitaminkonzentration im Gemüse enthalten. Da Vitamin C sehr lichtempfindlich ist, sind nach drei Stunden im Sonnenlicht nur noch ca. 35% des Vitamins enthalten. Lagert man Gemüse in Wasser, so sind im unzerkleinerten Zustand nach 12 Stunden 10% Vitamin C ausgeschwemmt, im zerkleinerten Zustand bereits über 50% (Schunk and Gasteiger, 2003).

Bei den meisten Vitaminen führt eine Unterversorgung zu Avitaminosen, die in einigen Fällen mit charakteristischen Krankheitsbildern einhergehen (z.B. Nachtblindheit bei Vitamin A Mangel), oft aber eher unspezifisch verlaufen, letztlich aber zum Tode führen können (Schunk and Gasteiger, 2003).

2.1.2 Vitamin B2: Pantothersäure

Vitamin B2 ist ein Komplex aus mehreren Vitaminen: Riboflavin, Folat, Nicotinat und Pantothersäure. Eine veraltete Bezeichnung für **Pantothersäure** ist Vitamin B5. Es ist ein Säureamid und setzt sich aus der Aminosäure β -Alanin und 2,4-Dihydroxy-3,3'-dimethylbutyrat (Pantoinsäure) zusammen. Pantothersäure kann

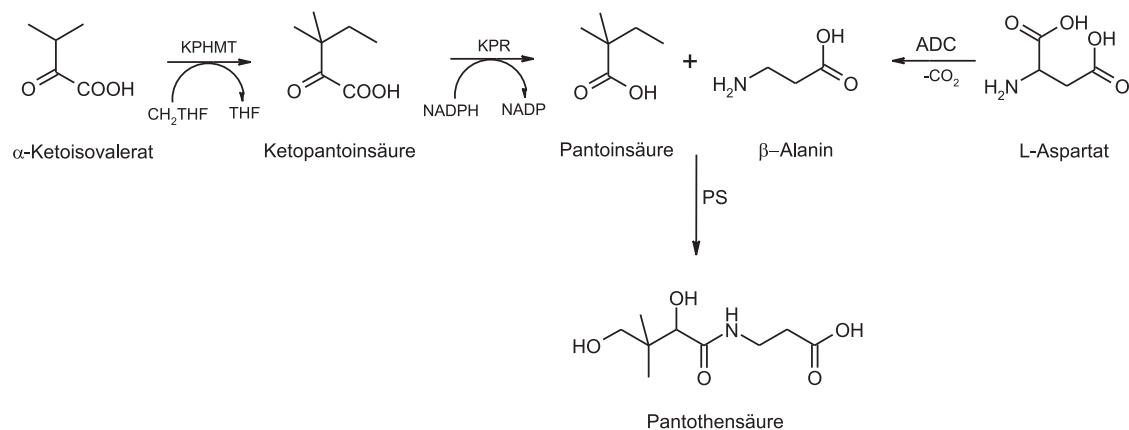


Abbildung 2.1: Biosynthese des Pantothenat in *E. coli*

nicht vom tierischen/menschlichen Organismus synthetisiert werden und muss deshalb mit der Nahrung als Vitamin B5 aufgenommen werden. Nur Bakterien, Pilze und Pflanzen sind in der Lage, Pantothersäure eigenständig zu produzieren. Die Biosynthese der Pantothersäure, die in Abbildung 2.1 gezeigt ist, ist für *Escherichia coli* sehr gut aufgeklärt, auch anhand von Kristallstrukturen der einzelnen beteiligten Enzyme (Von Delft *et al.*, 2001); (Albert *et al.*, 1998); (Matak-Vinkovic *et al.*, 2001); (Von Delft *et al.*, 2003).

Im ersten Syntheseschritt wird Ketopantoinsäure aus α -Ketoisovalerat (die Oxosäure des Valins, α -KIVA) unter Verwendung von 5,10-Tetrahydrofolat durch das Enzym Ketopantoinsäure Hydroxymethyltransferase (KPHMT) gebildet. Durch

Ketopantonsäure Reduktase (KPR) wird anschließend Ketopantonsäure zu Pantonsäure reduziert mit NADPH als Wasserstoffdonator. Separat zu diesem Reaktionsweg wird β -Alanin aus L-Aspartat durch das Enzym L-Aspartat- α -Decarboxylase (ADC) synthetisiert. Pantothenat Synthetase katalysiert die Kondensations von β -Alanin und Pantonsäure zu Pantothenensäure (Ottenhof *et al.*, 2004).

Obwohl dieser Biosyntheseweg der Pantothenensäure in höheren Lebewesen nicht vorhanden ist, kann es problemlos dem tierischen Organismus zugeführt werden, denn das Besondere an Pantothenensäure ist die Tatsache, dass sie so gut wie in allen Lebensmitteln zu finden ist: *pantos* (griechisch)= überall. Am reichhaltigsten ist Pantothenensäure in Leber und Hering vorhanden, in pflanzlichen Lebensmitteln, vor allem in Vollkornprodukten und verschiedenen Kohlsorten wie Blumenkohl und Brokkoli. Das Vitamin ist hitzestabil, wird allerdings in alkalischen und sauren Lösungen inaktiviert (Koolman and Röhm, 1994).

Dieser Unterschied in der Zugänglichkeit von Pantothenensäure zwischen menschlichen und Mikroorganismen macht die gesamte Biosynthese der Pantothenensäure zu einem attraktiven Target für Fungizide, Herbizide und antimikrobielle Wirkstoffe (Gerdes *et al.*, 2002).

Pantothenensäure ist an vielen Stoffwechselfvorgängen im Körper beteiligt: z.B. im Citratcyclus, bei der Bildung von Cholesterin sowie bei Synthese und Abbau von Fettsäuren. Auch das Acyl-Carrier-Protein (ACP) enthält Pantothenensäure als Bestandteil seiner prosthetischen Gruppen. Des Weiteren dient Pantothenensäure als Vorstufe und Baustein für Coenzym A und ist somit an der Aktivierung von Acyl-Resten im Lipid-Stoffwechsel beteiligt (Stryer, 1999).

2.1.3 Phosphopantothenoylcystein Synthetase (CoaB)- Ein Enzym aus der Biosynthese von Coenzym A

Definition des Begriffs Coenzyme

Leben ist im Grunde genommen nichts weiter als eine Vielzahl biochemischer Reaktionen, die kontinuierlich im Körper ablaufen. Die meisten dieser Reaktionen werden durch Enzyme als biologische Katalysatoren beschleunigt. Katalysatoren

sind Substanzen, welche die Geschwindigkeit und Genauigkeit einer Reaktion steigern, ohne dabei selbst verändert zu werden. Viele Enzyme enthalten Cofaktoren, die die katalytische Wirkung verstärken. Cofaktoren können Metallionen oder als Coenzyme bezeichnete organische Moleküle sein. Bei vielen enzymkatalysierten Reaktionen werden Elektronen oder Gruppen von Atomen von einem Substrat auf ein anderes übertragen. An solchen Reaktionen sind stets weitere Moleküle beteiligt, die die übertragene Gruppe vorübergehend übernehmen. Hilfsmoleküle solcher Art nennt man **Coenzyme**. Viele Coenzyme dienen also dazu, wenig reaktionsfähige Moleküle oder Gruppen zu aktivieren. Die Aktivierung besteht in der Ausbildung reaktionsfähiger Zwischenverbindungen, von denen aus die betreffende Gruppe in einer exergonen Reaktion auf andere Moleküle übertragen werden kann. Coenzyme sind selber nicht katalytisch aktiv und nicht enzymespezifisch, sondern arbeiten mit vielen Enzymen unterschiedlicher Substratspezifität zusammen.

Nach der Art ihrer Wechselwirkung mit dem Enzym unterscheidet man *lösliche Coenzyme* und *prothetische Gruppen* (siehe Abbildung 2.2). Lösliche Coenzyme werden während der Reaktion wie Substrate gebunden, chemisch verändert und dann wieder frei gesetzt. Die ursprüngliche Form des Coenzym wird durch eine zweite, unabhängige Reaktion regeneriert. Als prothetische Gruppen werden Coenzyme bezeichnet, die fest an ein Enzym gebunden sind und dies während der Reaktion nicht verlassen. Der vom Coenzym gebundene Teil des Substrates wird später auf ein weiteres Substrat oder Coenzym desselben Enzyms übertragen. Ein Protein, das im Besitz einer prothetischen Gruppe ist, bezeichnet man als Holo-protein. Ohne diese handelt es sich um ein Apoprotein (Koolman and Röhm, 1994).

Wichtige Coenzyme sind NADH, NADPH, FADH₂, FMN, Tetrahydrobiopterin und Tetrahydrofolsäure, die Wasserstoffe übertragen und somit an Redoxreaktionen beteiligt sind. S-Adenosylmethionin (SAM), Biotin und Tetrahydrofolsäure sind am Transfer von "ein-Kohlenstoff-Einheiten" (C-1-Bausteinen) wie Methylgruppen, CO₂ oder Methylen-, Methenyl-, Formylgruppen etc. beteiligt. Coenzym A überträgt Acylgruppen. Pyridoxalphosphat ist an vielen Reaktionen des Aminosäure- Metabolismus beteiligt wie Transaminierung, Decarboxylierung, Aldolspaltung. Thiamin- Pyrophosphat ist für die oxidative Decarboxylierung von α -Ketosäuren (z.B. Pyruvat zu Acetyl-CoA oder α -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA im Citratzyklus) und für die Transketolase-Reaktionen (z.B. im Pentosephosphatweg)

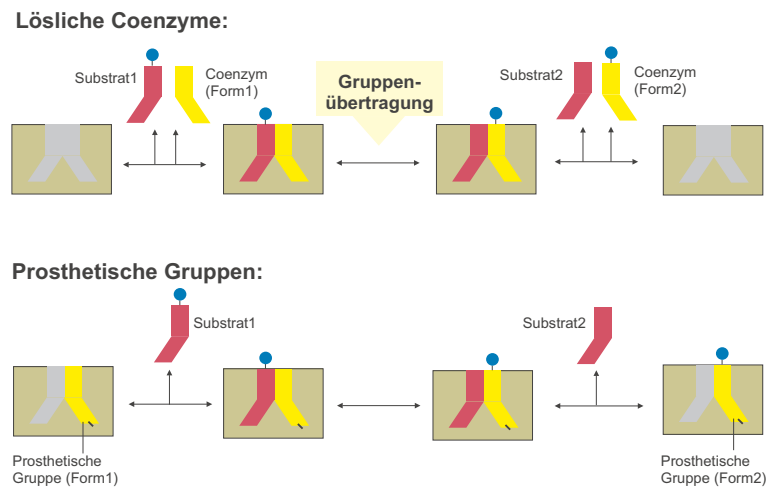


Abbildung 2.2: Es werden zwei Gruppen von Coenzymen unterschieden: Lösliche Coenzyme (oben) und prosthetische Gruppen (unten)

wichtig (Stryer, 1999).

Fast alle Coenzyme können von tierischen/menschlichen Zellen nicht von Grund auf synthetisiert werden. Ihre Vorstufen müssen deshalb als Vitamine mit der Nahrung zugeführt werden. Die B-Vitamine sind Bestandteile von Coenzymen.

Coenzym A

Coenzym A (CoA), wobei A für Acetylierung steht) ist ein Molekül mit einer zentralen Stellung im Stoffwechsel. Es ist ein hitzestabiler Cofaktor, der Acylgruppen aktiviert, umwandelt und überträgt.

Im CoA ist Pantethein über eine Phosphorsäureanhydrid-Bindung mit 3'-Phospho-ADP verknüpft. Pantethein besteht aus drei amidartig verbundenen Komponenten, der Pantoinsäure sowie β -Alanin und Cysteamin, zwei biogenen Aminen, die durch Decarboxylierung von Aspartat bzw. Cystein gebildet werden.

Entdeckt und charakterisiert wurde CoA 1964 durch Fritz Lipmann (Lipmann, 1962). Feodor Lynen klärte die endständige Sulfhydrylgruppe im CoA als die reaktive Stelle auf (Lynen, 1970): Acylgruppen werden hier als Thioester gebunden und dadurch das Substrat aktiviert. Das entstehende Derivat wird als Acyl-CoA bezeichnet. Die CoA-Thioester bezeichnet man als "aktivierte" Carbonsäure-Derivate

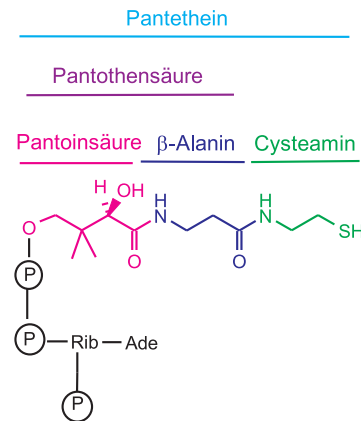


Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau des Coenzym A (CoA)

(beispielsweise Acetyl-Coenzym A (CoA-S-CO-CH₃) als “aktivierte Essigsäure“), weil sich solche Acylreste leicht auf andere Moleküle übertragen lassen. Davon wird im Stoffwechsel häufig Gebrauch gemacht. Coenzym A kann für Abbauvorgänge und die Energieerzeugung aktivierte Acylgruppen bereitstellen, ebenso wie zu biosynthetischen Zwecken.

Coenzym A erfüllt eine lebensnotwendige Rolle im Metabolismus von lebenden Organismen, denn ca. 4 % aller Enzyme brauchen entweder die Thioester oder das 4'-Phosphopantethein oder beide Verbindungen des CoA. Als ein essentieller Cofaktor, z.B. bei der Fettsäuresynthese und bei der nichtribosomalen Peptid-Synthese, fungiert 4'-Phosphopantethein als ein Acylgruppenüberträger (Abiko, 1975); (Klein-kauf, 2000), der Carbonsäuren für biologische Claisenreaktionen und die Entstehung von Peptiden und Estern aktiviert. Dabei sind Acetyl-CoA und Succinyl-CoA Schlüsselintermediate im Energiemetabolismus (Strauss *et al.*, 2001).

Phosphopantothenoylecystein Synthetase (CoaB)- Ein Enzym aus der Biosynthese von Coenzym A

Coenzym A wird in fünf enzymatischen Reaktionen, ausgehend von Pantothenensäure, synthetisiert (Brown, 1959) (Abbildung 2.4): Im ersten Schritt wird die Pantothenensäure durch die Pantothentat Kinase (CoaA) phosphoryliert. Die entstehende 4'-Phosphopantothensäure wird anschließend in einer zweistufigen Reaktionsfolge, die durch **Phosphopantothenoylecystein Synthetase (CoaB)** ka-

talysiert wird, zu (*R*)-4'-Phospho-N-pantothenoylcystein (*PPC*) umgewandelt. Im ersten Teilschritt dieser nucleosidtriphosphat-abhängigen Reaktion wird 4'-Phosphopantothenensäure durch Addition von CTP aktiviert. Das entstandene Intermediat 4'-Phosphopantothenoylcytidylat reagiert im zweiten Teilschritt der von CoaB katalysierten Reaktion in einem nukleophilen Angriff mit Cystein, wobei 4'-Phosphopantothenoylcystein (*PPC*) gebildet wird, das anschließend durch Phosphopantothenoylcystein Decarboxylase (CoaC) zu 4'-Phosphopantethein (*PP*) decarboxyliert wird. Durch nachfolgende Adenylierung (Pantotheinphosphat Adenyltransferase, CoaD) und Phosphorylierung (Dephospho-CoA-Kinase, CoaE) wird Coenzym A synthetisiert.

Die enzymatische Synthese einer Peptidbindung in 4'-Phosphopantethein ist eine Schlüsselreaktion in der Biosynthese von Coenzym A, in der *PP* als Cofaktor nicht in seine eigene Biosynthese involviert ist.

In Bakterien wird die Synthese von 4'-Phosphopantethein aus 4'-Phosphopantothenat und Cystein durch das bifunktionale Flavoprotein Dfp (CoaBC) in einer mehrstufigen Reaktion katalysiert. Der C-Terminus des Dfp stellt die CoaB-Domäne (Phosphopantothenoylcystein Synthetase) dar, der 4'-Phosphopantothenat durch Reaktion mit CTP aktiviert und entstandene Acyl-Intermediat 4'-Phosphopantothenoyl-CPM in einer nukleophilen Reaktion mit Cystein zu dem Produkt *PPC* generiert. Die N-terminale CoaC-Domäne von Dfp (Phosphopantothenoylcystein Decarboxylase) katalysiert die FMN-abhängige oxidative Decarboxylierung von *PPC* zu *PP*. In Eukaryoten liegen *PPC* Synthetase und *PPC* Decarboxylase in separaten Genen vor.

Das Dfp-Protein mit seiner *PPC* Synthetase und *PPC* Decarboxylase Aktivität aus *E. coli* zeigt Ähnlichkeiten zur *PPC* Synthetase und *PPC* Decarboxylase aus höheren Organismen, aber auch Unterschiede, was die benötigten Energiequellen für die katalytischen Reaktionen betrifft. Denn bei der Reaktionsfolge des Dfp-Proteins aus *E. coli* findet die Reaktion unter Verbrauch von Cytidin-5'-triphosphat (CTP) als aktivierendes Nucleosid-5'-triphosphat statt und in der anschließenden Kuppungsreaktion wird Cytidin-5'-monophosphat (CMP) abgegeben. Im Gegensatz dazu wird bei höheren Organismen (z.B. Mensch) in der Reaktionsfolge ATP zu ADP verbraucht an Stelle von CTP. Diese Unterschiede zwischen den Enzymen in Bakterien und höheren Organismen ergeben die Möglichkeit, selektive Inhibitoren

2 EINLEITUNG

für die bakteriellen Enzyme zu entwickeln und somit neue Antibiotika zu kreieren (Strauss *et al.*, 2001).

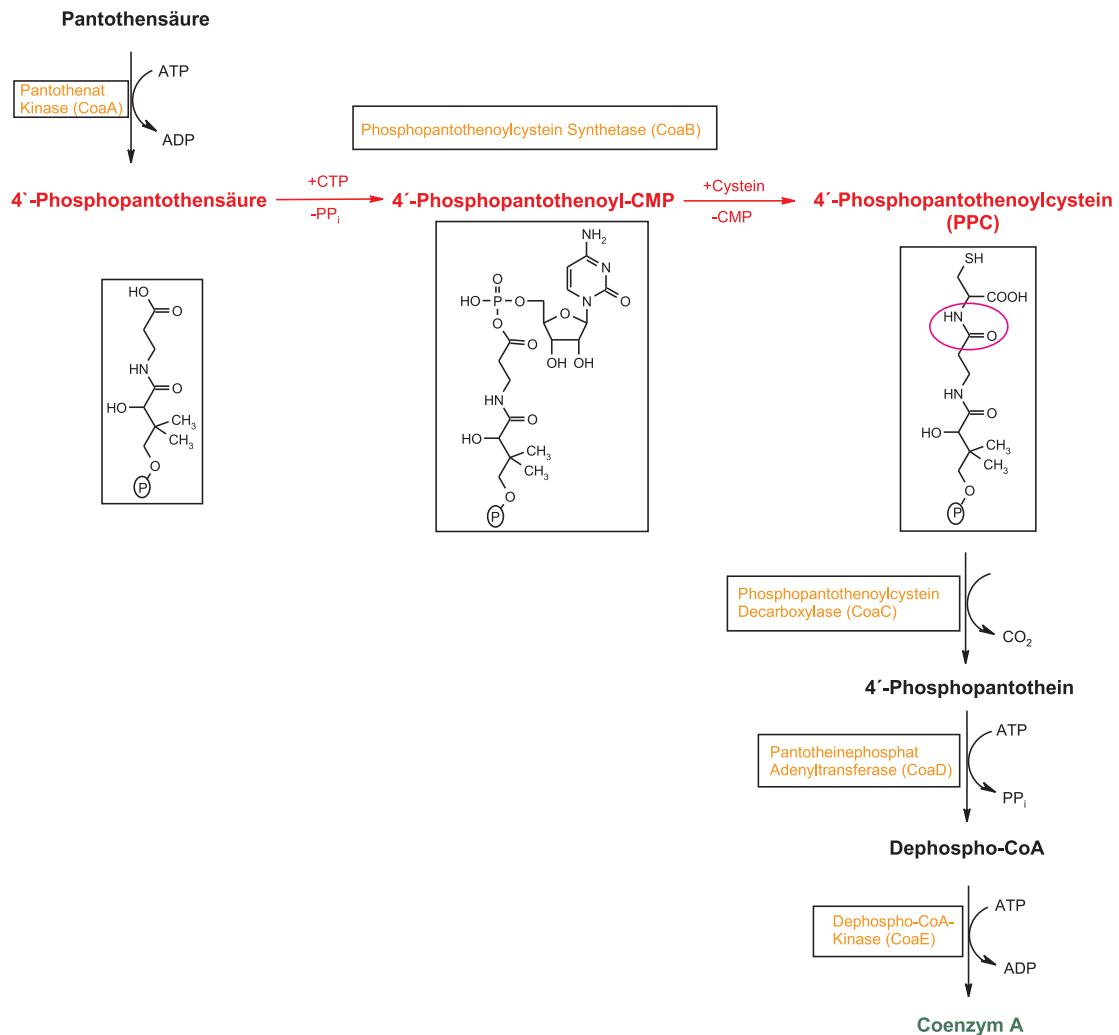


Abbildung 2.4: Biosynthese von Coenzym A: CoaB katalysiert die Reaktion zu *R*-4'-Phospho-N-pantothenoylcystein (*PPC*). CTP wird für die Aktivierung der 4'-Phosphopantothersäure verwendet, um das Acyl-Intermediat 4'-Phosphopantothenoyl-CMP zu bilden. Die Peptidbindung, die durch CoaB synthetisiert wird, ist im Produkt *PPC* hervorgehoben.

2.2 Proteinfaltung wird *in vivo* durch Chaperone katalysiert

Die Faltung der meisten Proteine wird von Enzymen unterstützt, da sich in der räumlichen Enge der Zelle die neu entstehenden Proteine ineinander verwirren würden. Molekulare „Anstandsdamen“, so genannte **Chaperone**, greifen hier ein, indem sie falsche Kontakte verhindern und eine illegale Liaison unterbinden. Chaperone binden reversibel entfaltete Segmente von Polypeptiden, die sonst als Aggregationszentren dienen und störend sein könnten. Somit minimieren sie die Aggregation von Proteinen und können auch bereits gebildete Proteinaggregate wieder auflösen. Die Hydrolyse von ATP dient dabei als Antriebsquelle für das Wirken der Chaperone.

Bindet eine neu entstehende Polypeptidkette an ein Chaperon, hält dieses es für einige Minuten entfaltet fest. Dies erscheint auf den ersten Blick nicht ganz einleuchtend, da die Konformation eines Proteins durch seine Aminosäuresequenz festgelegt ist. Denn auch im Reagenzglas falten sich die meisten Proteine spontan zur nativen Konformation. Die Unterschiede bestehen zum einen in der wesentlich höheren Proteinkonzentration (ca. 200 g/l) in der Zelle; ein entstehendes Protein ist somit von vielen potentiellen molekularen „Ablenkungen“ umgeben (Stryer, 1999). Zum anderen werden Rückfaltungsexperimente *in vitro* normaler Weise mit fertigen Proteinen durchgeführt, während im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) das N-terminale Ende eines neuen Proteins den ER-Kanal viele Sekunden (oder sogar Minuten) vor dem C-terminalen Ende verlässt. Chaperone bewahren durch Bindung der Polypeptidkette den entstehenden Teil der neuen Kette, indem sie unerlaubte intermolekulare Wechselwirkungen ausschließen. Zudem laufen Rückfaltungen vieler Proteine *in vitro* wesentlich langsamer und weniger effizient ab als *in vivo*, da Chaperone zusätzlich als Katalysator fungieren. Wie lange ein Chaperon ein Protein bindet, hängt von der Geschwindigkeit der ATP-Hydrolyse ab.

Der ADP-Chaperon-Komplex (siehe Abbildung 2.5) hat eine hohe Affinität für ungefaltete Polypeptide, jedoch nicht für bereits gefaltete native Proteine. Bindet ein ungefaltetes Peptidsegment an den ADP-Chaperon-Komplex, wird ADP freigesetzt und ATP tritt in das aktive Zentrum des Chaperons. Dieser ATP-Chaperon-Komplex setzt im Folgenden das Peptidsegment frei. Damit das Chaperon anschlie-

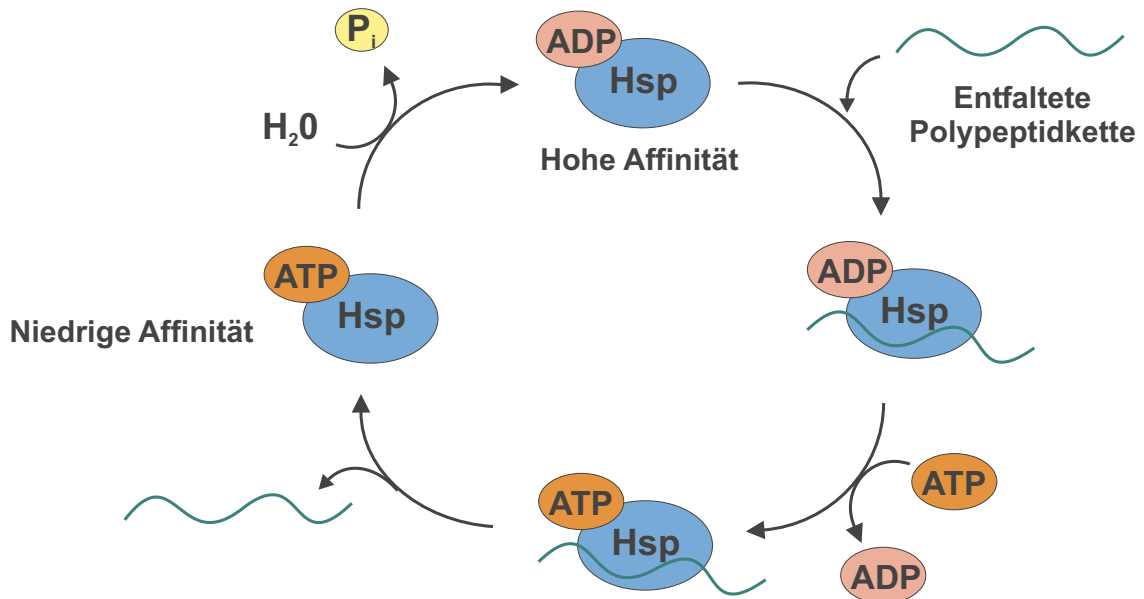


Abbildung 2.5: Zyklus der ATP-getriebenen Bindung von ungefalteten Proteinen an Chaperone, die als Hitzeschockproteine (Hsp) die Faltung unterstützen.

Wenn ein ungefaltetes Polypeptid erneut an ein Chaperon binden kann, erfolgt die Hydrolyse des gebundenen ATP zu ADP. Die Hydrolyse als geschwindigkeitsbestimmender Schritt entscheidet über den Zeitraum zwischen der Freisetzung und erneuten Bindung eines Peptidsegments; Chaperone sind langsame ATPasen (Stryer, 1999).

2.2.1 Cns1- ein Co-Chaperon von Hsp90 und Hsp70

Alle Zellen, prokaryotische wie eukaryotische, antworten auf einen Temperaturanstieg (Hitzeschock) mit der vermehrten Synthese von Chaperonen. Deshalb werden sie auch **Hitzeschockproteine** (Hsp) genannt. Weitere Faktoren, die die Synthese von Hsp auslösen können, sind neben dem Hitzeschock auch chemische Substanzen wie z.B. Arsenit, Ethanol oder Schwermetalle, physikalische Reize wie Druck und UV-Licht oder physiologischer Streß, wie er etwa bei Erkrankungen des Organismus durch Infektionen, Anoxie oder Ischämie verursacht wird (Hightower, 1991). Die Gruppe der molekularen Chaperone wird ihrem Molekulargewicht entsprechend in verschiedenen Klassen unterteilt: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 (die auch Chaperonine genannt werden) Hsp40, kleine Hsp und Calnexin/Calreticulin. All diesen

Hitzeschockproteinen ist bei ihrer Induktion gemein, dass eine große Anzahl ungefalteter Proteinketten vorliegt.

Für das Überleben von Zellen und Organismen ist das Zusammenspiel und die Interaktion von Hsp90 und Hsp70 sehr wichtig, denn viele zelluläre Proteinfaltungs- und Transportprozesse sowie die Aktivierung vieler Substratproteine werden von diesen zwei Chaperonmaschinen bewirkt. Dabei bilden sie mit Hilfe von Co-Chaperonen hochmolekulare und dynamische Komplexe mit den Substratproteinen, die so in einem inaktiven Zustand gehalten werden. Zusätzlich ist die Interaktion mit den Chaperonen für die nachfolgende Aktivierung durch die jeweilige Signaltransduktionskette essentiell. In dem Multichaperonkomplex werden diese zwei Chaperonmaschinen Hsp90 und Hsp70 durch ein drittes Protein Hop (*Hsp70/90 organizing protein*) verbunden, das somit einen physikalischen Link zwischen den beiden Chaperonen darstellt (siehe Abbildung 2.6). Viele Proteine sind von Hsp70 und Hsp90 abhängig, die wichtigsten Vertreter sind z.B. Steroidhormon-Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Kinasen und das Tumorsuppressor-Protein p53 (Wegele *et al.*, 2003).

Hsp90

Hsp90 ist ein hochkonserviertes Hitzeschockprotein, das mit 1 bis 2% den größten Anteil der gesamten Proteine in der Zelle einnimmt. Es ist ubiquitär in Prokaryoten und allen Klassen von Eukaryoten vertreten, allerdings scheint es in Archaeen zu fehlen. Es ist in verschiedenen Zellkompartimenten zu finden, z.B. dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und in den Chloroplasten. Während zytoplasmatisch vorkommendes Hsp90 essentiell für die Lebensfähigkeit unter allen Bedingungen in Eukaryoten ist und damit auch unter nicht-Stressbedingungen vorhanden ist, ist das bakterielle Homolog HtpG unter nicht-Stressbedingungen nicht essentiell. Hsp90 besteht aus drei Domänen: einer hochkonservierten N-terminalen ATPase Domäne, einer Mitteldomäne und einer C-terminalen Dimerisierungsdomäne (Übersicht in Wegele *et al.*, 2004).

Die Hydrolyse von ATP scheint für die Funktion von Hsp90 *in vivo* von zentraler Bedeutung zu sein, denn Mutanten, die ATP nicht hydrolysieren können, können die lebenswichtigen Funktionen von Hsp90 nicht ausführen. Im Gegensatz zu den meisten ATP-hydrolysierenden Proteinen ist ATP in einer ungewöhnlich geknickten Kon-

formation gebunden, wie die Kristallstruktur der N-terminalen Domäne von Hsp90 im Komplex mit ATP zeigte (Prodromou *et al.*, 1997). In die ATP-Bindetasche von Hsp90 können viele natürliche Substrate vollkommen unterschiedlicher Klassen mit hoher Spezifität und Affinität binden. Auch die Identifizierung einiger Antitumorproteine als Hsp90 Substrate führte zu Überlegungen, Hsp90 als *drug target* zu nutzen. Z.B. weisen Geldanamycin (GA) und das damit verwandte Herbimycin A eine Antitumoraktivität auf. Geldanamycin bindet dabei an die N-terminale Domäne von Hsp90 und fungiert als kompetitiver Inhibitor von ATP. Die Affinität von Geldanamycin für Hsp90 ist ca. 500-fach höher als die von ATP. Das humanverträglichen Geldanamycinderivat 17-AAG (17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin) hat bereits in nanomolaren Konzentrationen starke Antitumoraktivität gegen eine Reihe verschiedener Krebsarten gezeigt, wie aus klinische Untersuchungen hervorgeht (Übersicht in Wegele *et al.*, 2004).

Hsp70

Hsp70 Proteine stellen eine ubiquitär vorkommende Klasse von molekularen Chaperonen dar, die eine zentrale Bedeutung für das Chaperonsystem haben. Diese Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa üben zahlreiche essentielle Funktionen aus: Faltung von Proteinen in der Zelle, Regulation der Hitzeschockantwort und Translokation von Proteinen über Membranen. In Eukaryoten wurden Hsp70 Proteine im Cytosol, in Chloroplasten, Mitochondrien und im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) gefunden. In Säugetieren existieren zwei Isoformen im Cytoplasma: Neben der stress-induzierbaren 72 kDa große Form (Hsp70), die wichtige Funktionen eben unter Stressbedingungen ausüben, gibt es eine 73 kDa große Form, die konstitutiv exprimiert wird (Hsc70). Neuere Studien postulieren auch extrazellulär lokalisiertes Hsp70, das eine Schlüsselrolle bei der Induktion der zellulären Immunantwort spielen könnte. In *E. coli* gibt es mindestens drei cytosolische Isoformen der Hsp70-Familie: DnaK, Hsc66 und Hsc62 (Itoh *et al.*, 1999), von denen DnaK der bekannteste Vertreter ist. In Archaeen kommt Hsp70 in Halophilen und in einigen, aber nicht allen, Methanogenen vor. So fehlt es z.B. dem extrem thermophilen *Methanococcus jannaschii* (Übersicht in Wegele *et al.*, 2004).

Obwohl die einzelnen Hsp70 Proteine unterschiedliche Funktionen ausüben, können

sie dennoch alle in 3 Domänen unterteilt werden: Hsp70-Proteine bestehen aus einer hochkonservierten 44 kDa N-terminalen ATPase-Domäne und einer weniger konservierten 28 kDa C-terminalen Domäne, die in eine 18 kDa Peptidbindedomäne und eine 10 kDa variable Domäne mit unbekannter Funktion unterteilt werden kann. Die 44 kDa Domäne von Hsp70 hat im nativen Protein eine schwache intrinsische ATPase Aktivität, während die isolierte ATPase Domäne eine wesentlich höhere ATPase Aktivität zeigt (Übersicht in Wegele *et al.*, 2004).

Hsp70 Proteine arbeiten wie alle Chaperone ATP-abhängig an der Faltung von Polypeptidketten. Dabei sind die Zyklen von Substratbindung und -freisetzung mit der Bindung und Hydrolyse von ATP sowie einem Nukleotidaustausch gekoppelt. Während der ADP-Hsp70-Komplex eine hohe Affinität zum Substrat besitzt, weist die ATP-gebundenen Form des eukaryotischen Hsp70 keine zum Substrat auf. Somit führt also ATP-Hydrolyse zu einer stabileren Interaktion von Hsp70 mit dem jeweiligen Substrat (Abbildung 2.5).

Da Hsp70 Proteine in wichtige zelluläre Prozesse involviert sind wie dem Transport von Proteinen über Membranen, der Disassemblierung von Clathrin-umhüllten Vesikeln und der Regulation der Hitzeschockantwort. Somit kommt diesen Proteinen eine große Bedeutung dieser Proteine zu. Im Gegensatz zu Hsp90 sind Hsp70 Chaperone in einer breiten Vielfalt an Funktionen involviert (Bukau and Horwich, 1998); (Wegele *et al.*, 2004) während Hsp90 spezialisiertere Faltungsfaktoren zu sein scheinen (Buchner, 1999); (Wegele *et al.*, 2004); (Pearl and Prodromou, 2000); (Picard, 2002); (Young *et al.*, 2001).

Cns1

Die Familie der Hsp70 Chaperone aus *Saccharomyces cerevisiae* beinhaltet 14 Mitglieder, die nach ihrer Lokalisation in der Zelle in weitere Unterfamilien unterteilt werden: Ssa 1-4 , Ssb1-2 , Sse 1-2 und Ssz (wobei Ss für *stress-seventy-related* steht und die Buchstaben a, b, e und z Synonyme der Unterfamilien repräsentieren), die im Cytosol lokalisiert sind; die Proteine Kar2 und Ssi1 befinden sich im ER; sowie die mitochondrial lokalisierten Proteine Ssc1, Ssh1 und Ssj1 (Wegele *et al.*, 2003). Ssa-Proteine, die für Hefezellen essentiell sind, weisen eine nahe Verwandtschaft zu den cytosolischen Proteinen in Säugezellen auf. Es wurde gezeigt, dass in *Saccha-*

Saccharomyces cerevisiae nur die Klasse der Ssa Proteine in die Bildung des Multichaperonekomplexes mit Hsp90 (yHsp90) involviert ist. Dabei stellt Sti1 (*stress-inducible protein 1*) die Verbindung zwischen Hsp70 und Hsp90 Chaperonen in Hefen dar analog zu seinem eukaryotischen Homologen Hop. Im Gegensatz zu Hop fungiert Sti1 aber nicht nur als passiver Linker zwischen den beiden Chaperonen, sondern hat auch regulatorische Eigenschaften. Es ist in der Lage, die ATPase Aktivität von Ssa1 anzutreiben und gleichzeitig die ATPase Aktivität von yHsp90 zu inhibieren. Damit ist Sti1 ein spezifischer Aktivator von Hsp70 Chaperonen aus *Saccharomyces cerevisiae* (Wegele *et al.*, 2003).

Ebenso wie Sti1 zählt auch Cns1 (*cyclophilin seven suppressor*) zu den Co-Chaperonen, die mit Hsp90 und Hsp70 interagieren. Es bindet an beide Chaperone mit vergleichbarer Affinität. Im Gegensatz zu Sti1 hat Cns1 keinen Einfluss auf die ATPase Aktivität von yHsp90, während es hingegen die ATPase Aktivität des Hsp70 Chaperons Ssa um das 30-fache erhöht (Hainzl *et al.*, 2004). Des Weiteren wird Cns1 nicht wie Sti1 durch einen Hitzeschock induziert. Die Homologie zwischen den beiden Proteinen beträgt 24 % und die Sequenzidentität 18 % (Dolinski *et al.*, 1998).

Die Bindung zu den Chaperonen erfolgt bei beiden Co-Chaperonen über eine TPR- (*tetratricopeptid repeat*) Domäne, die wiederum in drei TPR-Motive unterteilt werden kann. Diese TPR-Motive bestehen aus helikalen Modulen mit wenig konservierten Wiederholungen von 34 Aminosäuren, die die Interaktion zwischen den Proteinen vermitteln (Richter *et al.*, 2003); (Lamb *et al.*, 1995). Der N-terminale Teil der TPR-Domäne interagiert mit Hsp70 (Ssa), während die C-terminale Hälfte dieser TPR-Domäne für Wechselwirkungen mit Hsp90 wichtig zu sein scheint (Scheufler *et al.*, 2000).

Cns1 ist ein monomeres, 44,1 kDa großes Protein, das in Hefen essentiell ist (Hainzl *et al.*, 2004); (Dolinski *et al.*, 1998); (Duina *et al.*, 1996); (Bohen, 1998); (Fang *et al.*, 1998). Es besteht aus 385 Aminosäuren, die in zwei Domänen aufgeteilt werden können: Die N-terminale Domäne (Cns1 N-204) mit ca. 200 Aminosäureresten besteht hauptsächlich aus der TPR-Domäne. Der C-terminalen Domäne (Cns1 218-C) aus 180 Aminosäuren bestehend ist bisher noch kein bekanntes Sequenzmotiv zugeordnet worden.

Der Name „Cns“ (*cyclophilin seven suppressor*) rührt von seiner Eigenschaft als

Suppressor eines schwerwiegenden Wachstumsdefekts her, der durch die Deletion von Cpr7 verursacht wurde. Cpr7 ist eines der zwei in *S. cerevisiae* vorkommenden Homologen (Cpr6 und Cpr7) des Cyclophilin 40; wobei Cns1 allerdings nur an Cpr7, nicht an Cpr6 bindet. Hefe-Stämme, denen das Protein Cpr7 durch einen *Knockout* fehlt, sind zwar überlebensfähig, stellen aber einen langsam wachsenden Phenotyp dar (Dolinski *et al.*, 1998). Cns1 wird in Hefen nur in sehr geringer Anzahl exprimiert (670 Kopien/Zelle) (Ghaemmaghami *et al.*, 2003), aber durch Überexpression von Cns1 vermag es den Cpr7 *Knockout* zu kompensieren.

Im Allgemeinen sind Cyclophiline *cis-trans*-Peptidyl-Prolyl-Isomerasen, die sowohl an das Immunsuppressivum Cyclosporin A (CsA) binden als es auch inhibieren (Dolinski *et al.*, 1998). Cyclophilin 40 mit seiner Größe von 40 kDa ist eine Komponente des Hsp90-Steroid-Rezeptor Komplexes, das über seine C-terminalen TPR-Domäne an Hsp90 bindet, während der N-Terminus die Prolyl-Isomerase Domäne beinhaltet.

Wie bereits erwähnt, besitzt Hsp90 eine duale Funktion: Zum einen agiert es nach einem Hitzeschock als Chaperon, um die Faltung denaturierter Proteine zu unterstützen und zum anderen fördert es die Aktivität von Signalproteinen. Dabei fungieren Hsp90 und seine assoziierten Proteine als große Multichaperon-Einheiten, die die verschiedenen Moleküle, die in die Signaltransduktion involviert sind, einschließlich okogener Kinasen und Mitgliedern der Steroid-Rezeptor-Familien, regulieren. Dabei bestehen diese Hsp90-Komplexe aus etlichen Proteinen wie Hsp70, Hop (Homologes zu Sti1 in Hefen), p48, p23, Immunophilin oder Cyclophilin 40, wobei die Chaperon Aktivität *in vitro* einiger dieser Proteine bereits bewiesen wurde (Bose *et al.*, 1996); (Freeman *et al.*, 1996); (Schneider *et al.*, 1996).

Die Interaktionen zwischen diesen Komponenten des Hsp90 Chaperon Komplexes und ihren Substraten laufen hoch geordnet und sehr dynamisch ab, wie für den Aufbau des Komplexes eines Steroid-Hormon-Rezeptors (SHR) in Abbildung 2.6 gezeigt wurde (Smith, 1993); (Smith *et al.*, 1995); (Richter and Buchner, 2001): Als erstes bindet Hsp70 den SHR in einer ATP hydrolysierenden Reaktion, um einen frühen Komplex zu bilden. Der folgende Intermediat-Komplex besteht aus dem Steroid-Hormon-Rezeptor mit Hsp90, Hsp70 und Hop gebunden, aus dem der trimere Hsp90-Hsp70-Hop-Komplex bald verdrängt und durch einen Hsp90-Immunophilin-p23-Komplex ersetzt wird. In diesem reifen Komplex ist der Steroid-Hormon-Rezeptor imstande, Hormone zu binden. Bindet der Rezeptor kein

Hormon, wird er aus dem Komplex freigegeben und durchläuft den Assoziations-Dissoziations-Zyklus erneut (Richter and Buchner, 2001).

Der Hsp90-Inhibitor Geldanamycin (GA) bindet an Hsp90 und unterdrückt so die Bindung von p23 an den Hsp90-Komplex. Dadurch findet GA Anwendung als chemotherapeutisches Agens. (Richter and Buchner, 2001).

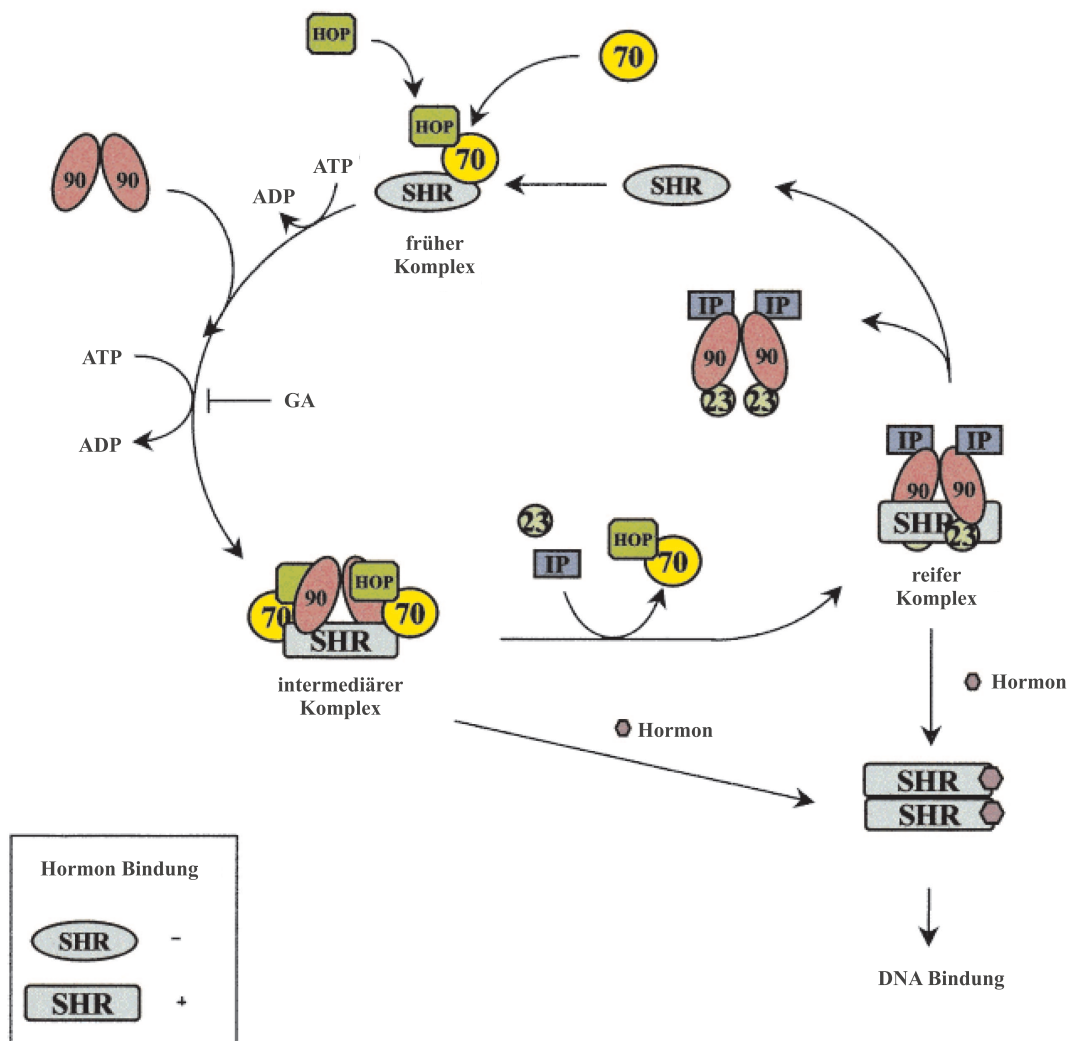


Abbildung 2.6: Chaperon Zyklus für die Aktivierung von Steroid-Hormon-Rezeptoren (SHR) durch Hsp90 (Richter and Buchner, 2001)

Da Hsp90 mit seinen assoziierten Partnerproteinen strukturell und funktionell kon-

serviert ist, kann das Gedankenmodell der Hsp90-assoziierte Chaperonmachinerie von Hefen auf Säugetiere übertragen werden, allerdings mit einem Komplex, der Hitzeschock induziert und nicht essentiell ist (Hsc82, Cpr6 und Sti1), während der andere Komplex konstitutiv und wichtig für das vegetative Wachstum ist (Hsc82, Cpr7 und Cns1) (Dolinski *et al.*, 1998).

2.3 Immunglobuline

2.3.1 Immunglobuline als Bestandteil des Immunsystems

Das Immunsystem hat die Aufgabe, Wirbeltiere vor Mikroorganismen wie Bakterien, Viren oder Parasiten zu schützen. Dies geschieht durch Erkennung der fremden molekularen Einheiten, ihrer Unterscheidung von den eigenen und der Einleitung ihrer Zerstörung. Das Immunsystem lernt aus Erfahrungen und vermag sich zu erinnern; Spezifität und Gedächtnis sind Kennzeichen des Immunsystems. Es verwendet zwei verschiedene Wege zur Kommunikation: Das Erkennungssystem der **humoralen Immunantwort** (humor = *lat.* Flüssigkeit) besteht aus löslichen Proteinen, den Antikörpern (Immunglobuline), die von Plasmazellen produziert werden. Plasmazellen sind B-Zellen, die durch T-Zellen aktiviert worden sind. Bei der **zellulären Immunantwort** töten T-Lymphocyten (T-Zellen) Zellen, die an ihren Oberflächen fremde Strukturen besitzen. Da B-Zellen durch T-Lymphocyten aktiviert werden, stimulieren sie somit zusätzlich die humorale Immunantwort. Beide Vorgänge, sowohl das Abtöten als auch die Unterstützung, werden durch die Bindung von T-Zellen-Rezeptoren an Peptide initiiert, die von MHC-Proteinen auf der Oberfläche von Zielzellen präsentiert werden (Stryer, 1999).

Immunologie vertieft das Verständnis pathologischer Vorgänge und liefert neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten, z.B. dienen monoklonale Antikörper als hochspezifische Detektoren für pathogene Mikroorganismen, Gewebläsionen und Krebs. Immunologie liefert auch Erkenntnisse über die Auslösemechanismen der Zellentwicklung und die Vorgänge bei der Stimulation oder Suppression einer Zelle durch die andere. Immunglobinfaltung ist ein fundamentales Strukturprinzip, auf das alle vielzelligen Organismen zurückgreifen, um Zell-Zell-Adhäsion und

-Erkennung zu vermitteln.

2.3.2 Funktion und Aufbau von Immunglobulinen

Antikörper oder Immunglobuline sind lösliche Antigen-Rezeptoren, die von aktivierten B-Zellen (Plasmazellen) gebildet und an das Blutplasma abgegeben werden. Als wichtiger Teil der humoralen Immunabwehr unterstützen sie das zelluläre Immunsystem auf verschiedenen Weisen, ohne selbst antimikrobielle Eigenschaften zu besitzen:

- Neutralisierung: Durch Bindung an Antigene auf der Oberfläche von Erregern verhindern sie deren Interaktion mit Körperzellen.
- Agglutinierung: Vernetzung einzelliger Erreger zu Aggregaten (Immunkomplexen), die leichter von Phagozyten aufgenommen werden können.
- Opsonierung: Aktivierung des Komplement-Systems und dadurch Förderung der angeborenen Immunabwehr.

Die Immunglobuline des Menschen werden in fünf Klassen eingeteilt:

Immunglobulin G (IgG) sind mit ca. 75% quantitativ die größten und wichtigsten Antikörper im Blut. Sie werden bei einer Erstinfektion erst nach ungefähr drei Wochen gebildet und treten bei einer Zweitinfektionen sofort in Aktion. Tritt dieselbe Infektion aber noch einmal auf, so werden IgG Antikörper sehr schnell und in sehr großer Menge produziert, um den erneuten Ausbruch einer Erkrankung zu verhindern. Sie können mit Hilfe von Rezeptoren die Plazenta passieren und werden so von der Mutter auf den Fötus übertragen.

Immunglobulin A (IgA) sind auf die Abwehr von Antigenen an den Oberflächen der menschlichen Schleimhäute z. B. in Nase, Rachen und Darm spezialisiert. Ihr Anteil an der gesamten Antikörpermenge beträgt ungefähr 17% . Häufig werden Krankheitserreger und Allergene schon durch die IgA abgefangen und neutralisiert. Dringen die Erreger aber tiefer ein, kommt es zu einer Immunreaktion. IgA gelangt

in die Milch einer stillenden Mutter, die so ihre Abwehrstoffe auf ihren Säugling übertragen kann.

Immunglobulin M (IgM) werden als Erste gebildet, wenn ein Antigen in den Organismus gelangt. Ihre Frühformen sitzen auf der Oberfläche von B-Zellen und werden später als Pentamere von Plasmazellen sezerniert. Weil IgM so schnell zur Verfügung steht, werden sie auch als Frühantikörper bezeichnet. Ihre Wirkung richtet sich besonders gegen Mikroorganismen.

IgM und IgG arbeiten Hand in Hand. Die Produktion von IgM sinkt einige Wochen nach Beginn der Infektion ab. Dann sind zum Schutz des Organismus verstärkt die IgG Antikörper gebildet worden, die einen speziellen Schutz bieten: Ist die Infektion eine Erstinfektion, dann steigt die IgM Produktion rasch an. Ist die Infektion eine Zweitinfektion, dann bleibt die IgM Konzentration gering. Ist die akute Phase einer Infektion überwunden, sinkt die Konzentration des IgM wieder.

Immunglobulin E (IgE) finden sich in geringen Konzentrationen im Blut (nur 0,001% aller Immunglobuline sind IgE). Sie sind stark spezialisiert: Sie lösen die Degranulation von Mastzellen aus und spielen daher bei der Abwehr von Parasiten (Wurminfektionen) und bei Allergien eine wichtige Rolle. Sie stammen aus dem Lymphgewebe, das in der Nähe der Atemwege und des Verdauungstraktes liegt. Sie können sich leicht an alle anderen Körperzellen ankoppeln und sind vor allem in der Haut und in den Schleimhäuten zu finden, die bei allergischen Reaktionen auf Allergene beteiligt sind. Kommen Allergene auf der Haut und den Schleimhäuten mit IgE in Berührung, bewirken die IgE eine Veränderung in der Funktion verschiedener Zellen. Diese Veränderungen führen zur Ausschüttung von Mediatoren (oder Mittlersubstanzen) aus den Zellen, die eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Der bekannteste Mediator ist das Histamin.

Immunglobulin D (IgD) sind im Serum nur in sehr geringen Mengen nachweisbar. Über ihre genaue Funktion und Bedeutung ist bisher nicht sehr viel bekannt. Es wird aber vermutet, dass sie bei der Aktivierung der B-Lymphozyten eine Rolle spielen, denn sie „sitzen“ auf der Oberfläche der B-Lymphozyten und kreisen mit ihnen im Blutstrom.

Immunglobuline sind heterotetramere Glykoproteine (siehe Abbildung 2.7), die aus zwei „schweren“ (H-Ketten, rot bzw. orange) und zwei „leichten“ (L-Ketten, gelb)

Polypeptidketten aufgebaut sind und eine Y-förmige Grundstruktur bilden. Die Proteinase Papain spaltet Immunglobuline in zwei Fab-Fragmente (*antigen binding*) und ein Fc-Fragment (*c=cystallizable*). Die Fab-Fragmente bestehen jeweils aus einer L-Kette und dem N-terminalen Teil der H-Kette. Sie enthalten sowohl im Fragment als auch im kompletten Antikörper die Antigenbindungsstelle. Das Fc-Fragment setzt sich aus den C-terminalen Hälften der beiden H-Ketten zusammen, die glycosiliert sind (blau). Die Aufgabe des Fc-Fragments besteht in der Bindung an Zelloberflächenrezeptoren (z.B. IgG - Makrophagen / IgE - Mastzellen), in der Aktivierung des Komplementsystems sowie im Transport der Antikörper. Die einzelnen Immunglobuline üben entsprechend ihrem Aufbau verschiedene Funktionen aus.

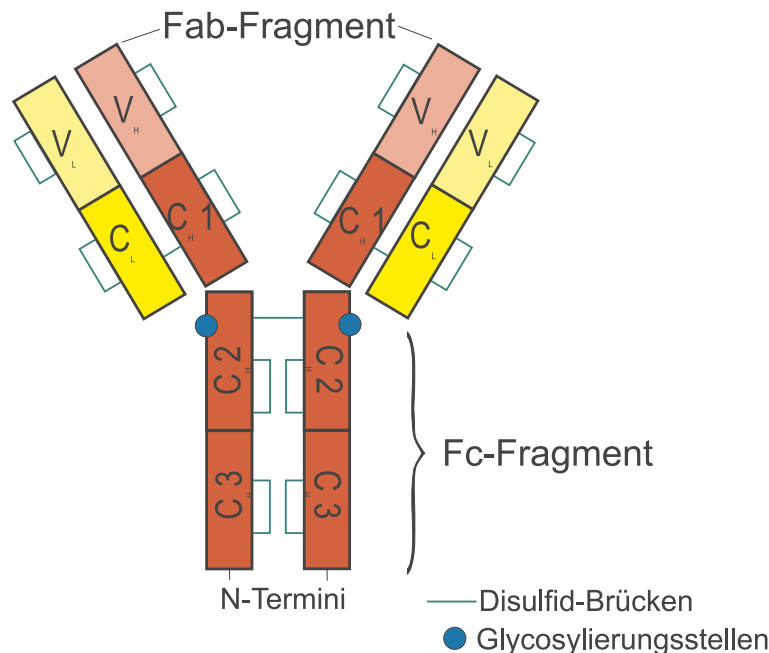


Abbildung 2.7: Abbildung des Immunglobulinantikörpers IgG. Die schweren Ketten sind rot, die leichten Ketten gelb dargestellt. Die Antigenbindungsstellen sind heller gekennzeichnet.

Immunglobuline sind modular aus mehreren kompakten Immunglobulin-Domänen aufgebaut: Vier dieser Domänen ($V_H, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}$) sind in den H-Ketten der IgG enthalten, zwei (V_L, C_{L1}) in den L-Ketten (wobei „C“ und „V“ jeweils konstante bzw. variable Bereiche kennzeichnen). Sowohl die beiden schweren Ketten als auch die schweren mit den leichten Ketten werden durch konservierte Disulfid-Brücken

verbunden. Weitere Disulfid-Brücken befinden sich innerhalb der Domänen zur Stabilisierung der Tertiärstruktur. Die Domänen haben alle eine Länge von etwa 110 Aminosäuren und sind untereinander homolog. In dem zentralen Bereich der Antikörper, die „*hinge*“-Region genannt wird und wie ein Schanier funktioniert, sind sie sehr beweglich. So kann der Abstand zwischen den Antigenbindungsstellen an den Enden der Fab-Einheiten variiert und damit an die spezifischen Determinanten auf dem Antigen angepasst werden, um die Bindungsaffinität zwischen Antikörper und Antigen zu erhöhen. Da alle Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie diese homologen und kompakt faltenden Domänen besitzen, die auch als *Immunoglobulin-Fold* bezeichnet werden, sind sie ein geeignetes Modellsystem für die Analyse der Faltung.

2.3.3 Der monoklonale Antikörper MAK33 aus Maus

Monoklonale Antikörper (MAK) werden von Immunzellen sezerniert, die von einer einzigen Antikörper bildenden Zelle abstammen, d.h. von einem Zellklon. Deshalb sind MAK jeweils nur gegen eine bestimmte Region einer immunogenen Substanz, die man als antigene Determinante (oder Epitop) bezeichnet, gerichtet. Große Moleküle enthalten mehrere Epitope, gegen die von verschiedenen B-Zellen unterschiedliche Antikörper gebildet werden.

Der monoklonare Antikörper MAK33 aus den B-Lymphozyten der Maus ist gegen die humane Creatin-Kinase (CK) des Skelettmuskelgewebes gerichtet. Creatin-Kinase ist ein intrazelluläres dimeres Enzym, das aus zwei Untereinheiten besteht. Es katalysiert die ATP-abhängige Phosphorylierung von Creatin. Es existieren drei Isoenzyme, die sich aus den Untereinheiten B (*brain*, Gehirn) und M (*muscle*, Muskel) zusammensetzen:

1. CK-BB kommt vor allem im Gehirn vor. Nach einem Schlaganfall (Apoplexie), einem epileptischen Anfall oder einer chronischen Niereninsuffizienz ist die Konzentration von CK-BB im Blutserum erhöht.
2. CK-MM ist hauptsächlich im Skelettmuskel zu finden. Bei einer Muskelerkrankung (z.B. progressive Muskeldystrophie) oder Muskelschädigungen (z.B. nach Injektionen) ist die CK-MM-Konzentration erhöht.

3. CK-MB kommt vor allem im Herzmuskel vor. Die Konzentration an CK-MB im Serum steigt nach einem Herzinfarkt deutlich an (Hildebrandt, 1998).

MAK33 hemmt fast ausschließlich die Aktivität des muskelspezifischen Isoenzym (CK-MM) und verringert die Kreatinkinase-Aktivität um 80%, wenn es an die dimer Form des CK-MM bindet (Buckel *et al.*, 1987). Nach einem Herzinfarkt wird in der klinischen Diagnostik zur Bestimmung der CK-MB-Konzentration eine Mischung von Antikörpern eingesetzt, die die CK-MM zu fast 100% inhibieren. Dabei werden CK-MB ebenfalls zu 50% inhibiert. Da der monoklonale Antikörper MAK33 ausschließlich die CK-MM-Aktivität hemmt, stellt er eine Ausnahme dar. Er ist allerdings für klinische Zwecke wenig geeignet, da er eine zu geringe inhibierende Wirkung zeigt.

2.4 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

2.4.1 Überblick

Da die Methode der Röntgenkristallographie in verschiedenen Lehrbüchern (Blundell and Johnson, 1976); (Drenth, 1994); (Stout and Jensen, 1989) ausführlich behandelt wird, sind im Folgenden nur die wichtigsten Grundprinzipien dieser Methode kurz erläutert.

Die Grundlage der Röntgenkristallographie wurde durch Wilhelm Conrad Röntgen geschaffen, der bei seinen Experimenten mit Kathodenstrahlen die nach ihm benannten Röntgenstrahlen entdeckte (Röntgen, 1895). M. v. Laue und seine Mitarbeiter (Friedrich *et al.*, 1912) zeigten 1912 das erste Mal Diffraction von Röntgenstrahlen, was W. L. Bragg 1913 (Bragg, 1913) dazu nutzte, die ersten Strukturbestimmungen an Natrium- und Kaliumchloridkristallen durchzuführen. P. P. Ewald etablierte 1921 die Theorie des reziproken Gitters zur Interpretation der Diffraction von Röntgenstrahlen an Kristallen (s.u.) und setzte so einen Meilenstein in der Röntgenkristallographie (Ewald, 1921). Über Kristalle von Proteinen wurde bereits 1840 berichtet, aber es dauerte bis 1934, bis die ersten Röntgendiffraktionsbilder eines Proteinkristalls veröffentlicht wurden (Bernal and Crowford, 1934). Die ersten bedeutenden Raumstrukturen, die röntgenkristallographisch bestimmt wurden,

waren die der DNA-Doppelhelix (Watson and Crick, 1953) und nachdem 1954 gezeigt werden konnte, dass die Methode des isomorphen Ersatzes auch für Proteine möglich ist (Green *et al.*, 1954); (Harker, 1956), konnten die ersten Proteinstrukturen von Myoglobin (Kendrew *et al.*, 1960) und Hämoglobin (Perutz *et al.*, 1960) gelöst werden.

Die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur von Proteinen ist deshalb von entscheidender Bedeutung, um zelluläre Prozesse im Detail verstehen zu können. Deshalb ist die Strukturbestimmung von Proteinen eines der am meisten bearbeiteten Themen in der modernen biochemischen Forschung. So waren im Februar 2005 in der Proteindatenbank in Brookhaven mehr als 29429 Proteinstrukturen hinterlegt. Um die Struktur von Makromolekülen bei atomarer Auflösung zu bestimmen, kann neben der Röntgenstrukturanalyse auch die Kernmagnetische Resonanz Spektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) angewendet werden. Die NMR-Spektroskopie hat den Vorteil, dass sie keine Kristalle voraussetzt, sondern das Protein in Lösung vorliegt. Außerdem können Informationen über die Dynamik des Makromoleküls gewonnen werden können. Allerdings ist die Anwendbarkeit dieser Methode im Allgemeinen auf Proteine bis zu einer Größe von 35 kDa beschränkt. Deshalb steht zur Strukturanalyse von höher molekularen Proteinen oft nur die Methode der Röntgenkristallographie zur Verfügung.

Die wichtigsten Röntgenquellen für die Proteinstrukturanalyse sind Drehanodengeneratoren, meist mit CuK_α -Strahlung (1,54182 Å) oder Synchrotrone mit Wellenlängen der Strahlung zwischen etwa 0,7 und 1,8 Å. Röntgenstrahlung besitzt wie alle Wellen die charakteristische Fähigkeit zur Interferenz, die durch Beugung an einer dreidimensionalen Anordnung des zu untersuchenden Einkristalls hervorgerufen wird. Somit ist die Proteinstrukturaufklärung durch Röntgenkristallographie auf die Kristallisierbarkeit des Proteinmaterials angewiesen und erfordert dadurch hohe Anforderungen an das Protein bezüglich Reinheit und Homogenität der Präparation.

Die prinzipiellen Schritte zur Lösung einer Proteinstruktur sind dabei:

- Bereitstellung von reinem Protein
- Kristallisationsbedingung finden
- Datensammlung und Datenauswertung des vermessenen Proteinkristalls

- spezifische Lösung des Phasenproblems
- Erstellung eines atomaren Modells des Proteins
- Verfeinerung dieses Atommodells

Besonders die enorme und stetig ansteigende Leistungsfähigkeit moderner Computer zusammen mit der Entwicklung neuer Programme, aber auch neue Techniken auf dem Gebiet der Molekularbiologie, die die Bereitstellung großer Proteinmengen ermöglichen, haben Anteil an der rasanten Zunahme an gelösten Proteinstrukturen.

2.4.2 Kristalle

Die Kristallisation ist ein Vorgang, bei der Moleküle aus übersättigter Lösung in den festen Phasenzustand übergehen. Dabei gibt es verschiedene Methoden zur Erzeugung von Proteinkristallen, wobei die der **Dampfdiffusion** die am häufigsten angewandte Methode darstellt. Bei dieser Methode wird die hochkonzentrierte Proteinlösung mit einem Fällungsmittel (Präzipitans) versetzt und diese Mischung über einem Reservoir mit höherer Konzentration des Fällungsmittels äquilibriert. Der Konzentrationsgradient zwischen Proteinlösung und Reservoir wird durch die Dampfphase ausgeglichen, was zu einem Aufkonzentrieren des Proteins bis zur Übersättigung führt und im Idealfall ein geordnetes Abscheiden des Proteins aus der Lösung, eben die Kristallisation des Proteins, zur Folge hat. Die Ausbildung eines Proteinkristalles ist jedoch stark von den Bedingungen wie pH-Wert, Salzkonzentration, Art des Fällungsmittels, Temperatur usw. abhängig und in keinster Weise vorhersagbar. Dieses vieldimensionale Problem wurde durch faktorielle Ansätze zu lösen versucht (Jancarik and Kim, 1991); (Carter and Carter, 1979), stellt aber auch heutzutage noch eines der Nadelöhre der Proteinkristallographie dar, das im günstigsten Fall halbempirisch zu lösen ist, aber in der Regel auf dem Prinzip von „*trial and error*“ beruht.

Alle Kristalle haben eine regelmäßige, dreidimensionale Aneinanderreihung einer einzelnen Einheit, der sogenannten **Einheitszelle**, gemeinsam. Diese Einheitszelle, die eine unterschiedliche Zahl an Atomen oder Molekülen umfassen kann, wird durch die Länge ihrer drei Achsen (a , b , c) und deren eingeschlossene Winkel α , β und γ charakterisiert. Die periodische Anordnung dieser Elementarzelle ergibt ein

Kristallgitter. Das Konzept der Einheitszelle ermöglicht es, die Strukturbeschreibung des gesamten Kristalls auf die seiner Einheitszelle zu reduzieren. Einheitszellen können eine interne Symmetrie aufweisen, d.h. die Wiederholung einer Anordnung, die durch verschiedene Symmetrieeoperationen erreicht werden kann. Deshalb wird die Einheitszelle oft durch eine kleinere sogenannte **asymmetrische Einheit** und die zugehörigen Symmetrieeoperationen beschrieben. Die asymmetrische Einheit ist demnach der kleinste Teil der Einheitszelle, aus der durch Anwendung aller Symmetrieeoperationen die Einheitszelle entsteht. Moleküle, die über eine kristallographische Symmetrie verwandt sind, sind identisch. Die Zahl der asymmetrischen Einheiten muss nicht mit der Zahl der Moleküle in der Einheitszelle übereinstimmen, so dass auch mehrere Moleküle in einer asymmetrischen Einheit vorliegen können. Diese Moleküle sind nicht identisch, für sie gilt dann eine nicht-kristallographische Symmetrie (NCS).

Es gibt sieben verschiedene Kristallsysteme: triklin, monoklin, orthorhombisch, tetragonale, trigonale, hexagonale und kubische. Diese ergeben zusammen mit den möglichen Symmetrieeoperationen 230 Raumgruppen, von denen jedoch nur 65 enantiomorph sind, d.h. da die Bausteine von Biomolekülen chiral sind, können weder Spiegelebenen, noch Inversionszentren auftreten und so reduziert sich die Anzahl der möglichen **Raumgruppen** für Proteinkristalle auf 65, in denen sie kristallisieren können.

Jede Einheitszelle eines Kristalls kann zur Vereinfachung durch einen Punkt ersetzt werden; so entsteht das Kristallgitter, also ein Gitter von Punkten, das sich in regelmäßigen Abständen in allen drei Richtungen wiederholt und den Inhalt der Einheitszelle und somit die Struktur des gesamten Kristalls widerspiegelt. In den Kristall können **Gitterebenen** so hineingelegt werden, dass sie verschiedene Punkte des Kristallgitters enthalten. Man kann die Lage einer Kristallfläche durch das Verhältnis der Achsenabschnitte im Koordinatensystem angeben. Zur Kennzeichnung der Kristallebenen werden die Reziprokwerte $x = a/h$, $y = b/k$ und $z = c/l$ verwendet (Friedrich *et al.*, 1912). Dabei wird angenommen, dass die Achsen der Einheitszelle parallel zu den Kristallachsen verlaufen. Diese Reziprokwerte werden MILLER-Indizes (hkl) genannt. Weist das Kristallgitter eine Symmetrie auf, liegt jedes Teilchen gemäß der jeweiligen Symmetrieeoperation mehrfach in der Einheitszelle vor und umfaßt dann mehrere asymmetrische Einheiten.

2.4.3 Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen

So wie sichtbares Licht an sehr kleinen Objekten gebeugt wird, können Röntgenstrahlen von Elektronen gebeugt werden. Trifft Röntgenstrahlung auf einen Kristall, regt ihr oszillierendes elektrisches Feld die Elektronen der einzelnen Atome im Proteinkristall zu Schwingungen mit gleicher Frequenz an. Die Elektronen senden ihrerseits dann als oszillierende Dipole eine Sekundärstrahlung gleicher Frequenz aus, die allerdings gegenüber der einfallenden Strahlung um 180° phasenverschoben ist (elastische oder kohärente THOMPSON-Streuung (Thomson, 1903). Im Normalfall, d.h. für leichte Atome wie Kohlenstoff, Stickstoff oder Sauerstoff, können die beobachteten Streueffekte als Beugung an freien Elektronen betrachtet werden, was im Fall der anomalen Streuung (siehe 2.4.4) nicht mehr gilt.

Die einzelnen gebeugten Strahlen interferieren miteinander, wodurch es in Abhängigkeit ihrer Phasendifferenz zu destruktiver oder konstruktiver Interferenz kommt, d.h. in den meisten Richtungen sich diese Wellen zu Null summieren und nur in ausgezeichneten Richtungen eine von Null verschiedene Streustrahlung auftritt (konstruktive Interferenz). Trifft Röntgenstrahlung auf ein geordnetes kristallines System, ergibt sich somit ein charakteristisches Interferenzbild. Dieses Reflexmuster wird dabei durch die Gittersymmetrie, die Intensität der einzelnen Reflexe und durch die Anordnung der Streuzentren in der Einheitszelle bestimmt. Dadurch erhält man Informationen über die Elektronendichteverteilung im Kristall und somit über die Struktur von Proteinen.

Bragg (Bragg, 1913) zeigte 1913 in Analogie zur Beugung von sichtbarem Licht, dass sich die Streuung von Röntgenstrahlen an einem Kristall so verhält, als ob sie an Gitterebenen reflektiert worden wäre. Jeder gestreute Strahl wird als BRAGG-Reflex von einer Kristallgitterebene betrachtet, wobei der Einfallswinkel ($\Theta = 90^\circ - \alpha_{hkl}$, mit d_{hkl} als Abstand benachbarter Gitterebenen) gleich dem Ausfallswinkel ist. Somit weicht der gestreute Strahl um den Winkel $2 \Theta_{hkl}$ vom einfallenden Strahl ab. Erfolgt die Streuung kohärent an benachbarten Gitterebenen, die den Abstand d besitzen, so kommt es für einen bestimmten Einfallswinkel Θ zu einem Gangunterschied von einer Wellenlänge λ oder einem ganzzahligen Vielfachen der Wellenlänge ($n\lambda$). Damit ist die Bedingung der konstruktiven Interferenz erfüllt. Diese wird durch die BRAGG'sche Gleichung beschrieben:

$$2d_{hkl}\sin\Theta_{hkl}=n\lambda$$

Durch Übertragung der BRAGG'schen Reflexionsbedingungen in den reziproken Raum entsteht die EWALD-Konstruktion (Ewald, 1921) (Abbildung 2.8). Dabei lässt sich das BRAGG'sche Gesetz unter Verwendung des reziproken Gitters als Vektordiagramm darstellen. Die EWALD-Konstruktion verbindet so das reziproke Gitter mit dem realen Kristallgitter.

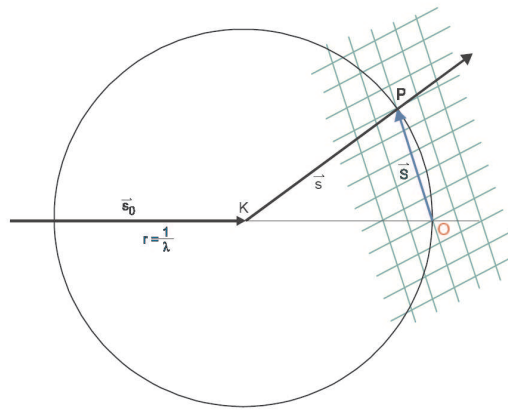


Abbildung 2.8: EWALD-Konstruktion (Ewald, 1921). Die Richtung des Primärstrahls s_0 geht vom Drehpunkt des Kristalls K zum Ursprung O des reziproken Gitters. Um den Kristall wird eine Kugel mit dem Radius $1/\lambda$ gezeichnet. Der gebeugte Strahl wird durch den Vektor s und ein reziproker Gittervektor durch den Vektor S repräsentiert.

Um den Kristall wird an der Stelle K eine Kugel mit dem Radius $1/\lambda$ gelegt. Auf den Schnittpunkt O des ungestreuten Röntgenstrahls durch die EWALD-Kugel wird der Nullpunkt des reziproken Gitters gesetzt. Jedem Reflex hkl ist ein Punkt im reziproken Gitter zugeordnet. Damit bilden die Reflexe des Kristallgitters ein dreidimensionales fiktives Gitter, das bezüglich der Orientierung in fester Beziehung zu dem realen Kristallgitter steht: Jeder dieser Punkte bildet einen Endpunkt des Vektors \vec{S} , der die Länge $1/d_{hkl}$ hat und senkrecht auf der Gitterebene hkl steht. Entsprechend lässt sich eine reziproke Zelle mit den Achsen a^* , b^* und c^* konstruieren. Jede dieser Achsen (z.B. a^*) steht senkrecht auf der Ebene, die von den beiden andere realen Achsen (z.B. b und c) aufgespannt wird und hat als Länge den reziproken Wert der entsprechenden realen Achse (z.B. $a^*=1/a$). Damit lassen

sich die reziproken Gitterpunkte als Vektor $\vec{S} = ha^* + kb^* + lc^*$ beschreiben. Immer wenn ein reziproker Gitterpunkt auf dem Kreis bzw. auf der Kugeloberfläche zu liegen kommt, ist die Reflexionsbedingung erfüllt, d.h. der reziproke Gitterpunkt \mathbf{P} , der die EWALD-Kugel mit dem Radius $1/\lambda$ schneidet, erfüllt exakt die Reflexionsbedingung. Die Richtung des gebeugten Strahls ergibt sich aus der Verbindung des Kristaldrehpunktes \mathbf{K} mit dem die Kugel durchquerenden reziproken Gitterpunkt \mathbf{P} . Daraus folgt, dass die Punkte des reziproken Gitters und damit das Streubild eines Kristalls nur von der Einheitszelle, nicht aber von dem Inhalt der Zelle abhängen. Informationen über den Zellinhalt, also über das Protein, sind in den Intensitäten und Phasen der verschiedenen Reflexe enthalten.

Eine FOURIER-Transformation verknüpft das reale Gitter (also das Protein im Kristall) mit dem reziproken Gitter. Da dies die Voraussetzung ist, um die Struktur von Proteinen mittels Kristallographie aufklären zu können, werden im Folgenden die wichtigsten mathematischen Gleichungen kurz erläutert.

Röntgenstrahlen werden an der Elektronenwolke von Atomen gestreut. Deshalb ist die Beugung des Primärstrahles tatsächlich das Ergebnis der Interferenz aller an den Elektronen der Atomhülle gebeugten Röntgenstrahlen. Die gesamte Streuintensität ergibt sich dabei als Überlagerung aller Elementarwellen.

Betrachtet man eine isolierte Einheitszelle, an der sich eine Röntgenwelle bricht, so ergibt sich ein richtungsabhängiges, kontinuierliches Beugungsbild. Durch die periodische Anordnung im Kristall können diese Sekundärwellen jedoch nur in bestimmte Richtungen konstruktiv interferieren, wodurch typische, punktförmige Reflexe entstehen. Die so erhaltenen Reflexe werden durch die komplexen Strukturformfaktoren beschrieben. Der **Strukturformfaktor** \mathbf{F}_{hkl} ist eine Kombination von N Wellen in der Richtung hkl , die von den N Atomen der Elementarzelle herrühren. Dabei hat jede dieser Wellen eine Amplitude f_i (atomarer Streufaktor) und die Phase ϕ_i , die die räumliche Position des Atoms i in der Elementarzelle ausdrückt. Somit besteht jeder Strukturformfaktor \mathbf{F}_{hkl} aus einer Amplitude und Phase, die sich als komplexe Zahl beschreiben lässt:

$$F_{hkl} = A_{hkl} + iB_{hkl}$$

mit

$$A_{hkl} = \sum_N f_i \cos 2\pi(hx_i + ky_i + lz_i)$$

und

$$B_{hkl} = \sum_N f_i \sin 2\pi(hx_i + ky_i + lz_i)$$

oder

$$\vec{F}(h, k, l) = \sum_i f_i e^{2\pi i \vec{r}_i(h, k, l)}$$

Der Strukturfaktor F beschreibt also die Summe der Streubeiträge über alle Atome i mit den fraktionellen Koordinaten \vec{r}_i in der Einheitszelle; f_i ist der Atomformfaktor oder atomare Streufaktor, der die Auflösungsabhängigkeit der Streuintensität an dem jeweiligen Atom repräsentiert und unter der Annahme von kugelsymmetrischer Ladungsverteilung in Abwesenheit von anomaler Streuung von der Elektronenzahl des jeweiligen Elementes abhängig ist.

Auf diese Weise wird ein Zusammenhang zwischen den Positionen der Atome (oder besser deren Elektronenhüllen) in der Einheitszelle und den die komplexen Strukturfaktoren (in denen die gebeugten Röntgenstrahlen beinhaltet sind) geschaffen.

Temperaturfaktor

Die Atome schwingen in Abhängigkeit von der Temperatur um ihre Gleichgewichtsposition, d.h. die Röntgenstrahlen treffen in aufeinander folgenden Einheitszellen nicht auf identische Atome an exakt der gleichen Position. Dies ist vergleichbar mit einem Röntgenstrahl, der auf ein schnell schwingendes Atom trifft. Dabei wird die gestreute Intensität vor allem bei großen Streuwinkeln vermindert und folglich muss der atomare Formfaktor mit einem temperaturabhängigen Faktor multipliziert werden. Die Bewegung der Atome innerhalb der reflektierenden Ebene (hkl)

beeinflusst aber nicht die Intensität des Reflexes (hkl) , sondern nur die Komponente senkrecht zur Ebene, d.h. in Richtung von \vec{S} , zeigt einen Effekt. Im einfachen Fall der isotropen Bewegung ist die Komponente für jeden Reflex (hkl) gleich und der Korrekturfaktor ergibt sich zu:

$$T_{iso} = e^{-B \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2}}$$

Der Temperaturfaktor ist mit der mittleren quadratischen Auslenkung wie folgt verknüpft:

$$B = 8\pi^2 \times \bar{u}^2$$

Ein Temperaturfaktor von $B = 30 \text{ \AA}^2$ würde demnach einer mittleren quadratischen Auslenkung \bar{u}^2 der atomaren Schwingung um eine Gleichgewichtsposition von $0,62 \text{ \AA}$ entsprechen. Dieser Wert gibt einen Eindruck von der Flexibilität und Unordnung in Proteinstrukturen, die keinesfalls vollkommen starr sind. Folglich beschreibt der Temperaturfaktor B diese dynamische Unordnung im Kristall durch die temperaturabhängige Schwingung der Atome und eine statistische Unordnung, die daraus resultiert, dass die Moleküle in unterschiedlichen Einheitszellen nicht exakt die gleiche Position und Orientierung aufweisen.

Berechnung der Elektronendichte

Da die Röntgenstrahlen an der Elektronenhülle der Atome gebeugt werden, ergeben sich aus der Strukturanalyse nicht sofort die exakten Atomkoordinaten, die den Positionen der Atomkerne entsprechen, sondern die dreidimensionale Verteilung der Elektronen der Atome, die als Elektronendichteverteilung bezeichnet wird. Die **Elektronendichteverteilung** ρ an jedem Punkt (x,y,z) in einem Kristall lässt sich aus der Strukturformamplitude $F(h,k,l)$, die proportional zur Quadratwurzel der gemessenen Intensität I für den Reflex (h,k,l) ist ($I_{hkl} \propto |F_{hkl}|^2$), der entsprechenden Phase ϕ_{hkl} und dem Volumen V der Einheitszelle berechnen:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| e^{i\phi_{hkl}} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

Aus dieser inverser Fourier-Transformierten Formel der Strukturfaktoren wird ersichtlich, dass zur Bestimmung der Molekülstruktur sowohl die Amplitude als auch Phase bekannt sein müssen. Der Gangunterschied ϕ_{hkl} eines Reflexes ist hierbei einer direkten Messung nicht zugänglich, da aus den integrierten Reflexintensitäten lediglich die Strukturamplituden $|\vec{F}_{hkl}|$ bestimmt werden können. Diese Unbestimmtheit wird in der Proteinkristallographie als das **Phasenproblem** bezeichnet.

2.4.4 Lösung des Phasenproblems

Wie bereits unter 2.4.3 beschrieben, sind der reale und reziproke Raum durch die Fourier-Transformation direkt ineinander überführbar und mit den Methoden der Kristallographie allerdings nur die Amplituden der Strukturfaktoren zugänglich. Deshalb müssen die für die Berechnung der Elektronendichteverteilung benötigten Phasen über Umwege erhalten werden. Es gibt verschiedene Ansätze, das Phasenproblem zu lösen:

- die Methode **Isomorphen Ersatzes** (MIR, *Multiple Isomorphous Replacement* oder SIR, *single isomorphous replacement*) (Green *et al.*, 1954), bei denen Schwermetallatome an das Protein im Kristall binden.
- die Methode der **Multiplen Anomalen Dispersion** (MAD) (Hendrickson, 1991), bei der die Messung bei unterschiedlichen Wellenlängen von anomalen Streuern (z.B. Zink, Selen, Quecksilber u.v.a.) die gewünschte Phaseninformation liefert.
- die Methode des **Molekularen Ersatzes** (MR) (Hoppe, 1957a); (Hoppe, 1957b); (Huber, 1965); (Rossman and Blow, 1962), bei der die Phaseninformation aus einer bekannten und hinreichend analogen Kristallstruktur erhalten wird.
- direkte Methoden (Hauptmann and Karle, 1953), die bei der Bestimmung bei Kleinmolekülstrukturen angewandt werden und noch nicht auf Proteinstrukturen übertragbar sind.

Die PATTERSON-Methode kann zur Lösung des Phasenproblems von Proteinstrukturen herangezogen werden: Dieser Methode liegt eine Funktion zu Grunde, die nur

von den Strukturfaktoramplituden und nicht von den Phasen abhängig ist, die so genannte PATTERSON-FUNKTION:

$$P(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}|^2 \cos(2\pi[hu + kv + lw])$$

Die Maxima dieser phasenunabhängigen Funktion entsprechen jedoch nicht den Atompositionen, sondern stellen die interatomaren Distanzvektoren dar. Daher entspricht die Symmetrie der PATTERSON-Synthese derjenigen der Elektronendichte ohne jegliche translatorische Symmetrieelemente mit Hinzufügung eines Inversionszentrums. Bedingt durch die kristallographischen Symmetrieelemente der jeweiligen Raumgruppe kommt es in bestimmten Bereichen dieser Dichtekarte zu einer Häufung von Distanzvektoren. Diese Bereiche werden HARKER-Ebenen genannt. Aufgrund der großen Anzahl an Atomen in einem Protein ist es nicht möglich, aus einer Patterson-Synthese auf die Proteinstruktur zu schließen und so ein Modell für die initiale Phaseninformation zu erhalten. Es ist allerdings möglich, aus Patterson-Karten von Substrukturen, Phaseninformation für die Proteinstruktur abzuleiten. Außerdem können experimentelle Patterson-Dichten mit theoretischen Modellen verglichen werden, um ein Modell so zu platzieren, dass daraus initiale Phasen berechnet werden können. Daraus ergeben sich die Methoden des Isomorphen Ersatzes (MIR oder SIR), der multiplen anomalen Dispersion (MAD) und des molekularen Ersatzes (MR), auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

Isomorpher Ersatz

Der Isomorphe Ersatz beruht auf einer lokalen Änderung der Elektronendichteverteilung im Kristall, wobei der Rest des Kristalls unverändert bleiben muss. Dieses Phänomen wird auch als **Isomorphie** der Kristalle bezeichnet. Um solche Veränderungen im Kristall zu erreichen, können verschiedene Methoden angewendet werden, die verbreitetste Methode ist allerdings die des *Schwermetallssoakens*. Dabei werden die Kristalle in Schwermetallsalzlösungen eingelegt, damit die Schweratome in die mit Lösungsmittel gefüllten Hohlräume des Proteinkristalls eindiffun-

dieren. Schweratome streuen aufgrund ihrer größeren Anzahl an Elektronen Röntgenstrahlen stärker als die in Proteinen vorkommenden Atome, d.h. die Positionen der Reflexe im Derivat und im nativen Beugungsbild sind gleich, lediglich ihre Intensitäten unterscheiden sich. Eine notwendige Eigenschaft des Isomorphen Ersatzes ist allerdings die vollständige Isomorphie der Proteinanordnung im Kristall und die geordnete Bindung von Schweratomen im kristallisierten Protein, da sonst der Datensatz des nativen Proteinkristalls (P) und die meist mehreren Datensätze der isomorphen Schweratom-Derivate (PH) nicht miteinander verglichen und keine zusätzlichen Phaseninformationen gewonnen werden können.

Grundlage dessen ist, dass die Strukturfaktoren des Gesamtmodells $F_{gesamt,hkl}$ sich als Summe der Strukturfaktoren der einzelnen Atome $F_{i,hkl}$ darstellen lassen, die sich wiederum aus den Strukturfaktoren des Proteins F_P und denen der Schweratome F_H zusammensetzen:

$$F_{gesamt,hkl} = \sum_i F_{i,hkl} = F_{P,hkl} + F_{H,hkl}$$

So können die Phasen aus den Koordinaten der zusätzlich eingebrachten Schweratome und den Strukturfaktoramplituden des nativen $|F_P|$ und des veränderten Kristalls $|F_{PH}|$ bestimmt werden:

$$|F_H| = |F_{PH}| - |F_P|$$

In guter Näherung kann davon ausgegangen werden, dass die Differenzen in den bestimmten Strukturfaktoramplituden ($\Delta|F| = |F_H|$) vom Protein (P) und Derivat (PH) allein auf Differenzen in den Strukturen zurückzuführen sind, also auf die vorhandenen Schwermetallatome im Kristall-Derivat.

Eine aus den $(\Delta|F|)$ berechnete PATTERSON-Synthese sollte also nur die interatomaren Distanzvektoren der Schweratome beinhalten und deshalb durch ein geeignetes Schweratommodell interpretierbar sein. Die initialen Phasenwinkel für die Proteinstrukturfaktoren lassen sich also durch den Vergleich der nativen Differenzstrukturfaktoramplitude mit der Derivat- und der Differenzstrukturfaktoramplituden mit den komplexen Strukturfaktoren aus dem Schweratommodell bestimmen.

In manchen Fällen lassen sich so bereits mit einem Derivat hinreichend genaue Proteinphasen bestimmen (Single Isomorphous Replacement, SIR), meist sind dazu jedoch mindestens zwei unabhängige Derivate nötig (Multiple Isomorphous Replacement, MIR).

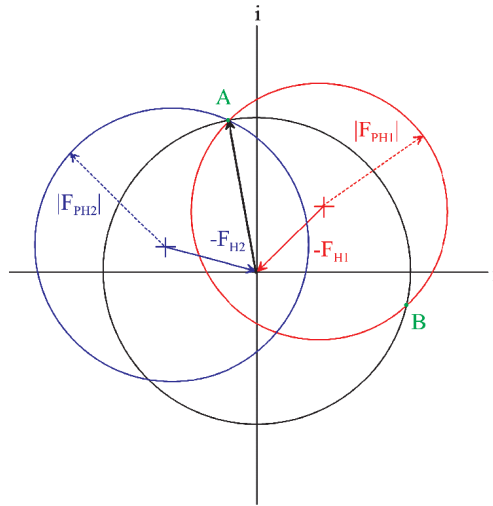


Abbildung 2.9: HARKER-Konstruktion (Harker, 1956). Um den Ursprung wird ein Kreis mit dem Radius $|F_P|$ für den jeweiligen Reflex gezeichnet (schwarz). Um $-\vec{F}_{H1}$ (Lage und damit Phase des Schwermetalls sind bekannt) wird ein weiterer Kreis mit dem Radius $|F_{PH1}|$ gezeichnet. Die beiden Schnittpunkte A und B ergeben zwei Möglichkeiten für \vec{F}_P . Ein weiteres Derivat hebt diese Unbestimmtheit auf: es ergibt sich ein Schnittpunkt (A) für alle drei Kreise, der einen eindeutigen Phasenwinkel markiert.

Multiple Anomale Dispersion

Bei der Bestimmung von Proteinphasen durch Multiple Anomale Dispersion (MAD) wird die Eigenschaft von Schweratomen als anomale Streuer in Proteinkristallen ausgenutzt. Normalerweise sind die Intensitäten zweier Reflexe I_{hkl} und I_{-h-k-l} , die durch Inversionssymmetrie miteinander verknüpft sind und als FRIEDEL-Paar bezeichnet werden, identisch. Dies gilt bei Proteinkristallen aber nur für die leichten Atome wie z.B. Kohlenstoff oder Stickstoff. Die Anwesenheit bestimmter Schweratome (z.B. Selen, Zink oder Quecksilber) führt dazu, dass sich die Intensitäten der Friedel-Paare unterscheiden. Dabei wird Röntgenstrahlung mit variabler Wel-

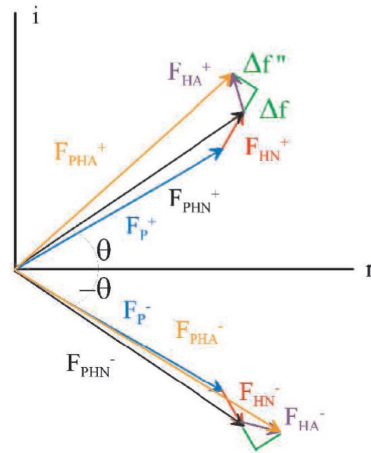


Abbildung 2.10: Der Einfluss der anomalen Dispersion auf Strukturformfaktoren mit entgegengesetzten Vorzeichen für den Phasenwinkel. Ohne anomale Streuung gilt $F_{PHN}^+ = F_{PHN}^-$. Diese Strukturformfaktoren setzen sich aus einem Beitrag des Proteins F_P und einem „normalen“ Beitrag F_{HN} des Schweratoms zusammen. Im Falle anomaler Streuung addiert sich eine reale Komponente Δf in Verlängerung zu F_{HN} und senkrecht dazu eine imaginäre Komponente $\Delta f''$, die stets einen kleinen Phasenwinkel dazu addiert. Als Folge davon weisen die kombinierten Strukturformfaktoren aus „normalen“ und „anormalen“ Beiträgen F_{PHA}^+ und F_{PHA}^- sowohl unterschiedliche Amplituden als auch Phasenwinkel auf.

lenlänge (Synchrotronstrahlung) an der spezifischen Absorptionskante des Schweratoms verwendet. In der Nähe dieser Absorptionskante findet keine elastische Streuung der Elektronen statt. Die Wechselwirkung der Synchrotronstrahlung mit dem Atomkern ruft eine Ionisation eines Elektrons aus der K-Schale hervor, was wiederum eine Phasenverschiebung bewirkt, die **anomale Streuung** oder **Dispersion**. Diese Phasenverschiebung unterscheidet sich allerdings von jener der elastischen Streuung (180°). Dies alles hat zur Folge, dass die Strukturformfaktoren F_{hkl} und F_{-h-k-l} keine komplex-konjugierten Zahlen mehr sind und somit für die Phasierung verwendet werden können, wie in Abbildung 2.10 gezeigt wird. Der atomare Formfaktor eines anomal streuenden Atoms f_{ano} lässt sich in einen Wellenlängen abhängigen Anteil f_λ und einen -unabhängigen Anteil f_0 darstellen, wobei der Wellenlängen-abhängigen Teil f_λ aus einem real und einem imaginär Teil besteht:

$$f_{ano} = f_0 + f_\lambda = f_0 + f'_\lambda + i f''_\lambda$$

Diese Amplitudendifferenzen (BIJOVET-Differenzen) der Reflexe (auch als anomaler Effekt bezeichnet) ermöglicht die Berechnung einer PATTERSON-Dichte, aus der sich wiederum ein Modell der Atome erstellen lässt, welche bei einer bestimmten Wellenlänge anomal streuen.

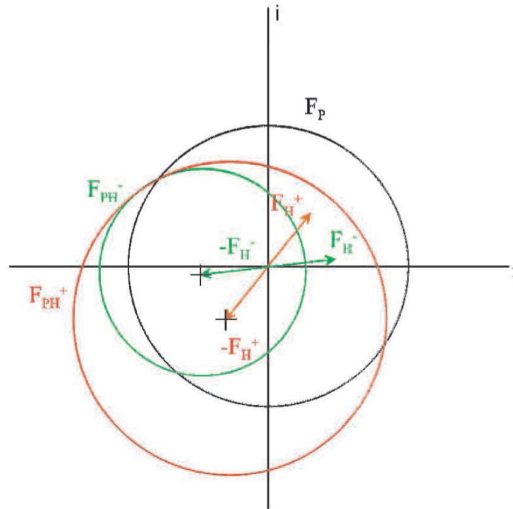


Abbildung 2.11: Vereinfachte Harkerkonstruktion, die die Ableitung eines eindeutigen Phasenwinkels mit Hilfe der anomalen Streuung erlaubt. Der Vektor für die „normalen“ Strukturfaktoramplituden ist mit F_P gegeben. Die beiden BIJOVET-Paare sind mit F_H^+ und F_H^- gekennzeichnet. F_H^- ist vereinfacht mit einem Phasenwinkel mit entgegengesetztem Vorzeichen dargestellt, damit sich die drei Kreise in einem Punkt schneiden. Im MAD Experiment wird F_P durch Messung eines *remote* Datensatzes bestimmt, dessen Wellenlänge weit von der Absorptionskante entfernt ist.

Bei einem MAD-Experiment werden bei drei verschiedenen Wellenlängen jeweils komplette Datensätze von einem einzigen Kristall aufgenommen. Bei der Wellenlänge direkt am Absorptionsmaximum (*-peak*) wird ein starkes anomales Signal gemessen, bei einer Wellenlänge knapp neben dem Absorptionsmaximum (ca. 0,001 Å, *inflection point*) wird ein Datensatz erhalten, der isomorphe Differenzen zum dritten Datensatz ergibt. Dieser dritte Datensatz (*remote*) wird bei ca. 0,1 Å neben dem Absorptionsmaximum aufgenommen und dient als nativer Datensatz.

Die Multiple Anomale Dispersion (MAD) kann vereinfachend als spezieller Fall des Isomorphen Ersatzes betrachtet werden. Analog zum MIR-Fall können in einem MAD-Experiment durch eine Harker-Konstruktion initiale Proteinphasenwinkel bestimmt werden (siehe Abbildung 2.11).

Die MAD-Methode mit Selenatomen wird häufig bei rekombinanten Proteinen angewendet. Das Selen wird als Selenomethionin dem Kulturmedium von Methionin-auxotrophen *E. coli* Zellen zugesetzt, wodurch die Proteinbiosynthese das Selenomethionin anstelle von Methionin in das überexprimierte Protein einbaut. Dadurch erübrigt sich die Suche nach einem geeigneten Schweratomderivat, da das Selen bereits in dem gereinigten Protein vorhanden ist. Da nur ein Kristall zur Messung benötigt wird, stellt Nicht-Isomorphie der Kristalle auch kein Problem dar.

Molekularer Ersatz

Die Methode des Molekularen Ersatzes (auch *Molecular Replacement*, MR genannt) (Hoppe, 1957a); (Rossmann and Blow, 1962); (Huber, 1965) wird angewandt, falls bereits ein Atommodell einer bekannten Kristallstruktur mit hinreichender Ähnlichkeit zum untersuchenden Modell vorliegt. Die notwendige Phaseninformation kann somit dadurch erhalten werden, indem das ähnliche Atommodell der bekannten Kristallstruktur in einer PATTERSON-Suche eingesetzt wird. Aus den Koordinaten der bekannten Struktur können die Strukturamplituden $|\vec{F}_{calc}|$ und die Phasen ϕ_{calc} für die zu lösende Struktur berechnet werden. Mit den Modellphasen und den experimentell erhaltenen Strukturfaktoramplituden $|\vec{F}_{obs}|$ wird eine Elektronendichtekarte für die zu bestimmende Kristallstruktur errechnet. Normalerweise unterscheiden sich sowohl die Raumgruppen als auch die Orientierung des Proteinmoleküls in der bekannten und in der neuen, unbekanntem Kristallstruktur. Deshalb wird das bekannte Strukturmodell erst korrekt in der neuen Kristallzelle plaziert. Das sechsdimensionale Suchproblem lässt sich in je drei Rotations- und drei Translationsvariablen zerlegen. Es wird die Rotationsorientierung mit Hilfe der PATTERSON-Funktion ermittelt. Dabei werden zwei PATTERSON-Funktionen berechnet, die eine mit den Strukturfaktoramplituden ($|\vec{F}_{obs}|$) aus den gemessenen Beugungsintensitäten, die andere mit den Strukturfaktoramplituden ($|\vec{F}_{calc}|$), die aus den Atomkoordinaten des Suchmodells berechnet werden. Die beiden Sätze an PATTERSON-Vektoren werden in einer Produktfunktion korreliert, wobei der eine Vektorsatz in einer Rotationsfunktion in kleinen Winkelschritten um alle drei Achsen gegen den anderen gedreht wird. Dabei werden die Vektoren innerhalb des Moleküls (Selbstvektoren) zur Deckung gebracht. Nach der korrekten Orientierung erfolgt die Positionierung

durch eine anschließende Translationsfunktion in allen drei Raumrichtungen der Einheitszelle, wobei die Kreuzvektoren zwischen den verschiedenen Molekülen eingesetzt werden. Durch FOURIER-Transformation lassen sich anschließend die Phasen berechnen. Als Faustregel gilt, dass diese Methode funktioniert, wenn die Homologie der Aminosäuresequenzen der beiden Proteine hoch und die r.m.s. Abweichung der $C\alpha$ -Positionen der zwei Strukturen $< 1 \text{ \AA}$ ist.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

- Ammoniumperoxodisulfat (BioRad, München)
- Protogel (30% (w/v) Acrylamid / 0,8% (w/v) Bis-acrylamid) (National Diagnostics, USA)
- Bacto-Trypton, Bacto-Agar und Hefe-Extrakt (Difco Laboratories, USA)
- IPTG (Biomol, Hamburg)
- Bradford Protein Assay (BioRad, München)

Soweit nicht anders vermerkt, wurden weitere Chemikalien von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) in p.a. Qualität bezogen.

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Plastik- und Verbrauchsmaterialien stammten von Eppendorf (Hamburg), Greiner (Frickhausen) und Roth (Karlsruhe). Ultra- und Sterilfiltrationseinheiten wurden von Millipore (Eschborn) und Pall Gelman Sciences (Ann Arbor, USA) bezogen. Kristallisationszubehör wurde von Hampton Research (Laguna Niguel, USA) erworben.

3.1.3 Geräte

Analysenwaage, Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Branson Sonifier 250	Fa. G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Dioden-Array Photometer DU 7500	Beckmann, München
Eagle-Eye II	Stratagene, Heidelberg
Goniometerkopf	Huber Diffraktionstechnik, Rimsting
Kühlzentrifuge J2-21	Beckmann, München
PHM 82 Standard pH-Meter	Radiometer Copenhagen, Dänemark
Elektroporator 1000	Stratagene, Heidelberg
Schüttelinkubator	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
PVDF Membran und Sterilfilter	Millipore GmbH, Eschborn
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München
Smart System	Pharmacia LKB Biotechnologie, Freiburg
FPLC System	Pharmacia LKB Biotechnologie, Freiburg
Zentrifugen	Beckman, Sorvall, Eppendorf

Zur Datenaufnahme der Kristallmessungen werden Drehanoden RU200 (RIGAKU) mit MARRESEACH (Hamburg) IMAGE PLATE Detektoren verwendet.

Zur Datenverarbeitung aller Art werden Server und Workstations der Firma DIGITAL alpha-stations (OSF), SILICON GRAPHICS work-stations und compute server (IRIX) eingesetzt.

3.1.4 Kits

Qiagen Plasmid Preparation Kit (Mini) (Qiagen, Hilden)

3.1.5 Säulenmaterial

Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden
Q-Sepharose-Fast-Flow	Amersham Pharmacia, Freiburg
Superose 12	Pharmacia LKB Biotechnologie, Freiburg

3.1.6 Puffer, Stammlösungen, Antibiotika und Induktorlösungen

Probenpuffer für die Agarosegelelektrophorese:

0,25% (w/v) Bromphenolblau

15% (v/v) Ficoll

0,5 mM EDTA

Ethidiumbromid-Stammlösung: 10 mg/ml

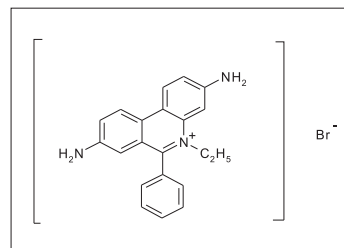


Abbildung 3.1: Strukturformel von Ethidiumbromid

Laufpuffer für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (10fach):

15 g Tris

148 g Glycin

5 g SDS

Der Laufpuffer wird mit Wasser auf 1 Liter aufgefüllt, wobei der pH-Wert zwischen 8.0 und 8.3 liegt.

Antibiotika:

Carbenicillin: 50 mg/ml in H₂O

Carbenicillin bewirkt bei wachsenden Zellen eine Inhibition der Zellwandbiosynthese.

Kanamycin: 25 mg/ml in H₂O

Kanamycin hemmt die Proteinsynthese durch Interaktion mit der 30S-Untereinheit der Ribosomen.

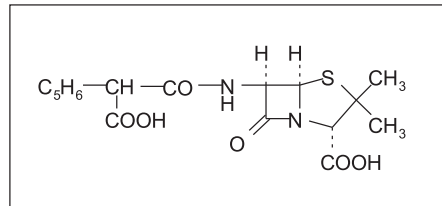


Abbildung 3.2: Strukturformel von Carbenicillin

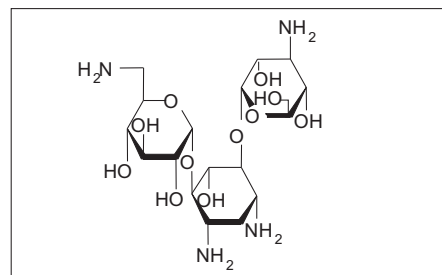


Abbildung 3.3: Strukturformel von Kanamycin

Induktorlösung:

IPTG: 1 mol/l in H₂O

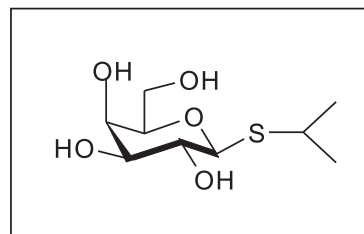


Abbildung 3.4: Strukturformel von IPTG

Isopropyl-β-D-Thiogalctopyranosid (IPTG) bindet als Induktor an den lac-Repressor. Das inaktivierte Repressormolekül dissoziiert vom Operator und ermöglicht die Transkription. Die IPTG-Stammlösung wird aliquotiert bei -20°C aufbewahrt.

Alle Lösungen und Puffer werden mit deionisiertem Wasser (Millipore) angesetzt.

3.1.7 Nährmedium für Bakterien

LB (Luria-Bertani)-Medium:

- 5 g Hefe-Extrakt
- 10 g Bacto-Trypton
- 10 g NaCl

werden in 1 Liter deionisiertem Wasser gelöst, mit NaOH auf pH 8.0 eingestellt und autoklaviert.

Für LB-Agar-Platten werden 15 g Bacto-Agar pro Liter Medium eingewogen.

Das entsprechende Antibiotikum wird nach dem Autoklavieren und Abkühlen zugegeben.

Neues Minimal Medium (NMM) (Budisa *et al.*, 1995):

Substanz	Stocklösung	Aliquot für 1 Liter	Endkonzentration
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 M	7,5 ml	7,5 mM
NaCl	5 M	1,7 ml	8,5 mM
KH ₂ PO ₄	1 M	22 ml	22,5 mM
K ₂ HPO ₄	1 M	47,6 ml	50 mM
MgSO ₄	1 M	1 ml	1 mM
Glucose	1 M	20 ml	20 mM
Alle Aminosäuren*	0,5 g/l	100 ml	50 mg/l
Ca ²⁺	1 mg/ml	1 ml	1 mg/l
Fe ²⁺	1 mg/ml	1 ml	1 mg/l
Spurenelemente**	10 µg/ml	1 ml	0,01 mg/l
Thiamine	10 µg/ml	1 ml	10 mg/l
Biotin	10 µg/ml	1 ml	10 mg/l
Antibiotika	100 µg/ml	1 ml	100 mg/l

*ohne Methionin

* Cu²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺ und MoO₄²⁻

Alle Aminosäuren-Mischung (ohne Methionin):

Alle Aminosäuren werden abgewogen (0,25 g für 500 ml), wobei Tyrosin (Tyr) und Tryptophan (Trp) getrennt behandelt werden, da sie in Wasser schlecht löslich sind. Zu Tyr und Trp werden 20 ml Wasser und unter Rühren einige Tropfen HCl gegeben, bis die Mischung klar ist. Anschließend werden 11 ml 1M KH₂PO₄ und 24

ml 1M K_2HPO_4 vermischt. Danach werden alle Komponenten zusammen gegeben, unter Rühren gelöst und auf einen Liter aufgefüllt. Anschließend muss das Medium sterilfiltriert werden, bevor 0,3 mM Selenomethionin zugegeben werden.

Die Expression erfolgt in einem methionindefizienten Stamm (z.B. *E. coli* B834), d. h. in einem Stamm, der nicht in der Lage ist, Methionin selber zu synthetisieren.

3.1.8 Bakterienstämme und Plasmide

Zur Expression rekombinanter Proteine wurden der *E. coli* Stamm M15 (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Expression Selenomethionin-markierten Proteins erfolgte in dem Methionin-defizienten Stamm *E. coli* B834 (Novagen, Bad Soden).

Die Bakterienstämme werden entweder als chemisch kompetente oder als elektrokompetente Zellen bezogen. Die Lagerungstemperatur der kompetenten Zellen liegt bei $-80^\circ C$.

Ein pQE8-Vektor mit N-terminalem hexa His-Tag mit der Sequenz Met-Arg-Gly-Ser-His₆-Gly wurde zur Expression von Proteinen verwendet.

Klone des pQE8-Expressionsvektors mit der Gensequenz des *coaB* wurden von Dr. PD T. Kupke (Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt.

3.2 Methoden zur Nukleinsäure-Analyse

3.2.1 Präparation von Plasmid DNA (Mini-Präp)

5 ml bakterielle Übernachtskultur werden 15 min bei 6000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet vollständig in 250 μl Puffer P1 resuspendiert. Es werden 250 μl Puffer P2 zugegeben und vorsichtig gemischt. Der nach der Neutralisation mit 350 μl Puffer N3 entstandene weiße Niederschlag enthält chromosomale DNA, denaturierte Proteine und Zellfragmente. Diese werden vom Lysat durch Zentrifugation (10 min, 20000x g) abgetrennt. Der Überstand wird erneut zentrifugiert und anschließend auf eine QIAprep Säule aufgetragen. Danach wird 30-60 sec zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die Säule wird anschließend mit 0,5 ml Puffer PB und 0,75 ml Puffer PE gewaschen. Nach jedem Reinigungs-

schritt wird 30-60 sec zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die DNA wird mit 50 μ l ddH₂O eluiert und der Erfolg der Präparation mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

3.2.2 Agarosegelelektrophorese

Agarose ist das wichtigste Trägermaterial für die Elektrophorese von Nukleinsäuren. Es handelt sich dabei um ein Polymer aus verschiedenen verknüpften Galactoseeinheiten (D-Galactose/3,6-Anhydrogalactose). Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle wird von mehreren Faktoren beeinflusst. Die effektive Größe der Nukleinsäuremoleküle hängt nicht nur von ihrer absoluten Masse, sondern auch von ihrer Form ab. Kleinere DNA-Fragmente wandern schneller im elektrischen Feld und können in höher konzentrierten Agarosegelen (ab 0,5%) getrennt werden. Zur Auftrennung großer DNA-Fragmente (>1kb) kommen niedrig konzentrierte Agarosegele (bis 0,5%) zur Anwendung.

Um die DNA im Agarosegel nachzuweisen, wird diesem Ethidiumbromid zugesetzt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen dem DNA-Doppelstrang und fluoresziert im UV-Licht bei 254 nm rot-orange. Für ein Agarosegel in der gewünschten Konzentration wird die Agarose in TAE-Puffer suspendiert und durch Aufkochen gelöst. Nach Zugabe von Ethidiumbromid (1 μ g/ml) wird die Lösung in eine Flachbettapparatur gegossen. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgt bei 10 V/cm Gel. Die Größe der DNA-Fragmente wird durch die Auftrennung von Größenstandards ermittelt.

TAE-Puffer: 40 mM Tris
 20 mM Essigsäure
 1 mM EDTA gelöst bei pH 8.0

6fach Probenpuffer: 30% Glycerin
 0,25% (w/v) Bromphenolblau

3.3 Arbeitsmethoden mit Bakterien

3.3.1 Transformation in chemisch kompetente *E. coli* Zellen

Die kompetenten *E. coli* Zellen werden auf Eis aufgetaut und je 200 μl pro Ansatz in ein vorgekühltes 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert. Je nach Vektorgröße werden 10 bis 200 ng DNA zugegeben. Der Ansatz wird 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die Hitzeschockbehandlung, bei der die Zellen die DNA aufnehmen, wird für 90 Sekunden bei 42°C durchgeführt. Der Transformationsansatz wird 2 Minuten auf Eis inkubiert, mit 800 μl LB-Medium versetzt und 1 Stunde bei 37°C kultiviert. Die Transformationsansätze werden auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.3.2 Transformation in elektrokompetente Zellen

Die kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut und je 40 μl pro Ansatz in ein vorgekühltes 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert. Dazu wird 1 μl Plasmid gegeben. Der Ansatz wird in eine ebenfalls vorgekühlte Glasküvette mit Elektroden pipettiert. Die Transformation erfolgte nach Trocknen der Elektroden bei 1650 V in einem Elektroporator. Nach der Elektroporation werden sofort 100-150 μl LB-Medium zu dem Transformationsansatz gegeben. Der Transformationsansatz wird auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.3.3 Heterologe Expression von rekombinantem Protein in *E. coli*

Die Transformanten werden in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37°C kultiviert. Diese Übernachtskultur wird in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum verdünnt und bei 37°C inkubiert, bis sie eine OD_{600} von 0,6 erreicht hat. Die Induktion rekombinanten Proteins erfolgt mit IPTG mit einer Endkonzentration von 0,1 bzw. 1 mM. Die Expression wird durch

Variation der Wachstumsbedingungen (Zeit, Temperatur) optimiert. Die Ernte der Zellen erfolgt durch Zentrifugation für 20 min bei 4200 U/min (Rotor JA 4.2) und 4°C. Zur Aufbewahrung werden die Bakterienpellets bei -20°C eingefroren. Für die Selenomethenonin-Expression wird analog, wie oben beschrieben, verfahren, allerdings wird die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

3.3.4 Herstellung von Rohextrakten aus *E. coli*

Die Bakterienzellen werden in 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 30 mM NaCl resuspendiert und mit Ultraschall aufgeschlossen. Der Zellaufschluss erfolgt auf Eis in Intervallen von 5 x 30 sec auf Stufe 6 am Sonifier. Die Trennung von Cytoplasma- und Membranfraktion erfolgt durch Zentrifugation für 15 min bei 13000 U/min im Rotor JA 20 bei 4°C. Der Proteingehalt der Cytoplasmafraktion wird nach der Methode von Bradford bestimmt. Aliquots der Fraktionen werden zur Beurteilung der Expressionshöhe auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt.

3.4 Proteinchemische Methoden

3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Ermittlung der Proteinkonzentration wird mit der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Verwendet wird hierfür der blaue Säurefarbstoff Coomassie-Brilliantblau G 250. In Gegenwart von Proteinen und im sauren Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Coomassie-Brilliantblau von 465 zu 595 nm durch Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein. Der Farbstoff bindet dabei recht unspezifisch an kationische und unpolare Seitenketten der Proteine. Als Proteinstandard werden 5 µl BSA (1 mg/ml Rinderserumalbumin) eingesetzt.

Proben: x µl Proteinlösung
 800 - x µl H₂O
 200 µl Bradford Reagenz

Die Absorptionswerte sollten innerhalb des linearen Bereichs von 0,2 bis 0,6 der Meßkurve liegen. Die Berechnung der Konzentration erfolgt anhand der Eichmessung mit BSA.

3.4.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen durch Absorption bei 280 nm

Diese Methode der Proteinbestimmung kann bei Proteinkonzentrationen zwischen 0,02 bis 3 mg/ml eingesetzt werden. Sie hat den Vorteil, dass sie wesentlich weniger durch parallele Absorption von Nichtproteinsubstanzen gestört wird.

Da in den Proteinlösungen zum Teil auch noch größere Mengen an Nukleinsäuren und Nukleotiden vorhanden sind, die ebenfalls bei 280 nm absorbieren, muss der bei 280 nm gemessenen Wert mit einem zweiten, bei 260 nm gemessenen Wert korrigiert werden. Dies geschieht nach folgender Formel:

$$\text{Proteinkonzentration [mg/ml]} = (1,55 A_{280}) - (0,76 A_{260})$$

Bei Proteinlösungen mit nur geringem Gehalt an Nukleinsäuren reicht die A_{280} -Messung aus. Die A_{280} -Methode orientiert sich maßgeblich an Tryptophan, das ein Absorptionsmaximum bei 279 nm aufweist. Da der Gehalt an Tryptophan von Protein zu Protein variieren kann, variieren folglich auch die Absorptionswerte. Der Extinktionskoeffizient muss daher zur Berechnung der Proteinkonzentration mittels mathematischer Algorithmen (<http://kr.expasy.org>) für das jeweilige Protein ermittelt werden.

3.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichts wird durch eine diskontinuierliche, denaturierende Gelelektrophorese erreicht. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz und überdeckt durch Micellenbildung mit Proteinen deren Eigenladungen. Zur der Probenvorbereitung werden die Proben bei 95°C denaturiert. Um Disulfid-Brücken im Protein zu spalten, werden zum Probenpuffer Thiole wie z.B. DTT zugegeben. Die SDS-PAGE wird mit einem 5%igen

Sammelgel und einem 12%igen Trenngel durchgeführt. Es werden jeweils acht Gele (8,5 x 8 cm²) in einer Gelgießkammer (Eigenbau, MPI Martinsried) gegossen.

Trenngel 12%: 36 ml Acrylamid-Stammlösung
17 ml 2 M Tris/HCl pH 8.8
36 ml H₂O
450 l 20% (w/v) SDS

Sammelgel 5%: 10 ml Acrylamid-Stammlösung
7,5 ml 1 M Tris/HCl pH 6.8
41,6 ml H₂O
300 l 20% (w/v) SDS

Die Trenngellösung wird nach Zugabe von 100 μ l TEMED und 100 μ l (0,1 mg/ml) APS in die vorbereitete Gelgießapparatur gegossen und mit wenig iso-Propanol blasenfrei überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wird die Alkoholschicht entfernt, das Sammelgel mit 100 μ l TEMED und 100 μ l (0,1 mg/ml) APS versetzt und in den Gießstand gefüllt. Die Kämme für zehn bis zwölf Geltaschen werden luftblasenfrei in das Sammelgel eingesetzt. Die ausgehärteten Gele werden in Hausaltsfolie luftdicht verschlossen und bis zu drei Wochen bei 4°C gelagert. Für die Gelelektrophorese werden die Proteinproben mit 10fach Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Die Trennung der Proteine erfolgt bei konstantem Strom von 15 mA je cm Gellänge im SDS-Laufpuffer. Zur Molekulargewichtsbestimmung der getrennten Proteine wird ein SDS-PAGE-Größenstandard (Low-Range SDS-Marker BioRad, München) mitgetrennt.

10fach Probenpuffer: 100 mM Tris/HCl pH 6.8
200 mM DTT
0,2% (w/v) Bromphenolblau
20% (w/v) Glycerin

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris/HCl pH 8.3
200 mM Glycin
0,1% (w/v) SDS

3.4.4 Coomassie-Färbung der SDS-Polyacrylamidgele

Die Trenngele werden nach erfolgter Elektrophorese in einer Coomassie-Lösung gefärbt. Dazu werden die Gele in der Färbelösung durch Mikrowellen kurz erwärmt und 10 min bei RT geschüttelt, danach in Entfärbelösung solange gewaschen, bis der Hintergrund farblos erscheint und anschließend getrocknet.

Coomassie-Färbelösung: 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blau G 250 in
40% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung: 40% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure

3.4.5 Affinitätschromatographie an einer Metall-Chelat-Matrix

Dieser Chromatographietyp wird zur Reinigung rekombinanter Proteine verwendet, denen durch molekularbiologische Methoden ein 6x His-Tag angefügt wurde. Im Fall der Ni-NTA Säule beruht die Reinigung auf der spezifischen Wechselwirkung der Histidin-Reste mit einem an eine NTA-Agarose gekoppelten Ni-Ion. NTA (Nitri-otriessigsäure) besetzt als vierzähliger Ligand vier der sechs Koordinationsstellen des Ni²⁺-Ions, das dadurch mit hoher Affinität an die Festphase gebunden ist. Die beiden freien Bindungsstellen stehen zur Interaktion mit den Stickstoffatomen der Imidazolringe der Histidin-Reste zur Verfügung. Das an die Metallchelatsäule gebundene Protein kann durch Absenken des pH-Wertes im Elutionspuffer oder durch Konkurrenzreaktion mit freiem Imidazol eluiert werden.

Waschpuffer: 20 mM Tris/HCl pH 8.0
50 mM NaCl
20 mM Imidazol

Elutionspuffer: 20 mM Tris/HCl pH 8.0
50 mM NaCl
250 mM Imidazol

Ausgangsmaterial für die Reinigung ist die bakterielle Cytoplasmafraktion. Die Ni-NTA Säule wird mit Aufschlusspuffer äquilibriert, bevor die Cytoplasmafraktion auf die Säule gegeben wird. Danach wird die Säule zweimal mit doppeltem Volumen der Ausgangslösung mit Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgt mit doppeltem Volumen des Ni-NTA Säulenmaterials mit dem Elutionspuffer.

3.4.6 Ionenaustausch-Chromatographie

Die Ionenaustausch-Chromatographie ist die am häufigsten angewandte Trennmethode für Proteingemische. Die Grundlage für den Ionenaustausch ist die kompetitive Wechselwirkung geladener Ionen. Die Proteine konkurrieren mit Salz-Ionen um die geladenen Positonen auf einer Ionenaustauscher-Matrix. Je stärker ein Protein geladen ist, desto stärker ist die Bindung an den Ionenaustauscher. Die Menge an Protein, die an einen Austauscher gebunden werden kann, hängt von der Molekülgröße ab. Für große Moleküle ist nur die Oberfläche eines Ionenaustauschers zugänglich und die Kapazität ist relativ gering. Dagegen können kleine Proteine auch das interne Volumen der stationären Phase ausnutzen. Die Elution des Proteins kann durch Einsatz eines Salzgradienten mit z.B. NaCl, der sowohl beim Kationen- als auch beim Anionenaustauscher die besten Trennungen ergibt, erreicht werden. Zur Reinigung wird Q-Sepharose verwendet.

Salzgradient: Puffer 1: 20 mM Tris/HCl pH 8.0
10 mM NaCl

Puffer 2: 20 mM Tris/HCl pH 8.0
400mM NaCl

3.4.7 Gelpermeationschromatographie

Bei der Gelpermeationschromatographie werden Proteine nach ihrer Form und Größe getrennt. Für analytische Zwecke wird das Smart System mit einer Superose 12 PC 3.2/30 Säule (beide Pharmacia LKB Biotechnologie, Freiburg) verwendet, um zu prüfen, ob das Protein einheitlich vorliegt. Für die qualitative Gelfiltration

wird das FPLC-System (Pharmacia LKB Biotechnologie, Freiburg) verwendet. Die stationäre Phase besteht aus Kügelchen eines gelartigen, hydratisierten Materials mit relativ konstanter Porengröße. Partikel, deren Größe die Porengröße der Säulenmaterialkügelchen überschreiten, werden vom Lösungsvolumen ausgeschlossen und durchwandern die Säule daher schneller. Kleinere Moleküle dringen in die Poren der Kügelchen ein und werden von diesen zurückgehalten. Neben der molekularen Masse ist auch die Molekülform der Partikel für die Retention bedeutsam, denn langgestreckte Moleküle werden schlechter in die Gelporen aufgenommen als solche kugelförmigen mit der gleichen molekularen Masse. Die Säule wird mit dem entgasten Laufpuffer äquilibriert und anschließend das Proteingemisch mit einer Konzentration von 1 mg/ml in wässriger Lösung auf die Säule aufgetragen. Die Flussrate beträgt 40 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Laufpuffer: 20 mM Tris/HCl pH 8.0
200 mM NaCl

3.4.8 Dialyse und Umpufferung von Proteinlösungen

Zum Entsalzen wird die Proteinlösung in einen Dialyseschlauch eingeschlossen, der in ein großes Volumen (5 Liter) Dialysepuffer (20 mM Tris/HCl, pH 8.0) getaucht wird. Nach einem Tag unter ständigem Rühren bei 4°C befinden sich beide Lösungen im Gleichgewicht, während das Protein im Inneren des Dialyseschlauches verbleibt, was einem Entsalzen der Proteinlösung gleich kommt. Zum Wechsel der Puffer wird die Proteinlösung über Gelfiltration (NAP-10-Säulen, Pharmacia) umpuffert. Dazu wird die NAP-Säule mit dem benötigten Puffer equilibriert und anschließend 1 ml Proteinlösung aufgetragen. Anschließend kann das Protein durch 1,5 ml des benötigten Puffers eluiert werden.

3.4.9 Konzentrierung von Proteinlösungen

Für die Vorbereitung der Kristallisationsexperimente wird die Proteinlösung aufkonzentriert. Dafür werden zum einen Amicon-Rührzellen oder für Ultrazentrifuga-

tion Centricon-10-Membran-Röhrchen verwendet. Bei beiden Konzentratoren wurde eine 10 kDa-Membran verwendet, welche nur Moleküle mit einem geringeren Molekulargewicht als 10000 Dalton durchlassen und es somit zu einer Anreicherung der Makromoleküle mit einem Molekulargewicht >10 kDa kommt.

3.5 Kristallographische Methoden

3.5.1 Kristallisation

Die Kristallisationsansätze erfolgen nach der Dampfdiffusionsmethode (McPherson, 1990) im sitzenden Tropfen („*sitting drop*“) in CrysChem Platten (Charles Supper Company). Die CrysChem Platten werden mit transparenter Klebefolie (CrystalClear, MancoInc., Avon, USA) verschlossen. Der Kristallisationsverlauf wird über mehrere Monate bei 20°C verfolgt. Für das Screening einer großen Anzahl von Kristallisationsbedingungen wird das Prinzip des „*sparse matrix sampling*“ angewandt (Carter and Carter, 1979); (Jancarik and Kim, 1991). Dabei werden jeweils 2 μ l (10 mg/ml) Proteinlösung mit 2 μ l des Kristallisationspuffers vermischt und gegen 300 μ l Reservoirlösung äquilibriert. In weiteren Versuchen kommen verschiedene Präzipitanzen (u.a. PEG verschiedener Molekulargewichte, MPD, Ammoniumsulfat, NaCl, Natriumcitrat), variiert gegen verschiedene pH-Werte, sowie unterschiedliche Additive (Hampton Research, USA) zum Einsatz.

Zur Cokristallisation wird das zu kristallisierende Protein mit ca. einer 10-fach höheren Konzentration an Substrat gemischt und, wie zuvor beschrieben, für Kristallisationsexperimente eingesetzt.

Phosphopantothensäure ist nicht kommerziell erhältlich und wird deshalb für Cokristallisationsexperimente, wie zuvor beschrieben (Kupke, 2002); (Kupke, 2004), enzymatisch hergestellt. Eine 100 mM Calciumpantothensäure-Lösung (Fluka) wurde mit Tri-Natriumphosphat gemischt und das präzipitierte Calciumphosphat durch Zentrifugation entfernt. 5 mM des entstandenen Natriumpantothensats wurde enzymatisch mit Pantothensat Kinase (CoaA), die einen His-tag beinhaltet, umgesetzt (15 μ g CoaA, 5 mM ATP and 2.5 mM MgCl₂ in 50 mM Tris-HCl pH 8.0).

Nach einer Inkubation von 45 Minuten bei 37°C wurde His-CoaA durch Zentrifugation mit einer Ni-NTA spin Säule (Quiagen) entfernt. Die 4'-Phosphopantothenensäure, die sich im Durchlauf befand, wurde auf 20 mM durch Verringerung des Lösungsvolumens im Vakuum aufkonzentriert.

3.5.2 Datensammlung

Die zu untersuchenden Kristalle werden direkt aus dem Kristallisationstropfen in eine silanisierte Quarzkapillare (1,0 mm Ø, Mark-Röhrchen für röntgenographische Aufnahmen, W. Müller, Berlin) montiert und die den Kristall umgebende Mutterlauge wird entfernt. Beide Seiten der Kapillare werden anschließend mit etwas Reservoirlösung gefüllt und mit Dentalwachs (Richter&Hoffmann Harvard Dental GmbH) verschlossen. Die Kapillaren werden auf einem Goniometerkopf fixiert und die verschiedenen Datensätze als Serie von Rotationsaufnahmen mit einem Drehwinkel von $\Delta\phi$ von 0.5 bis 3° auf einer Drehanode bei RT (50 kV, 100 mA) gesammelt. Die Messungen erfolgen mit Graphit monochromatisierter CuK α -Röntgenstrahlung mit einer Wellenlänge von $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ auf einer MAR345 *Image plate*.

Zur Messung von Cryo-Daten werden die Kristalle in *Loops* aus Nylon (Hampton Research, USA) geerntet und in Cryo-Puffer transferiert, falls sie nicht aus einer solchen Bedingung kristallisierten. Anschließend werden sie in flüssigem Stickstoff oder im Stickstoffstrom bei 100 K direkt an der Messapparatur schockgefroren.

Gemessen wurden die Kristalle am Max-Planck-Institut mit Kupfer-K α -Röntgenstrahlung ($\lambda = 1.542 \text{ \AA}$) mit einer *Image plate* (Marresearch, Hamburg), die auf einem Röntgendreanodengenerator (Rigaku RU-200, Tokio, Japan; Leistung 50 kV, 100 mA) montiert war. Die Datensammlungen (z.B. des MAD Experiments) am Synchrotron erfolgte am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY) in Hamburg (*beam line* BW6) mittels eines MAR CCD Detektors.

3.5.3 Datenauswertung

Die Bestimmung der Elementarzellenparameter, der Raumgruppe und der Kristallorientierung erfolgt mit zwei verschiedenen Programmpaketen. Es wird entweder das HKL Programmpaket mit DENZO (Otwinowski and Minor, 1997) zur Integration

der Reflexintensitäten benutzt oder MOSFLM v6.11 (Leslie, 1998) verwendet. Eine anschließende Datenreduktion wird mit den Programmen SCALEPACK (Otwinowski and Minor, 1997) oder SCALA und TRUNCATE durchgeführt (CCP4, 1994).

3.5.4 Phasierung

Die Bestimmung der Schwermetallatomlagen erfolgt durch die Programme SHELXS (Sheldrick *et al.*, 1993). Der Verfeinerung der Schweratomparameter sowie die Berechnung von Proteinphasen werden mit den Programmen MLPHARE (Otwinowski and Minor, 1997) durchgeführt. Die Elektronendichte wurde durch ein „solvent flattening“ mit dem Programmen RESOLVE (Terwilliger and Berendzen, 1999) oder DM (CCP4, 1994) verbessert.

Der Molekulare Ersatz wird mit dem Programm MOLREP (CCP4, 1994) durchgeführt.

3.5.5 Strukturlösung, Modellbau und Verfeinerung

Atomare Proteinmodelle werden auf einer SILICON GRAPHICS *work station* mit dem Programm MAIN (Turk, 1992) in die Elektronendichte eingepasst und mit dem Programm CNS (Brünger, 1992) verfeinert. Als Zielfunktion wird der kristallographische R-Faktor minimiert, wobei geometrische Parameter berücksichtigt werden (Engh and Huber, 1991); (Huber, 1965), da die Zahl der Observablen im Verhältnis zur Anzahl der verfeinerten Parameter in der Proteinkristallographie im Allgemeinen nicht ausreichend bestimmt ist. Das Gewichtsverhältnis zwischen kristallographischem und geometrischem Term wird dabei zu Beginn der Verfeinerung bestimmt und mit fortschreitender Qualität des Modells schrittweise erhöht. Um ein objektives Kriterium für den Erfolg der Verfeinerungsrechnungen zu haben, werden 5% der Reflexe zufällig ausgewählt und als *Test set* nicht in die Verfeinerung mit einbezogen. Der so berechnete freie R-Faktor warnt vor einer Überanpassung der Daten und sollte nicht mehr als 5% höher als der R-Faktor für das verbleibende *Work set* sein. Positionelle Verfeinerung und *simulated annealing* (SA) alternieren mit visueller Inspektion der Elektronendichte und manuellem Einpassen bis zu einem Absinken des R-Faktors auf 30%. Danach werden Wassermoleküle automa-

tisiert mit CNS eingebaut. Im Anschluss an die Koordinatenverfeinerung werden individuelle Temperaturfaktoren verfeinert. Dabei wurden Einschränkungen auferlegt für direkt verknüpfte Atome und für über einen Winkel verknüpfte Atome, jeweils für Haupt- und Seitenketten. Die Zielwerte der Standardabweichungen betragen dabei $1,5 \sigma$ (Hauptkette) und $2,0 \sigma$ (Seitenkette) für benachbarte Atome und $2,0 \sigma$ (Hauptkette) und $2,5 \sigma$ (Seitenkette) für über Winkel verknüpfte Atome.

Als objektives Kriterium für den Erfolg des Verfeinerungsprozesses hat sich die Berechnung des freien R-Faktors durchgesetzt (Brünger, 1992). Dazu werden 5% der Reflexe zufällig ausgewählt und als *Test set* nicht in die Verfeinerung mit einbezogen. Der so berechnete freie R-Faktor warnt vor einer Überanpassung der Daten und sollte nicht mehr als 5% höher als der R-Faktor für das verbleibende *Work set* sein.

3.5.6 Modellanalyse und graphische Darstellungen

Die Molekülgeometrien werden mit den Programmen PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) analysiert. Überlagerungen und least square fits von Koordinaten werden mit TOP3D (CCP4, 1994) durchgeführt. Sekundärstrukturelemente werden mit den Programmen STRIDE (Frishman and Argos, 1995) oder MOLAUTO (Kraulis, 1993) zugeordnet. Die Substratmodelle der CoaB-Komplexe werden mit dem Programm SYBYL Version 6.4 (Tripos Inc., 1997) generiert und energetisch minimiert.

Zur graphischen Darstellung von Molekülmodellen und für Abbildungen werden die Programme BOBSCRIPT (Esnouf, 1997), MOLSCRIPT (Kraulis, 1993), MAIN, GRASP (Nicholls *et al.*, 1993) und Raster3D benutzt. ALSRIPT (Barton, 1993), GCG und Server-Applikation im www wie BLAST, ClustalW werden für Sequenzvergleiche verwendet.

Zur Nachbearbeitung von Bildern sowie zu deren Konvertierung kommen die Programme PHOTOSHOP (Adobe Systems Inc., USA) und CorelDraw (Corel Corporation Limited, 1998) zur Anwendung.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Phosphopantothenoylecystein Synthetase aus *E.coli* (ecCoaB)

4.1.1 Expression, Reinigung und Charakterisierung des ecCoaB

Die Expression und Reinigung des Enzyms Phosphopantothenoylecystein Synthetase (*PPC*) aus *E.coli* (ecCoaB) erfolgte bereits während der Diplomarbeit 2002 (Stanitzek, 2002). Der Vollständigkeit halber wird im Folgenden nochmals auf die proteinchemischen Untersuchungen des nativen und selenomethionin-markierten ecCoaB eingegangen.

Zu Beginn wurde der Wildtyp des Enzyms ecCoaB untersucht. Nach Expression und Aufreinigung konnten aber nur verwachsene Kristalle des Proteins erhalten werden. Eine Mutante des CoaB (N210D) eröffnete einen neuen, besseren Weg zur Untersuchung des Enzyms. Des Weiteren zeigte diese Mutante eine sehr geringe enzymatische Aktivität, *PPC* zu synthetisieren; die Reaktion stoppte auf der Stufe des Phosphopantothenoyle-CMP-Intermediates (Kupke, 2002). Im weiteren Text wird die Mutante des Wildtyps mit CoaB bezeichnet.

Es wurden verschiedene Expressionstests bei unterschiedlichen Temperaturen (37°C, 25°C, 18°C) durchgeführt, um die optimalen Expressionsbedingungen zu ermitteln und damit eine höhere Löslichkeit des Proteins in der Cytoplasmafraktion zu erhalten. Der Erfolg der Expression wurde mittels SDS-PAGE Analyse beurteilt. Die Abbildung 4.1 zeigt das Ergebnis der Expression des CoaB bei 18°C.

Es ist deutlich erkennbar, dass das CoaB hauptsächlich in löslicher Form im Cyto-

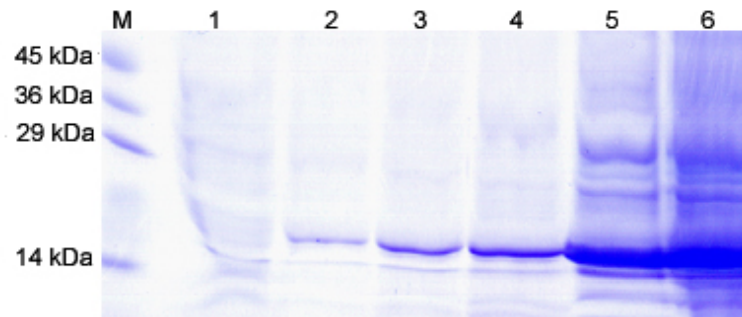


Abbildung 4.1: SDS-PAGE Analyse der Expression des ecCoaB bei 18°C: Spur **1** vor der Induktion, **2** 1 Stunde nach Induktion mit 1 mM IPTG, **3** 2 Stunden nach Induktion, **4** 4 Stunden nach Induktion, **5** nach Resuspendieren des Zellpellets in 20 mM Tris/HCl pH 8.0 und Spur **6** zeigt den Anteil an löslich exprimiertem CoaB im Cytoplasma nach Sonifizierung.

plasma vorliegt. Die Größe des Proteins liegt erwartungsgemäß im Bereich von 22,5 kDa.

Da das Enzym einen His-Tag beinhaltet, konnte die Aufreinigung über eine Nickel-Chelat-Matrix (siehe Kapitel 3.4.5) erfolgen. Das CoaB eluierte in einem linearen Gradienten von 10 mM bis 250 mM Imidazol (200 ml Gesamtvolumen) bei ca. 140 mM Imidazol mit einer Flussrate von 4 ml/min.

Die Fraktionen, in denen das Protein eluierte, wurden vereint, anschließend mittels einer Amicon-Rührzelle (Kapitel 3.4.9) auf 5 ml aufkonzentriert und mit destilliertem Wasser verdünnt, um die NaCl-Konzentration auf ca. 30 mM zu vermindern.

Zur weiteren Reinigung des CoaB wurde die Proteinlösung auf eine Q-Sepharose-Säule (Ionentauscher), wie in Kapitel 3.4.6 beschrieben, aufgetragen und gewaschen. Es wurde ein linearer Gradient von 0 bis 400 mM NaCl (240 ml Gesamtvolumen) mit einer Flussrate von 4 ml/min gefahren. Das Protein eluierte bereits beim Waschen mit 20 mM NaCl von der Q-Sepharose-Säule und befand sich in der Waschfraktion. Durch eine zweitägige Dialyse des Proteins (Kapitel 3.4.8) sollte der Salzgehalt auf 10 mM verringert werden. Anschließend wurde erneut eine Q-Sepharose-Säule gefahren, aber das CoaB eluierte dennoch beim Waschen, wie Abbildung 4.2 zeigt.

Da das Protein nach SDS-PAGE Analyse sauber vorlag, wurde es auf 12 mg/ml aufkonzentriert (siehe Kapitel 3.4.9) und umgepuffert (siehe Kapitel 3.4.8).

Die Ausbeute an gereinigtem CoaB betrug nach allen Reinigungsschritten 84 mg,

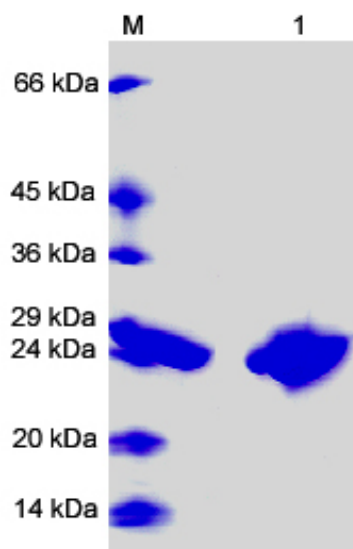


Abbildung 4.2: SDS-PAGE der Reinigung des ecCoaB

die aus 2 Litern Expressionskultur gewonnen wurden.

Die Gelpermeationschromatographie (siehe Kapitel 3.4.7) wurde hier zum analytischen Zweck eingesetzt, um zu prüfen, ob das Enzym in einheitlicher Form vorliegt. Dafür wurde ein Volumen von 40 μl mit einer Konzentration von 1 mg/ml an CoaB auf die Superose 12 Säule aufgetragen. Dem Chromatogramm der Gelfiltration konnte entnommen werden, dass das CoaB sauber und homogen vorlag, da nur ein Peak nach einer Retentionszeit von 30,23 Minuten (bei einer Flussrate von 40 $\mu\text{l}/\text{min}$) auftrat (siehe Abbildung 4.3). Auf diese Weise konnte genügend sauberes

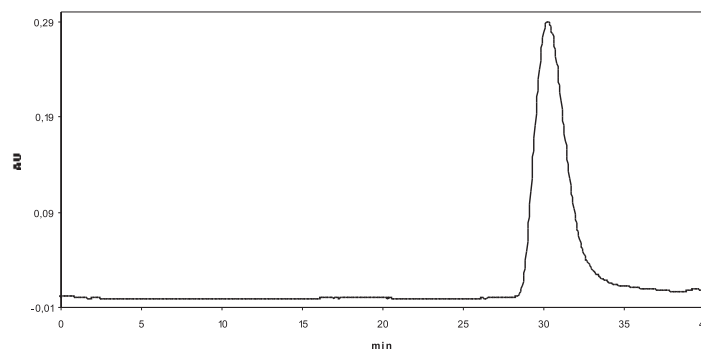


Abbildung 4.3: Chromatogramm der analytischen Gelfiltration

und kristallisierbares Material des CoaB erhalten werden, welches in einer großen Anzahl von Kristallisationsexperimenten eingesetzt wurde.

Selenomethionin-Markierung des Enzyms CoaB

Es wurde eine Expression in einem Methionin-defizienten Stamm (*E. coli* B834) auf Neuem Minimal Medium (NMM) mit 0,3 mM Selenomethionin (Budisa *et al.*, 1995) bei 18°C durchgeführt. Dabei wurden die Zellen bei einer $OD_{595}=0.5$ mit 1 mM IPTG 16 Stunden induziert. Der Erfolg der Expression wurde mittels SDS-PAGE beurteilt. Abbildung 4.4 zeigt das Ergebnis der Selenomethionin-Expression des CoaB bei 18°C. Das SDS-Gel belegt, dass das Selenomethionin-CoaB gut ex-

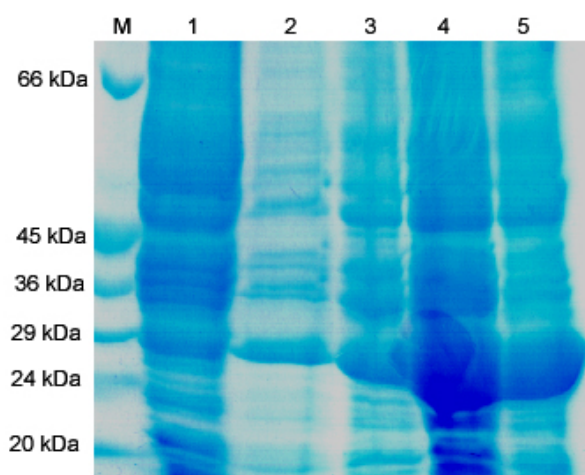


Abbildung 4.4: SDS-PAGE Analyse der Selenomethionin-Markierung des ecCoaB: **1** zeigt den Anteil an selenmarkiertem CoaB vor der Expression, **2** nach 4 Stunden Induktion mit 1mM IPTG, **3** nach 16 Stunden Induktion, **4** nach Resuspendieren des Zellpellets in 20 mM Tris/HCl pH 8.0 und **5** zeigt den Anteil an löslich eprimiertem Selenomethionin-CoaB im Cytoplasma nach Aufschließen der Zellen durch Sonifizierung; **M** Molekularstandard.

primierte und zum größten Teil in löslicher Form im Cytoplasma vorlag. Die Größe des Proteins lag erwartungsgemäß im Bereich von 22,5 kDa.

Das selenmarkierte CoaB wurde auf dieselbe Weise gereinigt wie das native Protein. Es band gut an die Nickel-Chelat-Matrix (siehe Kapitel 3.4.5) und eluierte in einem linearen Gradienten von 10 mM bis 250 mM Imidazol (200 ml Gesamtvolumen) bei

ca. 160 mM Imidazol mit einer Flussrate von 4 ml/min.

Die Fraktionen, in denen das Protein eluierte, wurden vereinigt und dialysiert, wie in Kapitel 3.4.8 beschrieben, um den NaCl-Gehalt zu reduzieren. Anschließend wurde die Proteinlösung auf eine Q-Sepharose-Säule, wie in Kapitel 3.4.6 beschrieben, aufgetragen und gewaschen. Es wurde ein linearer Gradient von 0 bis 400 mM NaCl (240 ml Gesamtvolumen) mit einer Flussrate von 4 ml/min gefahren. Das Protein eluierte bereits ab einer Salzkonzentration von ca. 20 mM NaCl. Die untere Abbildung 4.5 zeigt, dass das Protein sauber vorlag.

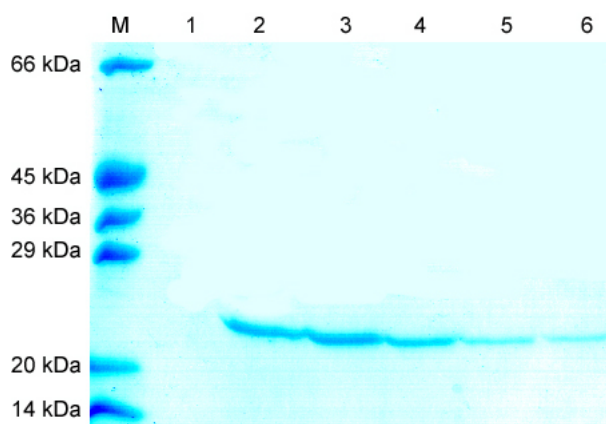


Abbildung 4.5: SDS-PAGE nach der Reinigung des selenmarkierten ecCoaB durch Q-Sepharose: **1** zeigt die Waschfraktion, **2-6** Elutionsfraktionen mit Protein; **M** Molekularstandard

Bei der anschließenden analytischen Gelpermeationschromatographie (siehe Kapitel 3.4.7) wurde überprüft, ob das Enzym homogen vorlag. Dafür wurde ein Volumen von 40 μ l mit einer Konzentration von 1 mg/ml an Proteinlösung auf die Superose 12 Säule aufgetragen. Da das Chromatogramm (Abbildung 4.6 oben) mehrere Peaks nach verschiedenen Retentionszeiten zeigte, wurde deutlich, dass das Selenomethionin-CoaB nicht homogen war. Deshalb wurde anschließend eine Gelfiltration an der FPLC quantitativ durchgeführt, wodurch das Protein noch einmal gereinigt wurde. Die Homogenität des CoaB konnte aber nicht verbessert werden, wie das Chromatogramm der anschließenden analytischen Gelfiltration in Abbildung 4.6 unten verdeutlicht.

Es wurden Massenspektren des nativen und des selenmarkierten Proteins angefertigt, die in Abbildung 4.7 gezeigt sind. Es ist zu erkennen, dass beide Proteine

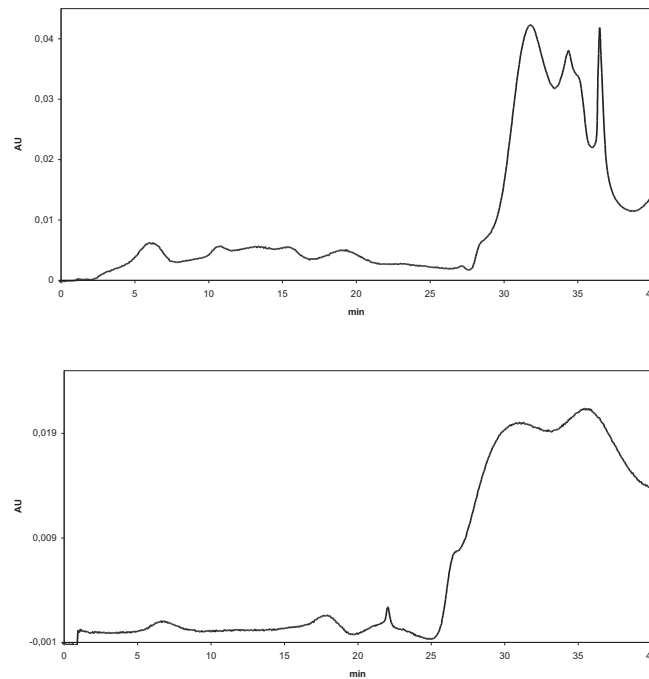


Abbildung 4.6: Chromatogramm der analytischen Gelfiltration

heterogen vorliegen.

Dennoch wurde das Protein auf 12 mg/ml aufkonzentriert (siehe Kapitel 3.4.9) und umgepuffert (siehe Kapitel 3.4.8), so dass der Salzgehalt 10 mM NaCl betrug. Danach wurde die Proteinlösung bei denselben Bedingungen kristallisiert wie das native CoaB.

Die Ausbeute an gereinigtem, selenmarkiertem CoaB betrug nach allen Reinigungsschritten 15 mg, die aus 1 Liter Expressionskultur gewonnen wurden.

Die berechnete Masse des nativen Proteins beträgt 26111 Da, die dem Peak bei 26108 Da zugeordnet werden kann; die berechnete Masse des selenmarkierten Proteins beträgt 26362 Da, die dem Peak bei 26360 Da entspricht. Grundsätzlich kann aber gesagt werden, dass die Selenmarkierung erfolgreich war, da die gesamten Massen des Spektrums des selenmarkierten CoaB schwerer sind. Dies zeigt auch der Peak bei etwa 26405 Da, der damit ca. 200 Da schwerer ist als der Peak bei 26206 Da, was etwa 5 Selenatomen entspricht. Die Abweichungen zwischen berechneten und tatsächlich beobachteten Massen im Massenspektrum sind nicht trivial zu er-

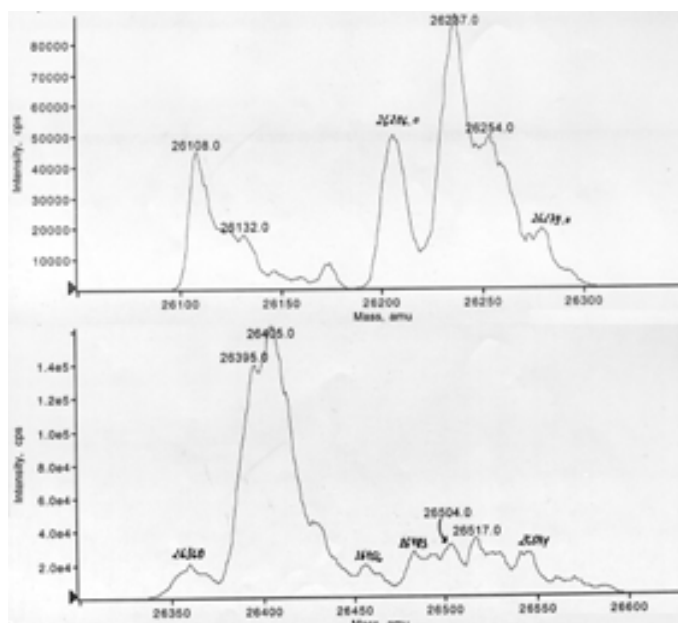


Abbildung 4.7: Massenspektren des nativen (oben) und des selenmarkierten ec-CoaB (unten)

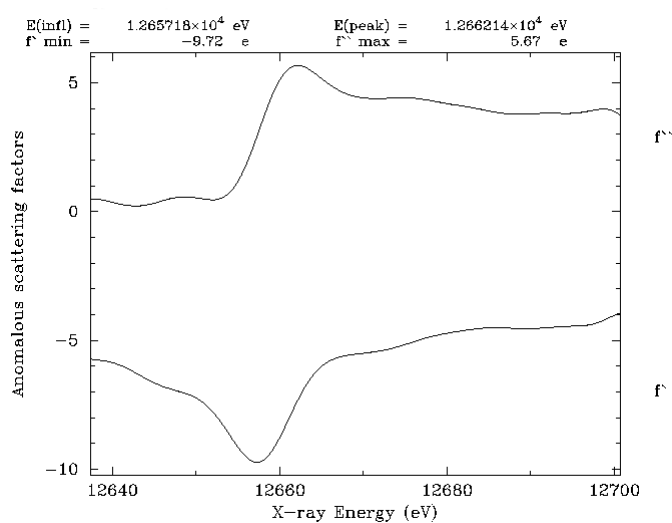


Abbildung 4.8: Anomale Streufaktoren, berechnet aus einem Fluoreszenzscan eines selenmarkierten CoaB-Kristalls an der Absorptionskante von Selen

klären und möglicherweise auf die nicht perfekte Desorption und Flugverhalten der Proteinmoleküle zurückzuführen.

Abbildung 4.8 zeigt die f' und f'' -Werte, wie sie aus einem Fluoreszenzscan des

selenmarkierten CoaB bestimmt wurden. Der Verlauf von f'' entspricht dabei der Absorption des Kristalls. Das Absorptionsspektrum bestätigt die Ergebnisse des Massenspektrums, dass Selen im Proteinkristall vorhanden ist, da eine Absorption der Selenatome deutlich zu erkennen ist.

4.1.2 Röntgenstrukturanalyse des Enzyms CoaB aus *E. coli*

Kristallisation

Das gereinigte native Enzym wurde mit einer anfänglichen Konzentration von 12 mg/ml in 10 mM Tris/HCl pH 8.0 in *Screening*-Experimenten eingesetzt. Kleine Kristalle des CoaB wurden nach ca. 2 Tagen im sitzenden Tropfen aus dem Hampton-Screen (Hampton-PEG-Screen 19) erhalten. Der Kristallisationstropfen setzte sich aus 2 μ l Proteinlösung und 2 μ l Reservoirlösung (20% PEG 3350, 0,2 M Ammoniumnitrat) zusammen. Die Kristallisationsbedingung wurde verfeinert, um die Form und Größe der Kristalle zu optimieren. Dabei wurde die PEG-Konzentration von 15 - 25% und die Ammoniumnitrat-Konzentration von 0,1 bis 0,3 M variiert. Es stellte sich heraus, je höher die Konzentration an PEG 3350 (bis 25%) und an Ammoniumnitrat (bis 0,3 M) war, desto schneller bildeten sich die Kristalle, die aber zu Verwachsungen neigten. Bei einer Konzentration von 15% PEG und 0,1 M Ammoniumnitrat wuchsen nach ca. einer Woche hochgeordnete Kristalle mit einer Größe von ca. 200 x 60 x 60 μ m³ und einem hohen Streuvermögen, die für Röntgenbeugungsexperimente tauglich waren. Aus dieser Bedingung typische Kristalle sind in Abbildung 4.9 dargestellt.

Für die Kristalle des selenmarkierten CoaB wurden für die verschiedenen Bedingungen dieselben Beobachtungen gemacht wie für die Kristalle des nativen Proteins. Als beste Bedingung stellte sich ebenfalls 15% Peg 3350 und 0,1 M Ammoniumnitrat heraus, aber generell waren diese Kristalle kleiner (150 x 40 x 40 μ m³) und das Wachstum erfolgte langsamer. Auch war deutlich stärkere Präzipitatbildung zu verzeichnen.

Da die Kristalle des CoaB nicht aus einer für Cryoexperimente tauglichen Bedingung stammten, mussten sie zuvor in eine Cryobedingung überführt werden. Es wurden einige Cryopuffer getestet, wobei nur die Kristalle mit Perfluoropolyether

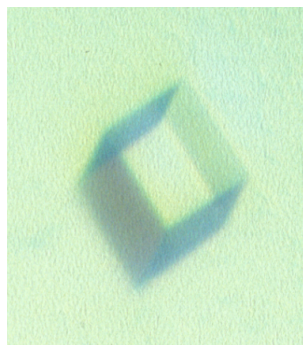


Abbildung 4.9: Typischer Kristall des ecCoaB in 15% PEG 3350 und 0,1 M Ammoniumnitrat

(PFO, Lancaster) stabil blieben.

Cokristallisation und Soaking Experimente

Zur Cokristallisation mit CTP wurde das Protein mit einer Konzentration von 15 mg/ml mit 2 mM CTP und 1 mM DTT gemischt. Der Kristallisationstropfen setzte sich aus 3 μ l Proteinlösung und 1 μ l Reservoirlösung (16% PEG 3000, 0,1 M Tris-HCl pH 6,6 und 0,1 M Calciumacetat) zusammen. Orthorhombische Kristalle mit der Raumgruppe **C222₁** wurden nach ca. 10 Tagen aus einem „sitzenden“ Tropfen erhalten (siehe Abbildung 4.10 links).

Da Phosphopantothensäure nicht kommerziell erhältlich ist, wurde es für die Cokristallisationsexperimente, wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, hergestellt (Kupke, 2002); (Kupke, 2004).

Wurde das ecCoaB-Protein erneut mit einer Konzentration von 15 mg/ml mit 2 mM Phosphopantothensäure, 2 mM CTP und 1 mM DTT gemischt, kristallisierte das Protein unter einer anderen Kristallisationsbedingung (20% PEG 3350 und 0,2 M Lithiumacetat) in einem Tropfen mit einem Protein-Puffer-Verhältnis von 3:2 (v/v) nach ca. 5 Tagen. Ein typischer Kristall ist in Abbildung 4.10 rechts gezeigt.

Für den Erhalt weiterer Komplexverbindungen wurden die mit Phosphopantothensäure und CTP cokristallisierten ecCoaB-Kristalle mit Cysteine *gesoakt* und dabei die *Soakingzeiten* und -konzentrationen zwischen 10 Minuten bis 24 Stunden, bzw. 2 mM bis 10 mM variiert.



Abbildung 4.10: Mit CTP cokristallisierter ecCoaB-Kristall (links) und ecCoaB komplexiert mit dem aktivierten Intermediat 4'-Phosphopantothenoyl-CMP (rechts), das bei der Cokristallisation mit 4'-Phosphopantothensäure und CTP *in situ* gebildet wurde.

Die Kristalle wurden zur Messung unter Cryobedingungen, wie zuvor beschrieben, in PFO überführt, montiert und im Stickstoffstrom schockgefroren. Die Diffraktionsdaten der ecCoaB-Cokristalle wurden am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY) in Hamburg aufgenommen, die *gesoakten* Kristalle wurden am Max-Planck-Institut in Martinsried vermessen.

Datensammlung und Strukturlösung

Die nativen Kristalle des Enzyms ecCoaB zeigen eine monokline Gittermetrik mit den Gitterkonstanten $a = 52,12 \text{ \AA}$, $b = 57,35 \text{ \AA}$, $c = 79,35 \text{ \AA}$ und $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 109,92^\circ$, $\gamma = 90^\circ$. Die Datenreduktion ergab die Raumgruppe **C2**. Die Auflösung des Datensatzes betrug $2,4 \text{ \AA}$. In der asymmetrischen Einheit enthalten die monoklinen Kristalle ein Molekül, entsprechend einem Solvensgehalt von 50%. Das Verhältnis von Zellvolumen zu molekularer Masse V_m liegt für Proteine im Bereich von $1,6 - 3,6 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ (Matthews, 1968) und beträgt beim nativen CoaB $2,48 \text{ \AA}^3/\text{Da}$.

Ein Diffraktionsbild des nativen Datensatzes ist in Abbildung 4.11 gezeigt. Da bisher keine Struktur des CoaB aus anderen Organismen oder homologe Strukturen bekannt waren, wurde zunächst versucht, die Struktur mittels Multiplem Isomorphem Ersatz (MIR) zu lösen. Dabei wurden verschiedene Kristalle des nativen Proteins eine Stunde in eine Lösung mit 2 mM Quecksilberacetat in 15% PEG 3350 und 0,1 M Ammoniumnitrat eingelegt. Die Datensätze wurden unter Cryobedingungen bei 100 K aufgenommen. Dabei wurde festgestellt, dass die Kristalle nicht-isomorph

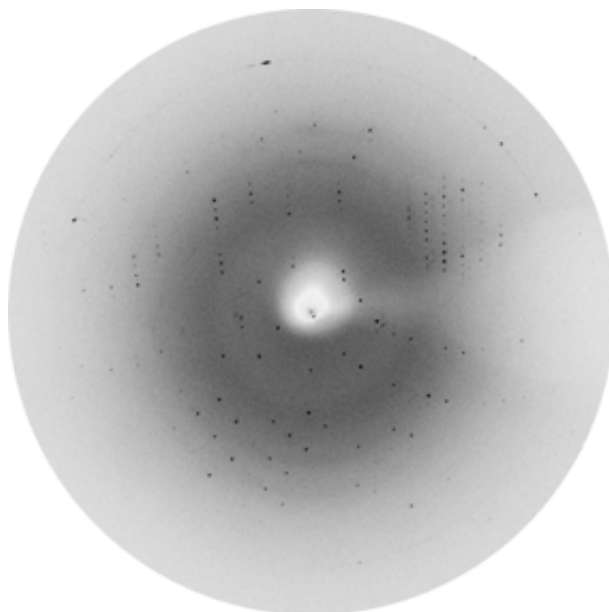


Abbildung 4.11: Diffraktionsbild des nativen Proteinkristalls von ecCoaB. Die Auflösung beträgt am Plattenrand 2,6 Å; Rotation: 1°, Wellenlänge: $\lambda = 1,5418$ Å

sind.

Deshalb wurde der Ansatz der Multiplen Anomalen Dispersion (MAD) weiter verfolgt und die Struktur des ecCoaB durch MAD an einem Selenomethionin-Derivat Kristall bestimmt. Die Messungen erfolgten am DESY in Hamburg. Die Bestimmung der Raumgruppe, die Verfeinerung der Zellparameter und die Integration der Daten erfolgte mit dem HKL-Programmpaket DENZO und SCALEPACK (Otwinowski and Minor, 1997). Fünf initiale Selenatompositionen wurden mit dem Programm SHELXS (Sheldrick *et al.*, 1993) identifiziert. Die Schweratomparameter wurden mit dem Programm MLPHARE (Otwinowski and Minor, 1997) verfeinert. Die Berechnung der Phasen erfolgte in einem Auflösungsbereich von 20 bis 2.7 Å. Die *Phasing power* (Phasing power = $\langle |F_H| \rangle / \text{r.m.s. lack of closure}$) betrug für die *remote* Wellenlänge ($\lambda = 1.05$ Å) 0,20 und für den *inflection point* ($\lambda = 0.9793$ Å) 0,24. Der anomale R_{Cullis} ($R_{Cullis}(\text{ano}) = \text{r.m.s. lack of closure} / \text{r.m.s. anomale Differenzen}$) hatte für die *peak* Wellenlänge ($\lambda = 0.9797$ Å) einen Wert von 0,78, für die *remote* Wellenlänge 0,91 und für den *inflection piont* einen Wert von 0,93. Die an der *peak* Wellenlänge aufgenommenen Daten dienten als Referenz Datensatz. Die nativen Daten mit einer Auflösung bis 2.4 Å wurden für weitere Verfeinerungen verwendet.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Tabelle 4.1 zeigt die Ergebnisse der Datensammlung und Prozessierungsstatistiken.

	Se(Peak)	APO	CTP	PCMP	CMP
Wellenlänge (Å)	0.9797	0.950	0.9789	0.9789	0.9789
Auflösungsbereich (Å)	20-2.5 (2.54-2.5)	20-2.4 (2.49-2.4)	20-2.5 (2.52-2.49)	20-2.3 (2.38-2.3)	20-2.85 (2.92-2.85)
Raumgruppe	C2	C2	C222 ₁	C222 ₁	C222 ₁
Zellkonstanten (Å)	a=52,3 b=57,3 c=77,2 γ=109,1	a=52,9 b=57,3 c=78,8 γ=108,9	a=45,9 b=144,4 c=246,2	a=43,6 b=142,6 c=244,6	a=45,8 b=144,3 c=245,1
Unabhängige Reflexe	7946	8804	28789	32347	19252
Multiplizität	5,5	7,5	3,1	2,9	3,0
Vollständigkeit(%)	95,6 (86,0)	99,9 (100,0)	99,5 (99,8)	93,4 (97,1)	98,7 (92,9)
I/σ(I)	19,8 (3,0)	18,7 (3,7)	18,0 (3,4)	15,1 (3,1)	38,7 (5,5)
R _{merge} ^a (%)	6,0 (52,2)	5,4 (49,6)	6,5 (42,7)	8,8 (29,7)	4,2 (20,2)

$$^a R_{merge} = \sum_{hkl} [(\sum_i |I_i - \langle I \rangle|) / \sum_i I_i].$$

Werte für die äußerste Auflösungsschale sind in Klammern angegeben.

Tabelle 4.1: Datensammlung und Prozessierungsstatistiken des Selenomethionin-, des nativen und der Substratkomplexdatensätze

Die Kristalle, die aus den beiden unterschiedlichen Cokristallisationsbedingungen wuchsen, wiesen eine orthorhombische Gittermetrik mit nahezu denselben Gitterkonstanten auf, sind aber bemerkenswert nicht-isomorph: a = 45,9 Å, b = 144,4 Å, c = 246,2 Å für die CoaB-CTP-Cokristalle, a = 43,6 Å, b = 142,6 Å, c = 244,6 Å für die mit Phosphopantothensäure und CTP cokristallisierten Kristalle. Diese orthorhombischen Cokristalle mit der Raumgruppe C222₁ enthalten drei Monomere in der asymmetrischen Einheit, entsprechend einem Solvenzgehalt von 55,1% und Matthews-Koeffizienten (Matthews, 1968) von 2,8 Å³/Da.

Modellbau, Verfeinerung und Qualität des Atommodells

Das finale Modell der apo-CoaB-Struktur beinhaltet 216 der 236 Aminosäuren, die manuell unter Verwendung des Programms MAIN (Turk, 1992) eingebaut wurden. Es beginnt mit dem Aminosäurerest Pro182 und endet mit Arg405. Keine Elektrodichte ist für die Aminosäuren Ser181, Thr284 bis Glu299 und den C-Terminus Arg406 vorhanden. Nach einer anschließenden *rigid body* Minimierung und einem *simulated annealing* bei 2000 K wurde das Modell mit dem Programm CNS unter Verwendung des *maximum-likelihood* Algorithmus (Brünger, 1992) verfeinert. In iterativen Zyklen von Modellbau, Einbau von Wassermolekülen und Verfeinerungen des Atommodells konvergierte der kristallographische R-Faktor schließlich bei 22.1% ($R_{free}=27.9\%$).

	APO	CTP	PCMP	CMP
Auflösungsbereich (Å)	20-2.4	20-2.5	20-2.3	20-2.85
Reflexe im <i>working set</i>	8106 92,0%	27197 94,0%	30744 88,8%	18316 93,9%
Reflexe im <i>test set</i>	698 7,9%	1592 5,5%	1603 4,6%	936 4,8%
R_{cryst}^a (%)	22,1	21,1	19,6	21,2
R_{free}^b (%)	27,9	25,8	26,6	27,5
Anzahl Proteinatome (ohne H)	1529	4705	5040	5027
Anzahl Solvenzatome (ohne H)	77	159	258	106
Anzahl Ligantenatome (ohne H)	-	87	117	63
r.m.s.-Abweichungen vom Idealwert der Bindungslängen (Å)	0,012	0,011	0,011	0,012
Bindungswinkel (°)	1,73	1,62	1,67	1,78
(ϕ, ψ)-Winkel Verteilung im bevorzugten Bereich (%)	86,4	86,5	92,3	84,7
zusätzlich erlaubten Bereich (%)	13,6	12,7	7,5	13,9

$$^a R_{cryst} = \sum_{hkl \subset W} ||F_{obs}| - k|F_{calc}|| / \sum_{hkl \subset W} |F_{obs}|$$

$$^b R_{free} = \sum_{hkl \subset T} ||F_{obs} - k|F_{calc}|| / \sum_{hkl \subset T} |F_{obs}|$$

Tabelle 4.2: Verfeinerungsstatistik

Die Strukturen der Komplexverbindungen des ecCoaB wurden mit Hilfe der PATTERSON-Suchmethode (*Molecular Replacement*) mit dem Programm MOLREP (CCP4, 1994) gelöst. Hierfür wurden Auflösungsbereiche von 20 - 3.5 Å verwendet. Dabei diente die zuvor mittels MAD gelöste native Kristallstruktur des ecCoaB als

Suchmodell.

Die Verfeinerungsstatistik ist in Tabelle 4.2 gezeigt.

Die CTP kokristallisierte ecCoaB Struktur wurde bei einer Auflösung von 2.5 Å bis zu einem R-Faktor von 21,1% ($R_{free}=25,8\%$) verfeinert, die mit CTP und Phosphopantothensäure kokristallisierte Struktur bis zu einem R-Faktor von 19,6% ($R_{free}=26,6\%$) bei einer Auflösung von 2.3 Å.

Eine Überprüfung der Bindungsgeometrien der Proteinhauptkette des ecCoaB zeigte, dass sich 86,4% (nativ), 86,5% (CTP), 92,5% (PCMP) bzw. 84,7% (CMP) aller Aminosäuren (Glycin und Prolin ausgeschlossen) in den am meisten bevorzugten Bereichen befinden, während 13,6% (nativ), 12,7% (CTP), 7,5% (PCMP) bzw. 13,9% (CMP) in zusätzlich erlaubten Bereichen liegen. Die Qualität des verfeinerten Modells wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) überprüft.

Strukturbeschreibung

Die Struktur des ecCoaB besteht aus zwölf β -Faltblattsträngen, fünf α -Helices und den verbindenden *Loops*. Alle α -Helices packen gegen ein zentrales achtsträngiges β -Faltblatt-Motiv: drei Helices befinden sich oberhalb, zwei unterhalb dieses zentralen Faltblatts. Zwei weitere β -Stränge ragen aus der globulären Domäne heraus und sind durch einen ungeordneten *Loop* verknüpft.

Die aus 236 Aminosäuren bestehende Primärstruktur des ecCoaB ordnet sich zu einer Sekundärstrukturabfolge der Topologie des Rossmann-*fold*, wie in Abbildung 4.12 zu sehen ist: I, Ia, Ib α 1, II, L2, III, α 3, IV, IVa, IVb, α 4, V, α 5, VI, „ α 6“, VIIb, VII, α 7.

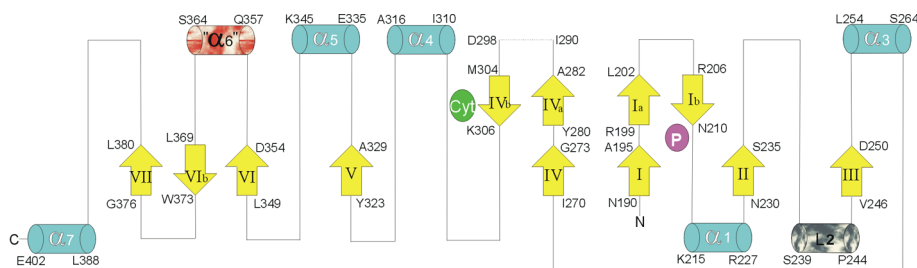


Abbildung 4.12: Topologie Diagramm des ecCoaB entsprechend dem Rossmann-*fold*

In der apo-Struktur des CoaB ist ein Monomer in der asymmetrischen Einheit zu finden, das über eine zweizählige kristallographische Achse mit dem benachbarten Monomer ein Dimer bildet.

In den orthorhombischen Kristallstrukturen, in denen sich drei Monomere in der asymmetrischen Einheit befinden, bilden zwei der drei Monomere ein Dimer, während das dritte Monomer über eine zweizählige kristallographische Achse mit seinem Symmetrieverwandten aus der benachbarten asymmetrischen Einheit ein Dimer bildet. Diese beiden Dimere sind identisch und unterscheiden sich auch nicht von dem Dimer der ligandenfreien CoaB-Struktur: Die mittlere quadratische Standardabweichung (r.m.s.d.) zwischen den Dimeren beträgt 1.31 Å.

Das Dimer hat die Form eines Bogens mit zwei globulären Untereinheiten als Seitenbegrenzungen und einer Dimerisierungsdomäne als Giebel (Abbildung 4.13). Die Ausdehnungsdimensionen des Dimers betragen 35 x 35 x 85 Å mit einer inneren Breite des Bogens von 12 Å. Die N-Termini, an die die PPC Decarboxylase (CoaC) im intakten Dfp kovalent angehängt sind, sind ca. 60 Å weit von einander entfernt.

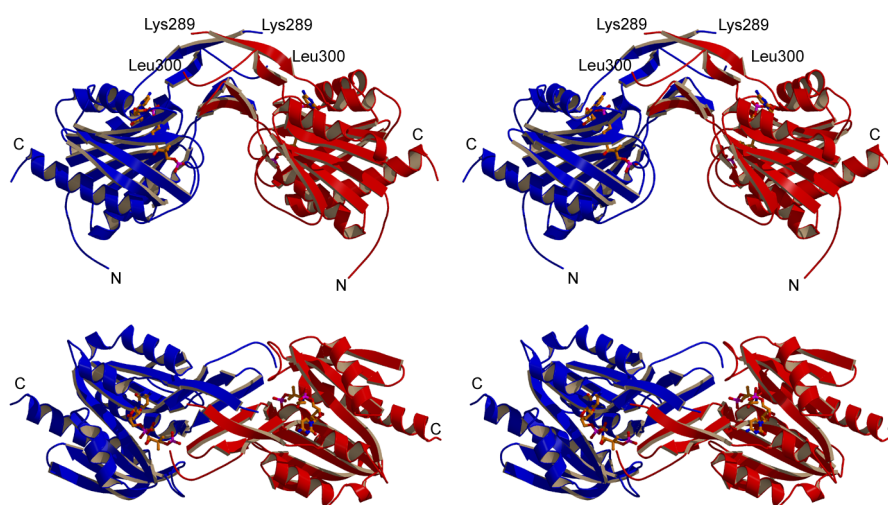


Abbildung 4.13: Seitenansicht des Dimers des ecCoaB (oben) und Draufsicht (unten). Das Enzym besteht aus zwei globulären Domänen, die sich in Analogie zum Rossmann-*fold* anordnen. Eine Dimerisierungsdomäne stellt eine Insertion zwischen den beiden kompakten Domänen dar und bildet so das Dimer.

Bei der Cokristallisation mit Phosphopantothensäure und CTP entstand *in situ* das aktivierte Intermediat 4'-Phosphopantothenoil-CMP. Das Substrat bleibt als Zwi-

schenstufe fest an das Enzym gebunden, wie es zuvor für diese Mutante Asn210Asp in Enzymassays beobachtet wurde (Kupke, 2004). Durch *Soaken* dieser Kristalle mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cystein oder Cysteamin und variierenden *Soakingzeiten* wurde CMP als Reaktionsprodukt und ein Phosphation an der Substratbindungsstelle der 4'-Phosphopantothensäure in der Elektronendichte sichtbar. Die Qualität dieser Dichte wurde besser, je kürzer die *Soakingzeiten* waren, die beste Elektronendichte für die Substrate wurde bei einer *Soakingzeit* von 15 Minuten beobachtet. Dies zeugt von einer langsamen Diffusion des Reaktionsprodukts von der Substratbindungsstelle in den Kristallen. Dies bedeutet, dass die Mutante immer noch genügend Restaktivität besitzt, um die zweite Halbreaktion der von CoaB katalysierten zweistufigen Reaktion, die Spaltung des Intermediat durch Cystein, durchzuführen und das Produkt *PPC* zu synthetisieren.

Substratbindung

CTP-Bindung

Die Cokristallisation von ecCoaB mit CTP zeigt eine klar definierte Elektronendichte für CTP, die sich in einer gut definierten Bindungstasche am N-Terminus der α -Helix $\alpha 4$ befindet, wie in Abbildung 4.14A zu sehen ist.

Ein zweiwertiges Metallion, vermutlich Calcium aus dem Kristallisationspuffer, wird durch das α - und β -Phosphat des CTP koordiniert, zusätzlich durch zwei Wassermoleküle und durch den in bakteriellen und eukaryotischen CoaB-Proteinen streng konservierte Aminosäurerest Asp279 (Abbildung 4.14A). Die Abstände zwischen Ligand und Metallion betragen 2.1 Å.

Eines der Sauerstoffatome des γ -Phosphates des CTP befindet sich 3 Å von dem zweiwertigen Metallion entfernt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Distanz für ein Magnesiumion, welches das aktive Metallion *in vivo* ist, geringer wäre.

Ein bemerkenswertes Ladungsnetzwerk an ausgeglichenen positiven und negativen Ladungen partizipiert an der Bindung von CTP: Diese schließen die Aminosäuren Lys289, Lys341, Lys345 und Arg344 ein, die Kontakte mit den Phosphatgruppen des CTP ausbilden. Asp309 und Glu330 sind in der Nähe der positiv geladenen Aminosäurereste zu finden und bilden Salzbrücken mit ihnen aus.

Der Aminosäurerest Lys289 repräsentiert das erste Lysin des Lys289-*X*-Lys-Lys-Motivs (*X* = Ile in ecCoab) und ist in allen bakteriellen, eukaryotischen und archaischen CoaB-Proteinen konserviert. Dieses wichtige Motiv ist in der Dimerisierungsdomäne lokalisiert und Teil des *Loops*, der aus der globulären Domäne herausragt bis in die benachbarte Untereinheit des Dimers. Dies stimmt mit früheren Überlegungen überein, dass dieses Lys289 an der Bindung der Phosphatgruppe des CTP oder der Pantothenensäure beteiligt ist (Kupke, 2004); (Kupke, 2002). In der ecCoaB Struktur ist dieses Lys289 nur in einem der drei Monomere geordnet (Monomer B) und bildet Kontakte zu einem der γ -Phosphat-Sauerstoffatome des CTP im benachbarten Monomer aus. Ile290 ist in einigen Untereinheiten partiell geordnet, während die anderen beiden Lysine dieses Lys-*X*-Lys-Lys-Motives in allen Kristallformen ungeordnet sind.

Die Ribose des CTP interagiert hauptsächlich mit der Proteinhauptkette: Die Carbonylsauerstoffatome von Gly273 und Ala275 bilden jeweils Wasserstoffbrücken-Bindungen mit den 2'- und 3'-Hydroxylgruppen der Ribose aus; das Carbonylsauerstoffatom von Phe327 formt einen van-der-Waals-Kontakt mit der 5'-Methylgruppe und die Seitenketten von Val311 unterstützen teilweise den Zuckerring durch hydrophobe Interaktionen mit C1' und O4'.

Durch diese Art der CTP-Bindung steht die β - und γ -Phosphatgruppe deutlich von der hervorgehobenen Spalte weg, die sich durch das Molekül zieht und als Substratbindungsstelle für den 4'-Phosphopantothenoylester dient. In dieser Geometrie ist das α -Phosphat in einer idealen Position für den nukleophilen Angriff der Carbonylgruppe der 4'-Phosphopantothensäure, um 4'-Phosphopantothenoyle-CMP mit dem Diphosphat als Austrittsgruppe zu bilden (Abbildung 4.14).

Bindung von 4'-Phosphopantothenoyle-CMP

Wie Abbildung 4.14B zeigt, ist die Bindungsstelle des aktivierten Intermediates 4'-Phosphopantothenoyle-CMP in *Loop*-Strukturen lokalisiert, die die C-terminalen Enden des zentralen, parallelen β -Faltblatts verbinden. In Anlehnung an den Rossmann-*fold* bindet die Phosphatgruppe der 4'-Phosphopantothensäure an den N-Terminus der Helix des ersten $\beta\alpha$ -Moduls. Die Pantothenat-Kette erstreckt sich in einer Furche zwischen den β -Faltsträngen 4 und 5. Der Cytidyl-Rest ist am N-

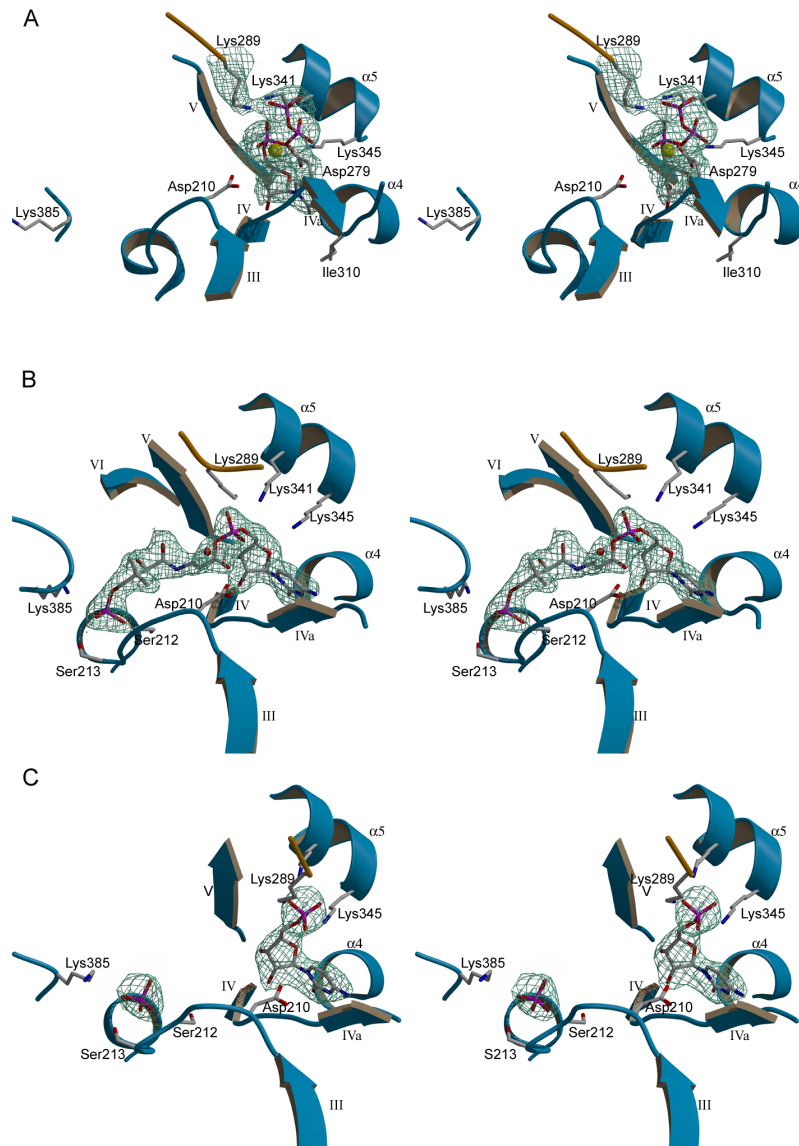


Abbildung 4.14: Momentaufnahmen der Substratbindung im aktiven Zentrum: (A) Die Elektronendichte des CTP, des zweiwertigen Metallions (Ca^{2+} in gelb) und die des Lys289, welches an Kontakte zum γ -Phosphat des CTP ausbildet, ist sehr gut definiert. (B) zeigt das *in situ* gebildete Intermediat 4'-Phosphopantothoyl-CMP und ein Wassermolekül (rot) oberhalb der zu spaltenden Acyl-Phosphat-Bindung. Die Position des Wassermoleküls kennzeichnet die Bindungsstelle des Cysteins. (C) Nach Soaken des Intermediatkomplexes mit Cystein ist das Reaktionsprodukt CMP und eine Phosphatgruppe, die möglicherweise vom ungeordneten Reaktionsprodukt PPC herrührt, zu sehen.

Terminus der α -Helix des vierten $\beta\alpha$ -Moduls lokalisiert, das sich auf der gegenüber liegenden Seite der 4'-Phosphopantothenoylephosphat-Bindungsstelle befindet. Der 4'-Phosphopantothenoyle-Rest wird von einer Substratbindungsklammer (Asp354 bis Ala368) umschlossen, die an eine gestreckte Helix erinnert und bei nicht gebundenem Substrat flexibel ist. Topologisch gesehen entspricht ein Teil dieses *Flaps* der α -Helix des $\beta\alpha$ -Moduls 6 (siehe auch Abbildung 4.12). Dieser Substratbindungsdeckel mit Val355 und Phe362 trägt zu einem hydrophoben Kern bei, der die Pantothentatmethylen-Gruppe einschließt. Das Hauptkettenamid von Asn363 ist in der Phosphatbindungsstelle lokalisiert, die hauptsächlich durch Seitenketten und Hauptkettenamiden der Aminosäurereste Ser212, Ser213 und den Hauptkettenamiden von Lys215 und Met216 gebildet wird (Abbildung 4.14).

Reaktion des Acyl-Phosphat-Intermediat mit Cystein

Ein prinzipieller Mechanismus für die Spaltung des Acyl-Phosphat-Intermediates beinhaltet einen nukleophilen Angriff auf das Carbonylkohlenstoffatom, um einen tetraedrischen Übergangszustand auszubilden. Diese Reaktion ähnelt dem Reaktionsmechanismus für Proteasen. Die ideale Position der Aminogruppe des Cysteins für diesen nukleophilen Angriff befindet sich oberhalb des Carbonylkohlenstoffatoms, senkrecht über der Ebene, die durch die Carbonylgruppe und dem damit verbundenen Sauerstoffatom des CMP aufgespannt wird.

Es gibt keine strukturellen Daten über diesen Bindungsmechanismus des Cysteins zum Acyl-Intermediat-Komplex, aber der postulierte Mechanismus erlegt strenge Restriktionen auf: Ein Wassermolekül (W1) mit einem Abstand von 3 Å von dem Carbonylkohlenstoffatom entfernt, ist in allen drei Molekülen in der asymmetrischen Einheit zu finden. Diese Stelle zeigt ungefähr die erwartete Position der Aminogruppe des Cysteins (siehe Abbildungen 4.15 und 4.16). Da Serin nicht als eines der Substrate des Enzyms beobachtet wurde, ist zu erwarten, dass die Thiolgruppe sehr spezifische Kontakte ausbildet. Zusätzlich scheint die Thiol-Bindungsstelle eine gut definierte Größe zu haben, denn z.B. D,L-Homocystein fungiert auch nicht als eines der Substrate für ecCoaB (Kupke, 2004).

Eine kleine, hydrophobe Kavität wird durch einen Teil des Intermediats, den Aminosäureresten Val205, Ala276, Ala329, Val355 und Phe362 (des flexiblen Substrat-

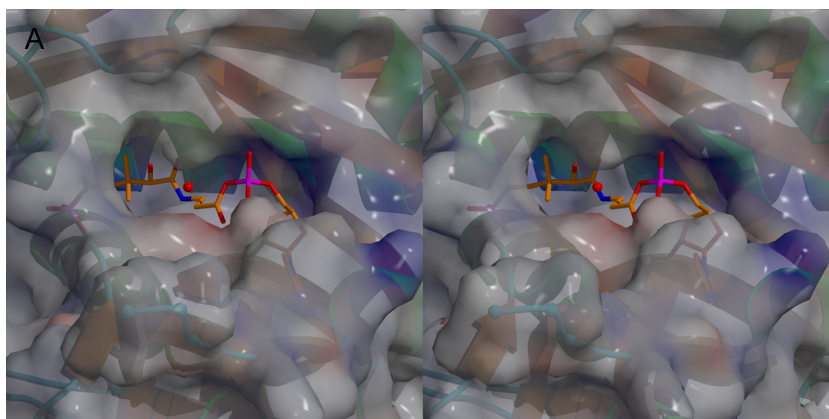


Abbildung 4.15: Oberflächenabbildung des aktiven Zentrums mit gebundenem 4'-Phosphopantothenoil-CMP-Intermediat (vgl. auch Abbildung 4.14B): Der Eingang in das aktive Zentrum wird durch die ungeordneten Reste Ile290 und Glu299 kontrolliert.

bindungsdeckel) gebildet (Abbildung 4.16). Die einzige polare Gruppe, die in diese hydrophobe Kavität hineinragt, ist die Hauptketten Carbonyl-Gruppe von His211, die 5 Å von dem Wassermolekül W1 entfernt ist. Die Seitenkette von Val205 tritt in den drei Monomeren der asymmetrischen Einheit in unterschiedlichen Konformationen auf: Abhängig von der Konformation der Seitenkette von Val205 ist die Kavität groß genug, um die Thiol-Seitenkette des Cysteins aufzunehmen. Größere Seitenketten werden nicht akzeptiert und damit nicht gebunden. Auch die hydrophobe Eigenschaft dieser potenziellen Thiol-Bindungskavität kann die Erklärung sein, warum die polarere Hydroxylgruppe des Serins nicht gebunden wird. EcCoaB ist nicht absolut spezifisch für L-Cystein, denn verwandte Thiol-Verbindungen wie Cysteamin und Cysteinmethylester addieren ebenso an 4'-Phosphopantothensäure (Kupke, 2004). Dies beweist, dass die Carboxylgruppe des Cysteins an viel weniger stringenten Kontakten beteiligt ist. Wird Cystein so in die Struktur gemodelt, dass erstens die Aminogruppe oberhalb des Carbonylkohlenstoffs des Acyl-Intermediates (also in der Nähe von W1) lokalisiert ist und zweitens die Thiolgruppe an die darüber liegende postulierte Thiol-Kavität gebunden ist, so steht die Carboxylgruppe des Cysteins in das Solvenz. Ein solcher Substratbindungsmodus wäre kompatibel mit den beobachteten Substratspezifitäten.

Der Aminosäurerest Asp210, der im Wildtyp ein Asparagin ist, bildet sowohl einen Kontakt zu dem Wassermolekül W1 als auch zu einem weiteren Wassermolekül W2

aus, welches den CMP-Phosphatrest und das Carbonylsauerstoffatom des Intermediates überbrückt (Abbildung 4.16). Eine entstehende negative Ladung am Carbonylsauerstoff während des nukleophilen Angriffs der Aminogruppe des Cysteins auf das Carbonylkohlenstoffatom kann so durch den Kontakt zu W2 stabilisiert werden. Andere Gruppen wie z.B. das Hauptketten Amid von Val277 (in einer Entfernung von 3.8 Å) bildet keine direkten Kontakte zur Stabilisierung des entstehenden Oxyanions aus. Die negative Ladung des Asp210 vermindert durch Entstehung einer Salzbrücke vermutlich die Nukleophilie der Aminogruppe oder destabilisiert während des tetraedrischen Übergangszustand eine sich entwickelnde negative Ladung auf dem Carbonylsauerstoff des Intermediats. Die Mutante Asn210Asp zeigt sehr geringe Enzymaktivität *in vitro*. Aber dennoch muß eine Restaktivität auch im Kristall noch vorhanden sein, denn durch *Soaken* der 4'-Phosphopantothenoil-CMP-Kristalle mit variierenden Konzentrationen von 2 bis 10 mM Cystein und verschiedenen *Soakingzeiten* von 15 Minuten bis 24 Stunden wurden immer nur Elektronendichten für ein CMP und Phosphation unterschiedlicher Qualität erhalten, wie Abbildung 4.14C zeigt. Nichtsdestoweniger zeigt dieses Experiment, dass das 4'-Phosphopantothenoil-CMP komplexierte CoaB-Protein auch in den Kristallen immer noch in einer enzymatisch aktiven Konformation vorliegt.

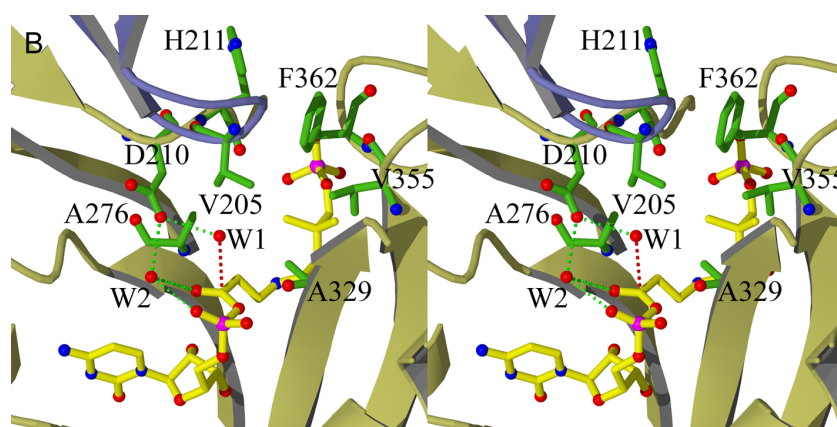


Abbildung 4.16: Schematische Darstellung der Bindungsstelle des 4'-Phosphopantothenoil-CMP im aktiven Zentrum. Asp210 ist Asparagin im Wildtyp CoaB

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

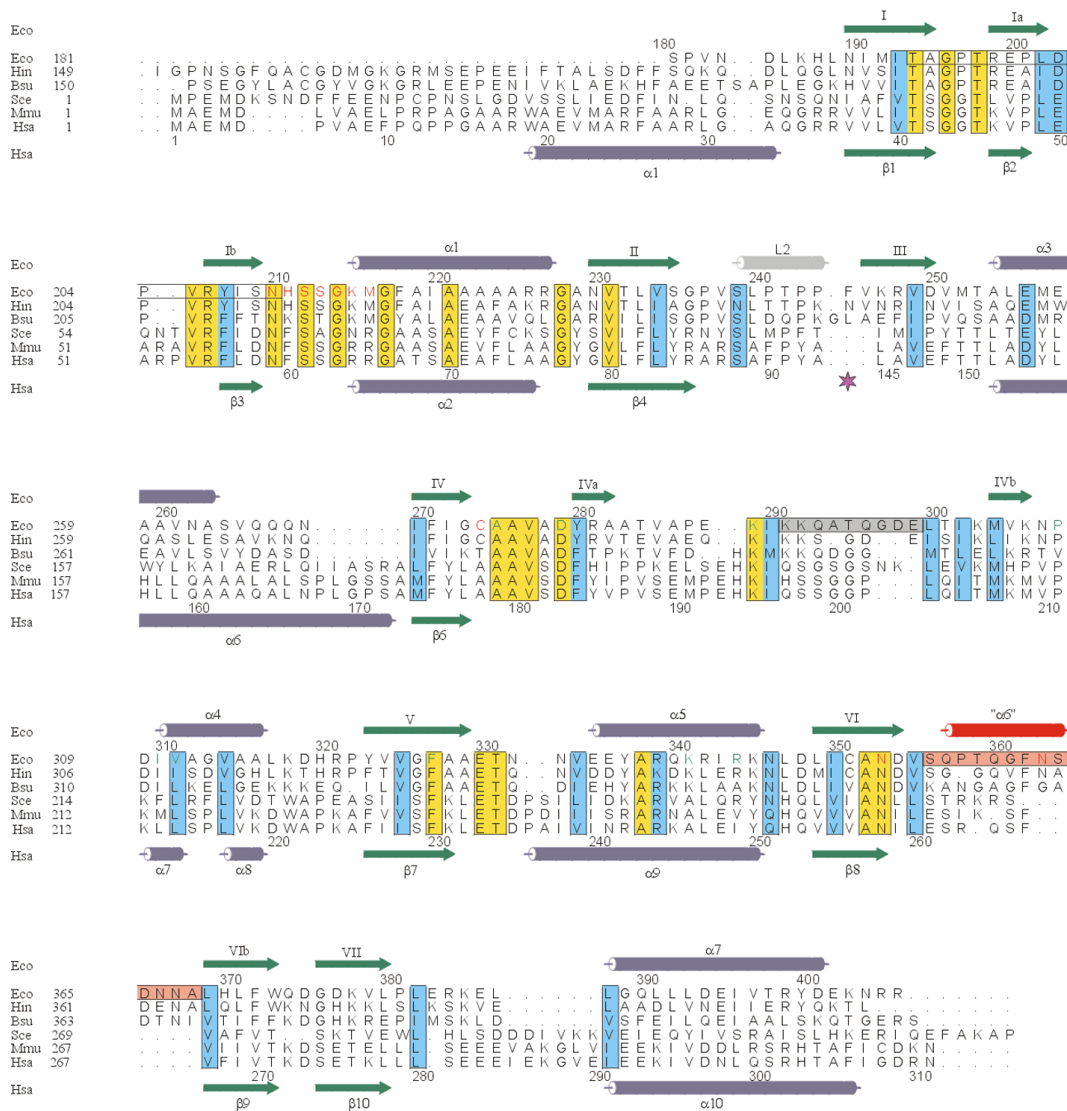


Abbildung 4.17: Struktur basiertes Sequenzalignment der *E. coli* (Eco), *Haemophilus influenzae* (Hin), *Bacillus subtilis* (Bsu), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Maus* (Mmu) und *Mensch* (Hsa) CoaB Enzyme. Streng konservierte Reste sind gelb, konservative Austausche sind hellblau hinterlegt. Die Sekundärstrukturelemente des ecCoaB sind oberhalb der Sequenzen zu finden, die des humanen Enzyms befinden sich unterhalb des Alignments. Die Substratbindungskammern und die Reste, die in die Substratbindung involviert sind, sind rot gekennzeichnet. Der ungeordnete *Loop* (Lys291/Lys292 bis Glu299), der den Eingang ins aktive Zentrum kontrolliert, ist grau hinterlegt. Der Stern kennzeichnet die Insertion im humanen Enzym, die die zweite Dimerisierungsdomäne bildet.

Konservierte Sequenzmotive

Der Sequenzvergleich (Abbildung 4.17) der bakteriellen CoaB-Proteine zeigt vier Sequenzmotive, die an der Substratbindung beteiligt sind. Zwei sind primär in die CTP-Bindung involviert: Das Nukleotid-Bindungsmotiv I besteht aus den Aminosäuren Ala275-Ala-Val-Ala-Asp- X_9 -Lys289- X -Lys-Lys. Ala275-Ala sind in der Nähe der Acyl-Phosphat-Bindung und der Ribose zu finden; die Seitenkette von Val277 unterstützt die Nukleobase und Asp279 koordiniert das zweiwertige Metallion, das an das CTP bindet. Neun Aminosäuren weiter, die in der Dimerisierungsdomäne lokalisiert sind, folgt Lys289 im Motiv, das weitere Kontakte zur Phosphatgruppe des CTP oder Acyl-Intermediates in der benachbarten Untereinheit ausbildet.

Die Nukleobasen-Bindungsstelle wird durch das Nukleotid-Bindungsmotiv II vervollständigt, das weniger gut konservierte Aminosäuren beinhaltet. Darin und durch die Art, wie spezifische Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Proteinhauptkette und dem Nukleobasenrest ausgebildet werden, liegt der Unterschied für die Spezifität zwischen ATP und CTP. In ecCoaB beinhaltet dieses Motiv die Aminosäuren Asn307-Pro-Asp-Ile-Val. Überraschender Weise ist Asp309, das sich auf der direkten Seite der Base gegenüber von Val277 befindet, strikt konserviert, obwohl die Seitenkette nicht an spezifischen Kontakten außer an einem Netzwerk aus positiv und negativ geladenen Aminosäureresten beteiligt ist. Das Nukleotid-Bindungsmotiv II der eukaryotischen ATP-bindenden CoaB-Proteine unterscheidet sich von dem der bakteriellen. Im humanen Enzym lautet die Sequenz Val210-Pro-Lys-Leu-Leu; mit den streng konservierten Resten Pro211-Lys, die den klaren Unterschied in der CTP- und ATP-Abhängigkeit in CoaB-Proteinen ausmachen. Zwei weitere Motive partizipieren in der Bindung des 4'-Phosphopantothenoyl- und des Acyl-Phosphatrestes. Das PhosphoPantothanat-Bindungsmotiv I mit den Aminosäuren Asn210-His-Ser-Ser-Gly-Lys beinhaltet Asn210, einen Rest, der in der Nähe der zu spaltenden Acyl-Phosphat-Bindung zu finden und möglicher Weise an der Cystein-Bindung beteiligt ist. Die Seitenketten von His211 und Val355 verankern den Substratbindungs-*Flap* durch Kontakt zur Seitenkette von Phe362. Von Ser212 bis Lys215 bindet die Phosphatgruppe des 4'-Phosphopantothenoyl-Restes. Das PhosphoPantothanat-Bindungsmotiv II beinhaltet die Reste Gly326-Phe-Ala-Ala. Gly326-Phe binden den β -Alanin Teil des Pantothens und Ala328-Ala bilden

die Bindungsstelle des Acyl-Phosphat-Restes.

Der Substratbindungs-*Flap* („H6“, rot gekennzeichnet in Abbildung 4.17) ist nicht sehr konserviert, weder in seiner Länge noch in seiner Sequenz. Interaktionen mit dem 4'-Phosphopantothenoyle-Rest werden hauptsächlich über Hauptkettenatome vollzogen.

4.1.3 Diskussion

Mechanistische Vergleiche mit der Pantothentat Synthetase

Sowohl die Phosphopantothenoylecystein- als auch die Pantothentat Synthetase fügen eine Peptidbindung in Coenzym A ein. Ebenso wie die Kondensation einer Carbonsäure und eines Amins freie Energie verbraucht, so benötigt die Knüpfung einer Peptidbindung eine chemische Aktivierung ihrer Komponenten. Diese Aktivierung ist mit der Hydrolyse einer Nukleosidtriphosphatverbindung verbunden. Beide Enzyme unterliegen einem Mechanismus, der auch für die Aktivierung der Aminosäuren bei ribosomalen (Übersicht in Ibba and Soll, 2000) und nichtribosomalen (Übersicht in Cane *et al.*, 1998), (Schwarzer *et al.*, 2002) Biosynthesen verwendet wird: Im ersten Schritt bilden all diese Enzyme ein aktiviertes (Amino-)Acyl-AMP Intermediat. Eine Ausnahme stellt die bakterielle Phosphopantothenoylecystein Synthetase dar, die ein Acyl-Cytidylat-Intermediat ausbildet.

Die kristallographischen Momentaufnahmen, die in dieser Arbeit präsentiert werden, erlauben eine detaillierte Beschreibung der Reaktion der PPC Synthetase und einen Vergleich mit der Reaktion der Pantothentat Synthetase. Im ersten Reaktionsschritt bindet CTP über ein zweiwertiges Metallion an das Enzym (Abbildung 4.14A). Es bleibt unklar, ob 4'-Phosphopantothensäure unabhängig von CTP an das Enzym binden kann. Jedenfalls muss die 4'-Phosphopantothensäure ideal für einen linearen Angriff der Carbonylgruppe auf die α -Phosphatgruppe des CTP positioniert werden, wobei die Diphosphatgruppe als Abgangsgruppe fungiert. Das Intermediat Phosphopantothenoyle-CMP ist fest an das Enzym gebunden und sehr gut definiert (Abbildung 4.14B). Die Bindung von Cystein an ecCoaB kann erst nach der Entstehung des Intermediates gezeigt werden. Zusammen mit Phe362 aus der sonst flexiblen Substratbindungsklammer trägt es einen wichtigen Teil zu ei-

ner kleinen Stelle am aktiven Zentrum bei, die in der Nähe der zu spaltenden Acyl-Phosphat-Bindung liegt und als potentielle Substatbindungsstelle für Cystein dient. Dieses Modell wird durch die Tatsache bestätigt, dass nach dem *Soaken* der Intermediat komplexierten Kristalle mit hohen Konzentrationen an Cystein keine Elektronendichte für Cystein in dem Produkt-Komplex beobachtet werden konnte (Abbildung 4.14C). Dieser Komplex zeigt, dass die Affinität des Produkts, 4'-Phosphopantothenoilcystein an das Enzym zu binden, signifikant geringer ist und so nur Elektronendichte für die Phosphatgruppe beobachtet werden konnte.

Eine ähnliche Reaktionskaskade wurde bei der Pantothanat Synthetase (Zheng and Blanchard, 2001) und (Wang and Eisenberg, 2003) beobachtet. Pantothanat Synthetase katalysiert die ATP-abhängige Kondensation von Pantoinsäure und β -Alanin in einer zweistufigen Reaktion, die einem „Bi Uni Uni Ping Pong“ Mechanismus folgt. Im ersten Schritt bindet ATP an das Enzym, gefolgt von Pantoinsäure und dem Austritt einer Pyrophosphatgruppe. Im darauf folgenden Schritt bindet β -Alanin an das entstandene Pantoyl-Adenylat, wobei Pantothensäure und AMP gebildet werden. Die Kristallstruktur der mit dem Reaktionintermediat Pantoyl-Adenylat komplexierten Pantothanat Synthetase gibt Aufschlüsse, wie eine Peptidbindung durch Pantothanat Synthetase geknüpft wird. In diesem Enzym wird die Substatbindung durch eine partiell flexible Region des aktiven Zentrums vermittelt, die das Carbonylsauerstoffatom der Pantoinsäure in die Nähe des α -Phosphoratoms des ATP für den linearen nukleophilen Angriff bringt. Ähnlich wie in *ecCoaB* ist das Acyl-Intermediat, wenn es an das Enzym gebunden ist, recht stabil. Die Bindung von β -Alanin kann nur nach der Bildung des Pantoyl-Adenyl-Intermediates im aktiven Zentrum beobachtet werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Knüpfung der Peptidbindungen in Coenzym A durch die Enzyme Phosphopantothenoilcystein und Pantothanat Synthetase auf sehr ähnlichen mechanistischen Grundlagen beruhen.

Vergleich PPC Synthetasen aus *E. coli* und Mensch

Mit der PPC Synthetase aus *E. coli*, die hier in dieser Arbeit analysiert wurde und der schon früher bestimmten Struktur des humanen Enzyms (Manoj *et al.*, 2003) sind zwei Vertreter unterschiedlicher Klassen repräsentiert. Ein Vergleich dieser bei-

den Prototypen zeigt, dass wichtige strukturelle Eigenschaften in beiden Klassen konserviert sind. Die Dimere aus den unterschiedlichen Kristallen, die das ecCoaB ausbildet, sind identisch mit dem des humanen CoaB. Die Sekundärstruktur Zuordnung (Assignment) und die Sequenzüberlagerung (Alignment) des *E. coli* mit dem humanen CoaB ist in Abbildung 4.17 zu sehen.

Diese Ausbildung der identischen Dimere ist für beide Enzyme essentiell. Dies war nicht vorauszusehen, wenn man den unterschiedlichen oligomeren Zustand des Dfp und den des humanen CoaB beachtet. Die Dimerisierung erfolgt in beiden Enzymen im Wesentlichen durch eine Dimerisierungsdomäne, die von beiden Monomeren gemeinsam gebildet wird. Diese Dimerisierungsdomäne besteht aus einem viersträngigen antiparallelen β -Faltblatt, das von einer Insertion im $\beta\alpha$ -Module 1 (human: Lys46 bis Asp58; *E. coli*: Thr198 bis Asn210) gebildet wird und einem antiparallelen zweisträngigen β -Faltblatt, welches sich oberhalb des viersträngigen β -Faltblatts befindet und von einer Insertion im $\beta\alpha$ -Module 4 (human: Asp183 bis Val210; *E. coli*: Ala278 bis Lys306) gebildet wird. Eine Überlagerung der beiden Enzyme ist in Abbildung 4.18 zu sehen.

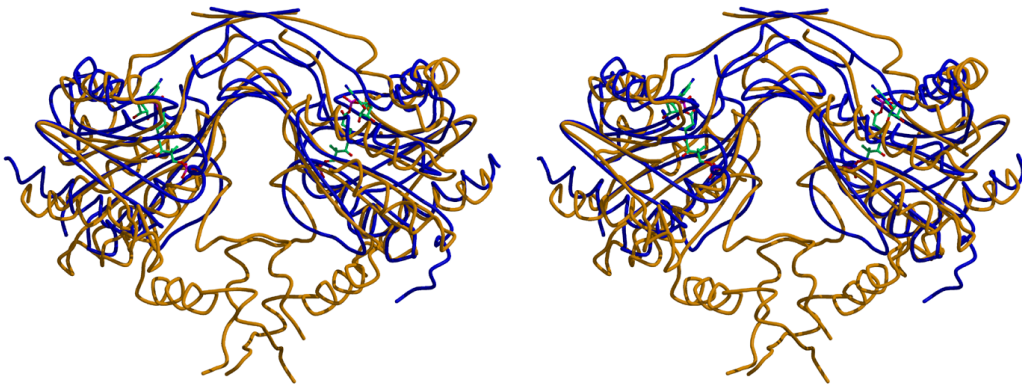


Abbildung 4.18: Überlagerung des humanen (gold) und *E. coli* (blau) CoaB. Das humane CoaB Enzym ist ein monofunktionales Dimer, das eine zusätzliche Dimerisierungsdomäne besitzt. Das Acyl-Intermediat ist grün dargestellt.

In beiden Strukturen erstreckt sich dieses zweisträngige β -Faltblatt bis in die benachbarte Untereinheit und befindet sich dort als teilweise untergeordneter *Loop* in

der Nähe des Eingangs zum aktiven Zentrum: die letzten geordneten Reste dieses *Loops* im humanen Enzym sind Met191 bis Leu 203, in *E. coli* Ile290 bis Glu 299. Vermutlich kontrolliert diese Region den Zugang des Cysteins zum Acyl-Cytidylat-Intermediat.

Das monofunktionale eukaryotische CoaB Enzym beinhaltet eine weitere Dimerisierungsdomäne, die im bakteriellen Enzym nicht vorhanden ist. Diesen signifikanten Unterschied repräsentiert eine Insertion zwischen Ala93 und Gly142 im $\beta\alpha$ -Module 2 der humanen PPC Synthetase. Diese besteht aus zwei α -helikalen Segmenten und einer β -Haarnadelschleife. Diese Module ähneln im Dimer zwei Händen, die ineinander greifen und so durch die Ausbildung intensiver Kontakte die Stabilität des Dimers steigern. Diese Kontakte sind im Dfp-Protein nicht nötig, da hier jedes Monomer an seinem N-Terminus kovalent mit der PPC Decarboxylase verankert ist. Abbildung 4.19 zeigt links die Anordnung, wie CoaB und CoaC im difunktionellen Dfp-Protein verknüpft sind und rechts die Implikationen, die diese Anordnung für das dodecamere Dfp hat.

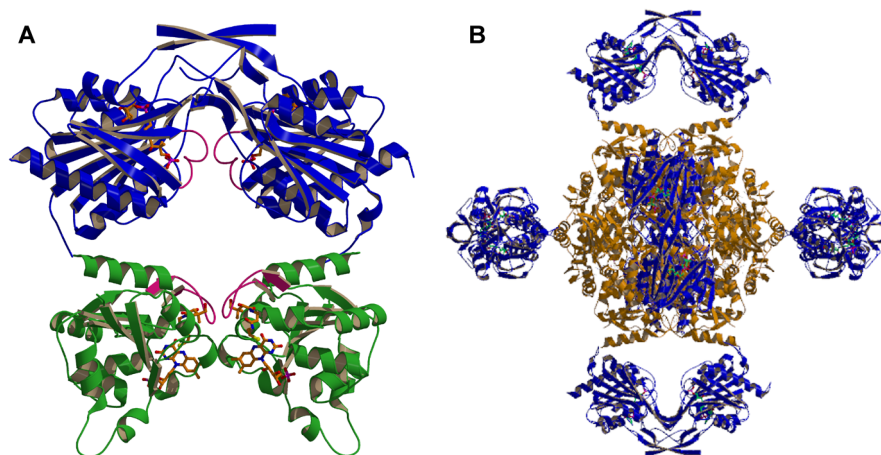


Abbildung 4.19: Verknüpfung zwischen CoaB (blau) und CoaC (grün) im kompletten Dfp-Protein: (A) Die N-Termini des CoaB sind kovalent mit der PPC Decarboxylase verankert. Der Substratbindungs-*Flap* ist pink dargestellt. (B) Anordnung der PPC Synthetase (blau) und Decarboxylase (gold) im dodecameren Dfp-Protein.

Ein weiterer Unterschied zwischen dem humanen und dem ecCoaB ist eine α -Helix im humanen Enzym, die $\beta 1$ vorangeht und gegen $\beta 2$ und $\beta 3$ packt. Das zentrale achtsträngige β -Faltblatt beider Enzyme überlagert hervorragend, wie Abbildung 4.18 zeigt, ebenso wie die Phosphat-Bindungsstelle, die in der humanen PPC Syn-

thetase durch die Aminosäuren Phe60-Ser-Ser-Gly-Arg-Arg-Gly und im *E. coli* Enzym durch His211-Ser-Ser-Gly-Lys-Met-Gly gebildet wird.

Es gibt überzeugende Belege, dass beide Enzyme ihre Substrate auf dieselbe Weise binden und auch denselben enzymatischen Mechanismus befolgen: Es wurde gezeigt, dass die Phosphat-Bindungsstelle der PPC Synthetasen denen der Mitglieder der Ribokinase Familie entspricht (Manoj *et al.*, 2003). In der humanen PPC Synthetase Struktur wurde in dieser Phosphat-Bindungsstelle ein Sulfation gefunden, das nur 1 Å von dem Phosphatrest der 4'-Phosphopantothenoyleinheit des Acyl-Intermediates in der *E. coli* Struktur entfernt ist. Ealick und seine Mitarbeiter modellierten an diese Stelle eine Phosphatgruppe des ATP (Manoj *et al.*, 2003). Dies steht in eindeutigem Gegensatz zu dem experimentell ermittelten Substratbindungsmodus, der in der Struktur des ecCoaB gefunden wurde. Modelliert man ein Acyl-Intermediat in die Struktur der humanen PPC Synthetase genauso wie es im *E. coli* Enzym vorliegt, findet man nur sinnvolle Interaktionen des Intermediates oft mit konservierten Resten wie z.B. mit Phe327 (*E. coli*/ Phe230 (Human) (Abbildungen 4.18 und 4.20). Der konservierte Rest Asp279 (*E. coli*/ Asp183 (Human), der an das zweiwertige Metall bindet, deutet darauf hin, dass beide Enzyme ihre Substrate auf die gleiche Art und Weise binden und denselben enzymatischen Mechanismus grundlegend teilen.

Wie schon zuvor erwähnt, verwendet das humane Enzym ATP als aktivierendes Nukleotid, während das bakterielle Enzym CTP umsetzt. Die unterschiedliche Nukleotidabhängigkeit kann nun auf struktureller Basis erklärt werden (Abbildung 4.20): Beide Enzyme unterscheiden sich signifikant in diesem Basen-interagierenden Teil ihrer Nukleotid-Bindungstasche. Wenngleich im ecCoaB einige konformelle Änderungen beobachtet wurden, besonders die Ordnung von Bindungs-*Loops* durch Substratbindung, so ist die Nukleotid-Bindungstasche doch völlig starr.

Obwohl der hydrophobe Rest des β -Strangs IVa (Val277 in ecCoaB, Val181 im humanen CoaB), die eine Seite des Nukleotidrests unterstützt und auch die Position des metallbindenden Aspartat (Asp279 in ecCoaB, Asp183 im humanen CoaB) im β -Strang IVa konserviert ist, weichen die α -Helix $\alpha 5$ und der voraus gehende Verbindungsloop zum β -Strang IVb (Lys306 bis Ala312 in ecCoaB, Met209 bis Pro216 im humanen CoaB) in beiden Strukturen deutlich von einander ab. Diese Region stellt Wasserstoffbrücken-Bindungen zur Verfügung und zeigt eine strenge Formhaltung

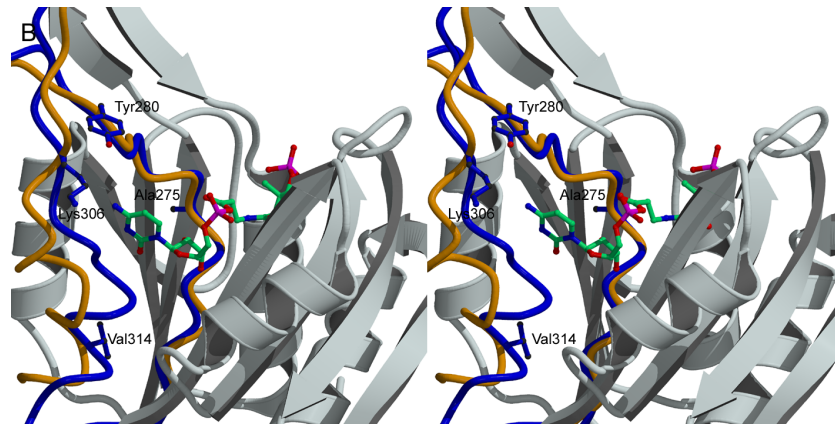


Abbildung 4.20: Vergleich der Nucleobindungstaschen des humanen (gold) und des ecCoaB (blau). Das gebundene 4'-Phosphopantothonyl-CMP-Intermediat ist grün dargestellt. Die größere Bindungstasche des humanen Enzyms ist befähigt die größere Adenosyl-Einheit anstelle des Cytidyl-Restes zu binden.

jeweils für die Basen Adenin und Cytosin. Im humanen Enzym ist diese Region nach außen verzogen, wodurch die Nukleotid-Bindungstasche vergrößert wird. Wird ein Adenosylrest in diese Tasche modelliert, findet man bevorzugte Wechselwirkungen ohne nennenswerte sterische Konflikte (siehe Abbildung 4.20).

Dennoch sollte bemerkt werden, dass die Region um Ser215 in der humanen Struktur deutlich höhere Temperaturfaktoren von ca. 70 Å im Vergleich mit den durchschnittlichen Temperaturfaktoren des Proteins von ca. 43 Å aufweist, was eventuell auf Flexibilität hinweist.

Die 4'-Phosphopantothonyl-Einheit wird von einem sehr großen Loop (Asp354 bis Asn367) umschlossen, der die β -Stränge $\beta 6$ und $\beta 6b$ verbindet und teilweise an eine langgezogene α -Helix erinnert. Im humanen Enzym ist dieser Loop sieben Aminosäurereste kürzer (Ile259 bis Ser265) und entsprechend dem ecCoaB in Substratabwesenheit ebenfalls komplett ungeordnet. Ein kürzerer Loop könnte Substrate in einer gestreckteren Art und Weise umschließen, wie es für die flexible Substratbindungskammern in EpiD (Blaesse *et al.*, 2000) oder AtHAL3 (Steinbacher *et al.*, 2003) beobachtet wurde.

Es weist vieles daraufhin, dass die PPC Synthetasen aus *E. coli* und Mensch sowohl denselben Substratbindungsmodus als auch denselben enzymatischen Mechanismus für die Metall-aktivierende Reaktion von CTP bzw. ATP mit 4'-Phosphopantothensäure teilen.

4.2 Röntgenstrukturanalyse des Co-Chaperons Cns1 218-C

4.2.1 Kristallisation

Das gereinigte Cns1 218-C aus *Saccharomyces cerevisiae* (Hainzl *et al.*, 2004), das freundlicher Weise von Dipl. Biologe Otmar Hainzl vom Lehrstuhl für Biotechnologie (Prof. Johannes Buchner) an der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt wurde, wurde mit einer Konzentration von 13 mg/ml in 40 mM Hepes pH 7,5 und 300 mM KCl in *sitting drop* Kristallisationsexperimenten eingesetzt. Dafür wurden 2 μ l des Proteins mit 2 μ l Präzipitanzlösung versetzt und gegen 300 μ l Bodenpuffer derselben Bedingung bei 20°C äquilibriert. Es wurden die Hampton-Screens Index und Cryo verwendet. Schon nach wenigen Stunden wuchsen aus zehn Bedingungen Kristalle verschiedener Größen, die teilweise zu Verwachsungen neigten. Tabelle 4.3 zeigt die Bedingungen, die röntgentaugliche Kristalle ergaben.

Salz	Puffer	Präzipitanz	Index Bedingung
0.05 M MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.1 M HEPES pH 7.5	30% PEG-Monomethylether 550	55
0.2 M Trimethylamine N-oxid·2H ₂ O	0.1 M Tris/HCl pH 7.5	20% PEG-Monomethylether 2000	62
0.2 M NaCl	0.1 M Tris/HCl pH 8.5	25% PEG 3350	73
0.2 M MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.1 M Bis-Tris pH 6.5	25% PEG 3350	83

Tabelle 4.3: Kristallisationsbedingungen des Cns1 218-C aus *S. cerevisiae*

Röntgentaugliche Kristalle aus Bedingung 62 mit einer Größe von 500 x 100 x 100 μ m³; ein entsprechendes Diffraktionsbild sind in Abbildung 4.21 gezeigt.

4.2.2 Datensammlung und Strukturlösung

Da die Kristalle des Cns1 218-C aus *S. cerevisiae* nicht aus Cryo-Bedingungen wuchsen, mussten sie zur Datensammlung unter Cryo-Bedingungen (100 K) in einen

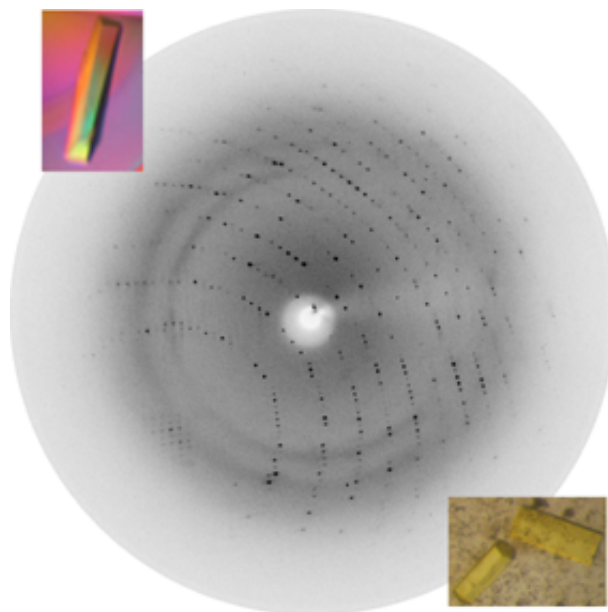


Abbildung 4.21: Typische Kristalle sowie ein Diffraktionsbild (maximale Auflösung 2.3 Å, Rotation 0,5°, Wellenlänge $\lambda = 1.5418$ Å) des Cns1 218-C aus *S. cerevisiae*

Tropfen aus Mutterlauge mit 20% PEG 600 überführt werden. Die Indizierung zeigte eine orthorhombische Gittermetrik mit den Gitterkonstanten $a = 44.7$ Å, $b = 81.0$ Å, $c = 100.3$ Å und $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. Die Analyse der Matthews-Parameter (Matthews, 1968) ergab für zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheit einen Matthews-Koeffizient von 2.23 Å³/Da, entsprechend einem Solvenzgehalt von 45%. Die Verfeinerung der Zellparameter und die Integration der Daten erfolgte mit dem HKL-Programmpaket DENZO und SCALEPACK (Otwinowski and Minor, 1997). Systematische Auslöschungen entlang der Serien $h00$, $0k0$ und $00l$ legten die Raumgruppe **P2₁2₁2₁** nahe. Tabelle 4.4 zeigt die Ergebnisse der Datenprozessierung der Cns1 218-C Kristalle.

Da bisher keine homologe Kristallstruktur des Cns1 218-C bekannt ist, wurde zunächst versucht, die Struktur mittels Multiplem Isomorphem Ersatz (MIR) zu lösen. Dabei wurden die Kristalle des Cns1 218-C mit unterschiedlichen Schwermetallverbindungen wie z.B. Quecksilber(II)acetat ((CH₃COO)₂Hg), Thiomersal (C₉H₉HgNaO₂S), 2,6-Biscloromercury-4-nitrophenol, Kaliumtetrachloroplatinat(II)(K₂PtCl₄) und variierenden Zeiten von 2 bis 48 Stunden *gesoaked*. Kristalle, die in einer 5 mM 2,6-Biscloromercury-4-nitrophenol-

	Se(<i>Peak</i>)	<i>Inflection point</i>	<i>High energy remote</i>
Wellenlänge (Å)	0.9792	0.9796	0.950
Auflösungs- bereich (Å)	20-2.0 (2.06-1.99)	20-2.0 (2.06-1.99)	20-2.0 (2.07-1.99)
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellkonstanten (Å)	a=44,4 b=80,6 c=98,4	a=44,5 b=80,7 c=98,5	a=44,5 b=80,7 c=98,6
Unabhängige Reflexe	25052	25080	27452
Multiplizität	6,8	6,9	6,5
Vollständigkeit(%)	99,3 (96,5)	97,4 (97,5)	99,2 (97,5)
I/ σ (I)	26,7 (6,4)	26,8 (6,0)	24,6 (4,3)
R _{merge} ^a (%)	7,8 (17,9)	7,3 (18,0)	7,3 (18,6)
R _{Cullis} ^b	0,85	-	0,79
R _{Cullis} (ano) ^c	0,68	-	0.74
Phasing Power ^d	0,93	-	1,2

^a $R_{merge} = \sum_{hkl} [(\sum_i |I_i - \langle I \rangle|) / \sum_i I_i]$.

^b R_{Cullis} =r.m.s. lack of closure/r.m.s. isomorphe Differenzen.

^c R_{Cullis} (ano)=r.m.s. lack of closure/r.m.s. anomale Differenzen.

^d Phasing power $\langle |F_H| \rangle$ /r.m.s. lack of closure.

Werte für die äußerste Auflösungsschale sind in Klammern angegeben.

Tabelle 4.4: Datensammlung und Prozessierungsstatistiken des Selen- und des nativen Cns1 218-C Datensatzes

Lösung 2 Stunden eingelegt waren, sind in Abbildung 4.21 unten zu sehen.

Die Datensätze der verschiedenen Derivate wurden sowohl unter Cryobedingungen bei 100 K als auch bei Raumtemperatur aufgenommen. Dabei wurde festgestellt, dass die Kristalle nicht-isomorph sind.

Deshalb wurde der Ansatz der Multiplen Anomalen Dispersion (MAD) verfolgt und die Struktur des Cns1 218-C durch MAD an einem Selenomethionin-Derivat-Kristall bestimmt. Die Messungen erfolgten am DESY in Hamburg. Die Datenprozessierung erfolgte mit dem HKL-Programmpaket DENZO und SCALEPACK (Otwinowski and Minor, 1997). Die fünf Selenatompositionen wurden mit dem Programm SHELXS (Sheldrick *et al.*, 1993) identifiziert und die Schweratomparameter mit dem

Programm MLPHARE (Otwinowski and Minor, 1997) verfeinert. Die Berechnung der Phasen erfolgte in einem Auflösungsbereich von 20 bis 2.0 Å.

Tabelle 4.4 zeigt die Ergebnisse der Datenprozessierung und Phasierungsstatistik der Datensätze des Cns1 218-C Selenomethionin-Kristalls. Der Datensatz, der bei der Wellenlänge des *inflection point* aufgenommen wurde, dient als nativer Datensatz.

4.2.3 Modellbau, Verfeinerung und Qualität des Atommodells

Die exzellente Qualität der gemessenen Daten bis zu einer Auflösung von 2.0 Å ermöglichte bereits im ersten Zyklus des manuellen Modellbaus den Einbau von über 90% der insgesamt 356 Aminosäuren der zwei Moleküle des Cns1 218-C aus *S. cerevisiae* in der asymmetrischen Einheit unter der Verwendung des Programmes MAIN (Turk, 1992). Anschließend wurde eine *rigid body* Minimierung und ein *simulated annealing* bei 2000K durchgeführt und mit dem Programm CNS unter Verwendung des *maximum-likelihood* Algorithmus (Brünger, 1992) verfeinert. In iterativen Zyklen von Modellbau, Einbau von Wassermolekülen und Verfeinerung des Atommodells, gefolgt von einer abschließenden individuellen B-Faktorverfeinerung, konvergierte der kristallographische R-Faktor bei 18.8% ($R_{free} = 24.7\%$).

Zu Beginn der Verfeinerung war der *Loop* zwischen Pro302 und Gly310 vollkommen ungeordnet, im Laufe der Verfeinerung konnte aber zumindest die Proteinhauptkette in die Elektronendichte gebaut werden. Für den Aminosäurerest Phe306 war die Elektronendichte schon zu Beginn der Verfeinerung sehr gut definiert und so konnte von diesem Rest ausgehend der *Loop* gebaut werden. Das Monomer A des finalen, verfeinerten Atommodells des Cns1 218-C aus *S. cerevisiae* enthält alle der 178 Aminosäurereste, während in Monomer B die Elektronendichte der ersten zwei Aminosäuren des N-Terminus nicht definiert sind und es somit 176 Rest beinhaltet. Die Qualität des verfeinerten Atommodells wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) beurteilt, in dem die Bindungsgeometrien der Proteinhauptkette des Cna1-218C überprüft wurde. Dabei ergab sich, dass sich 94,2% aller Aminosäure (Glycin und Prolin ausgenommen) in den am meisten bevorzugten Bereichen befinden, während 5,8% in zusätzlich erlaubten Bereichen liegen. Keine Aminosäure zeigt eine Bindungsgeometrie, die in den weitläufig erlaubten oder

verbotenen Bereich der Ramachandran-Statistik (Ramachandran and Sasisekharan, 1968) fallen würde. Die Verfeinerungsstatistik ist in Tabelle 4.5 gezeigt.

	Cns1 218-C
Auflösungsbereich (Å)	20-2.0
Reflexe im <i>working set</i>	23130 95,0%
Reflexe im <i>test set</i>	1177 4,8%
R_{cryst}^a (%)	18.8
R_{free}^b (%)	24.7
Anzahl Proteinatome (ohne H)	2719
Anzahl Solvenzatome (ohne H)	338
r.m.s.-Abweichungen vom Idealwert der Bindungslängen (Å)	1,16
Bindungswinkel (°)	0,011
(ϕ, ψ) -Winkel Verteilung im bevorzugten Bereich (%)	94,2
zusätzlich erlaubten Bereich (%)	5,8

$${}^a R_{\text{Faktor}} = \frac{\sum_{hkl \subset W} ||F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}||}{\sum_{hkl \subset W} |F_{\text{obs}}|}$$

$${}^b R_{\text{free}} = \frac{\sum_{hkl \subset T} ||F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}||}{\sum_{hkl \subset T} |F_{\text{obs}}|}$$

Tabelle 4.5: Verfeinerungsstatistik

4.2.4 Strukturbeschreibung und Diskussion

Die aus 178 Aminosäuren bestehende Primärstruktur des Cns1 218-C aus *S. cerevisiae* ordnet sich zu einer Sekundärstrukturabfolge der Topologie H1, S1, S2, S3, S4, H2, S5, H3, H4, S6, H5, S7, H6, H7, S8, S9, H8, H9. Bis auf α -Helix H1 packen alle Helices gegen ein zentrales fünfsträngiges β -Faltblattmotiv, das aus den Faltblattsträngen S4, S5, S6, S7 und S9 gebildet wird (siehe Abbildung 4.22). Die Elektronendichte der α -Helix H1, die den N-Terminus bildet, ist sehr gut definiert, obwohl sie aus dem kompakten Kernbereich des Proteins in das Solvenz ragt.

Ein Bereich von 9 Aminosäuren (Pro302 bis Gly310) (in Abbildung 4.22 rot dargestellt) liegt als beweglicher *Loop* vor. Die Elektronendichte des in diesem *Loop* befindlichen Phenylalanins 306 ist gut definiert und fixiert als eine Art Anker diesen

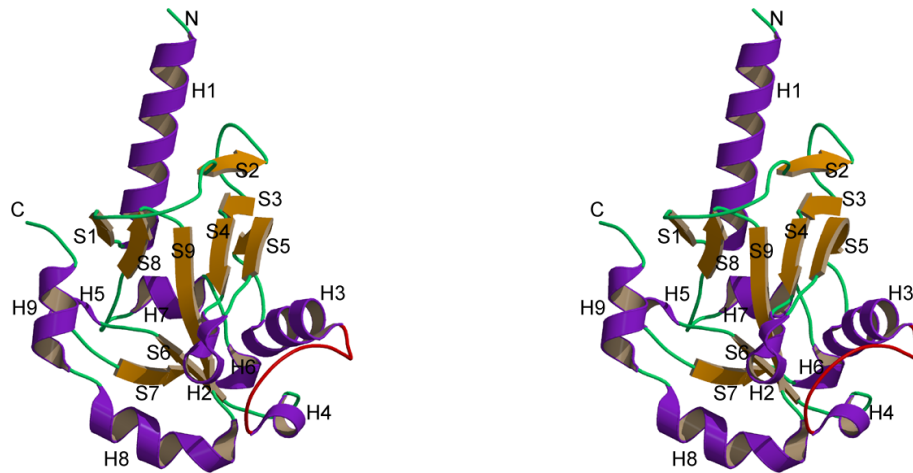


Abbildung 4.22: Stereodarstellung der Kristallstruktur des Cns1 218-C aus *S. cerevisiae*. β -Faltblattstrukturen sind orange, Helix-Motive sind lila und der flexible Loop von 9 Aminosäuren (Pro302 bis Gly310) ist rot dargestellt

Loop am hydrophoben Kern des Proteins. Weitere Loops, die die Helix H3 und den β -Strang S6, die Stränge S6 und S7 sowie β -Strang S7 und die Helix H4 verbinden, enthalten die kurzen helikalen Segmente H4 (Gly310-Phe314), H5 (Thr325-Gly328) und H6 (Gly334-Leu337). Eine kurze 3_{10} -Helix H2 (Met272-Asp277) liegt zwischen den Faltblattsträngen S4 und S5.

Der C-Terminus weist überwiegend helikale Elemente auf, wobei die Helices H8 und H9 am C-Terminus mit 12 bzw. 8 Aminosäureresten und einer Länge von 15 Å bzw. 10 Å in die Länge gezogen erscheinen.

Das Cns1 218-C Monomer besitzt eine Größe von etwa 53 x 30 x 29 Å. In der Kristallstruktur sind zwei Monomere des Cns1 218-C in der asymmetrischen Einheit gleich orientiert, was sich in einem Pseudoursprungspeak in der nativen Pattersonfunktion äußert.

Ein struktureller Vergleich des Cns1 218-C aus *S. cerevisiae*, der mit Hilfe des DALI-Algorithmus (Holm and Sander, 1993) durchgeführt wurde, ergab nur sehr begrenzte Ähnlichkeiten zu einer bereits bekannten Faltung. Die höchste Ähnlichkeit ($Z = 7,0\%$) ergab sich zum Ubiquitin ((Ramage *et al.*, 1994), PDB-ID:1UBI), allerdings sind nur 69 Aminosäuren zwischen den beiden Proteinen homolog, was 10% entspricht. Die höchste Sequenzhomologie der DALI-Suche weist mit 89 Aminosäuren (11%) und einer strukturellen Ähnlichkeit von $Z = 5,9\%$ eine Golgi-vermittelnde

ATPase ((Paz *et al.*, 2000), PDB-ID: 1EO6-A) auf. Dies weist daraufhin, dass es sich um einen neuen Faltungstyp handelt. Ein entsprechendes Topologie-Diagramm ist in Abbildung 4.23 gezeigt.

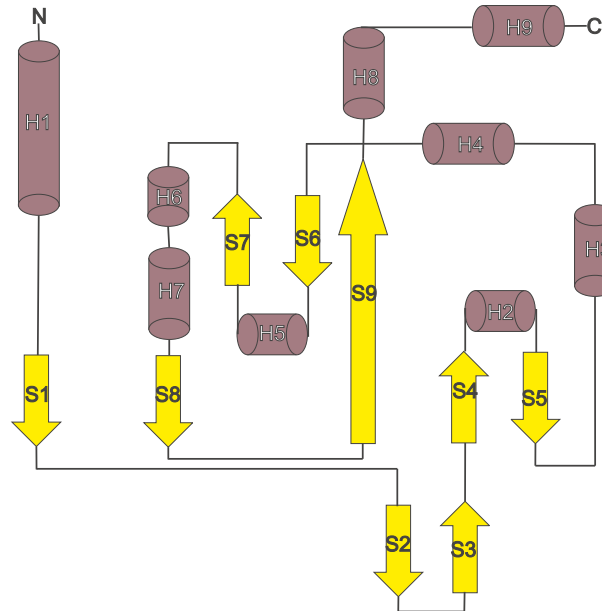


Abbildung 4.23: Topologiediagramm des Cns1 218-C aus *S. cerevisiae*

Ein Aminosäuresequenzvergleich der C-terminalen Domäne des Cns1 aus *S. cerevisiae* mit Cns-Proteinen aus anderen Organismen ist in Abbildung 4.24 gezeigt. Die Sequenzhomologien der einzelnen Sequenzen zum Cns1 218-C aus *S. cerevisiae* betragen 74 - 42%: Die Sekundärstrukturelemente des Cns1 218-C sind oberhalb des Alignments abgebildet und wurden mit Hilfe des Programms MOLAUTO (Kraulis, 1993) automatisch zugeordnet; die Nummerierung der Sequenz bezieht sich auf die des gesamten Cns1-Proteins.

Streng konservierte Aminosäurereste sind gelb, konservative Austausche hellblau dargestellt. Da sich fast alle streng konservierten Reste im hydrophoben Kern des Proteins befinden, kommt ihnen wahrscheinlich hauptsächlich eine strukturstabilisierende Funktion zu: Durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Seitenkette des konservierten Arg234, das sich in der α -Helix H1 befindet, und dem Carbonylkohlenstoff des Phe261 sowie zwischen der Seitenkette des ebenfalls konservierten Ser263 und dem Hauptkettenamid von Asp257 wird der *Loop*

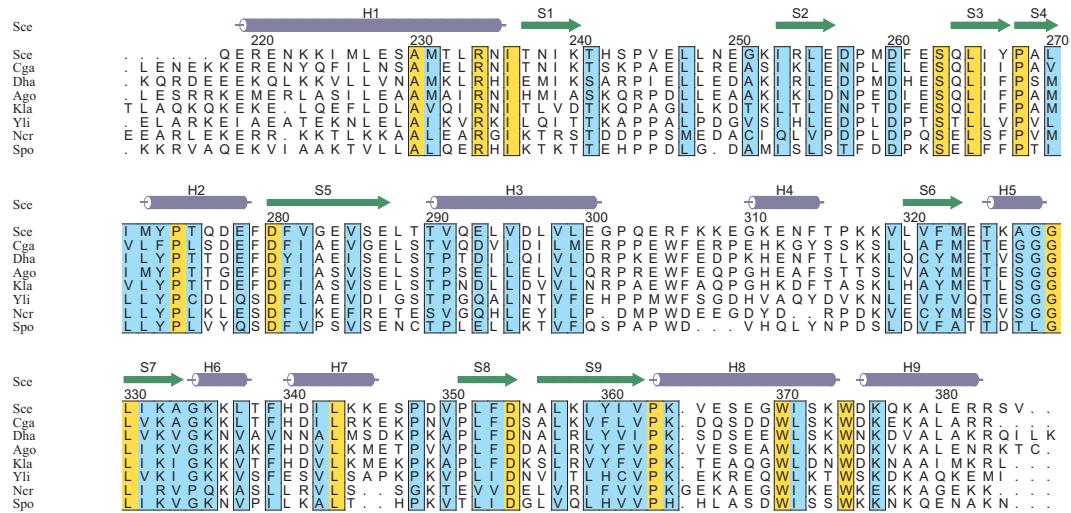


Abbildung 4.24: Struktur-basiertes Sequenzalignment des Cns1 218-C aus *S. cerevisiae* (Ser) mit Homologen Sequenzen aus *Candida glabrata* (Cga), *Debaryomyces hansenii* (Dha), *Ashbya gossypii* (Ago), *Kluyveromyces lactis* (Kla), *Yarrowia lipolytica* (Yli), *Neurospora crassa* (Ncr) und *S. pombe* (Spo). Streng konservierte Reste sind gelb, konservative Austausche hellblau hinterlegt. Die Sekundärstrukturelemente des Cns1 218-C aus *S. cerevisiae* sind oberhalb der Sequenzen zu finden.

zwischen den Strängen S2 und S3 fixiert. Weitere Wechselwirkungen finden zwischen dem Carbonylsauerstoff- und Amidstickstoffatom des konservierten Pro268 und Amidgruppe von Leu357 aus dem Strang S9 bzw. dem Carbonylsauerstoffatom von Ly252 aus dem S1 und S2 verbindenden *Loop* statt. Gly329 bildet sowohl Hauptketteninteraktionen als auch eine Wasserstoffbrückenbindung zur Seitenkette des Thr325 aus α -Helix H5 aus. Des Weiteren sind Wasserstoffbrücken zwischen den Hauptkettenatomen des streng konservierten Leu343 und Phe339 zu finden, was zu einer Stabilisierung des verbindenden *Loops* von H6 und H7 beiträgt.

Die Oberfläche des Cns1 218-C weist eine positiv geladene Vorder- und eine negativ geladene Rückseite auf. Während die Rückseite hauptsächlich eine glatte Oberfläche darstellt, ist die Vorderseite des Proteins von drei Vertiefungen gekennzeichnet, wie in Abbildung 4.25 oben gezeigt ist.

Am auffälligsten ist die Einbuchtung an der unteren Vorderseite des Moleküls, die von den Helices H8 und H9 des C-Terminus und dem zentralen fünfsträngigen β -Faltblattmotiv flankiert wird und eine Dimension von ca. 20 Å x 10 Å einnimmt. Die fünf hydrophoben Aminosäurereste Pro274, Phe322, Tyr360, Trp370 und Trp374

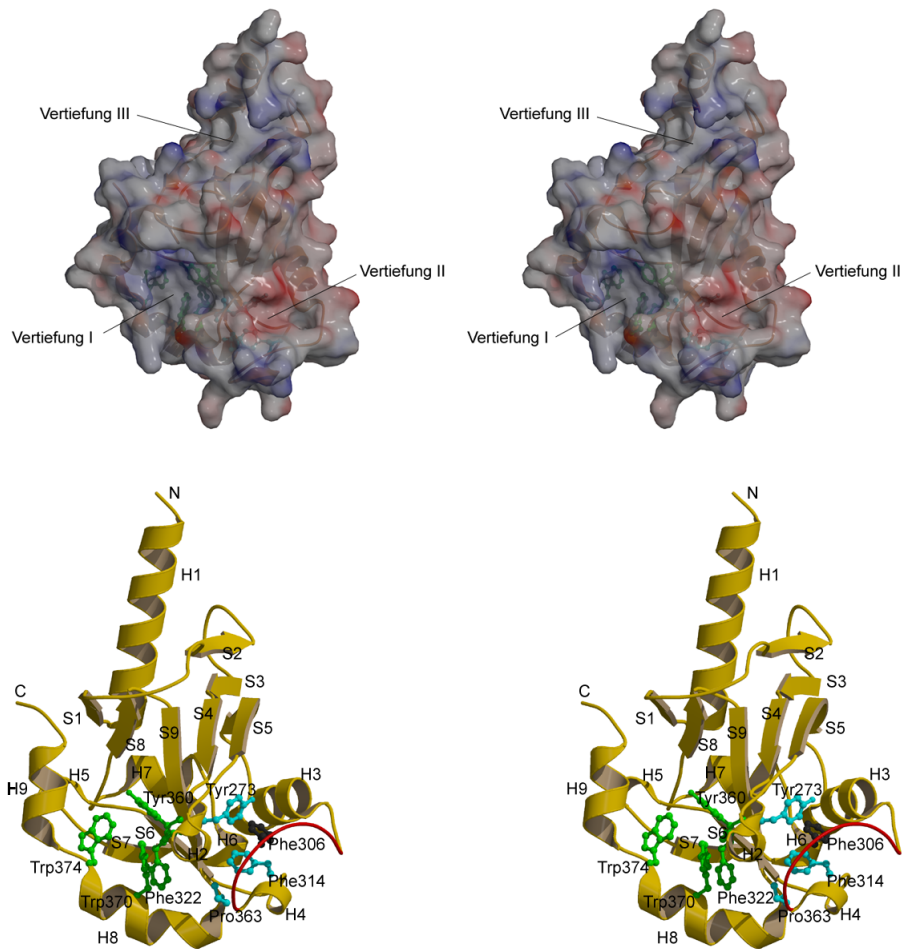


Abbildung 4.25: Oben: Oberflächenabbildung des Cns1 218-C aus *S. cerevisiae*: Es sind deutlich drei Vertiefungen auf der Oberfläche des Moleküls zu sehen (Kontourierung der Polarität der Oberfläche bei pH 7 von +25 kT/e (blau) bis -25 kT/e (rot)). Unten: Ribbon-Darstellung des Proteins. Die hydrophoben Reste, die die Vertiefung I bilden sind grün, die aus Vertiefung II türkis und Phe306 als Anker des flexiblen *Loops* schwarz dargestellt.

bilden diese trichterförmige Spalte, von denen Pro274, Trp370 und Trp374 streng konserviert sind und Phe322 konservativ ausgetauscht ist (siehe Abbildung 4.24). Die Oberseite dieses Trichters bildet der *Loop* zwischen den Strängen S1 und S2, dessen Elektronendichte sehr gut definiert ist. Die Seitenkette von His242 des β -Faltblattes S1 bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zum Carbonylsauerstoff von Glu381 der α -Helix H9 und fixiert somit den C-Terminus. Eine weitere Stabilisierung des C-Terminus kommt durch die Ausbildung einer Salzbrücke zwischen Glu324 und

Arg382 und Arg383 zustande. Zusätzlich können weitere Hauptketteninteraktionen zwischen His242 und Arg382 sowie Lys240 und Ser384 beobachtet werden.

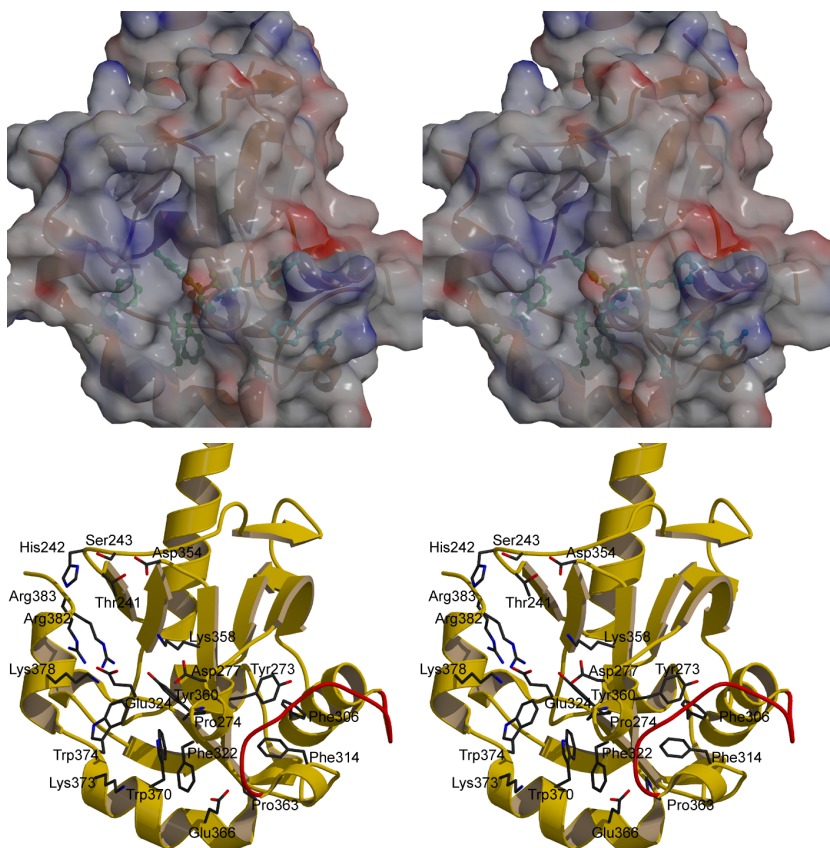


Abbildung 4.26: Zoom in Vertiefung I: Stereodarstellung der Oberfläche mit hydrophoben Aminosäureresten (oben, Kontourierung der Polarität siehe Abbildung 4.25) und den polaren Aminosäuren, die Vertiefung I flankieren (unten).

Auf der anderen Seite wird dieser nach vorne ragende *Loop* durch Ausbildung von van-der-Waals Kontakten zwischen Val245 und Phe279, Leu247 und Phe281 sowie Leu248 und Ala356 fixiert. So entsteht unterhalb des *Loops* eine kleine Kavität, die mit fünf Wassermolekülen gefüllt ist. Asp354, der sich dort befindet, ist ein strikt konservierter Aminosäurerest, an den eines dieser Wassermoleküle mit einem Abstand von 2.9 Å bindet, die übrigen Wassermoleküle befinden sich in einer Entfernung von ca. 4 Å.

Eine Reihe von polaren Aminosäureresten säumen die Flanken des Trichters: Arg383, Arg382, Lys278, Lys273, Glu366, Asp277, Tyr360, Lys358, Ser243, His242, Thr241 und Glu324, wie in Abbildung 4.26 unten zu erkennen ist. Die Dimension

dieser Spalte ist damit vereinbar, dass sie als Peptidbindungstasche dienen könnte, wie sie bei TPR-Domänen beobachtet werden (Scheuffler *et al.*, 2000) (siehe Abbildung 4.26 oben).

Eine weitere, wenn auch wesentlich kleinere Einwölbung, findet man in einem 45° Winkel zu dieser großen Einbuchtung. Diese zweite Vertiefung wird ebenfalls von hydrophoben Aminosäuren (Tyr273, Phe314 und Pro363) geformt (siehe Abbildung 4.25 oben). Wie Abbildung 4.24 zeigt, stellen Tyr273 und Phe314 in anderen Organismen konservativ ausgetauschte, hingegen Pro363 einen strikt konservierten Aminosäurerest dar. Der flexible *Loop* um Phe306 bildet einen Deckel für diese kleinere trichterförmige Vertiefung II, die einen Durchmesser von 8 Å aufweist. Die Trichterform und die Flexibilität des *Loops* deuten möglicher Weise auf eine weitere potentielle Peptidbindung hin.

Die dritte Furche befindet sich am N-Terminus des Cns1 218-C und wird von polaren Seitenketten der α -Helix H1 und der β -Stränge S1 und S2 gebildet. In dieser Vertiefung III befinden sich auch die streng konservierten Reste Ile236 und Leu255, ebenso wie Leu265, dessen Carbonyl- und Amidgruppen mit den jeweiligen Amid- und Carbonylgruppen der Hauptkette von Glu287 interagieren und dadurch Wechselwirkungen zwischen den Strängen S3 und S5 schaffen. Diese ca. 16 Å lange und 8 Å breite Spalte kann ebenfalls als mögliche Peptidbindungsstelle fungieren (Abbildung 4.25 oben).

Ein Vergleich mit der N-terminalen TRP-Domäne des Cns1 Homologen Hop, dessen Kristallstruktur bereits bekannt ist (Scheuffler *et al.*, 2000), zeigt, wie das Hsp90 Peptid gebunden ist: Die Peptidbindungsstelle befindet sich in einer vertieften Rinne, die von der C-terminalen α -Helix flankiert wird. Die Dimensionen der Bindungsstelle betragen 10 Å in die Breite und ca. 20 Å in der Länge und sind damit vergleichbar mit denen der Vertiefung I des Cns1 218-C (Abbildung 4.27).

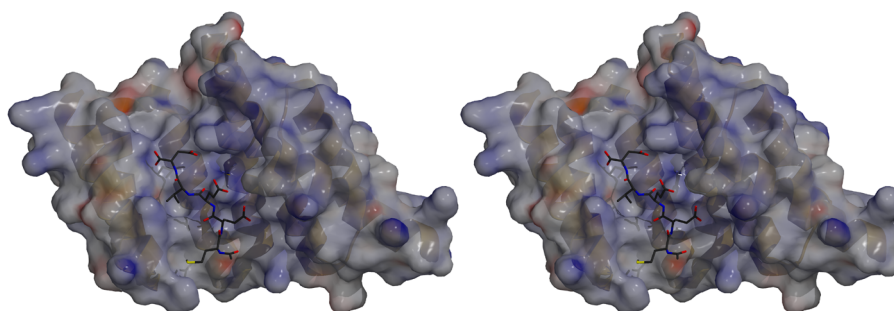


Abbildung 4.27: Stereodarstellung der Oberfläche von Hop mit gebundenem Hsp90 Peptid (Kontourierung der Polarität der Oberfläche bei pH 7 von +35 kT/e (blau) bis -35 kT/e (rot))

4.3 Röntgenstrukturanalyse des unglycosilierten Fc-Fragments des Antikörpers MAK33 aus Maus

4.3.1 Kristallisation

Das nicht-glycosilierte Fc-Fragment des Antikörpers MAK33 aus Maus wurde rekombinant in *E. coli* als Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) überexprimiert, rückgefaltet und gereinigt (Vinci *et al.*, 2004) und von Silvia Catharino Rodrigues aus dem Lehrstuhl für Biotechnologie (Prof. Johannes Buchner) an der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt.

Zur Kristallisation wurde das Protein mit einer Konzentration von 15 mg/ml in einem 50 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 8,0 in *sitting drop* Experimenten eingesetzt. 2 μ l des Proteins wurden mit 2 μ l Präzipitanzlösung, die sich aus 0,05 M Calciumacetat, 0,1 M Imidazol pH 8,0, 35% 2-Ethoxyethanol (Emerald Cryo I, 18) zusammensetzte, versetzt und gegen 300 μ l Bodenpuffer derselben Bedingung bei 20°C äquilibriert. Nach ca. 10 Tagen wuchsen aus dieser Kristallisationsbedingung Proteinkristalle, die sich mit einer Größe von 300 x 300 x 100 μ m³ als röntgentauglich mit hohem Streuvermögen erwiesen. Abbildung 4.28 zeigt das Diffraktionsbild

dieser hexagonalen Fc-Fragment Kristalle.

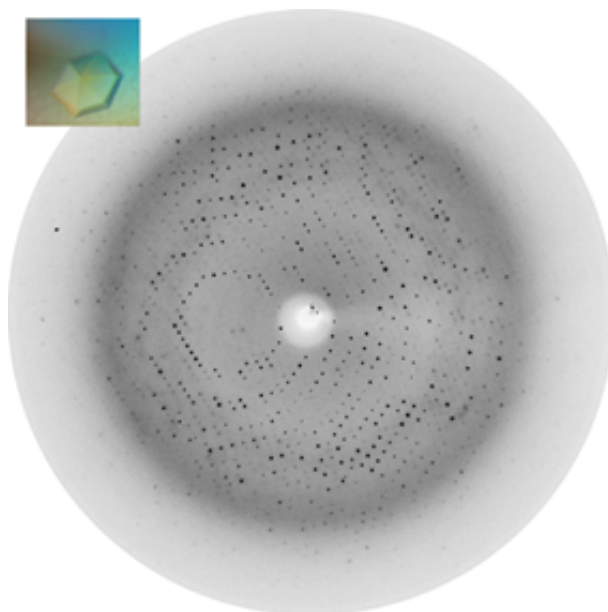


Abbildung 4.28: Diffraktionsbild (maximale Auflösung 2.3 Å, Rotation 0,5°, Wellenlänge $\lambda = 1.5418$ Å) und hexagonale Kristalle des Fc-Fragments des Antikörpers MAK33 aus Maus in 0,05 M Calciumacetat, 0,1 M Imidazol pH 8,0, 35% 2-Ethoxyethanol (Emerald Cryo I, 18)

4.3.2 Datensammlung und Strukturlösung

Da die Kristalle aus einer Cryo-Bedingung wuchsen, konnten sie direkt aus der Mutterlauge montiert und bei 100 K im Stickstoffstrom vermessen werden. Die Indizierung der jeweiligen Diffraktionsdaten zeigte eine hexagonale Gittermetrik mit den Gitterkonstanten $a = 96,45$ Å, $b = 96,45$ Å, $c = 90,63$ Å und $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$.

Der vollständige Datensatz beinhaltete Reflexe bis zu einer maximalen Auflösung von 2.8 Å (siehe Abbildung 4.28). In der asymmetrischen Einheit befindet sich ein Monomer mit einem entsprechenden Solvenzgehalt von 51,4%, wie eine Analyse der Matthews-Parameter ergab (Matthews, 1968). Die Bestimmung der Raumgruppe, die Verfeinerung der Zellparameter und die Integration der Daten erfolgte mit dem

HKL-Programmpaket DENZO und SCALEPACK (Otwinowski and Minor, 1997). Tabelle 4.6 zeigt die Ergebnisse der Datenprozessierung.

Die Struktur des Fc-Fragments aus MAK33 aus Maus wurde mit Hilfe der PATTERSON-Suchmethode (*Molecular Replacement*) mit dem Programm MOLREP (CCP4, 1994) gelöst. Dabei wurden die Daten bis zu einer Auflösung von 20-3.5 Å verwendet. Als Suchmodell diente die bereits bekannte Kristallstruktur der C_H3-Domäne des Fc-Fragments des MAK33 Antikörpers aus Maus ((Thies *et al.*, 1999), PDB-ID:1CQK). In der Rotationssuche konnte sowohl die C_H3- als auch die C_H2-Domäne des monomer vorliegenden Fc-Fragments eindeutig orientiert werden. Hierbei zeichneten sich zwei Lösungen mit deutlich abgehobenen Werten (Rf/sigma = 5,94 bzw. 5,89) gegenüber einer nächstmöglichen, falschen Orientierung (Rf/sigma = 3,06) ab. In der anschließenden Translationssuche wurden beide Rotationslösungen in der asymmetrischen Einheit positioniert. Dabei ergab die korrekte Positionierung der beiden Moleküle eine Lösung mit einem Korrelationskoeffizienten (Corr.) von 24,2% und einem R-Faktor von 56,6% und eine weitere Lösung mit einem Corr. von 36,6% und einem R-Faktor von 52,2%.

Tabelle 4.6 zeigt die Ergebnisse der Datensammlung und -prozessierung des Fc-Fragments.

	Fc-Fragment
Auflösungsbereich (Å)	20-2.8
Raumgruppe	P6 ₁ 22
Zellkonstanten (Å)	a= 96,45 b= 96,45 c= 90,63
Unabhängige Reflexe	6550
Multiplizität	11,5
Vollständigkeit(%)	99,9 (100)
I/σ(I)	3,5 28,6
R _{merge} ^a (%)	4,8 (27,8)

$$^a R_{merge} = \sum_{hkl} [(\sum_i |I_i - \langle I \rangle|) / \sum_i I_i].$$

Tabelle 4.6: Datensammlung und Prozessierungsstatistiken des Fc-Fragments

4.3.3 Modellbau, Verfeinerung und Qualität des Atommodells

	Fc-Fragment
Auflösungsbereich (Å)	20-2.8
Reflexe im <i>working set</i>	5864 94,4%
Reflexe im <i>test set</i>	343 5,5%
R_{cryst}^a (%)	25.2
R_{free}^b (%)	34.4
Anzahl Proteinatome (ohne H)	1656
Anzahl Solvenzatome (ohne H)	33
Anzahl Ligantenatome (ohne H)	-
r.m.s.-Abweichungen vom Idealwert der Bindungslängen (Å)	0.008
Bindungswinkel (°)	1,29
(ϕ, ψ) -Winkel Verteilung im bevorzugten Bereich (%)	78,9
zusätzlich erlaubten Bereich (%)	19,2

$$^a R\text{-Faktor} = \frac{\sum_{hkl \subset W} ||F_{obs}| - k|F_{calc}||}{\sum_{hkl \subset W} |F_{obs}|}$$

$$^b R_{free} = \frac{\sum_{hkl \subset T} ||F_{obs} - k|F_{calc}||}{\sum_{hkl \subset T} |F_{obs}|}$$

Tabelle 4.7: Verfeinerungsstatistik

Die Qualität der gemessenen Daten bis zu einer Auflösung von 2.8 Å ermöglichte den Einbau von 83% aller 210 Aminosäuren des Fc-Fragments des Antikörpers MAK33 aus Maus unter der Verwendung des Programms MAIN (Turk, 1992). Anschließend wurde eine *rigid body* Minimierung und ein *simulated annealing* bei 2000K durchgeführt und mit dem Programm CNS unter Verwendung des *maximum-likelihood* Algorithmus (Brünger, 1992) verfeinert. In iterativen Zyklen von Modellbau, Einbau von Wassermolekülen und Verfeinerung des Atommodells, gefolgt von einer abschließenden individuellen B-Faktorverfeinerung, konvergierte der kristallographische R-Faktor bei 25.2% ($R_{free} = 34.4\%$).

Während aller Stadien der Verfeinerung war für die Glycosilierungsstellen um Asn300 keine druchgängige Elektronendichte sichtbar. Diese semi-geordnete Region von Glu293 bis Phe303 wurde dennoch in das Atommodell eingebaut, da diese flexible Region wichtig für die Gesamtheit des Proteins ist, aber die Besetzung auf Null gesetzt. Ebenso verhält es sich für die ungeordneten Regionen Asp286 bis

Pro274, Asn327 bis Ala333 und Glu421 bis Thr425. So enthält das finale Modell 205 der 210 Aminosäuren des Fc-Fragments: 98 können der C_H2 -Domäne, 106 der C_H3 -Domäne zugeordnet werden. Die Aminosäuren der C_H3 -Domäne sind sehr gut definiert, während hingegen nur in der C_H2 -Domäne flexible Regionen auftreten. Die Qualität des verfeinerten Atommodells wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) beurteilt, in dem die Bindungsgeometrien der Proteinhauptkette des Fc-Fragments überprüft wurde. Dabei ergab sich, dass 78,9 % aller Aminosäure (Glycin und Prolin ausgenommen) sich in den am meisten bevorzugten Bereichen befinden, während 19,2% in zusätzlich erlaubten Bereichen liegen. Drei Aminosäuren zeigen eine Bindungsgeometrie, die in den weitläufig erlaubten, aber keine in den verbotenen Bereich der Ramachandran-Statistik (Ramachandran and Sasisekharan, 1968) fallen würde. Die Verfeinerungsstatistik ist in Tabelle 4.7 gezeigt.

4.3.4 Strukturbeschreibung und Diskussion

Die aus 210 Aminosäuren bestehende Struktur des Fc-Fragments des MAK33 Antikörpers aus Maus besteht aus zwei annähernd gleich großen Domänen mit 99 Aminosäuren für die C_H2 -Domäne, 108 Aminosäuren für die C_H3 -Domäne und einer Schanierregion von 9 Aminosäuren (Ser340 bis Ala348), die beide Domänen verknüpft. Die Sequenznummerierung richtet sich nach der des gesamten MAK33 Antikörpers. In Übereinstimmung mit bekannten Strukturen anderer Fc-Fragmente (Deisenhofer, 1981), (Krapp *et al.*, 2003) weist das Fc-Fragment des MAK33 Antikörpers aus Maus ebenfalls den zu erwartenden *Immunoglobulin-Fold* auf. Dabei sind die C_H2 - und C_H3 -Domäne aus zwei Lagen antiparalleler β -Faltblatt-Strukturen aufgebaut, die das überwiegend hydrophobe Innere des Proteins umschließen, wie in Abbildung 4.29 gezeigt ist. Diese zwei übereinander liegenden β -Faltblätter beider Domänen bestehen wiederum aus vier (S1 S2 S4 S5) bzw. aus drei (S3 S6 S7) Strängen für die C_H2 -Domäne sowie für die C_H3 -Domäne aus S8 S9 S11 S12 bzw. S14 S13 S10. Senkrecht dazu stehen Disulfidbrücken, die jeweils die beiden β -Faltblätter verbinden und von den Aminosäuren Cys264 aus Strang S2 und Cys324 aus Strang S6 (C_H2 -Domäne) und Cys370 aus Strang S9 und Cys428 aus Strang S13 (C_H3 -Domäne) gebildet werden und im hydrophoben Inneren des

Proteins verborgen liegen. Während in der C_H2 -Domäne zwei kurze α -Helices H1 und H2 zu finden sind, besitzt die C_H3 -Untereinheit nur ein kurzes helikales Segment H3. Vier der Sekundärstrukturen verbindenden *Loops* (in Abbildung 4.29 pink dargestellt) erweisen sich in der Kristallstruktur in hohem Maße als ungeordnet. Diese Bereiche erstrecken sich in der C_H2 -Domäne von Aminosäure Asp268 bis Glu275, Gln293 bis Phe303 und von Asn327 bis Ala333; in der C_H3 -Domäne von Aminosäure Glu421 bis Thr425.

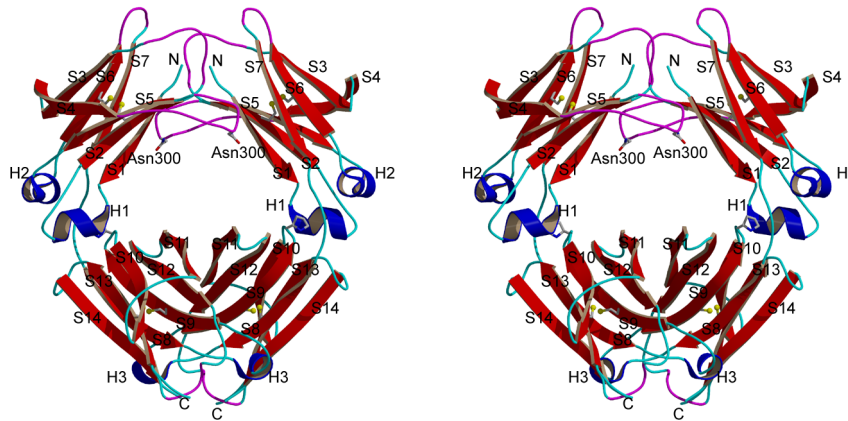


Abbildung 4.29: Physiologisches Dimer des nicht-glycosilierten Fc-Fragments des Antikörpers MAK33 aus Maus; Asn300 kennzeichnet die N-glycosidische Bindungsstelle, flexible *Loops* sind pink dargestellt

Die meisten Proteine der Immunoglobulin-Superfamilie zeichnen sich dadurch aus, dass sie mindestens einen *cis*-Prolinrest im nativen Zustand besitzen (Deisenhofer, 1981). Diese *cis-trans*-Isomerisierung stellt bei der Proteinfaltung oft einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar (Isenman *et al.*, 1979). Pro377, das sich in der C_H3 -Domäne in einem Loop befindet, der die β -Faltblattstränge S9 und S10 verbindet, nimmt eine *cis*-Konfiguration an. Die großen hydrophoben Aminosäurereste Phe376 und His432 im Abstand von 2.8 bzw. 3.9 Å bilden für Pro377 eine Barriere, die eine Isomerisierung in die *trans*-Konformation verhindert. Dies ist in Übereinstimmung mit der bereits bekannten Struktur der C_H3 -Domäne des MAK33 Antikörpers aus Maus.

Abbildung 4.29 zeigt das physiologische Dimer des Fc-Fragments des Antikörpers MAK33 aus Maus, das aus Kristallkontakten zu einem Symmetrieverwandten

erstellt wurde. Es zeigt, dass eine Dimerisierung nur durch Wechselwirkungen nicht kovalenter Art der C_H3 -Domänen untereinander zustande kommt. Die C_H2 -Domänen bilden keinerlei Kontakte zueinander aus. Der flexible Loop von Gln293 bis Phe303 beinhaltet die Erkennungssequenz Asn-X-Thr für die N-Glycosylierungsstelle (Kornfeld and Kornfeld, 1985). Dabei wird eine solche N-glycosidische Bindung zwischen dem Amidstickstoff der Asparaginseitenkette von Asn300 im Fall des Maus Proteins (bzw. Asn297 im humanen Fc-Fragment) und der Oligosaccharideinheit ausgebildet. Dies stellt eine Erklärung für die Flexibilität dieses *Loops* dar, da es sich hier um eine unglycosylierte Form des Fc-Fragments handelt und somit durch die Abwesenheit eines Zuckers die Fixierung dieser Region nicht mehr gegeben ist.

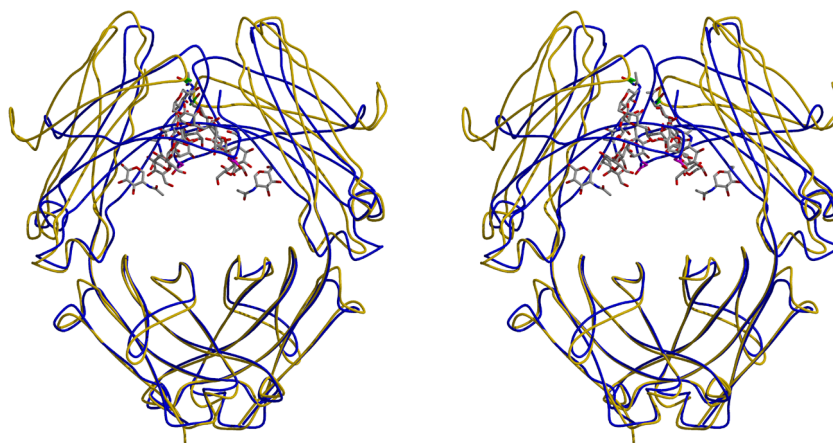


Abbildung 4.30: Überlagerung des nicht-glycosylierten Fc-Fragments des MAK33 Antikörpers aus Maus (blau) mit einem glycosylierten Fc-Fragment aus Mensch (gelb). Die Aminosäuren des konservierten N-Glycosylierungsmotif Asn-X-Thr sind in der humanen Struktur grün und in der Struktur aus Maus pink dargestellt.

Eine Überlagerung des unglycosylierten Fc-Fragments des MAK33 Antikörpers aus Maus (blau) mit einem glycosylierten Fc-Fragment aus Mensch ((Krapp *et al.*, 2003), PDB-ID: 1H3X) (gelb) in Abbildung 4.30 zeigt, dass die C_H3 -Domänen im Gegensatz zu den C_H2 -Domänen sehr gut überlagern. Es ist eine generelle Verschiebung dieser C_H2 -Domänen zueinander beobachtbar, aber es kommt nicht zu einem Zusammenklappen der beiden Domänen, wie man erwarten könnte. Die Konformation des Fc-Fragments bleibt auch in der nicht-glycosylierten Form erhalten.

Abbildung 4.32 zeigt eine Überlagerung des nicht-glycosylierten Fc-Fragments des

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

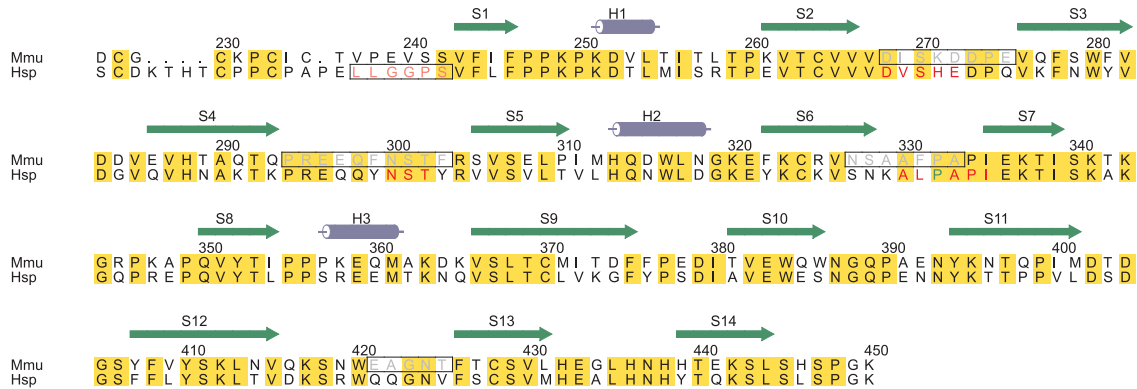


Abbildung 4.31: Sequenzalignment des Fc-Fragments des MAK33 Antikörpers aus Maus (Mmu) mit der homologen Sequenzen aus *Homo sapiens* (Hsa). Streng konservierte Reste sind gelb hinterlegt. Die Sekundärstrukturelemente des Fc-Fragments des MAK33 Antikörpers aus Maus sind oberhalb der Sequenzen zu finden und wurden automatisch mit dem Programm STRIDE (Frishman and Argos, 1995) zugeordnet. Die an der Rezeptorbindung beteiligten Aminosäuren sind in der humanen Sequenz rot, bzw. grün und der sich erst durch die Bindung an den Rezeptor ordnende N-terminale Linker pink markiert. Die fehlgeordneten Sequenzbereiche des Fc-Fragments aus Maus sind eingerahmt dargestellt. Die Nummerierung der Sequenz bezieht sich auf die des gesamten MAK33 Antikörpers aus Maus.

Antikörpers MAK33 aus Maus (rot) mit der Kristallstruktur des Komplexes des humanen (glycosilierten) Fc-Fragments (blau) gebunden an den Fc γ -Rezeptor (Fc γ III) ((Sondermann *et al.*, 2000), PDB-ID: 1E4K) (gelb). Auch hier weisen die C_H3-Domänen in beiden Strukturen kaum Abweichungen von einander auf, während in der Struktur der C_H2-Domänen große Unterschiede zu sehen sind. Die Bindung des humanen Fc-Fragments an den Rezeptor beruht auf Interaktionen von fünf Bereichen der C_H2-Domänen mit dem Rezeptor, die im Folgenden mit den entsprechenden Regionen im MAK33 Fc-Fragments vergleichend gegenüber gestellt werden: Der konservierte Rest Pro329 (in Abbildung 4.31 grün markiert) repräsentiert im humanen Protein einen der Hauptinteraktionskontakte und ist einer der wenigen beteiligten Aminosäurereste, die im Fc-Fragment des MAK33 Antikörpers geordnet sind. Die mit dem Rezeptor wechselwirkenden Bereiche Asp265 bis Glu269 (Val268 bis Ile272 in Maus) und Asn297 bis Thr299 (Asn300 bis Thr302 in Maus) befinden sich im MAK33 Antikörper in den flexiblen *Loops* (vgl. Abbildung 4.31 und 4.32). Es ist zu erwarten, dass diese Bereiche sich durch Bindung an den entsprechenden Rezeptor ordnen, wie es für den um 13 Aminosäuren längeren N-Terminus

in der humanen Struktur beobachtet wurde. In der Kristallstruktur des humanen Fc-Fragments ohne Rezeptor ist dieser Bereich, der die „*hinge*“-Region zur C_H1 -Domäne beinhaltet, flexibel und ordnet sich durch die Bindung an den Rezeptor (Sondermann *et al.*, 2000). Diese „*hinge*“-Region ist allerdings hier in der Aminosäuresequenz des MAK33 Fc-Fragments nicht vorhanden (siehe Abbildung 4.31). Eine spezielle Rolle kommt auch dem Zucker bei der Rezeptorbindung zu, da der Kohlenhydratrest *N*-Acetyl-D-Glucosamin (NAG) ebenfalls Kontakte zum Rezeptor ausbildet (Sondermann *et al.*, 2000). Es bleibt zu untersuchen, ob auch die nicht-glycosilierte Form des Fc-Fragments des MAK33 Antikörpers an den entsprechenden Rezeptor zu binden vermag und durch welche Aminosäurebereiche diese Bindung dann ausgebildet wird.

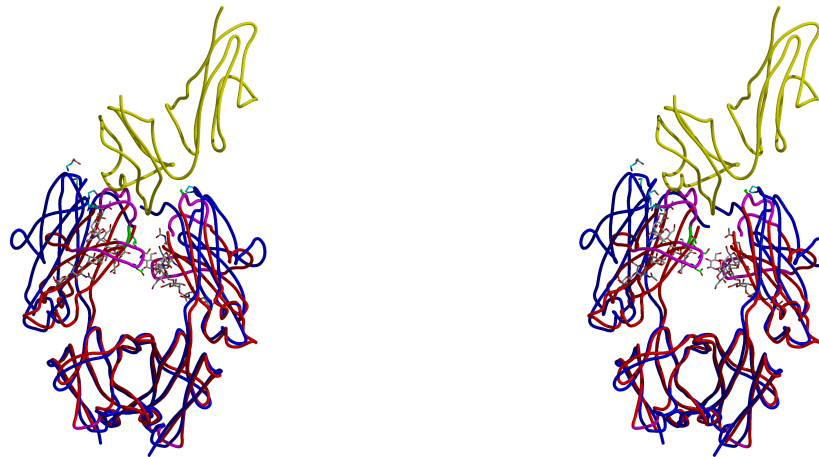


Abbildung 4.32: Überlagerung des nicht-glycosilierten Fc-Fragments des MAK33 Antikörpers aus Maus (rot) mit der Struktur des humanen (glycosilierten) Fc-Fragments (blau) gebunden an den $Fc\gamma$ -Rezeptor ($Fc\gamma$ III) (gelb). Flexible *Loops* des Maus Fc-Fragments sind pink gekennzeichnet. Die Aminosäuren, die in der Struktur des humanen Fc-Fragments Interaktionen mit dem Rezeptor aufweisen sind hellblau, die entsprechenden in der Struktur aus Maus grün markiert.

Abkürzungen

% (w/v)	Gewichtsprozent
% (v/v)	Volumenprozent
Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
A	Ampère
Ac	Acetat
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BCMNP	2,6-Bischloromercuri-4-nitrophenol
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Carb	Carbenicillin
CK	Creatin Kinase
CMP	Cytidin-5'-monophosphat
Cns1	<i>Cyclophilin seven suppressor</i>
CoA	Coenzym A
Corr.	Korrelationskoeffizient
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
ddH ₂ O	<i>aqua bidestillata</i>
DESY	Deutsches Elektronen Synchrotron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol

ABKÜRZUNGEN

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
FMN	Flavinmononukleotid
Hop	Hsp70/90 organizing protein
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
Hsp	Hitzschockprotein
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
kDa	(kilo)Dalton
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani
M	Molar
MAD	Multiple Anomale Dispersion
MIR	<i>Multiple Isomorphous Replacement</i>
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
MR	<i>Molecular Replacement</i>
nm	Nanometer
NMM	Neues Minimal Medium
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCMP	4'-Phosphopantothenoil-CMP Intermediat
PDB	<i>Protein Database</i>
PEG	Polyethylenglykol
PFO	Perfluoropolyether
PPC	(<i>R</i>)-4'-Phospho-N-pantothenoilcystein
PP	4'-Phosphopantethein
rms	Mittleres Abweichungsquadrat
RT	Raumtemperatur
SA	<i>Simulated annealing</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat

SHR	Steroid-Hormon-Rezeptor
Sti1	<i>Stress-inducible protein 1</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt

Literaturverzeichnis

- Abiko, Y. (1975). *Metabolic Pathways*. Academic Press, Inc., New York.
- Albert, A., Dhanaraj, V., Genschel, U., Khan, G., Ramjee, M., Pulido, R., Sibanda, B., von Delft, F., Witty, M., Blundell, T., Smith, A., and Abell, C. (1998). Crystal structure of aspartate decarboxylase at 2.2 Å resolution provides evidence for an ester in protein self-processing. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 289.
- Barton, G. (1993). ALSCRIPT a tool to format multiple sequences alignments. *Protein Eng.*, **6**, 37–40.
- Bernal, J. and Crowford, D. (1934). X-ray photographs of crystalline pepsin. *Nature*, **133**, 794–795.
- Blaesse, M., Kupke, T., Huber, R., and Steinbacher, S. (2000). Crystal structure of the peptidyl-cysteine decarboxylase EpiD complexed with a pentapeptide substrate. *EMBO J.*, **19**, 6299–6310.
- Blundell, T. and Johnson, L. (1976). *Protein Crystallography*. Academic Press, London.
- Bohen, S. (1998). Genetic and Biochemical Analysis of p23 and Ansamycin Antibiotics in the Function of Hsp90-Dependent Signaling Proteins. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 3330–3339.
- Bose, S., Weikl, T., Bügl, H., and Buchner, J. (1996). Chaperone Function of Hsp90-Associated Proteins. *Cell*, **274**, 1715–1717.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-

- gram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
- Bragg, W. (1913). The structure of some crystals as indicated by their diffraction of X-rays. *Proc. Roy. Soc. Sect. A.*, **89**, 248–277.
- Brünger, A. (1992). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*, **355**, 472–475.
- Brown, G. (1959). The metabolism of pantothenic acid. *J. Biol. Chem.*, **234**, 370–378.
- Buchner, J. (1999). Hsp90 and Co, a holding for folding. *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 136–141.
- Buckel, P., Hubner-Parajsz, C., Mattes, R., Lenz, H., Haug, H., and Beaucamp, K. (1987). Cloning and nucleotide sequence of heavy- and light-chain cDNAs from a creatine-kinasespecific monoclonal antibody. *Gene*, **51**, 13–19.
- Budisa, N., Steipe, B., Demange, P., Eckerskorn, C., Kellermann, K., and Huber, R. (1995). High level biosynthetic substitution of methionine in proteins by its analogs 2-aminohexanoic acid, selenomethionine, telluromethionine and ethionine in *E. coli*. *Eur. J. Biochem.*, **230**, 788–796.
- Bukau, B. and Horwich, A. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, **92**, 351–366.
- Cane, D., Walsh, C., and Khosla, C. (1998). Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science*, **282**, 63–68.
- Carter, C. and Carter, C. (1979). Protein crystallization using incomplete factorial experiments. *J. Biol. Chem.*, **254**, 12219–12223.
- CCP4 (1994). The CCP4 suite: Programs for protein crystallography. *Acta Cryst. D.*, **50**, 760–763.
- Deisenhofer, J. (1981). Crystallographic Refinement and Atomic Models of a Human Fc Fragment and Its Komplex with Fragment B of Protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8 Å Resolution. *Biochemistry*, **20**(9), 2361–2370.
- Dolinski, K., Cardenas, M., and Heitman, J. (1998). CNS1 Encodes an Essential

- p60/Sti1 Homolog in *Sachharomyces cerevisiae* That Suppresses Cyclophilin 40 Mutations and Interacts with Hsp90. *Mol. Cell. Biol.*, **18**(12), 7344–7352.
- Drenth, J. (1994). *Principles of protein X-ray crystallography*. Springer Verlag, New York.
- Duina, A., Chang, H.-C., Marsh, J., Lindquist, S., and Gaber, R. (1996). A Cyclophilin Function in Hsp90-Dependent Singal Tranduction. *Cell*, **274**, 1713–1715.
- Engh, R. and Huber, R. (1991). Accurate Bond and Angle Parameters for X-ray Protein-Structure Refinement. *Acta. Cryst. A.*, **47**, 392–400.
- Esnouf, R. (1997). An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *J. Mol. Graph. Model.*, **15**, 132–134.
- Ewald, P. (1921). Das „reziproke Gitter“ in der Strukturtheorie. *Z. Kristallogr.*, **56**, 491–500.
- Fang, Y., Fliss, A., Rao, J., and Caplan, A. (1998). SBA1 Encodes a Yeast Hsp90 Cochaperone That Is Homologous to Vertebrate p23 Proteins. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 3727–3734.
- Freeman, B., Toft, D., and Morimoto, R. (1996). Molecular Chaperone Machines: Chaperone Activities of Cyclophilin Cyp40 and the Steroid Aporeceptor-Associated Protein p23. *Cell*, **274**, 1718–1720.
- Friedrich, W., Knipping, P., and Laue, M. (1912). Sitzungsberichte der mathematisch-physikalischen Klasse der Königlich Bayerischen Akademie der Wissenschaften zu München.
- Frishman, D. and Argos, P. (1995). Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins*, **23**, 566–579.
- Gerdes, S., Scholle, M., M., D., Bernal, A., Baev, M., Farrell, M., Kurnasov, O., Daugherty, M., Mseeh, F., Polanuyer, B., Campbell, J., Anantha, S., Shatalin, K., Chowdhury, S., Fonstein, M., and Osterman, A. (2002). From genetic footprinting to antimicrobial drug targets: examples in cofactor biosynthetic pathways. *J. Bacteriol.*, **184**, 4555–4572.
- Ghaemmaghani, S., Huh, K.-W., Bower, K., Howson, R., Belle, A., Dephoure, N.,

LITERATURVERZEICHNIS

- O'Shea, E., and Weissman, J. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, **425**, 737–741.
- Green, D., Ingram, V., and Perutz, M. (1954). The structure of hemoglobinIV. Sign determination by isomorphous replacement method. *Proc. Roy. Soc. Sect. A.*, **225**, 287–307.
- Hainzl, O., Wegele, H., Richter, K., and Buchner, J. (2004). Cns1 is an Activator of the Ssa1 ATPase Activity. *J. Biol. Chem.*, **279**, 23267–23273.
- Harker, D. (1956). The determination of the phases of the structure factors on non-centrosymmetric crystals by the method of double isomorphous replacement. *Acta. Cryst. D.*, **9**, 1–9.
- Hauptmann, H. and Karle, J. (1953). Solution of the phase problem. I. The centrosymmetric crystal. *A.C.A. Monograph, 3, Polycrystal Book Service, Pittsburgh.*
- Hendrickson, W. (1991). Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Science*, **254**, 51–58.
- Hightower, L. (1991). Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell*, **66**, 191–197.
- Hildebrandt, H. (1998). *Psyhyrembel - Klinisches Wörterbuch*, volume 258. Auflage. de Gruyter Verlag, Berlin.
- Holm, L. and Sander, C. (1993). Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J.Mol.Biol.*, **233**, 123–138.
- Hoppe, W. (1957a). Die Faltmolekülmethode: eine neue Methode zur Bestimmung der Kristallstruktur bei ganz oder teilweise bekannten Molekülstrukturen. *Acta. Cryst. D.*, **10**, 750–751.
- Hoppe, W. (1957b). Die Faltmolekülmethode und ihre Anwendung in der röntgenographischen Konstitutionsanalyse von Biflorin. *Z. Elektrochem.*, **61**, 1076–1083.
- Huber, R. (1965). Die automatisierte Faltmolekülmethode. *Acta. Cryst. D.*, **19**.
- Ibba, M. and Soll, D. (2000). Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 617–650.

- Iseman, D., Lancet, D., and Pecht, I. (1979). Folding Pathways of Immunoglobulin Domains. The Folding Kinetics of the C γ 3 Domain of Human IgG. *Biochemistry*, **18**, 3327–3336.
- Itoh, T., Matsuda, H., and Mori, H. (1999). Phylogenetic Analysis of the Third Hsp70 Homolog in *Escherichia coli*; a Novel Member of the Hsc66 Subfamily and Its Possible Co-Chaperone. *DNA Research*, **6**, 299–305.
- Jancarik, J. and Kim, S.-H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.*, **24**, 409–411.
- Kendrew, J., Dickerson, R., Strandberg, B., Hart, R., and Davies, D. (1960). Structure of myoglobin; a three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature*, **185**, 422–427.
- Kleinkauf, H. (2000). The role of 4'-phosphopantetheine in the biosynthesis of fatty acids, polyketides and peptides. *Biofactors*, **11**, 91–92.
- Koolman, J. and Röhm, K.-H. (1994). *Taschenatlas der Biochemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985). Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 631–664.
- Krapp, S., Mimura, Y., Jefferis, R., Huber, R., and Sondermann, P. (2003). Structural Analysis of Human IgG-Fc Glycoforms Reveals a Correlation Between Glycosylation and Structural Integrity. *J. Mol. Biol.*, **325**, 979–989.
- Kraulis, P. (1993). MOLSCRIPT - A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Scientist*, **7**, 16–16.
- Kupke, T. (2002). Molecular characterization of the 4'-phosphopantothienoylcysteine synthetase domain of bacterial Dfp flavoproteins. *J. Biol. Chem.*, **277**, 36137–36145.
- Kupke, T. (2004). Active-site residues and amino acid specificity of the bacterial 4'-phosphopantothienoylcysteine synthetase CoaB. *Eur. J. Biochem.*, **271**, 163–172.

- Lamb, J., Tugendreich, S., and Hieter, P. (1995). Tetratrico peptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 257–259.
- Laskowski, R., McArthur, M., Moss, D., and Thornton, J. (1993). PROCHECK-A Programm to check the stereochemical Quality of Protein Structures. *J. Appl. Cryst.*, **26**, 283–291.
- Leslie, A. (1998). MOSFILM 6.0 edit., Cambridge, UK.
- Lipmann, F. (1962). Development of the acetylation problem: a personal account. In *Nobel lectures: Physiology or Medicine (1942-1962)*, pages 413–438. American Elsevier, New York.
- Lynen, F. (1970). The pathway from „activated acetic acid“ to the terpenes and fatty acids. In *Nobel lectures: Physiology or Medicine (1963-1970)*, pages 103–138. American Elsevier, New York.
- Manoj, N., Strauss, E., Begley, T., and Ealick, S. (2003). Structure of human phosphopantothenoylcysteine synthetase at 2.3 Å resolution. *Structure*, **11**, 927–936.
- Matak-Vinkovic, D., Vinkovic, M., Saldanha, S., Ashurst, J., Von Delft, F., Inoue, T., Miguel, R., Smith, A., Blundell, T., and Abell, C. (2001). Crystal Structure of *Escherichia coli* Ketopantoate Reductase at 1.7 Å Resolution and Insight Into the Enzyme Mechanism. *Biochemistry*, **40**, 14493.
- Matthews, B. (1968). Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.*, **33**, 491–497.
- McPherson, A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur. J. Biochem.*, **189**, 1–23.
- Nicholls, A., Bharadwaj, R., and Honig, B. (1993). GRASP - Graphical Representation and Analysis of Surface-Properties. *Biophys. J.*, **64**, A166.
- Ottenhof, H., Ashurst, J., Whitney, H., Saldanha, S., Schmitzberger, F., Gweon, H., Blundell, T., Abell, C., and Smith, A. G. (2004). Organisation of the pantothenate (vitamin B5) biosynthesis pathway in higher plants. *Plant J.*, **37**(1), 61.
- Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997). Proceedings of X-ray diffraction data collected in oscillations mode. *Methods Enzymol.*, **276**, 307–326.

- Paz, Y., Elazar, Z., and Fass, D. (2000). Structure of Gate-16, Membrane Transport Modulator and Mammalian Ortholog of Autophagocytosis Factor Aut7P. *J. Biol. Chem.*, **275**, 25445–25450.
- Pearl, H. and Prodromou, C. (2000). Structure and in vivo function of Hsp90. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 46–51.
- Perutz, M., Rossmann, M., Cullis, A., Muirhead, H., Will, G., and North, A. (1960). Structure of hemoglobin; a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5 Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature*, **185**, 416–422.
- Picard, D. (2002). Heat shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell. Mol. Life Sci*, **59**, 1640–1648.
- Prodromou, C., Roe, S. M., O'Brien, R., Ladbury, J., Piper, P., and Pearl, L. (1997). Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell*, **90**, 65–75.
- Ramachandran, G. and Sasisekharan, V. (1968). Advan. Protein Chem. *Conformation of polypeptides and proteins*, **23**, 283–437.
- Ramage, R., Green, J., Muir, T., Ogunjobi, O., Love, S., and Shaw, K. (1994). Synthetic, structural and biological studies of the ubiquitin system: the total chemical synthesis of ubiquitin. *Biochem. J.*, **299**, 151–158.
- Richter, K. and Buchner, J. (2001). Hsp90: Chaperoning Signal Transduction. *J. Cell. Physiol.*, **188**, 281–290.
- Richter, K., Muschler, P., Hainzl, O., Reinstein, J., and Buchner, J. (2003). Sti1 Is a Non-competitive Inhibitor of the Hsp90 ATPase. *J. Biol. Chem.*, **278**(12), 10328–10333.
- Röntgen, W. (1895). Über eine neue Art von Strahlen. *Sitzungsberichte der Physikalisch-Medizinischen Gesellschaft zu Würzburg*, pages 132–141.
- Rossmann, M. and Blow, D. (1962). The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Cryst. D.*, **15**, 24–31.
- Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F.-U., and Moarefi, I. (2000). Structure of TPR Domain-Peptide Com-

- plexes: Critical Elements in the Assembly of the Hsp70-Hsp90 Multichaperone Machine. *Cell*, **101**, 199–210.
- Schneider, C., Sepp-Lorenzino, L., Nimmesgern, E., Ouerfelli, O., Danishefsky, S., Rosen, N., and Hartl, F.-U. (1996). Pharmacologic shifting of a balance between protein refolding and degradation mediated by Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 14536–14541.
- Schunk, A. and Gasteiger, J. (2003). Vitamine und Coenzym (http://www2.chemie.uni-erlangen.de/projects/vsc/chemie-mediziner-neu/vitamine/index.html).
- Schwarzer, D., Finking, R., and Marahiel, M. (2002). Non-ribosomal peptides: from genes to products. *Nat. Prod. Rep.*, **20**, 275–287.
- Sheldrick, G., Dauter, Z., Wilson, K., Hope, H., and Sieker, L. (1993). The application of direct methods of patterson interpretation to high-resolution native protein data. *Acta Crystallogr.*, **D49**, 18–23.
- Smith, D. (1993). Dynamics of Heat Shock Protein 90-Progesterone Receptor Binding and the Disactivation Loop Model for Steroid Receptor Complexes. *Mol. Endocrinol.*, **7**, 1418–1429.
- Smith, D., Whitesell, L., Nair, S., Chen, S., Prapapanich, V., and Rimerman, R. (1995). Progesterone Receptor Structure and Function Altered by Geldanamycin, an Hsp90-Bindung Agent. *Mol. Cell. Biol.*, **15**(12), 6804–6812.
- Sondermann, P., Huber, R., Oosthuizen, V., and Jacob, U. (2000). The 3.2-Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-FcγRIII complex. *Nature*, **406**, 267–273.
- Stanitzek, S. (2002). *Röntgenstrukturanalyse der apikalen Domäne des Thermosoms aus Pyrodictium occultum, Kristallisation des Enzyms CoaB1*. Diplomarbeit, Technische Universität München.
- Steinbacher, S., Hernandez-Acosta, P., Bieseler, B., Blaesse, M., Huber, R., Culianez-Macia, F., and Kupke, T. (2003). Crystal structure of the plant PPC decarboxylase AtHAL3a complexed with an ene-thiol reaction intermediate. *J. Mol. Biol.*, **327**, 193–202.

- Stout, G. and Jensen, L. (1989). *X-ray structure determination*. John Wiley, New York.
- Strauss, E., Kinsland, C., Ge, Y., McLafferty, F., and Begley, T. (2001). Phosphopantothenoylcysteine synthetase from *Escherichia coli*. Identification and characterization of the last unidentified coenzyme A biosynthetic enzyme in bacteria. *J. Biol. Chem.*, **276**, 13513–13516.
- Stryer, L. (1999). *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.
- Terwilliger, T. and Berendzen, J. (1999). Automated structure solution for MIR and MAD (<http://www.solve.lanl.gov>). *Acta Crystallogr.*, **D55**, 849–861.
- Thies, M., Mayer, J., Augustine, J., Frederick, C., Lilie, H., and Buchner, J. (1999). Folding and Association of the Antibody Domain C_H3: Prolyl Isomerization Precedes Dimerization. *J. Mol. Biol.*, **293**, 67–79.
- Thomson, J. (1903). Conduction of Electricity through Gases.
- Turk, D. (1992). *Weiterentwicklung eines Programms für Molekülgraphik und Elektronendichte-Manipulation und seine Anwendung auf verschiedene Protein-Strukturaufklärungen*. Phd thesis, Technische Universität München.
- Vinci, F., Catharino, S., Frey, S., Buchner, J., Gennaro, M., Pucci, P., and Ruoppolo, M. (2004). Hierarchical Formation of Disulfide Bonds in the Immunoglobulin Fc Fragment Is Assisted by Protein-disulfide Isomerase. *J. Biol. Chem.*, **279**(15), 15059–15066.
- Von Delft, F., Lewendon, A., Dhanaraj, V., Blundell, T., Abell, C., and Smith, A. (2001). The Crystal Structure of *E. Coli* Pantothenate Synthetase Confirms It as a Member of the Cytidylyltransferase Superfamily. *Structure*, **9**, 439.
- Von Delft, F., Inoue, T., Saldanha, S., Ottenhof, H., Schmitzberger, F., Birch, L., Dhanaraj, V., Witty, M., Smith, A., Blundell, T., and Abell, C. (2003). Structure of *E. Coli* Ketopantoate Hydroxymethyl Transferase Complexed with Ketopantoate and Mg²⁺, Solved by Locating 160 Selenomethionine Sites. *Structure*, **11**, 985.
- Wang, S. and Eisenberg, D. (2003). Crystal structures of a panthothenate synthetase

LITERATURVERZEICHNIS

- from *M. tuberculosis* and its complex with substrates and a reaction intermediate. *Protein Sci.*, **12**, 1097–1108.
- Watson, J. and Crick, F. (1953). Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, **171**, 737–740.
- Wegele, H., Haslbeck, M., Reinstein, J., and Buchner, J. (2003). Sti1 is a Novel Activator of the Ssa Proteins. *J. Biol. Chem.*, **278**, 25970–25976.
- Wegele, H., Mueller, L., and Buchner, J. (2004). *Hsp70 and Hsp90 - a relay team for protein folding.*, volume 151 of *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* Springer Verlag.
- Young, J., Moarefi, I., and Hartl, F.-U. (2001). Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J. Cell Biol.*, **154**, 267–273.
- Zheng, R. and Blanchard, J. (2001). Steady-state and pre-steady state kinetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* pantothenate synthetase. *Biochemistry*, **40**, 12904–12912.