

Max-Planck-Institut für Biochemie  
Abteilung Strukturforschung

**Zwei Untereinheiten aus Proteinkomplexen:  
Die Kristallstruktur der APC10-Untereinheit des humanen  
*Anaphase-promoting Complex*  
und  
die Kristallstruktur der Carboxytransferase-Untereinheit der  
Glutaconyl-CoA Decarboxylase aus *Acidaminococcus fermentans***

Kerstin Sybille Wendt

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. Dr. A. Bacher

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Dr. h.c. R. Huber
2. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Die Dissertation wurde am 16.05.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Chemie am 18.06.2002 angenommen.

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 1998 bis Mai 2002 in der Abteilung Strukturforschung des Max-Planck Instituts für Biochemie in Martinsried erstellt.

Bei Prof. Dr. R. Huber möchte ich mich für die Überlassung der reizvollen Themen und die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Die sehr gute Ausstattung und die große Selbständigkeit erlaubten es, dem eigenen Forscherdrang zu folgen und die Projekte selbständig weiterzuentwickeln.

Im Zusammenhang mit der Kristallstruktur des APC10 möchte ich mich bei Jan-Michael Peters, Christian Gieffers und Hartmut Vodermaier vom Institut für Molekulare Pathologie in Wien für die Überlassung der DNA verschiedener APC-Untereinheiten, für die Durchführung der zellbiologischen Experimente, ihre Diskussionsfreudigkeit, sowie die Hilfe beim Durchboxen der Publikation bedanken.

Bei Prof. Dr. W. Buckel und Iris Schall vom Laboratorium für Mikrobiologie der Phillips-Universität Marburg möchte ich mich für die Unterstützung mit Protein und Rat bei der Kristallisation der GcdA bedanken.

Gleb Bourenkov und Dr. Hans Bartunik danke ich für die Messzeit und die ausgezeichnete Betreuung an der BW6-Beamline am DESY und für die Hilfe bei der schwierigen Suche nach den Platin-Positionen in den GcdA-Datensätzen.

Bei Julia Georgescu möchte ich mich für die Hilfe bei der Aufnahme der NMR-Spektren zur Überprüfung der Proteinfaltung bedanken. Dr. Karlheinz Mann und Marius Bociu vom Max-Planck Institut für Biochemie danke ich für die von Ihnen durchgeführten DNA- und Proteinsequenzierungen. Großer Dank gilt auch Sylvia Koerner und Elisabeth Weyher-Stingl für die Durchführung der massenspektroskopischen Untersuchungen am Protein aber auch bei den Versuchen, den Liganden von APC10 zu identifizieren.

Ein besonderer Dank gilt den Sekretärinnen der Abteilung Renate Rüller, Gina Beckmann und Monika Bumann für die freundliche Unterstützung bei den vielen bürokratischen

Angelegenheiten, sowie Werner Dersch und Ottmar Paul für die Hilfe bei den technischen Problemen.

Bei Dr. Peter Sondermann und Dr. Uwe Jacob möchte ich mich für die vielen fruchtbaren Diskussionen, Tipps und die praktische Hilfe bei der Einarbeitung in die Feinheiten der Strukturlösung, aber auch für die Motivation, wenn Ergebnisse mal auf sich warten ließen, bedanken.

Meinen lieben Kollegen aus dem Labor und dem Rechenzentrum Martin Augustin, Constanze Breithaupt, Dr. Tim Clausen, Dr. Oliver Einsle, Martha Garrido, Dr. Stefan Gerhardt, Dr. Michael Groll, Daniela Jozic, Stephan Krapp, Tobias Krojer, Jens Kaiser, Sofia Maciera, Snezan Marinkovitch, Dr. Berta Martins, Uta Ohndorf, Dr. Vaughan Oosthuizen, Dr. Clemens Steegborn, Dr. Markus Wahl und den vielen Anderen die hier nicht aufgeführt sind möchte ich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre im Labor und in der ganzen Abteilung danken.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinen Schwestern und meinem Freund Tobias, die mich während des Studiums und der Promotionszeit immer tatkräftig unterstützt haben.

## Abkürzungen

Å	Angström, $1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$
APC	<i>Anaphase-promoting complex</i> oder Cyclosom
AU	asymmetrische Einheit
Bim	<i>Blocked in mitosis</i>
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
Bub	<i>Budding uninhibited by benzimidazole</i>
BSA	Serumalbumin aus Rind
Cdc	<i>Cell division cycle</i>
Cdh	Cdc20 homolog
CDK	Cyclin abhängige Kinase
cDNA	DNA komplementär zu RNA
Cut	<i>Cells untimely torn</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E6-AP	E3-Enzym das den Tumor-Suppressors p53 in mit humanem Papillomavirus infizierten Zellen ubiquitiniert
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
GCA	Glutaconyl-CoA
GST	Glutathione S transferase
HECT	homolog zum E6-AP C-terminus
HERC2	humanes Orthologes von RJS
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethylsulfonsäure
HIS <sub>6</sub>	His-Tag aus 6 Histidinen
Hsp	Hitzeschockprotein
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
LB	Luria-Bertani
Mad	<i>Mitotic arrest defective</i>
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MPF	<i>Maturation promoting factor</i>
NCS	nichtkristallographische Symmetrie
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
Pds	<i>Precocious disassociation of sister chromatids</i>
Plk	<i>Polo-like kinase</i>
RJS	runty-jerky-sterile

SCF	Skp1-cullin-F-box protein
SDS	Natiumdodecylsulfat
Sic	<i>S-phase inhibitor cyclin/Cdk</i>
TPR	<i>Tetratrico peptide repeat</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
VHL-CBL	von Hippel-Lindau-Cul2/elongin B/elongin C-Komplex
PAM	Protein assoziiert mit dem Transkriptionsfaktor Myc
PP5	Protein-Phosphatase 5
PCR	Polymerasekettenreaktion
r.m.s.d.	<i>root mean square deviation</i>
U	units
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
1.1	Die Kristallstruktur der APC10-Untereinheit des humanen APC	1
1.2	Die Kristallstruktur der Carboxytransferase-Untereinheit der Glutaconyl-CoA Decarboxylase aus <i>Acidaminococcus fermentans</i>	2
<b>2</b>	<b>Einführung</b>	<b>4</b>
2.1	Der <i>Anaphase-promoting Complex</i>	4
2.1.1	Der Zellteilungszyklus	4
2.1.2	Regulation durch Ubiquitin-abhängige Proteolyse	5
2.1.3	Der Anaphase-promoting Complex	7
2.1.4	Regulation von Aktivität und Substratspezifität des APC	9
2.1.5	Die 11 Untereinheiten des humanen APC	10
	<i>APC2 und APC11</i>	11
	<i>Die tetraatricopeptide-repeat (TPR) Untereinheiten</i>	12
	<i>APC1, APC4, APC5, APC9 und CDC26</i>	12
	<i>APC10/ DOC1</i>	12
2.2	Die Glutaconyl-Coenzym A Decarboxylase aus <i>Acidaminococcus fermentans</i>	14
2.2.1	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Antiporter	14
2.2.2	Energiegewinnung durch Decarboxylierung	14
2.2.3	Die Fermentation von Glutamat zu Acetat	15
2.2.4	Glutaconyl-CoA Decarboxylase aus <i>Acidaminococcus fermentans</i>	18
2.2.5	Die biotinabhängige Decarboxylierung	19
2.3	Zielsetzung der Arbeit	22
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>23</b>
3.1	Materialien	23
3.1.1	Bakterienstämme, Plasmide, Oligonucleotide, Enzyme, Medien und Antibiotika	23
	<i>Bakterienstämme</i>	23
	<i>Plasmide</i>	23
	<i>Oligonucleotide</i>	23
	<i>Enzyme</i>	24
	<i>Medien</i>	24
	<i>Antibiotika</i>	24
3.1.2	Sonstige Materialien	24
3.2	Molekularbiologische Methoden	25
3.2.1	Steriles Arbeiten	25
3.2.2	Ethanolprezipitation von DNA	25
3.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25

3.2.4	Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	26
3.2.5	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	26
3.2.6	Konzentrationsbestimmung von DNA	26
3.2.7	Verdau von DNA durch Restriktionsendonucleasen	26
3.2.8	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	27
3.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten	27
3.2.10	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	27
	<i>Elektroporation</i>	27
	<i>Transformation chemisch kompetenter Zellen</i>	27
3.2.11	Präparation von Plasmid-DNA	28
3.2.12	DNA-Sequenzierung	28
3.3	Mikrobiologische Methoden	28
3.3.1	Bakterienkulturen	28
	<i>Flüssigkultur von Bakterien</i>	28
	<i>Plattenkultur von Bakterien</i>	28
3.3.2	Heterologe Expression von rekombinantem Protein in <i>E. coli</i>	29
3.3.2.1	Expression von APC10 und APC $\Delta$ C14 in unlöslicher Form	29
3.3.2.2	Expression von GcdA	29
3.3.2.3	Expression des mit Selenomethionin markierten Proteins	30
3.3.3	Aufschluss von <i>E.coli</i> Zellen	31
3.3.4	Präparation von <i>inclusion bodies</i>	31
3.4	Proteinchemische Methoden	32
3.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	32
	<i>Colorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford</i>	32
	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration anhand des Absorptionskoeffizienten</i>	32
3.4.2	SDS-Page-Gelelektrophorese	32
	<i>Coomassie-Färbung</i>	33
	<i>Silberfärbung nach Marcinka</i>	33
3.4.3	Western-Blot und Detektion der Proteine auf der Membran	34
	<i>Detektion von Proteinen im Western-Blot mittels Antikörper-Färbung</i>	35
3.5	Präparation von APC10/DOC1	35
3.5.1	Rückfaltung von APC10	35
3.5.2	Reinigung des renaturierten APC10	36
3.5.3	Massenspektroskopie	37
3.5.4	Proteinreinigung von APC10 $\Delta$ C14	37
3.5.5	Proteinreinigung der GcdA –Untereinheit der Glutaconyl-CoA-decarboxylase	38

3.6	Kristallographie und Strukturbestimmung	39
3.6.1	Kristallisation	40
3.6.2	Theoretischer Hintergrund	40
3.6.2.1	Kristallaufbau	40
3.6.2.2	Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen	41
3.6.2.3	Das reziproke Gitter	41
3.6.2.4	Die Ewald-Konstruktion	42
3.6.2.4	Friedel'sches Gesetz	42
3.6.2.5	Die Elektronendichtefunktion und die Pattersonfunktion	42
3.6.2.6	Das Phasenproblem	44
3.6.2.7	Multipler isomorpher Ersatz	44
3.6.2.8	Die anomale Streuung	46
3.6.2.9	Multiple Anomale Dispersion (MAD)	47
3.6.3	Datensammlung und Datenauswertung	48
3.6.4	Modellbau und Verfeinerung	49
3.6.5	Geometrische Analysen der Strukturen sowie der Proteinoberfläche	50
3.6.6	Suche nach Sequenz und Strukturhomologie	50
3.6.7	Graphische Darstellungen	50
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>51</b>
4.1	Die Kristallstruktur von humanem APC10	51
4.1.1	Expression und Reinigung von humanem APC10 sowie von APC10 $\Delta$ C14	51
4.1.2	Renaturierung von APC10	51
4.1.3	Kristallisation von APC10 $\Delta$ C14	53
4.1.4	Bestimmung von Raumgruppe und Zellkonstanten	55
4.1.5	MAD-Experiment und Berechnung der initialen Elektronendichte	56
4.1.6	Modellbau und Verfeinerung	57
4.1.7	Strukturbeschreibung	58
4.1.8	Strukturell homologe Proteine	60
4.1.9	Der C-Terminus von APC10	62
4.2	Die Kristallstruktur der Carboxytransferase-Untereinheit (GcdA) der Glutaconyl-CoA Decarboxylase aus <i>Acidaminococcus fermentans</i>	64
4.2.1	Proteinexpression und Reinigung der GcdA	64
4.2.2	Molekulargewichtsbestimmung der GcdA	65
4.2.3	Kristallisation	66
4.2.4	MAD-Experiment, Lösung des Phasenproblems und Modellbau	67
4.2.5	Strukturbeschreibung	71
<i>Domäne I</i>		73



<i>Domäne II</i>	74
4.2.6 Die Strukturähnlichkeit zwischen den Domänen I und II	76
4.2.7 Die Oberfläche der GcdA-Struktur	77
4.2.8 Strukturverwandte Proteine	78
4.2.9 Identifizierung der Substratbindungsstelle in der GcdA-Struktur	81
4.2.10 Die Architektur der Substratbindungstasche	83
4.2.11 Der Biotin-Carrier der Glutaconyl-Coenzym A Decarboxylase	85
4.2.12 Die Interaktion mit dem Biotin-Carrier	86
<b>5 Diskussion</b>	<b>88</b>
5.1. Die APC10-Untereinheit des humanen APC	88
5.1.1 Invariante Aminosäuren in den Apc10 Untereinheiten verschiedener Spezies	88
5.1.2 Einblicke in eine mögliche Funktion von APC10 innerhalb des Holo-APC	89
5.1.3 Die Struktur des APC10 aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	90
5.1.4 Die APC10 Struktur als Leitstruktur für andere Doc-Domänen Proteine	91
5.2 Die GcdA-Untereinheit der Glutaconyl-CoA-Decarboxylase	93
5.2.1 Das Molekulargewicht der nativen GcdA	93
5.2.2 Die Entwicklung von zwei Substratbindungsstellen mit unterschiedlicher Spezifität in der GcdA	94
5.2.3 Der GcdA/Glutaconyl-CoA-Komplex : Einblicke in den Mechanismus der Carboxytransferase	95
5.2.4 Sequenzähnliche Decarboxylasen	96
5.2.5 Weitere Ziele	98
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>99</b>

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Die Kristallstruktur der APC10-Untereinheit des humanen APC

Der Anaphase-promoting Complex ist eine Zellzyklus-regulierte Ubiquitin-Protein-Ligase. Sie kontrolliert wichtige Übergänge in der Mitose und in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus, indem sie regulatorische Zellzyklusproteine durch Ubiquitinierung für die Proteolyse durch das Proteasom markiert. Die Aktivität und Substratspezifität des APC wird durch Phosphorylierung, aber auch durch regulatorische Proteine wie CDC20 und CDH1 gesteuert. Der humane APC besteht aus 11 Untereinheiten, von denen zwei Untereinheiten, APC11 und APC2, jedoch ausreichen, um die Ubiquitinierungsreaktion zu katalysieren. Die Funktion der anderen Untereinheiten ist bisher unklar. Die APC10 Untereinheit des humanen APC10 besitzt eine starke Sequenzhomologie zu Apc10-Proteinen anderer Spezies aber auch zu Proteinsequenzen in potentiellen Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3), die als Doc-Domänen bezeichnet werden. APC10 könnte daher eine wichtige Rolle bei Ubiquitinierungsreaktionen spielen. Das APC10-Protein konnte in *E.coli* nicht löslich exprimiert werden. Degradationsprobleme des rückgefalteten Proteins führten zur Klonierung eines, am C-Terminus um 14 Reste verkürzten, APC10-Fragmentes, welches in *E. coli* löslich und korrekt gefaltet exprimiert werden konnte. Die Kristallstruktur des APC10 konnte durch ein MAD-Experiment mit Kristallen des mit Selenomethionin markierten Proteins bei einer Auflösung von 1,6 Å gelöst werden. Von den 185 Aminosäuren des APC10 sind 162 Reste in der Kristallstruktur enthalten sind. Das Eindomänenprotein besteht aus einem  $\beta$ -Sandwich, in dem ein fünfsträngiges, antiparalleles Faltblatt auf ein dreisträngiges, antiparalleles Faltblatt gepackt ist. Die charakteristische Anordnung der Stränge in den Faltblättern charakterisiert die Tertiärstruktur des Proteins als *jelly-roll*-Faltungstyp. Strukturell sehr ähnliche Proteine mit dem gleichen Faltungstyp sind die D1-Domäne der Galactose-Oxidase aus *Dactylium dendroides*, die Galactose-bindende Domäne der Sialidase aus *Micromonospora viridifaciens*, die C2-Domäne des Gerinnungsfaktors Va aus *Homo sapiens* und die N-terminale Domäne des DNA-Reparaturproteins XRCC1 aus *Xenopus laevis*. Den strukturell homologen Proteinen ist gemeinsam, dass sie eine Oberflächenregion, die der N-terminalen Loop-Region in der APC10-Struktur entspricht, zur Bindung eines Liganden, Zucker, Phospholipid oder einzelsträngige DNA, verwenden. Weiterhin besteht in der N-terminalen Loop-Region eine Anhäufung von evolutionär invarianten Resten in der Proteinsequenz des APC10 und eine Mutation in dieser Region führt zu schweren Defekten in der APC-Funktion. Diese Daten weisen auf eine mögliche Funktion des APC10-Proteins als Bindungsstelle für einen noch unbekanntem Liganden hin. Für die in der Kristallstruktur nicht enthaltenen 23 C-terminalen

Reste konnte nachgewiesen werden, dass sie für die Bindung des APC10-Proteins an eine andere APC-Untereinheit, CDC27/APC3, verantwortlich sind. CDC27/APC3 enthält 10 *tetratricopeptide repeats*, die aus anderen Proteinen als Protein-Protein-Wechselwirkungsmotiv bekannt sind. Über diese Interaktion des C-Terminus ist das APC10-Protein möglicherweise im APC-Komplex verankert.

## 1.2 Die Kristallstruktur der Carboxytransferase-Untereinheit der Glutaconyl-CoA Decarboxylase aus *Acidaminococcus fermentans*

Glutaconyl-CoA Decarboxylase aus *Acidaminococcus fermentans* ist ein Ionenkanal in der Cytoplasmamembran, der die bei der Decarboxylierung von Glutaconyl-CoA, einer Zwischenstufe im Abbau von Glutamat, frei werdende Energie zum Transport von Na<sup>+</sup>-Ionen ins Periplasma benutzt. Das Protein besteht aus 4 Untereinheiten mit noch unbekannter Stöchiometrie. Die Carboxytransferase-Untereinheit (GcdA) katalysiert den Transfer eines CO<sub>2</sub> vom Glutaconyl-CoA auf Biotin, welches kovalent an eine Lysin-ε-Aminogruppe der GcdC-Untereinheit gebunden ist. Die Decarboxylierung des Carboxybiotins durch die Carboxybiotin-Decarboxylase-Untereinheit (GcdB), die mit 9 potentiellen Transmembranhelices den eigentlichen Ionenkanal bildet, liefert die Energie für den Aufbau des Na<sup>+</sup>-Gradienten. Eine weitere Untereinheit, GcdD, die eine einzelne potentielle Transmembranhelix enthält, wird als Membrananker für die GcdA-Untereinheit diskutiert. Das GcdA-Protein konnte rekombinant in *E.coli* exprimiert, gereinigt und kristallisiert werden. Die Kristallstruktur der GcdA-Untereinheit der Glutaconyl-CoA Decarboxylase konnte durch ein MAD-Experiment mit in Platinterpyridin eingelegten Kristallen bei einer Auflösung von 2,6 Å gelöst werden. Das GcdA-Protein liegt in Lösung wahrscheinlich als Dimer vor. Unter den Kristallisationsbedingungen kam es jedoch zur Ausbildung eines Tetramers, in dem sich zwei Dimere mit ausgeprägt hydrophoben Oberflächenregionen aneinanderlagern. Das GcdA-Monomer ist aus zwei Domänen, I und II, aufgebaut, die jedoch eine so hohe Sequenzhomologie und Strukturhomologie aufweisen, dass sie möglicherweise durch Exonduplikation aus einem Ursprungsprotein hervorgegangen sind. Jede Domäne ist aus einem siebensträngigen Falblatt mit parallelen und antiparallelen Strängen aufgebaut, das an beiden Seiten von mehreren α-Helices flankiert wird. Zusätzlich enthalten sie noch je zwei antiparallel gegeneinander gepackte α-Helices, die weit aus der Oberfläche des Proteins herausstehen. Diese „Helix-Finger“, von in der Struktur benachbarten Domänen I und II unterschiedlicher Monomere, lagern sich gegeneinander und bilden so eine Höhlung in der Proteinoberfläche, die das aktive Zentrum des Proteins enthält. Die zwei

Substratbindungsstellen des GcdA-Dimers konnten anhand des Glutaconyl-CoA/GcdA Komplexes, sowie des strukturhomologen Chlorobenzoyl-CoA/Chlorobenzoyl-CoA Dehalogenase-Komplexes identifiziert werden. Da sich das aktive Zentrum in einer Höhlung mit nur zwei Zugangsmöglichkeiten befindet und eine bereits vom Glutaconyl-CoA Substrat besetzt ist, kann über die bleibende Öffnung auf den Angriffspunkt des Biotinyllysins-Armes und die Interaktion des GcdA-Proteins mit dem Biotincarrier geschlossen werden.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Kerstin S. Wendt, Hartmut C. Vodermaier, Uwe Jacob, Christian Gieffers, Michael Gmachl, Jan-Michael Peters, Robert Huber und Peter Sondermann "Crystal structure of the APC10/DOC1 subunit of the human anaphase-promoting complex". *nature structural biology* (2001) **8**, 784-788

Kerstin S. Wendt, Gleb Bourenkow, Iris Schall, Wolfgang Buckel, Robert Huber and Uwe Jacob," The crystal structure of the Carboxytransferase subunit of Glutaconyl-CoA-decarboxylase", Manuskript in Vorbereitung

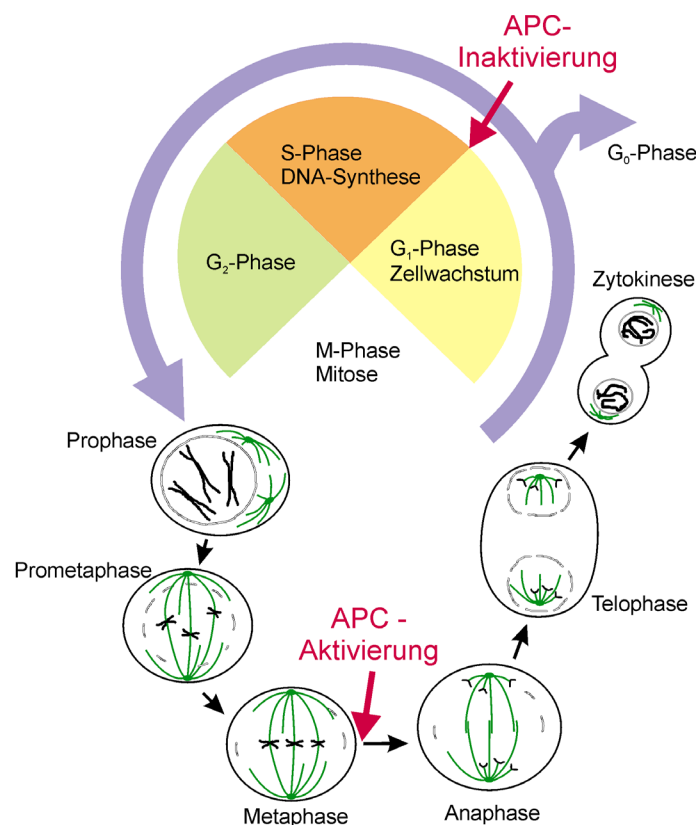
## 2 Einführung

### 2.1 Der *Anaphase-promoting Complex*

#### 2.1.1 Der Zellteilungszyklus

Basis für jegliche Wachstums-, Entwicklungs- sowie Regenerationsprozesse von mehrzelligen Organismen ist die Teilung ihrer Zellen. Dabei müssen neben den Komponenten des Zytoplasmas, wie den Zellorganellen, auch die genetischen Informationen der Zellen verdoppelt und jeweils zur Hälfte auf die Tochterzellen aufgeteilt werden. Dieser als Zellteilungszyklus bezeichnete Vorgang sowie seine Regulation sind schon seit langem Gegenstand intensiver Forschung.

Die wichtigsten Phasen im Teilungszyklus eukaryontischer Zellen sind die S-Phase, während der das genetische Material der Zelle verdoppelt wird, und die M-Phase, auch Mitose, in der das genetische Material zu gleichen Teilen auf die beiden Tochterzellen aufgeteilt wird. Dazwischen liegen Wachstumsphasen der Zelle, die G<sub>1</sub>-Phase und die G<sub>2</sub>-Phase (Abb. 2-1).



**Abbildung 2-1: Die verschiedenen Phasen des Zellzyklus.** Die Mitose wurde detailliert dargestellt. Die Spindelfasern sowie Kinetochoren sind grün dargestellt. Abbildung nach (Löw).

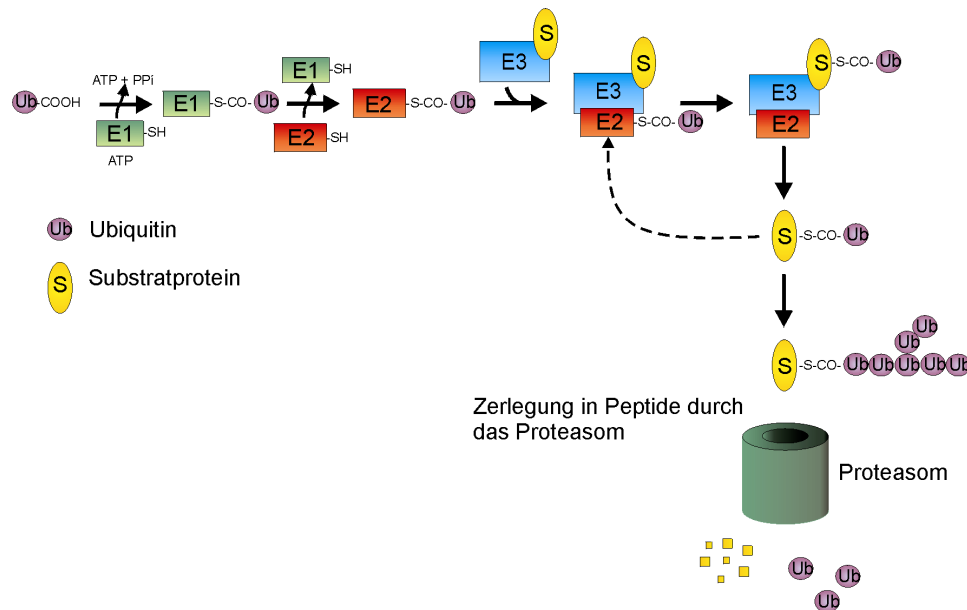
Die Mitose kann nochmals in fünf Phasen unterteilt werden: Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase. Während der Prophase beginnt die Kondensation des Chromatins und die Chromosomen werden als fadenförmige Strukturen sichtbar. Die

Zentriolen wandern zu den Zellpolen und der Aufbau der bipolaren mitotischen Spindel im Zytoplasma beginnt. In der Prometaphase wird die Kondensation der Chromosomen fortgesetzt und die Schwesterchromatiden werden erkennbar. Die Kernhülle zerfällt in Membranvesikel und die Spindelfasern dringen in den Kernbereich ein. An den Zentromeren bilden sich die Kinetochoren und die Kinetochor-Mikrotubuli binden an die Kinetochoren. Die Chromosomen beginnen in die Metaphasenebene zu wandern. In der folgenden Metaphase sind die Chromosomen in der Mitte zwischen den Spindelpolen angeordnet und bilden die metaphasische Platte. Die Schwesterchromatiden sind im Zentromerbereich noch durch den Cohesin-Komplex verbunden. Der Spindelapparat ist komplett ausgebildet. Beim Eintritt in die Anaphase werden die Chromatiden getrennt und durch Verkürzung der Kinetochor-Mikrotubuli zu den Zellpolen bewegt. Die polaren Mikrotubuli werden verlängert, wodurch die Spindelpole auseinanderweichen und die Zelle gestreckt wird. Mit der Telophase wird die Mitose abgeschlossen. Nachdem die Chromatiden an den Zellpolen angekommen sind und anfangen zu decondensieren, werden die Kernhüllen und Nucleoli gebildet und zwei Tochterkerne entstehen. Die Kinetochor-Mikrotubuli verschwinden, aber die polaren Mikrotubuli werden weiter verlängert. Während der späten Anaphase beginnt bereits die Cytokinese bei der durch einen die Zellmembran einschnürenden, kontraktilen Ring in der Höhe der Metaphasenplatte das Cytoplasma auf die beiden Tochterzellen verteilt wird (Voet und Voet, 1992). Die korrekte Aufteilung des verdoppelten Chromosomensatzes auf die beiden Tochterzellen erfordert die präzise Einhaltung eines zeitlichen Ablaufes und somit eine genaue An- und Abschaltung der entsprechenden Prozesse. Störungen in diesem Ablauf können zum Stillstand der Zellen in der Mitose, zum Zelltod oder zur Ungleichverteilung der Chromatiden führen. Bei verschiedenen Krebsarten wurde eine solche Ungleichverteilung von Chromatiden gefunden (Jallepalli *et al.*, 2001).

### **2.1.2 Regulation durch Ubiquitin-abhängige Proteolyse**

Der Zellzyklus wird von zwei sehr unterschiedlichen Regulationsmechanismen gesteuert. Bei der Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen durch mitotische Kinasen handelt es sich um reversible Prozesse, welche vor allem am Anfang der Mitose eine Rolle spielen. Ein Signal, das zur irreversiblen Abschaltung von Proteinen führt und somit zur Festlegung einer Richtung im Zellzyklus geeignet ist, ist die ubiquitinabhängige Proteolyse durch das 26S-Proteasom. Dafür werden die Substratproteine mit Poly-Ubiquitin-Ketten als Erkennungssignal für das Proteasom markiert (Peters, 1994). Ubiquitin ist mit 76 Aminosäuren ein sehr kleines, aber innerhalb der Eukaryonten hochkonserviertes Protein.

Neben der Zellzyklusregulation ist es in viele weitere Prozesse wie die Organell-Biogenese, Apoptose, Zellproliferation oder Zelldifferenzierung integriert.



**Abbildung 2-2: Markierung von Proteasom-Substratproteinen mit Ubiquitin durch eine E1-E2-E3 Kaskade.** Abbildung nach (Weissman, 2001).

In ersten Schritt der Ubiquitinierungsreaktion wird das Ubiquitin durch ATP-abhängige Ausbildung einer energiereichen Thioesterbindung zu einem Ubiquitin-aktivierenden Enzym (E1) aktiviert. Danach wird es auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) übertragen. Die Bindung an das Zielprotein erfolgt durch eine Ubiquitin-Protein Ligase (E3) (Abb.2-2). Dabei bildet das C-terminale Glycin von Ubiquitin eine Isopeptidbindung zu einer Lysin-ε-Aminogruppe des Substrates. Bislang konnten zwei Klassen von E3 Enzymen mit jeweils konservierten Domänen unterschieden werden. E3-Enzyme die HECT-Domänen enthalten, wie E6-AP, bilden eine Thioesterbindung mit Ubiquitin und übertragen es dann auf das Substrat (Huibregtse *et al.*, 1993; Scheffner *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu arrangieren RING-Finger E3's das E2-Enzym und das Substrat räumlich so, dass das Ubiquitin direkt vom E2 auf das Substrat übertragen werden kann (Weissman, 2001). Der RING-Finger ist eine durch die Koordination von zwei  $Zn^{2+}$ -Ionen stabilisierte Protein-Protein Wechselwirkungsdomäne, die in zahlreichen Proteinen gefunden wird. Darunter ist eine steigende Anzahl von Proteinen, welche als Ubiquitin-Protein Ligasen identifiziert wurden, wie c-CBL, MDM2, VHL oder Komplexe wie der SCF-Komplex oder der APC (Joazeiro und Weissman, 2000). Das c-CBL Protein ist ein Proto-Onkogen das aktivierte Rezeptor-Tyrosin-Kinasen erkennt, ubiquitiniert und somit das Signal beendet. MDM2 ist ein Phosphoprotein des Zellkerns welches das Wachstumssuppressorprotein p53 negativ reguliert, indem es p53 bindet und ubiquitiniert. Das VHL-Protein ist ein Tumorsuppressorprotein das mit dem von-

Hippel-Lindau Syndrom assoziiert ist und an den ElonginC-ElonginB Komplex bindet. Zu den Multi-Protein-Komplexen gehören die *Skp1-cullin-F-box* Ubiquitin-Protein-Ligase (SCF), welche unter anderem die Initiation der DNA-Replikation am G<sub>1</sub>/S-Phasen-Übergang steuert, und der für den Beginn der Anaphase und das Ende der Mitose verantwortliche *Anaphase-promoting Complex* (APC).

Gegenüber der grossen Anzahl identifizierter E3-Proteinen konnte bislang nur ein einziges Ubiquitin-aktivierendes Enzym, E1/Uba1, beschrieben werden. Ubiquitin-konjugierende Enzyme sind mehrere bekannt, beispielsweise die mit dem APC interagierenden Proteine Ubc4 und UbcH10 (Weissman, 2001).

Die Poly-Ubiquitinierung der Substratproteine durch die E3-Enzyme erfolgt entweder durch Bildung von Ubiquitin-Ketten, indem an die Lys 48 Seitenkette von bereits gebundenem Ubiquitin ein weiteres Ubiquitin angehängt wird, oder durch die gleichzeitige Ubiquitinierung mehrerer Lysin-Seitenketten des Substrates.

### 2.1.3 Der *Anaphase-promoting Complex*

Der *Anaphase-promoting Complex* (APC), auch als Cyclosom bezeichnet, ist eine Ubiquitin-Protein Ligase (E3), die wichtige Übergänge im Zellzyklus kontrolliert (Peters, 1998; Page und Hieter, 1999; Peters, 1999; Weissman, 2001). Im Gegensatz zu anderen E3-Komplexen mit maximal 5 Untereinheiten (SCF, VHL) ist der humane APC mit 11 bekannten Untereinheiten ein ungewöhnlich großer Komplex ( $M_r \sim 870\ 000$ ). Die dreidimensionale Struktur des humanen APC konnte von Gieffers *et al.* durch Kryo-Elektronenmikroskopie mit einer Auflösung von 24 Å ermittelt werden (Gieffers *et al.*, 2001) (Abb. 2-3).

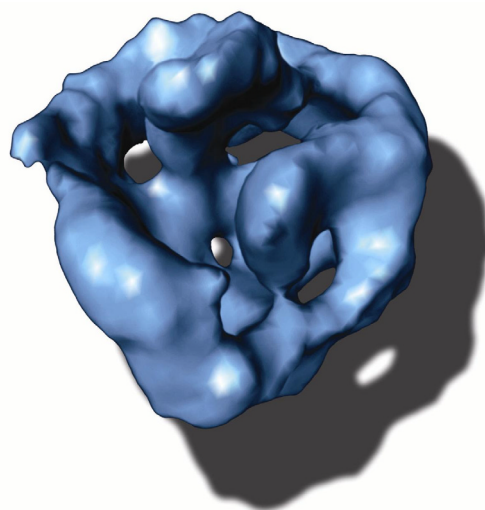
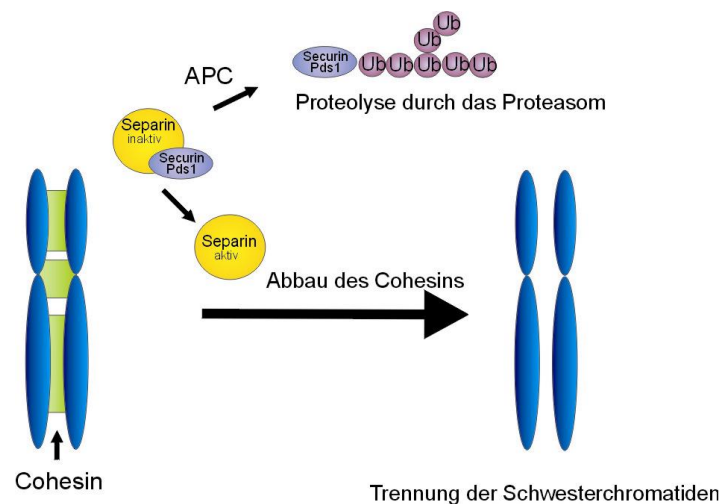


Abbildung 2-3: Dreidimensionale Struktur des APC ermittelt durch Kryo-Elektronenmikroskopie nach Gieffers *et al.*, 2001.



Die 11 Untereinheiten des humanen APC bilden einen Proteinwall, welcher eine innere Kammer umschließt. Dieser Innenraum wird als Reaktionskammer für die Ubiquitinierungsreaktion diskutiert, da er groß genug ist, um Substratproteine und das ubiquitinierte E2-Enzym aufzunehmen.

Der APC ist fast während des ganzen Zellzyklus aktiv. Am Ende der Metaphase wird er aktiviert und erst am Übergang der darauffolgenden G<sub>1</sub> zur S-Phase wieder inaktiviert (Fang *et al.*, 1998; Kramer *et al.*, 1998) (Abb. 2-4).



**Abbildung 2-4: Einleitung der Schwesterchromatidentrennung durch den APC.** Die Cystein-Protease Separin (Separase) wird durch die ubiquitinabhängige Proteolyse des Anaphasen-Inhibitors Securin (Pds1) aktiviert.

Während der Metaphase sind die Schwesterchromatiden bei Hefen noch über ihre ganze Länge, bei Vertebraten jedoch nur in Centromernähe, durch den Cohesin-Komplex verbunden (Hirano, 2000; Amon, 2001; Cohen-Fix, 2001). Die Auflösung des Cohesin-Komplexes erfolgt durch die Cystein-Protease Separase (Esp1), die auch als Separin bezeichnet wird. Die Separase ist bis zu diesem Stadium des Zellzyklus durch die Bindung eines Securins (Pds1) inaktiviert (Abb. 2-4). Die Ubiquitinierung des Securins durch den APC und die folgende Proteolyse aktivieren die Separase und die Chromatidentrennung wird eingeleitet. Die Beendigung der Mitose sowie der Metaphasen/Anaphasen-Übergang erfordert die Inaktivierung von mitotischen cyclin-abhängigen Protein-Kinasen (Cdk). Der APC markiert die aktivierenden B-Typ Cycline dieser Cdk's für die Proteolyse, was zur deren Inaktivierung führt. Weitere Ubiquitinierungssubstrate des APC sind A-Typ Cycline, Polo-ähnliche Kinasen, Spindel-assoziierte Proteine wie Ase1 oder Kip1, APC-Aktivatoren wie Cdc20 und auch Inhibitoren der DNA-Replikation wie Geminin (Peters, 1999).

Die Erkennung des Substrates durch den APC erfolgt anhand zweier unterschiedlicher konservierter Sequenzmotive, der D-box oder der KEN-box. Als D-box (*destruction-box*) wird ein Motiv von neun Aminosäuren mit der Sequenz R-X-X-L-X-X-X-X-N am Aminoterminus des Substrates bezeichnet (Glotzer *et al.*, 1991). Die KEN-box ist ein ebenfalls N-terminal lokalisiertes Motiv aus sieben Aminosäuren mit der Sequenz K-E-N-X-X-X-N, das beispielsweise in B-Typ Cyclinen gefunden wurde (Pfleger und Kirschner, 2000). Die Aktivität des APC ist wahrscheinlich nicht auf Zellzyklusproteine beschränkt. Hinweis dafür ist die Expression der verschiedenen APC-Untereinheiten in den meisten Geweben, auch wenn die Mehrheit der Zellen dort ausdifferenziert sind und sich nicht mehr teilen (Jorgensen *et al.*, 2001).

#### 2.1.4 Regulation von Aktivität und Substratspezifität des APC

Die Vielfalt der Substrate des APC in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus erfordert eine präzise zeitliche Regulation von Aktivität und Substratspezifität des APC. Dabei agieren aktivierende und hemmende Proteine (Tab.2-1) in engem Zusammenspiel mit Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen. Die bisher am besten charakterisierten Cofaktoren des APC sind die aktivierenden WD40-Proteine Cdc20 und Cdh1, sowie die APC-Inhibitoren Mad2 und Emi2.

Die Aktivierung des APC in der Metaphase erfordert die Phosphorylierung von APC-Untereinheiten durch Polo-ähnliche Kinasen (Charles *et al.*, 1998; Descombes und Nigg, 1998; Nigg, 1998; Shirayama *et al.*, 1998; Kotani *et al.*, 1999) aber auch die Bindung von Cdc20. Der aktivierte APC<sup>Cdc20</sup>-Komplex ubiquitiniert D-box-Substrate wie das Securin Pds1. Am Ende der Metaphase wird die Substratspezifität des APC durch Aktivierung mit unphosphoryliertem Cdh1 statt mit Cdc20 erweitert, so dass auch KEN-box Substrate wie die B-Typ Cycline prozessiert werden können. Da die Aktivierung von APC<sup>Cdh1</sup> erst zeitlich nach APC<sup>Cdc20</sup> und nach Abschluss der Chromatidentrennung erfolgen darf, wird Cdh1 bereits im frühen Zellzyklus, am Übergang G<sub>1</sub>-S-Phase, durch eine Cyclin A abhängige Proteinkinase phosphoryliert und somit inaktiviert (Zachariae *et al.*, 1998; Lukas *et al.*, 1999; Sorensen *et al.*, 2001). Erst am Ende der Mitose wird eine Cdh1-spezifische Phosphatase, Cdc14, aktiviert, welche Cdh1 dephosphoryliert und somit aktiviert (Visintin *et al.*, 1998; Jaspersen *et al.*, 1999; Bembenek und Yu, 2001).

Ein weiterer Überwachungsmechanismus der die Aktivierung des APC verhindert, so lange die mitotische Spindel nicht voll funktionsfähig ist, ist der *spindle checkpoint* (Li *et al.*, 1997; Fang *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 1999; Dobles *et al.*, 2000; Shah und

Cleveland, 2000). Bisher konnte gezeigt werden, dass dieser *checkpoint* durch nicht an Chromatiden gebundene Kinetochore sowie durch fehlende Spannung der Mikrotubuli aktiviert wird (Gorbsky, 2001). Eine Komponente dieses *checkpoints* ist MAD2, ein APC-Inhibitor der an den APC<sup>CDC20</sup>-Komplex bindet und ihn inaktiviert, solange der *spindle checkpoint* aktiviert ist (Li *et al.*, 1997; Fang *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 1999; Dobles *et al.*, 2000). Weitere Komponenten des Checkpoints, die bereits in Hefen und Vertebraten identifiziert werden konnten, sind Mad1, Mad3, Bub1, BubR1, Bub2, Bub3 und Msp1

(He *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 1998; Brady und Hardwick, 2000; Hu *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2001). Über die einzelnen Proteine ist bislang nur sehr wenig bekannt. Für BubR1 wurde eine Bindung an Cdc20 nachgewiesen, wodurch der APC nicht aktiviert werden kann (Tang *et al.*, 2001). Weiterhin wurde ein MAD2-ähnliches Protein Mad2B identifiziert, welches an APC<sup>Cdh1</sup> bindet und diesen Komplex inhibiert (Chen und Fang, 2001; Pflieger *et al.*, 2001). Damit ist die Beschreibung der APC-Regulation auf keinen Fall vollständig. Es werden immer weitere APC-Regulatoren gefunden, wie der APC-Inhibitor Emi1, welcher kürzlich in Xenopus-Eiern identifiziert wurde. Emi1 kann den APC<sup>Cdc20</sup> Komplex sowie den APC<sup>Cdh1</sup> Komplex unabhängig vom *spindle checkpoint* inhibieren (Reimann *et al.*, 2001a; Reimann *et al.*, 2001b).

**Tabelle 2-1: APC-Regulatoren in verschiedenen Spezies**

Spezies	<i>H. sapiens</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>X. laevis</i>	MW [kDa] <sup>1</sup>
Aktivatoren	CDC20	Cdc29	Slp1	Fizzy	-	55
	CDH1	Hct1/Cdh1	Srw1/Ste9	Fizzy-related	-	55
Inhibitoren	MAD2	Mad2	Mad2	-	-	24
	-	-	-	Real	Emi1	-

<sup>1</sup> MW - Molekulargewicht des humanen Proteins.

### 2.1.5 Die 11 Untereinheiten des humanen APC

Die Nomenklatur der APC-Untereinheiten ist sehr unterschiedlich. Einige Untereinheiten sind in den verschiedenen Spezies unter mehreren Namen beschrieben. In dieser Arbeit bezeichnen Untereinheiten in Grossbuchstaben wie APC11 die humanen Proteine und Bezeichnungen wie Apc11 bezeichnen die Untereinheiten allgemein.

**Tabelle 2-2: APC-Untereinheiten in den verschiedenen Spezies nach Peters, 1999**

<i>Spezies</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>A. nidulans</i>	MW [kDa] <sup>1</sup>
APC	APC1/Tsg24	Apc1	Cut4	BIME	200
Untereinheiten	APC2	Apc2	-	-	105
	APC3/CDC27	Cdc27	Nuc2	BIMA	94
	APC4	Apc4	Cut20	-	92
	APC5	Apc5	-	-	75
	APC6/CDC16	Cdc16	Cut9	BIMH	70
	APC7	-	-	-	62
	APC8/CDC23	Cdc23	-	-	60
	-	Apc9	-	-	-
	APC10/DOC1	Apc10/Doc1	Apc10	-	24
	APC11	Apc11	-	-	10
	CDC26	Cdc26	Hcn1	-	14
	-	Apc13	-	-	-

<sup>1</sup> MW - Molekulargewicht des humanen Proteins

### APC2 und APC11

Bislang konnte nur zwei Untereinheiten des APC eine Funktion zugewiesen werden. Ein Komplex aus APC2 und APC11 ist reicht in Gegenwart von UBC4 oder UbcH10 aus, um verschiedene APC-Substrate zu ubiquitinieren. Dieser minimale rekonstituierte APC besitzt keine Substratspezifität, es kommt nicht nur zur Ubiquitinierung der angebotenen Substrate sondern auch zu Multi-Ubiquitin-Ketten, die nicht an Substratprotein gebunden sind, oder sogar zur Ubiquitinierung von APC11 selbst (Tang *et al.*, 2001). Außerdem wurde für Apc11p (*S. cerevisiae*) (Leverson *et al.*, 2000) und APC11 (*H. sapiens*) (Gmachl *et al.*, 2000) allein eine Ubiquitinierungsaktivität nachgewiesen, wenn UBC4 als E2 zur Verfügung steht. APC11 enthält eine RING-H2-Domäne in der ein Cluster aus sechs Cysteinen sowie zwei Histidinen zwei Zinkatome koordiniert (Zachariae *et al.*, 1996; Ohta *et al.*, 1999; Gmachl *et al.*, 2000). APC11 sowie seine Homologen in anderen E3-Komplexen binden an Proteine die Cullin-Domänen enthalten. Cullin-Proteine sind essentiell für die Ubiquitinierung von G1-Cyclinen, CDK-Inhibitoren und weiteren wichtigen regulatorischen Proteinen in Hefe und Mammalia. In anderen RING-Finger E3-Proteinen die Cullin-Domänen enthalten sind diese Domänen essentiell für die Rekrutierung von E2-Enzymen. Eine der APC Untereinheiten, APC2, enthält eine C-terminale Cullin-Domäne, die an das E2-Protein UbcH10 bindet (Yu *et al.*, 1998; Ohta *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2001).

### **Die *tetratricopeptide-repeat* (TPR) Untereinheiten**

Vier der APC-Untereinheiten, APC3/CDC27, APC6/CDC16, APC8/CDC23 und die nur von Vertebraten bekannte Untereinheit APC7, enthalten mehrfach vorkommende 34 Aminosäuren lange Motive, die sogenannten *tetratricopeptide repeats* (TPR). Wahrscheinlich funktionieren Proteine mit TPR-Domänen als „Gerüstproteine“ und koordinieren als Protein-Protein-Wechselwirkungsmodule den Zusammenbau von Multi-Protein-Komplexen wie dem APC (Das *et al.*, 1998; Blatch und Lassle, 1999). Hinweise dafür sind das Vorhandensein dieser Domänen in verschiedenen heterooligomeren Proteinkomplexen und die Blockierung der Bildung eines stabilen APC-Komplexes bei Mutationen in den TPR-Domänen von Cdc27 in *S. cerevisiae* sowie *S. pombe* (Lamb *et al.*, 1994; Lamb *et al.*, 1995; Peters, 1999). Die Kristallstrukturen verschiedener TPR-Domänen-Proteine wie der humanen Protein-Phosphatase 5 (PP5) (Das *et al.*, 1998) oder des Hsp70-Hsp90 Komplexes (Scheufler *et al.*, 2000) zeigen, dass jedes TPR-Motiv aus einem Paar antiparalleler  $\alpha$ -Helices besteht, die bei bis zu 16 Wiederholungen des Motivs aneinandergereiht eine rechtsgängige helikale Struktur mit einer amphipatischen Rinne bilden. Diese Rinne ist hervorragend für die Bindung von Proteinen, aber auch anderer Moleküle geeignet (Abb. 4-11).

### **APC1, APC4, APC5, APC9 und CDC26**

Von diesen Untereinheiten ist bisher nur bekannt, dass sie essentielle Untereinheiten des APC sind, ihre Funktion im Komplex ist jedoch unklar. Apc1 (Jorgensen *et al.*, 2001) ist mit 200 kDa die größte APC-Untereinheit und CDC26 ist mit 14 kDa die kleinste (Gmachl *et al.*, 2000). Bis auf Apc9, das bisher nur in *S. cerevisiae* gefunden wurde, sind alle Untereinheiten für Hefen und Vertebraten charakterisiert (Peters, 1999; Zachariae und Nasmyth, 1999).

### **APC10/ DOC1**

Eine weitere essentielle Komponente der APC Aktivität ist die Apc10 Untereinheit, auch als Doc1 bezeichnet (Irniger *et al.*, 1995; Hwang und Murray, 1997; Kominami *et al.*, 1998). Sie wurde zuerst in *S. cerevisiae* bei der Suche nach Mutanten mit einem Defekt in der Proteolyse mitotischer Cycline identifiziert (Irniger *et al.*, 1995; Zachariae und Nasmyth, 1996; Hwang und Murray, 1997). In *S. pombe* wurde Apc10 ebenfalls anhand von Mutanten identifiziert, die Sterilität sowie Defekte in der Chromosomentrennung zeigten (Kominami *et al.*, 1998; Zachariae *et al.*, 1998). Die Mutanten sind temperatursensitiv, so dass sie bei Temperaturerhöhung von 25 auf 37°C in der Mitose arretieren. Apc10/Doc1

Deletionsmutanten bei *S. pombe* sind lebensfähig aber das Ende der Mitose und das gesamte Wachstum sind verzögert.

Mittlerweile konnten hochkonservierte Apc10 Homologe in verschiedenen Spezies identifiziert werden, darunter *Homo sapiens*, *Xenopus laevis*, *Mus musculus* und *Drosophila melanogaster*. Mäuse die homozygot für ein defektes Gen für das Apc10 Protein sind, zeigen einen im Embryonalstadium letalen Phänotyp, auch als Oligosyndactylismus bezeichnet, der auf einer Blockade des Metaphasen/Anaphasen-Übergangs beruht. Bei diesem durch Strahlung hervorgerufenen Gendefekt wurden die ersten 38 Aminosäuren des Apc10 deletiert (Pravtcheva und Wise, 2001).

Experimente am humanen APC10 zeigten, dass APC10 eine echte Untereinheit des humanen APC und kein vorübergehend assoziiertes Regulatorprotein ist (Grossberger *et al.*, 1999; Kurasawa und Todokoro, 1999). Einige Proteinsequenzen mit bislang unbekannter Funktion, wie KIAA0076, KIAA0708, RJS/HERC2 (Lehman *et al.*, 1998) und PAM (Guo *et al.*, 1998), enthalten eine Region mit Sequenzhomologie zu APC10/DOC1 welche als DOC-Domäne bezeichnet wird. Einige dieser Proteine enthalten zusätzlich eine Cullin-Domäne, eine HECT-Domäne oder eine RING-H2 Domäne (Grossberger *et al.*, 1999). Da diese Domänen von anderen Ubiquitin-Protein-Ligasen bekannt sind, spielt Apc10/Doc1 möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Ubiquitinierungsreaktion (Peters, 1999).

Über die Lokalisation von APC10 im APC ist wenig bekannt. Es gibt Hinweise, dass APC11 und APC10 miteinander interagieren, da APC11 und APC10 copräzipitiert werden können (Tang *et al.*, 2001).

## 2.2 Die Glutaconyl-Coenzym A Decarboxylase aus *Acidaminococcus fermentans*

### 2.2.1 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter

Im Stoffwechsel vieler Prokaryonten spielen elektrochemische Gradienten eine wichtige Rolle. Sie stellen einen wichtigen Kopplungsmechanismus zwischen exergonischen und endergonischen Prozessen dar. Chemische Energie oder Lichtenergie wird in Form von Protonengradienten oder Na<sup>+</sup>-Gradienten gespeichert und treibt endergonische Prozesse wie ATP-Synthese, Flagellenbewegung oder die Aufnahme von Wasser gegen einen Salzgradienten an. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter sind in der Cytoplasmamembran der meisten Zellen von Prokaryonten bis zum Menschen, höheren Pflanzen und in den Membranen vieler eukaryontischer Organellen vorhanden. Sie wurden zuerst von Peter Mitchell und Kollegen entdeckt und sind sehr weit verbreitet (West und Mitchell, 1974). Besonders in marinen, halophilen, alkalophilen Organismen sowie Bakterien des Magen-Darm-Traktes sind sie für die Aufrechterhaltung des pH-Wertes sowie des osmotischen Gleichgewichtes, die Na<sup>+</sup>-abhängige Energiekonservierung, aber auch den Ionen-Wasser Kotransport verantwortlich (Dimroth, 1987).

### 2.2.2 Energiegewinnung durch Decarboxylierung

Anaerobe und fakultativ anaerobe Bakterien gewinnen ihre Energie unter Anderem durch die Fermentation von Substraten wie Citrat, Lactat, Succinat oder Glutamat. Die frei werdende Energie der Decarboxylierungsschritte in diesen Stoffwechselwegen wird oft in Form eines Na<sup>+</sup>-Gradienten gespeichert. Prominente Vertreter von endergonischen Prozessen in höheren Organismen, die ebenfalls durch Energie aus Decarboxylierungsreaktionen angetrieben werden, sind die Fettsäurebiosynthese und die Synthesen von Phosphoenolpyruvat, Sphingosin und  $\delta$ -Aminolaevulinat, welche durch die Decarboxylierung von Malonyl-CoA, Oxaloacetat, Serin und Glycin angetrieben werden. Zu einer Klasse von Na<sup>+</sup>-abhängigen Ionenpumpen, die ihre Energie aus der Decarboxylierung von  $\beta$ -Ketosäuren und deren Analoga beziehen, gehören die biotinabhängigen Decarboxylasen: Oxalacetat-Decarboxylase aus den Enterobakterien *Klebsiella Pneumoniae* und *Salmonella typhimurium*, Malat-Decarboxylase aus *Malomonas rubra*, Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase aus *Veilonella Parvula* und *Propiogenium modestum*, sowie die Glutaconyl-CoA Decarboxylase aus den anaeroben Bakteriestämmen *Acidaminococcus fermentans* und *Fusobakterium nucleatum*. Die freie Energie dieser Decarboxylierungen beträgt  $\Delta G^0 = 30$  kJ/mol und genügt, um pro erzeugtem CO<sub>2</sub> ein Na<sup>+</sup> im Austausch gegen 1-2 H<sup>+</sup> vom Cytosol in das Periplasma zu transportieren. Für *Propiogenium modestum* konnte nachgewiesen werden, dass die freien Energie der

Decarboxylierung von Methylmalonyl-CoA zu Propionyl-CoA, die in dem  $\text{Na}^+$ -Gradienten gespeichert ist, von einer  $\text{Na}^+$ -abhängigen  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATPase zur ATP-Synthese eingesetzt wird (Hilpert und Dimroth, 1984; Bott *et al.*, 1997). Das in dieser Arbeit beschriebene Protein Glutaconyl-CoA Decarboxylase aus *Acidaminococcus fermentans* ist in der Lage die bei der Decarboxylierung von Glutaconyl-CoA frei werdende chemische Energie in einem  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Gradienten zu speichern. Glutaconyl-CoA ist ein Zwischenprodukt beim Abbau von Glutamat.

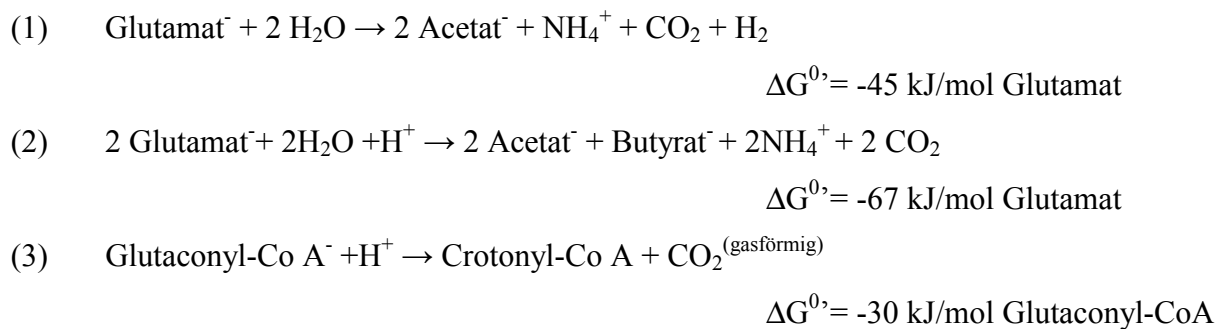
### 2.2.3 Die Fermentation von Glutamat zu Acetat

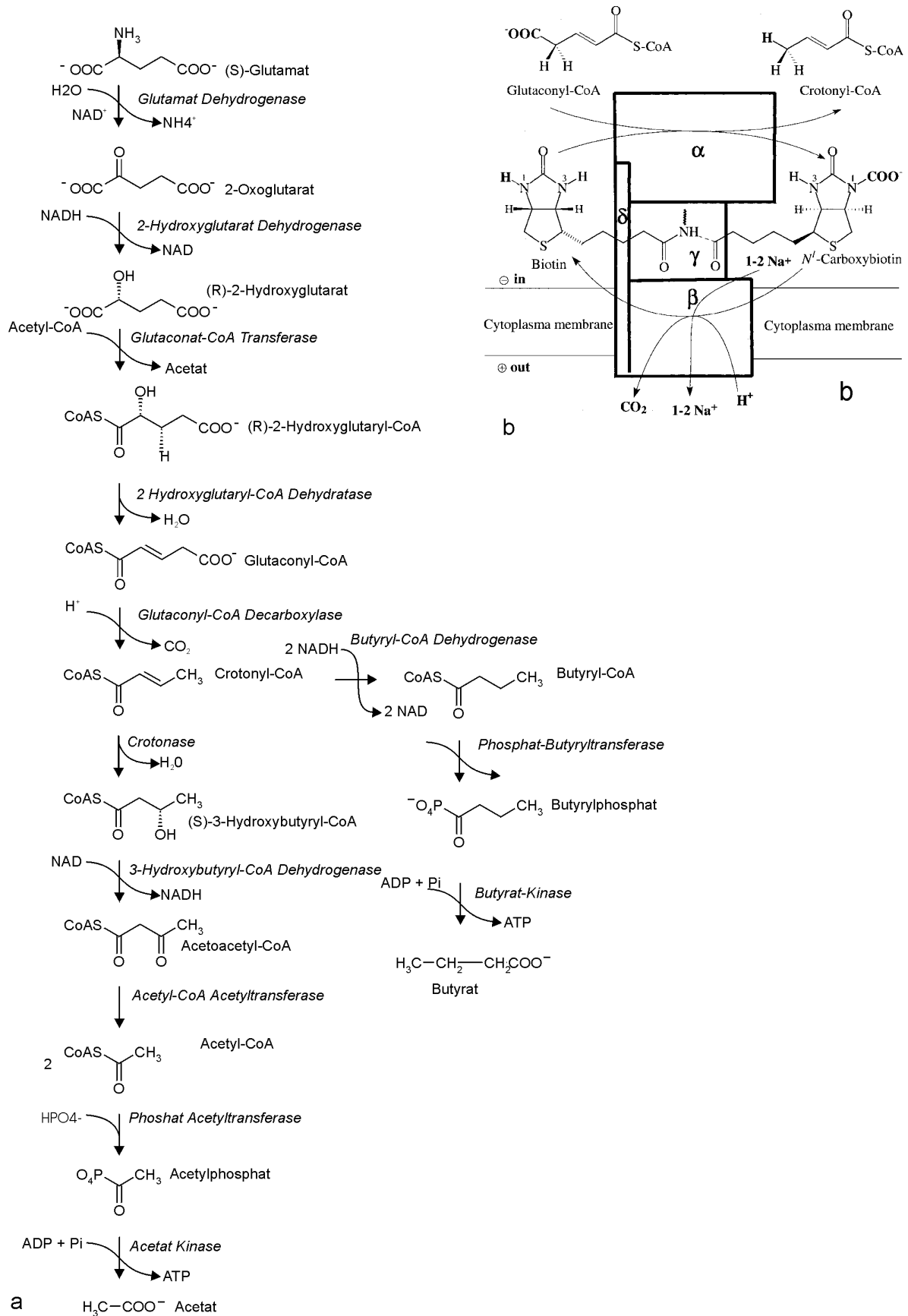
Einige strikt anaerobe Bakterien wie *Acidaminococcus fermentans* können Glutamat bei Abwesenheit anderer Quellen als einzige Kohlenstoffquelle verwerten. Für die Fermentation von Glutamat zu Ammoniak,  $\text{CO}_2$ , Acetat und  $\text{H}_2$  sind zwei unterschiedliche Wege beschrieben, die jedoch zu identischen Produkten führen (Gleichung 1) (Buckel und Barker, 1974; Buckel, 2001a). Der Methylaspartat-Weg ist vom Coenzym  $\text{B}_{12}$  abhängig und wird von nahe verwandten Bodenbakterien wie beispielsweise *Clostridium tetani* oder *Clostridium tetanomorphum* beschriftet. Von Coenzym  $\text{B}_{12}$  unabhängig ist dagegen der Hydroxyglutarat-Weg, welcher bei Bakterien aus anaeroben Nischen von Mensch und Tier, z.B. bei *Acidaminococcus fermentans* oder *Fusobacterium nucleatum*, vorkommt (Buckel und Barker, 1974). Das in dieser Arbeit beschriebene Enzym aus *Acidaminococcus fermentans*, Glutaconyl-CoA Decarboxylase ist an der Umsetzung von Glutamat über den Hydroxyglutarat-Weg beteiligt (Abb. 2-5 a). Glutamat wird zuerst durch oxidative Desaminierung unter Verwendung von  $\text{NAD}^+$  zu 2-Oxoglutarat sowie Ammoniak oxidiert. Oxoglutarat wird dann zu (R)-2-Hydroxyglutarat reduziert. Glutaconat-CoA Transferase katalysiert die Bildung von (R)-2-Hydroxyglutaryl-CoA aus Acetyl-CoA, wobei Acetat frei wird (Buckel *et al.*, 1981b; Jacob *et al.*, 1997). Die folgende Dehydratisierung von (R)-2-Hydroxyglutaryl-CoA zu Glutaconyl-CoA wird durch die FMN-abhängige 2-Hydroxyglutaryl-CoA Dehydratase, welche einen [4Fe-4S] Eisen-Schwefel-Cluster enthält, unter Verbrauch von ATP katalysiert (Buckel, 1980a; Muller und Buckel, 1995). Die Decarboxylierung von Glutaconyl-CoA zu Crotonyl-CoA wird durch die Glutaconyl-CoA Decarboxylase katalysiert (Gleichung 3). Crotonyl-CoA kann zu (S)-3-Hydroxybutyryl-CoA umgesetzt werden oder zu Butyryl-CoA. Der Weg über (S)-3-Hydroxybutyryl-CoA zu Acetyl-CoA bzw. Acetat wird durch Crotonase, 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase, Acetyl-CoA Acetyltransferase, Phosphat-Acetyltransferase und Acetat-Kinase katalysiert (Weg nach Wohlfarth und Buckel, 1985; Mack *et al.*, 1994 und Schweiger *et al.*, 1987)



(Gleichung 1). Der zweite, über Butyryl-CoA zu Butyrat führende Weg, wird durch Phosphat-Butyryltransferase und Butyrat-Kinase katalysiert (Gleichung 2). Das Verhältnis zwischen den entstehenden Endprodukten Acetat und Butyrat kann durch die extrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration beeinflusst werden (Hartel und Buckel, 1996). Unter physiologischen Bedingungen wurde ein Verhältnis von 3:1 zwischen Acetat und Butyrat beobachtet, so dass sich aus 1 mol Glutamat 1,2 mol Acetat, 0,4 mol Butyrat, 0,2 mol  $\text{H}_2$  und 0,6 mol ATP ergeben (Hartel und Buckel, 1996). Härtel und Buckel postulierten 1996 einen Mechanismus der die extrazelluläre Wasserstoffbildung erklärt (Hartel und Buckel, 1996). Dabei wird das bei der Oxidation von (S)-3-Hydroxybutyryl-CoA zu Acetoacetyl-CoA durch die 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase gebildete NADH durch eine membranständige NADH Dehydrogenase oxidiert und zwei frei werdende Elektronen pro NADH auf eine extrazelluläre Hydrogenase übertragen. Diese Hydrogenase reduziert zwei Protonen im extrazellulären Raum unter Bildung von  $\text{H}_2$ . Im Cytoplasma werden die bei der Oxidation von NADH freigesetzten Protonen bei der Decarboxylierung von Carboxybiotin verbraucht (Abb. 2-5 b und Abschnitt 2.2.5) (Hartel und Buckel, 1996; Buckel, 2001b).

Bei der Fermentation von Glutamat zu Acetat wird insgesamt eine Energie von 45 kJ pro mol Glutamat frei (Gleichung 1) und bei der Fermentation von Glutamat zu Butyrat eine Energie von -67 kJ/mol Glutamat (Gleichung 2). Der größte Anteil der frei werdenden Energie (30 kJ/mol Glutamat) stammt dabei aus der Debarboxylierung von Glutaconyl-CoA zu Crotonyl-CoA (Gleichung 3) durch die membranständige Glutaconyl-CoA Decarboxylase.





**Abbildung 2-5: Glutamat-Fermentation bei Acidaminococcus Fermentans.** **a)** Glutamat-Fermentation nach dem Hydroxyglutarat-Weg in *Acidaminococcus fermentans*, *Fusobacterium nucleatum* und anderen anaeroben Bakterien (Buckel und Barker, 1974; Buckel, 1980a). **b)** Theoretisches Modell der Glutaconyl-Coenzym A Decarboxylase, das eine mögliche Anordnung der vier Untereinheiten, deren Funktionen, sowie die Integration des Enzyms in die Cytoplasmamembran zeigt (Abbildung aus Buckel, 2001).

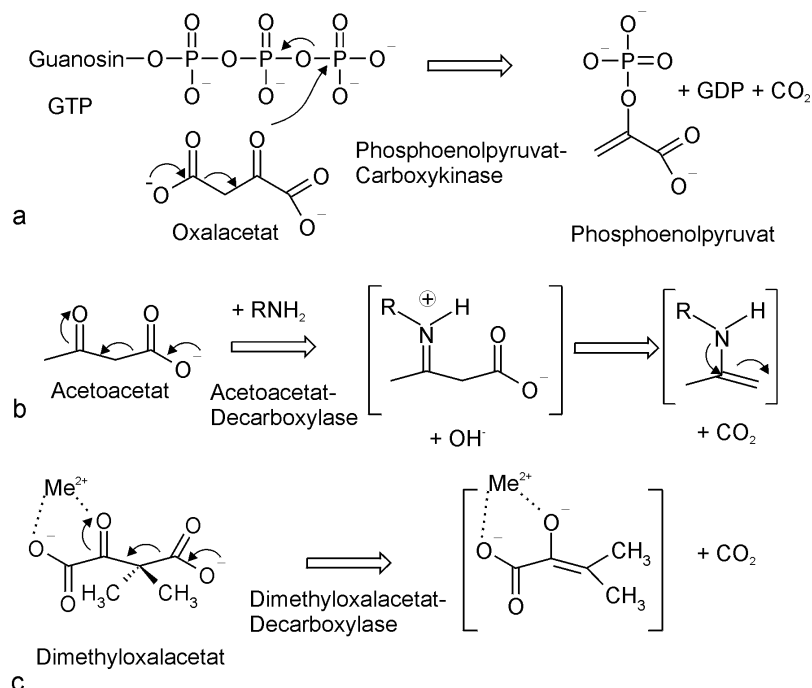
#### 2.2.4 Glutaconyl-CoA Decarboxylase aus *Acidaminococcus fermentans*

Glutaconyl-CoA Decarboxylase ist ein Schlüsselenzym der Glutamat-Fermentation in dem strikt anaeroben Bakterium *Acidaminococcus fermentans*, welches aus dem Intestinum von Schweinen und dem Rinderrumen isoliert wurde (Cheeseman und Fuller, 1966; Rogosa, 1969; Cook *et al.*, 1994). Die Reinigung des nativen Proteins und der Na<sup>+</sup>-Transport der Glutaconyl-CoA Decarboxylase durch die Cytoplasmamembran wurde zuerst von Buckel *et al.* (Buckel und Semmler, 1982) beschrieben. Die Kopplung von Decarboxylierungsreaktion und Membrantransport wurde anhand der nativ gereinigten und in Phospholipidvesikeln rekonstituierten Glutaconyl-CoA Decarboxylase untersucht (Buckel und Semmler, 1983). Wie die verwandten Na<sup>+</sup>-transportierenden Decarboxylasen Oxaloacetat-Decarboxylase und Methylmalonyl-CoA Decarboxylase besteht Glutaconyl-CoA Decarboxylase aus vier verschiedenen Untereinheiten (Abb. 2-5 b) mit noch unbekannter Stöchiometrie, der Carboxytransferase-Untereinheit (65 kDa) GcdA, der Carboxybiotin-Decarboxylase (36 kDa) GcdB, der Biotin-tragenden Untereinheit GcdC (24 kDa) und GcdD (14 kDa) (Braune *et al.*, 1999). Biotinabhängige Decarboxylasen wie die Glutaconyl-CoA Decarboxylase katalysieren die Decarboxylierungsreaktion in zwei Schritten. Im ersten Schritt wird das CO<sub>2</sub> von der Carboxytransferase-Untereinheit auf ein kovalent an die ε-Aminogruppe von Lys 112 der GcdG Untereinheit geknüpftes Biotin übertragen. Die GcdA Untereinheit kann die Carboxylierung von freiem Biotin in Gegenwart von Glutaconyl-CoA auch isoliert von den anderen Untereinheiten katalysieren (Braune *et al.*, 1999). Carboxybiotin kann durch Protonierung sehr leicht decarboxyliert werden und ist ein sehr energiereiches Intermediat. Dieser Zwischenschritt ermöglicht es, die räumliche Distanz zwischen dem katalytischen Zentrum der Carboxytransferase und dem katalytischen Zentrum der in der Membran verankerten Carboxybiotin-Decarboxylase GcdB zu überwinden. Im mittleren Teil der Sequenz des Biotin-Carriers GcdC (146 Aminosäuren) befindet sich eine 50 Reste umfassende „Linker-Region“ (Reste 26-75), welche durch einen hohen Gehalt von Prolinen (14 Prolinen und 34 Alanine) wahrscheinlich eine gestreckte Konformation besitzt, aber trotzdem rigide ist (Braune *et al.*, 1999). Die Carboxybiotin-Decarboxylase GcdB formt mit 9 möglichen Transmembran-Helices (Braune *et al.*, 1999; Buckel, 2001b) einen Ionenkanal und transportiert mit der freien Energie aus der Decarboxylierung von Carboxybiotin 1-2 Na<sup>+</sup>/CO<sub>2</sub> im Austausch gegen H<sup>+</sup> durch die Membran. Die GcdD Untereinheit besitzt ebenfalls eine hydrophobe N-terminale Region, die möglicherweise eine membranständige α-Helix bildet (Braune *et al.*, 1999). Ihre Funktion ist unklar, möglicherweise dient sie zur Verankerung der GcdA Untereinheit in der Membran. Lediglich die Methylmalonyl-CoA Decarboxylase

besitzt noch eine weitere sehr kleine  $\epsilon$ -Untereinheit (55 Aminosäuren) mit noch unbekannter Funktion (Huder und Dimroth, 1993). Bislang gibt es in *Acidaminococcus fermentans* keine Hinweise auf eine Kopplung des  $\text{Na}^+$ -Gradienten an eine ATP-Synthese, wie durch die  $\text{Na}^+$ -abhängige  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATPase bei *Propiogenium modestum* (Hilpert und Dimroth, 1984; Bott *et al.*, 1997). In *Acidaminococcus fermentans* konnte jedoch eine  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit der Wasserstoffproduktion durch membranständige NADH Dehydrogenasen (Siehe 2.2.3.) nachgewiesen werden (Buckel und Semmler, 1982; Buckel und Liedtke, 1986b; Hartel und Buckel, 1996).

### 2.2.5 Die biotinabhängige Decarboxylierung

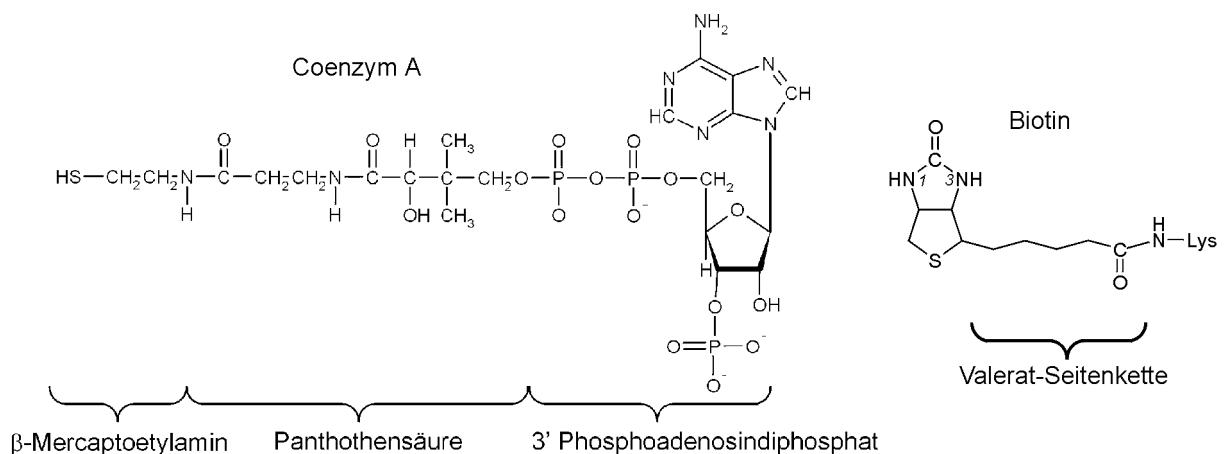
Carboxylasen und Decarboxylasen katalysieren Herstellung oder Spaltung einer Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung, wobei  $\text{CO}_2$  Substrat oder Produkt. Nach der Enzymnomenklatur werden sie den Carboxy-Lyasen zugeordnet (EC 4.1.1.). Bei Decarboxylierungsreaktionen kommt es zu einer Umwandlung eines Carboxylatanions, das an ein  $\text{sp}^3$ -Zentrum gebunden ist, in anorganisches  $\text{CO}_2$  und ein  $\text{sp}^2$ -Zentrum. Die verschiedenen Typen von Carboxylasen unterscheiden sich hinsichtlich der Stabilisierung der negativen Ladung am  $\text{sp}^2$ -Zentrum und dessen weiterer Verwendung.



**Abbildung 2-6: Stabilisierung der Enolat-Übergangszustände bei verschiedenen decarboxylierenden Enzymen.** a) Ausbildung eines phosphorylierten Intermediates bei der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase. b) Ausbildung einer Schiff'schen Base im Übergangszustand bei der Acetoacetat-Decarboxylase c) Stabilisierung des Enolates durch ein zweiwertiges Metallion wie  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  oder wie  $\text{Cu}^{2+}$  bei der Dimethylmalat Decarboxylase. (Voet und Voet, 1992)

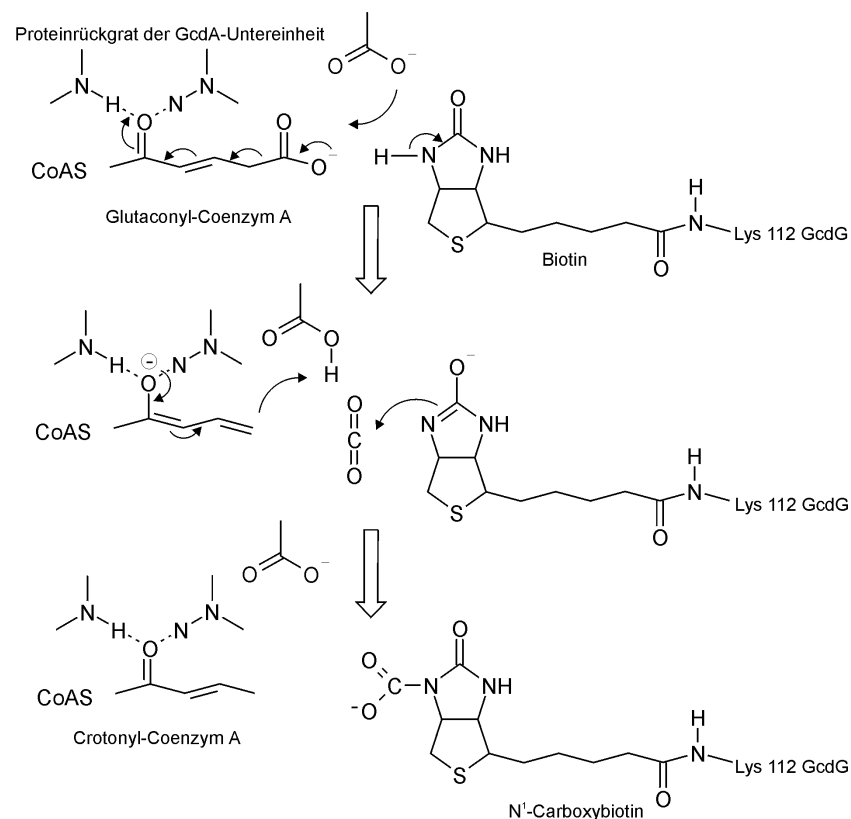
Bei  $\beta$ -Ketocarbonsäuren erfolgt die Decarboxylierung über einen Enolat-Übergangszustand der  $\beta$ -Ketogruppe, welcher durch verschiedene Mechanismen stabilisiert werden kann. Bei der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase wird der Oxyanion-Übergangszustand durch Phosphorylierung abgefangen (Abb. 2-6 a) (Voet und Voet, 1992). Weitere Möglichkeiten sind die vorübergehende Ausbildung einer Schiff-Base zwischen der  $\beta$ -Ketogruppe und einem primären Amin wie beispielsweise bei der Acetoacetat Decarboxylase (Abb. 2-6 b). Weitere in verschiedenen Enzymen gefundene Stabilisierungsmöglichkeiten sind zweiwertige Metallionen wie  $Mg^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  die durch Vermittlung eines Wassermoleküls den Carbonylsauerstoff koordinieren (Abb. 2-6 c) oder die Stabilisierung des Enolates über zwei starke Wasserstoffbrückenbindungen zu Aminogruppen des Proteinrückgrates, wie bei der Methylmalonyl-CoA Decarboxylase aus *Escherichia Coli* (Benning *et al.*, 2000) und möglicherweise auch bei Glutaconyl-CoA Decarboxylase aus *Acidaminococcus fermentans* (Abb.2-8).

Eine Reihe von Decarboxylasen überträgt die Carboxylgruppe zuerst auf Biotin, wodurch ein Teil der Energie, die bei der Decarboxylierung frei wird, im Carboxybiotin gespeichert wird. In einem zweiten Schritt wird das Biotin regeneriert und  $CO_2$  wird frei. Diese Decarboxylasen sind aus mindestens 3 funktionellen Untereinheiten aufgebaut: 1. einer Carboxytransferase (Abb. 2-8), 2. dem Carboxybiotin Carrierprotein und 3. der Biotin-Carboxylase. Biotin (Abb. 2-7) ist ein Ringsystem, in dem ein Imidazolin-Ring an einen Tetrahydrothiophen-Ring, der eine Valerat-Seitenkette trägt, kondensiert ist. Die Carboxylierungsstelle wird dabei von dem am wenigsten sterisch behinderten Stickstoff an Positionen 1 der Ureido-Gruppe gebildet (Abbildungen 2-5 b und 2-7).



**Abbildung 2-7: Die Coenzyme der Glutaconyl-CoA Decarboxylase.** Die Glutaconat-CoA Transferase aktiviert 2-Oxoglutarat durch Übertragung auf Coenzym A. Biotin ist durch seine Valerat Seitenkette an die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins gekoppelt. Das Ringsystem sitzt daher am Ende eines 1,4 nm langen beweglichen Arms, und kann so als Carboxy-Carrier räumliche Distanzen zwischen verschiedenen aktiven Zentren überwinden.

Zu diesen Decarboxylasen gehören auch die unter 2.2.2. beschriebenen  $\text{Na}^+$ -abhängigen Ionenpumpen. Hier wird die Zwischenstufe des Carboxybiotin benutzt, um die räumliche Entfernung zwischen zwei enzymatisch aktiven Zentren zu überwinden. Der Mechanismus erinnert an den Lipoamid-Arm des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (Voet und Voet, 1992). Über die strukturellen Grundlagen dieses *swing over* Mechanismus des Lipoyl-Armes ist noch nichts bekannt. Von biotinabhängigen Decarboxylasen sind schon Kristallstrukturen der Carboxytransferase-Untereinheiten sowie ihrer Biotin-Carriern bekannt, beispielsweise die Strukturen der Biotin-Carboxylase (Waldrop *et al.*, 1994) und der Biotinyl-Domäne (Athappilly und Hendrickson, 1995) der Acetyl-CoA Carboxylase, einem Enzym der Fettsäure-Biosynthese.



**Abbildung 2-8: Postulierter Mechanismus des Carboxytransfers von Glutaconyl-CoA auf Biotin nach Buckel, 2001 (Buckel, 2001b).** Der Oxyanion-Übergangszustand der Carbonylgruppe des Thioesters wird durch Kontakte zu zwei Aminogruppen des Proteinrückgrates der GcdA Untereinheit stabilisiert.

### 2.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Funktion der meisten Untereinheiten des Anaphase-promoting Complex ist noch unklar. Daher sollte das humane APC10 Protein rekombinant exprimiert, gereinigt, kristallisiert und die Kristallstruktur der APC10 Untereinheit gelöst werden. Die Struktur des APC10 Proteins kann als Strukturmodell für die Doc-Domäne dienen. Aus der Kristallstruktur und möglichen Strukturhomologien zu anderen Proteinen sollten Informationen über die Funktion der APC10-Untereinheit im APC-Komplex und über die Interaktion mit anderen APC-Untereinheiten gewonnen werden.

Die Glutaconyl-CoA Decarboxylase ist ein Beispiel für eine Familie von  $\text{Na}^+$ -abhängigen Ionenpumpen. Über die Stöchiometrie der Untereinheiten in diesen Ionenpumpen, sowie über den Mechanismus, mit dem die freie Energie der Decarboxylierung in einen  $\text{Na}^+$ -Gradienten umgewandelt wird, ist nur wenig bekannt. Da das Holoenzym der Glutaconyl-CoA Decarboxylase nur sehr schwer nativ zu reinigen ist und bislang nicht kristallisiert, sollte die rekombinant exprimierte Carboxytransferase-Untereinheit (GcdA) kristallisiert und ihre Struktur, sowie der Substratkomplex gelöst werden. Mit diesen Strukturen sollten möglichst viele Informationen über die GcdA-Untereinheit und auch über das Holoenzym gewonnen werden.

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Bakterienstämme, Plasmide, Oligonucleotide, Enzyme, Medien und Antibiotika

##### Bakterienstämme

<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>F</i> <sup>-</sup> $\phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> ( <i>rK</i> - <i>mK</i> + ) <i>phoA</i> <i>supE44</i> $\lambda$ <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> (Stratagene GmbH, Heidelberg)
<i>E. coli</i> B834(DE3) pUBS250	<i>F</i> <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdsb</i> , ( <i>rb</i> - <i>mb</i> - ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3), <i>metB</i> , pUBS250 ( <i>Cm</i> <sup>R</sup> ) (Brinkmann <i>et al.</i> , 1989) (Novagen, Bad Soden)
<i>E. coli</i> B834	<i>F</i> <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdsb</i> , ( <i>rb</i> - <i>mb</i> -), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>metB</i> (Novagen, Bad Soden)

Der *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  wurde für Klonierungszwecke aber auch für die Expression der Glutaconyl-CoA Decarboxylase GcdA Untereinheit benutzt. Das Selenomethionin-markierte GcdA-Protein wurde in dem Stamm *E. coli* B834 exprimiert. Der Stamm *E. coli* B834(DE3) pUBS250 wurde für die native Expression von APC10 aber auch für die Expression des mit Selenomethionin markierten Proteins verwendet.

##### Plasmide

Das Plasmid pET11d der Firma Novagen (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden) wurde für die Expression von APC10 verwendet. In diesem Vektor steht das zu exprimierende Gen unter der Kontrolle eines T7*lac*-Promotors. Die Carboxytransferase-Untereinheit der Glutaconyl-CoA Decarboxylase wurde mit Hilfe des Expressionsvektors pJF118HE (Furste *et al.*, 1986; Braune *et al.*, 1999) exprimiert, in dem das zu exprimierende Gen unter der Kontrolle eines Ptac Promotors steht.

##### Oligonucleotide

Doc1vorn	5'-TTTTAA <u>CCATGG</u> CTA CAC CAA AC -3' <small><i>NcoI</i></small>
Doc1hin	3'-TT <u>GGATCC</u> TCACC TTA TTGAACG-5' <small><i>BamHI</i></small>
Doc1trunc	3'-GT <u>GGATCC</u> TCAT CTA GGAAATTTA CC-5' <small><i>BamHI</i></small>
T7-Promotor-Primer	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7-Terminator-Primer	3'-ATAGTTATTGCTCAGCGGTG-5'



## Enzyme

Alle verwendeten DNA-modifizierenden Enzyme wurden von New England Biolabs (Schwalbach) bezogen.

## Medien

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium):

1% Trypton,  
0,5 % Hefeextrakt,  
1 % NaCl

Für LB-Agarplatten wurde dem  
LB-Medium noch 15 g/l Agar-Agar  
zugesezt.

SOB-Medium:

2% w/v Trypton,  
0,5 % w/v Hefeextrakt,  
10 mM NaCl,  
0,025 mM KCl

Minimalmedium: Siehe Abschnitt 3.3.2.3.

## Antibiotika

Endkonzentrationen eingesetzter Selektions-Antibiotika:

Ampicillin (Amp)	100 µg/ml
Kanamycin (Kan)	50 µg/ml
Chloramphenicol (Chl)	34 µg/ml

Von allen Antibiotika wurde eine 1000× konzentrierte Stammlösung in Wasser oder bei Chloramphenicol in Ethanol hergestellt, sterilfiltriert und bei –20 °C aufbewahrt.

### 3.1.2 Sonstige Materialien

Die Chemikalien und anderen Verbrauchsmaterialien wurden, wenn nicht anders beschrieben in *p.A.* Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel de Hën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Hampton Research (Laguna Hills, USA), Millipore (Eschborn), Qiagen (Hilden), Stratagene (Heidelberg), BioRad (München) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Gelektrophoresekammern für die horizontale Gelelektrophorese mit Agarose-Gele oder für die SDS-Page-Gelelektrophorese von Proteinen waren Eigenanfertigungen des MPI für Biochemie.

### 3.2 Molekularbiologische Methoden (Sambrook *et al.*, 1989)

#### 3.2.1 Steriles Arbeiten

Alle Lösungen und Medien für molekularbiologische Arbeiten sowie die Proteinexpression wurden vor Verwendung autoklaviert, bzw. sterilfiltriert. Nach Verwendung wurden die mit Bakterien kontaminierten Medien und Geräte nochmals autoklaviert. Alle Puffer wurden mit Wasser von MILLIPORE-Qualität hergestellt, durch Filtration durch eine PVDF-Membran (Porendurchmesser 0,22 µm) sterilisiert und bei Bedarf mit einer Wasserstrahlpumpe entgast.

#### 3.2.2 Ethanolprecipitation von DNA

Um DNA zu konzentrieren oder von Verunreinigungen zu befreien wurde sie einer Ethanol-fällung unterzogen. Zur DNA-Lösung wurden 1/10 des Volumens an 3 M Kaliumacetat-Lösung, pH 5,2, sowie 2,5 Volumina absolutes Ethanol (-20 °C) gegeben und die DNA für 30 min bei -20°C gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (45 min, 12000 rpm, 4 °C) abgetrennt, der Überstand abdekantiert und das Pellet mit 1 ml eiskaltem 70 %igen Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 12000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet luftgetrocknet. Die DNA wurde in TE-Puffer oder in H<sub>2</sub>O aufgenommen.

TE-Puffer:

10 mM Tris/HCl, pH 8,0

1 mM EDTA

#### 3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für diese Arbeit mussten das Gene für die humane APC Untereinheit APC10 aus der cDNA amplifiziert und in einen geeigneten Expressionvektor kloniert werden. Anhand der bekannten Sequenz des APC10 Gens wurden die Primern Doc1vorn (NcoI Schnittstelle + Startmethionin) und Doc1hin (BamHI + Stop) generiert. Durch eine PCR-Reaktion (Saiki *et al.*, 1986) mit den spezifischen Primer Doc1vorn und Doc1hin wurden die Restriktionsschnittstellen NcoI und BamHI, das Codon für das Startmethionin und das Stop-Codon in die für das APC10 Protein codierende Sequenz eingeführt.

Die PCR-Ansätze mit jeweils 25 µl Volumen enthielten 50-100 ng template-DNA, je 3 pmol der 5' und 3'-Primer, 2.5 µl 10×PfuTurbo-Reaktionspuffer (Stratagen, Heidelberg), je 250 µM dATP, dGTP, dCTP und dTTP. Die Ansätze wurden in einem RoboCycler Gradient 96 (Stratagen, Heidelberg) dem folgenden Temperaturprogramm unterworfen:

1× 1' 94 °C  
40'' Gradient 50 bis 61 °C  
4' 72 °C

30× 1' 94 °C  
       40'' Gradient 50 bis 61 °C  
       4' 72 °C  
 1× 10' 72 °C ( ' Minuten, ''Sekunden)

Vor der weiteren Verarbeitung wurde das PCR-Produkt mit dem Qiagen PCR-Purification Kit von überschüssigen Nucleotiden, Enzymen und Salzen gereinigt.

### 3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente können in Abhängigkeit von ihrer Größe mit 0.8 bis 2 %igen Agrosegelelen getrennt werden. Die Agarose wurde in kochendem 1×TAE-Puffer gelöst, auf unter 60°C abgekühlt und nach Zugabe von 1 µg/ml Ethidiumbromid (Molecular Probes Europe BV, Leiden) in eine horizontale Elektrophoresekammer gefüllt. Nach dem Erstarren der Agarose wird die Kammer mit TAE-Puffer gefüllt und die mit 6×Auftragspuffer versetzten DNA-Proben aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei 5-10 V/cm Elektrodenabstand durchgeführt. Die DNA-Fragmente im Gel können mit UV-Licht (sichtbar gemacht werden).

10×TAE-Puffer:	Auftragspuffer:
400 mM Tris/HCl	10 ml 1×TAE-Puffer
100 mM Na-Acetat	80 ml Glycerin (87 %ig)
10 mM EDTA	0,2 g Bromphenolblau
pH 7,8	0,2 g Xylencyanol

### 3.2.5 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Die DNA-Banden wurden mit einer Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem Qiagen Gel Extraction Kit nach der mitgelieferten Anleitung aus dem Gel extrahiert.

### 3.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch eine Absorptionsmessung mit einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine OD<sub>260nm</sub> von 1,0 einer Konzentration von 50 µg DNA/ml, 40 µg RNA/ml und 30 µg Oligonucleotide/ml. Die OD der Proben sollte bei der Messung zwischen 0,1 und 1,0 liegen.

### 3.2.7 Verdau von DNA durch Restriktionsendonucleasen (Sambrook *et al.*, 1989)

Um für eine Ligation geeignete Fragmente zu erhalten oder zur Charakterisierung von Plasmiden wurden 0,5 –2 µg DNA nach den Angaben des Herstellers (NEB, Schwalbach) mit der gewünschten Restriktionsendonuclease sowie dem zugehörigen Puffer versetzt, der Ansatz auf 10 µl aufgefüllt und 1 h bei 37°C inkubiert.

### 3.2.8 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um die Religation von geschnittenen Vektoren zu verhindern wurden die 5' terminalen Phosphatgruppen abgespalten. Zuvor wurden die Restriktionsendonucleasen hitzeinaktiviert, indem der Restriktionsansatz 20 min bei 80 °C inkubiert wurde. Danach wurde der Restriktionsansatz mit 0,5 U calf *intestinal phosphatase* (CIP) pro µg DNA versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die CIP-DNA-Phosphatase wurde durch Inkubation für 10 min bei 65 °C unter Zugabe von 0.5 µl 0.5 M EDTA bei pH 8 inaktiviert.

### 3.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente, wie geschnittene Vektor-DNA oder Insert-DNA, mit komplementären 3'- und 5'-Enden wurden kovalent miteinander verbunden, indem 15 ng der Vektor-DNA im molaren Verhältnis von 1:5 mit der Insert-DNA gemischt und mit 10×T4-DNA-Ligase Puffer sowie 1 U T4-DNA-Ligase versetzt wurden. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16°C.

### 3.2.10 Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen

#### Elektroporation

In einer Elektroporationsküvette mit 0,2 mm Elektrodenabstand (BioRad, München) wurden 40 µl der elektrokompenten Zellen sowie 50 bis 150 ng der entsalzten DNA gemischt und in einem Elektroporator 1000 (BioRad, München) (Ladespannung 1650 V) kurzzeitig einem sehr starken elektrischen Feld ausgesetzt. Die Zellen wurden mit 500 µl 37 °C warmem LB-Medium aufgenommen, 1 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert und anschliessend 50 – 200 µl der Kultur auf einer LB-Agarplatte mit Selektions-Antibiotikum ausgestrichen.

#### Transformation chemisch kompetenter Zellen

Die chemisch kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 50 µl Zellsuspension mit 100 – 200 ng DNA gemischt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert, für 30 s einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und wieder 2 min auf Eis inkubiert.

Die Zellen wurden in 750 µl LB-Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschliessend wurden die Zellen zur Selektion von Transformanten auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum ausgestrichen oder in LB-Medium mit Selektions-Antibiotikum weiter inkubiert.

### 3.2.11 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurde der *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  mit dem gewünschten Plasmid transformiert und damit 10 ml bzw. 50 ml LB-Medium + Selektions-Antibiotikum angeimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Qiagen Mini Kit bzw. dem Qiagen Maxi Prep Kit nach der mitgelieferten Vorschrift.

### 3.2.12 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruchmethode durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977). Die verwendeten Sequenzierungsprimer sind unter 3.1.1. aufgeführt. Für die Sequenzierungsreaktion wurden zu 4  $\mu$ l Big Dye Terminator Mix (Applied Biosystems, München) 3,5 pmol Primer und 0,5  $\mu$ g *Template*-DNA gegeben und mit Wasser auf 10  $\mu$ l aufgefüllt. Die PCR-Reaktion wurde in einem RoboCycler Gradient 96 (Stratagen, Heidelberg) mit dem folgenden Temperaturprotokoll durchgeführt.:

30 $\times$  96 °C 30''  
48 °C 30''  
60 °C 4' ('Sekunden, ''Minuten)

Anschliessend wurden die Reaktionsprodukte mittels Micro-Spin S-200 Säulchen (Pharmacia, Schweden) gereinigt und eine Ethanol-fällung durchgeführt. Die Gelelektrophorese mit anschließender fluoreszenzspektroskopischer Analyse wurde von Marius Bociu (MPI für Biochemie, Martinsried) mit einem ABI Prism DNA-Sequenzator (Modell 373, Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt.

## 3.3 Mikrobiologische Methoden

### 3.3.1 Bakterienkulturen

#### Flüssigkultur von Bakterien

Eine Einzelkolonie wurde mit einer sterilen Impföse von einer Agarplatte abgenommen und in 5 mL steriles LB-Medium mit einem Selektions-Antibiotikum okuliert. Die Kulturen wurden über Nacht in einem Schüttler bei 37 °C inkubiert. Diese Vorkultur kann für Plasmidpräparationen oder zum Animpfen von größeren Kulturen im Verhältnis 1:100 bis 1:1000 genutzt werden.

#### Plattenkultur von Bakterien

LB-Medium wurde mit 15 g/l Agar versetzt und autoklaviert. Vor dem Giessen der Platten wurde das bis auf unter 60 °C abgekühlte Medium mit den erforderlichen Konzentrationen

Antibiotika versetzt. Nach dem Ausplattieren von Bakterien wurden die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bis zur Verwendung wurden die Platten bei 4 °C gelagert.

### **3.3.2 Heterologe Expression von rekombinantem Protein in *E. coli***

#### **3.3.2.1 Expression von APC10 und APC $\Delta$ C14 in unlöslicher Form**

Die für die APC10 Untereinheit des humanen APC codierende DNA-Sequenz wurde mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen NcoI und BamHI in den pET11d Vektor kloniert. Mit diesem Plasmid wurde der *E.coli*-Stamm B834(DE3) pUBS250 (Brinkmann *et al.*, 1989) transformiert und eine Plattenkultur auf eine LB-Ampicillin (Amp)-Kanamycin (Kan)-Agarplatte angelegt. Von einer Einzelkolonie wurde eine Vorkultur mit 100 ml LB-Amp-Kan angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 12 l LB-Amp-Kan-Medium im Verhältnis 5 ml Vorkultur auf 1 L Medium angeimpft. Die Inkubation erfolgte unter Schütteln bei 37°C in 2 l Schikanenkolben. Nachdem eine OD<sub>600nm</sub> von 0,8 erreicht war, wurde die Proteinexpression in den *E. coli*-Zellen durch Zugabe von 100 mM IPTG-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 100  $\mu$ M IPTG in der Kultur gestartet. Nach der Induktion wurde die Kultur weitere 6 h bei 37 °C inkubiert und die Zellen durch Abzentrifugation (4200 rpm, 20 min, 4°C) geerntet.

Um eine C-terminal verkürzte Version des APC10 zu exprimieren, wurde in die bereits in den pET11d Vektor klonierte für das APC10 Protein codierende DNA durch PCR mit dem „Doctrunc“ Primer und dem „Doc1vorn“ Primer ein Stop-Codon eingeführt. Dadurch wurde eine frühere Termination der Translation erreicht. Die Expression des APC10 $\Delta$ C14 Proteins erfolgte entsprechend dem unverkürzten APC10-Protein.

#### **3.3.2.2. Expression von GcdA**

Der *E.coli*-Stamm DH5 $\alpha$  wurde mit dem in den Expressionsvektor pJF11HE klonierten GcdA Gen (Braune *et al.*, 1999) transformiert und eine Plattenkultur auf einer LB-Amp-Agarplatte angelegt. Mit einer Einzelkolonie wurde eine Vorkultur von 120 ml LB-Amp-Medium angeimpft und über Nacht inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 12 l LB-Amp-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37°C in 2 l Schikanenkolben. Nachdem eine OD<sub>600nm</sub> von 0,8 erreicht war, wurde die Kultur mit 50  $\mu$ M Endkonzentration IPTG induziert und für 12 h weiter inkubiert. Die Zellen wurden durch Abzentrifugation (4200 rpm, 20 min, 4 °C) geerntet.

### 3.3.2.3 Expression des mit Selenomethionin markierten Proteins (Budisa *et al.*, 1995)

Mit dem Expressionsvektor, welcher die für das gewünschte Protein codierende DNA-Sequenz enthält, wurden Zellen eines geeigneten methionin-auxotrophen *E.coli*-Stammes, beispielsweise *E.coli* B834(DE3) pUBS250 (Brinkmann *et al.*, 1989), transformiert. Die Vorkulturen für die Expressionen wurden in LB-Medium mit Selektions-Antibiotikum hergestellt. Vor der Überimpfung auf das Minimalmedium wurden die Vorkulturen abzentrifugiert (20 min, 4000 rpm) und das Zellpellet in Minimalmedium aufgenommen. Mit den resuspendierten Zellen wurde die Hauptkultur angeimpft und gleichzeitig das entsprechende Selektions-Antibiotikum in die Kultur gegeben. Im weiteren Verlauf erfolgte die Expression der einzelnen Proteine wie unter 3.3.2.1. und 3.3.2.2. beschrieben. Die Teilungsrate der *E.coli*-Zellen war jedoch geringer als bei LB-Medium, wodurch das Erreichen einer für die Induktion geeigneten Zelldichte ( $OD_{600} \sim 0,8$ ) länger dauerte.

Minimalmedium:

740 ml H<sub>2</sub>O (in 2L Erlenmeyerkolben mit Schikanen autoklaviert)

100 ml 10×Nährsalz-Lösung

100 ml 10×Aminosäuren-Lösung

60 ml 1 mg/ml Seleno-D,L-Methionin-Lösung

1 Liter 10×Nährsalz-Lösung:

75 ml 1 M (NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>)

17 ml 5 M NaCl

10 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>

200 ml 1 M Glucose

10 ml CaSO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O

10 ml Spurenelement-Stammlösung

10 ml 10 mg/ml Thiamin-Stammlösung

10 ml 10 mg/ml Biotin-Stammlösung

10 ml 1 mg/ml Ammonium-Eisen(II)-Sulfat × 6 H<sub>2</sub>O, frisch hergestellt !

648 ml H<sub>2</sub>O

1 Liter 10×Aminosäuren-Lösung:

247 ml H<sub>2</sub>O

476 ml 1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

220 ml 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,5 g aller Aminosäuren außer Methionin, Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin

30 ml Aminosäurelösung II

30 ml Aminosäurelösung II:

0,5 g Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin

1,5 ml 32 % HCl

28 ml H<sub>2</sub>O

Spurenelement-Stammlösung:

5 µl 10 mg/ml MnCl<sub>2</sub>-Lösung

5 µl 10 mg/ml CuSO<sub>4</sub>-Lösung

5 µl 10 mg/ml Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>-Lösung  
auf 50 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen

Für die einzelnen Komponenten wurden Stammlösungen in H<sub>2</sub>O hergestellt und durch Filtration durch eine PVDF-Membran mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm sterilisiert.

### 3.3.3 Aufschluss von *E.coli* Zellen

Nach dem Ernten der Zellen durch Abzentrifugieren (4200 rpm, 20 min, 4°C) werden sie in 10 ml Sonipuffer pro Liter Kulturmedium resuspendiert. Danach wurden die Zellen entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt, oder sofort aufgeschlossen.

Durch Zugabe einer Spatelspitze Lysozym und 30 min Inkubation bei RT unter ständigem Rotieren wurden die Zellwände aufgebrochen, so dass die Zellen durch Sonifikation (Branson, Macrotip, Stufe 8, *duty cycle* 60 %, 10-15 min) im Eisbad vollständig aufgeschlossen werden können. Anschließend wird das Zellysat 30 min bei 20000 U/min und 4 °C abzentrifugiert. Nach Bedarf wurden der Zellsuspension Proteaseinhibitoren (Tab. 3-1) oder ein fertiger Protease-Inhibitor-Coctail (Complete<sup>TM</sup>, Boehringer Mannheim) zugesetzt.

Sonipuffer:

300 mM NaCl

50 mM Phosphatpuffer, pH 7,4

**Tabelle 3-1: Proteaseinhibitoren: Anwendungskonzentration und Aufbewahrung von Stammlösungen**

Protease-Inhibitor	eingesetzte Konzentration	Stammlösung	Aufbewahrung der Stammlösung
Aprotinin	1-2 µg/ml	10 mg/ml in 0,01M HEPES pH 8,0	-20 °C
Leupeptin	1-2 µg/ml	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O	-20 °C
Pepstatin	1 µg/ml	1 mg/ml in Ethanol (98 %)	-20 °C
Antipain	1-2 µg/ml	1 mg/ml in H <sub>2</sub> O	-20 °C
PMSF	100 µg/ml	1,75 mg/ml in Isopropanol	-20 °C, instabil
EDTA	1mM	0,5 M in H <sub>2</sub> O	sterilfiltriert bei RT

### 3.3.4 Präparation von *inclusion bodies*

Häufig wird das in *E. coli* rekombinant exprimierte Protein in der Zelle als inaktives, unlösliches Aggregat, in *inclusion bodies* (IB) abgelagert. Ursache dafür kann ein sehr hohes Expressionslevel bei cytoplasmatisch exprimierten heterologen, aber auch homologen Proteinen (Williams *et al.*, 1982) sein. Außerdem ist die reduzierende Umgebung im Zytoplasma von *E. coli* für die Ausbildung von Disulfidbrücken ungeeignet, so dass die Faltung von Zielproteinen mit Disulfidbrücken gestört ist und diese ebenfalls in IB's abgelagert werden. Der Anteil des in *inclusion bodies* abgelagerten rekombinanten Proteins kann bis zu 30 % des gesamten Zellproteins betragen (Lilie *et al.*, 1998).



Die *inclusion bodies* befinden sich nach dem Abzentrifugieren des Zellysates im Sediment und müssen noch von nicht aufgeschlossenen Zellen, den Resten der Zellmembranen und Zellorganellen befreit werden. Dazu wird das Zellpellet mehrmals mit einem Dounce-Homogenisator in Sonipuffer + 0,5 % (v/v) LDAO resuspendiert und abzentrifugiert. Mit dieser Prozedur lassen sich die *inclusion bodies* im Sediment anreichern. Das LDAO wird durch Waschen mit dem Sonipuffer entfernt. Die Reinheit des Zielproteins in den *inclusion bodies* kann bis zu 90 % betragen (Lilie *et al.*, 1998).

### 3.4 Proteinchemische Methoden

#### 3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

##### Colorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Zu 200 µl des käufliche Bradford-Reagenses BIO-ASSAY (Biorad, München ) wurden (800 – Volumen der Proteinprobe) µl Wasser gegeben, gemischt, die Proteinprobe (0,5 bis 5 µg Protein) dazugegeben und wieder gemischt. Nach 5 min Inkubation wurde die Extinktion der Probe bei 595 nm gemessen und mit einer Eichkurve (BSA in H<sub>2</sub>O) verglichen.

##### Bestimmung der Proteinkonzentration anhand des Absorptionskoeffizienten

Zur Proteinbestimmung kann auch die hauptsächlich durch Tyrosine und Tryptophane hervorgerufene Absorption bei 280 nm herangezogen werden. Die Extinktion der Probe, welche in dem Bereich von 0,1 bis 1,0 liegen sollte, wird bei 280 nm bestimmt und die Proteinkonzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet:

$$E = \epsilon_{280\text{nm}} \cdot c \cdot d$$

*c* - gesuchte Konzentration

*d* – Schichtdicke der Küvette [cm]

$\epsilon_{280\text{nm}}$  – Extinktionskoeffizient bei 280 nm, nach (Gill und von Hippel, 1989) aus der Anzahl von Tyrosinen, Tryptophanen un Cysteinen berechenbar

#### 3.4.2 SDS-Page-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese wurde nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Die dazu nötigen Gele mit verschiedenen Anteilen Polyacrylamid wurden nach dem Schema in Tabelle 3-2 hergestellt.

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen 1:1 mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Die Elektrophorese wurde bei 150 V – 180 V durchgeführt. Anschließend wurden die Gele gefärbt oder geblottet.

2 x Probenpuffer:

100 mM Tris/AcOH, pH 6,8  
 100 mM DTT  
 5 mM EDTA  
 20 % (v/v) Glycerin  
 0,04 % (w/v) Bromphenolblau

**Tabelle 3-2: Konzentration und Volumina der nötigen Lösungen für 8 reduzierende SDS-Page-Polyacrylamid-Gele mit 5 % igem Sammelgel**

	Sammelgel		Trenngel	
	5%	10 %	12,5 %	15 %
Acrylamid 30 % w/v [ml]	6,8	20	25	30
H <sub>2</sub> O [ml]	27,6	28	23	18
1M Tris-HCl pH 6,6 [ml]	5	-	-	-
2M Tris-HCl pH 8,8 [ml]	-	11,8	-	-
10 % (w/v) SDS [µl]	600	600	600	600
10 % (w/v) AMPS [µl]	600	600	600	600
TEMED [µl]	20	20	20	20

### Coomassie-Färbung

Die Gele wurden ca. 30 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert und in Entfärberlösung bis zum optimalen Kontrast der Banden wieder entfärbt.

Färbelösung:

50 % Ethanol (v/v)

10 % Essigsäure (v/v)

0,1 % Coomassie R 250 (w/v)

Entfärber:

30 % Ethanol (v/v)

7 % Essigsäure (v/v)

### Silberfärbung nach Marcinka (Marcinka, 1975)

Die hochsensitive Silberfärbung kann Proteinbanden, die weniger als 0,02 µg Protein enthalten, in Polyacrylamidgelen sichtbar machen.

Lösung A:

40 % Methanol

12 % Eisessig

100 µl Formaldehyd (38 %)

Lösung C:

2 g AgNO<sub>3</sub> in 10 ml H<sub>2</sub>O

Lösung B:

0,4 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> × 5 H<sub>2</sub>O

in 10 ml H<sub>2</sub>O

Lösung D:

2 g Natriumcitrat

in 10 ml H<sub>2</sub>O

Silberlösung:

1 ml Lösung C

75 µl Formaldehyd (38 %)	12 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
100 µl Lösung D	100 ml Formaldehyd (38 %)
	20 ml Lösung B
Entwickler:	in 200 ml H <sub>2</sub> O

Das Gel wurde über Nacht in 200 ml Lösung A fixiert und dann in 100 ml 30 %igem Methanol (15 min), 2 × in 250 ml H<sub>2</sub>O (15 min) gewaschen. Nach Vorinkubation (1 min, 0,5 ml Lösung B in 100 ml H<sub>2</sub>O) und Spülen (3×20 s in 150 ml H<sub>2</sub>O) wurde das Gel 20 min in 100 ml Silberlösung inkubiert und wieder gewaschen (1×1min, 2×30 s in 250 ml H<sub>2</sub>O). Die Entwicklung erfolgte in 200 ml Entwickler bis zur Sichtbarkeit der Banden. Die Reaktion wurde mit 200 ml Stopplösung (20% Methanol + 1 ml Lösung D) abgebrochen und die Färbung ( 2×30 min mit 200 ml H<sub>2</sub>O +1 ml Lösung D, 20 µl Lösung B) fixiert.

### 3.4.3 Western-Blot und Detektion der Proteine auf der Membran

Für die Ansequenzierung von Proteinbanden oder die Detektion mit Antikörpern werden die durch das Gel getrennten Proteine im Elektroblothing-Verfahren auf eine PVDF-Membran (Millipore, Eschborn) oder eine Nitrocellulose-Membran übertragen. In einer *semi dry blot* Apparatur (BioRad, München) werden von unten nach oben die folgenden Schichten aufeinandergelegt: 6 Lagen 3MM-Filterpapier (Whatman, Maidstone, England) getränkt mit Anodenpuffer I ; 3 Lagen 3MM-Filterpapier getränkt mit Anodenpuffer II; 1 Lage PVDF-Membran (Porendurchmesser 0,45 mm), die zuvor mit 60 % (v/v) Methanol und mit Wasser äquilibriert wurde, das Polyacrylamid-Gel sowie 6 Lagen 3MM-Filterpapier getränkt mit Kathodenpuffer. Die Übertragung der Proteine auf die Membran Proteine erfolgte durch ein elektrisches Feld das für 1,5 Stunden bei einem Stromfluß von 50 mA (ca. 0,8 mA/cm 2 Gelfläche) angelegt wird.

Anodenpuffer I:

300 mM Tris pH ~10,4

20 % (v/v) Methanol

Anodenpuffer II:

25 mM Tris pH ~10

20 % (v/v) Methanol

Kathodenpuffer:

25 mM Tris pH ~10

40 mM 6-Aminohexansäure

20 % (v/v) Methanol

Die Proteine auf der Membran können durch kurzzeitige Inkubation (1-2 min) in Membran-Färbelösung und darauffolgendes Waschen mit Entfärber sichtbar gemacht werden.

Membranfärbelösung:

50 % (v/v) Methanol

10 % (v/v) Essigsäure

0,1 % (w/v) Coomassie

Brilliant Blue G250 (Serva)

Entfärber:

30 % (v/v) Methanol

7 % (v/v) Eisessig

### *Detektion von Proteinen im Western-Blot mittels Antikörper-Färbung*

Die Spur des Protein-Markers wird vor dem Blockierungsschritt der Membran entfernt und separat mit Coomassie gefärbt. Der restliche Blot wird über Nacht bei 4 °C in Blockierungspuffer inkubiert und danach 3×5 min in TBST-Puffer gewaschen. Das Antiserum das den primären Antikörper enthält wurde in TBST (1µl Antiserum in 1ml Puffer) verdünnt und der Blot 1 h damit inkubiert. Der überschüssige Antikörper wird durch 3×5 min Waschen in TBST-Puffer entfernt und der Blot danach 30 – 45 min (RT) mit Sekundäntikörper (AP-Konjugat, 1 µl in 5 ml TBST-Puffer) inkubiert. Nach nochmaligem Waschen mit 3×5 min TBST-Puffer wird der Blot für 10 min mit 10 ml frisch hergestelltem BCIP/NBT–AP-Färbungssubstrat inkubiert. Die Entwicklung wird durch Waschen mit H<sub>2</sub>O gestoppt und der Blot kann getrocknet aufbewahrt werden.

10× TBS-Puffer:

100 mM Tris/HCl

1,50 M NaCl, pH 7,4

TBST-Puffer:

1× TBS-Puffer mit

0,05 % (v/v) Tween 20

Blockierungspuffer:

2 % (w/v) BSA Fraktion V in TBS-Puffer

0,05 % (w/v) Natriumazid

BCIP/NBT–AP-Färbungssubstrat

0,4 mg/ml NBT

(Nitroblautetrazoliumchlorid)

0,19 mg/ml BCIP (5-Brom-4-chlor

-3-indoylphosphat-toluidin)

100 mM Tris/HCl, pH 9,5

50 mM MgSO<sub>4</sub>

## **3.5 Präparation von APC10/DOC1**

### **3.5.1 Rückfaltung von APC10**

Die Renaturierung von Proteinen erfordert die Entfernung des denaturierenden Reagenzes durch Verdünnung oder Dialyse in einem Puffer, der die Proteinfaltung stabilisiert und die Aggregation von Faltungsintermediaten verhindert. Dabei müssen ähnlich viele Variablen wie bei der Kristallisation von Proteinen getestet werden: pH, Ionenstärke, Temperatur und Additive wie Arginin, PEG, Detergentien oder Chaotrope. Enthält das Protein Disulfidbrücken kann im Renaturierungspuffer ein Redoxsystem aus einer Mischung des reduzierten und oxidierten Zustandes von Thiolreagenzien, wie Glutathion, Cystein oder Cysteamin, etabliert werden (Lilie *et al.*, 1998).

Die *inclusion bodies* wurden für die Renaturierung des APC10-Proteins in 6M Guanidin, 150 mM Phosphatpuffer pH 7,4 gelöst, 1 mM Mercaptoethanol zugegeben werden um bestehende Disulfidbrücken aufzubrechen und eine Proteinkonzentration von 20 mg/ml eingestellt. Diese Lösung wurde vor jeder Rückfaltung frisch hergestellt.

Je 20 µl dieser Proteinlösung wurden in 2 ml der verschiedenen Rückfaltungspuffer getropft (mindestens eine 1:100 Verdünnung), über Nacht bei 4 °C gerührt und danach gegen 1×PBS dialysiert. Die Analyse der Proben erfolgte durch eine analytische Gelfiltration mit einer Superdex<sup>TM</sup> 75 PC 3.2/30 Säule an einem Smart System (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) oder nach einer Proteinfällung aus 500 µl Lösung durch SDS-Gelelektrophorese. Die beste Rückfaltungsbedingung wurde durch Screening von Temperatur, Salzgehalt, Additiven wie PEG oder Tris, Detergezien sowie eingesetzter Proteinkonzentration weiter optimiert.

#### *Rückfaltungspuffer Initialer Screen*

0; 0,8 und 1,6 M Arginin  
 100 mM Tris/Mes pH 5, pH 6, pH 7 und pH 8  
 150 mM NaCl  
 Temperatur: 4°C

#### *Rückfaltungspuffer mit der höchsten Ausbeute an korrekt gefaltetem Protein*

1.2 M Tris/HCl pH 7,0  
 150 mM NaCl  
 30 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 1 % PEG 4000  
 3 mM DTT  
 5 mM EDTA  
 Protease-Inhibitoren  
 Temperatur: 16 °C

### **3.5.2 Reinigung des renaturierten APC10**

Das Absorptionsmaximum des renaturierten APC10 Proteins war von 280 nm zu 265 nm verschoben, ein deutliches Indiz für eine Anlagerung von DNA an das Protein ist. Diese Verunreinigung wurde mittels einer Hydroxylapatit-Matrix abgetrennt. Das Protein wurde mit Puffer A auf eine Hydroxylapatit-Säule (15 ml Hydroxylapatit-Matrix in einem Säulenkörper 25 mm Durchmesser 20 cm Länge) aufgetragen. In einem Gradienten von 0-100 % Puffer B eluierte das APC10 Protein bei 50 mM Phosphat von der Säule. Die DNA konnte mit 100 % Puffer B wieder von der Säule entfernt werden.

Höhermolekulare Verunreinigungen sowie nur partiell gefaltetes Protein wurde durch eine Gelfiltrations-Chromatographie mit einer Superdex<sup>TM</sup>75 10/30 Säule an einem Äkta-Explorer-System (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) entfernt.

Puffer A:  
 50 mM Tris/HCl, pH 7,0  
 3 mM DTT  
 150 mM KCl

Puffer B:  
 50 mM Tris/HCl, pH 7.0  
 3 mM DTT  
 150 mM KCl  
 500 mM Phosphat

Gelfiltrationspuffer:

10 mM Tris/HCl, pH 7,0; 150 mM NaCl

5 mM EDTA; 3mM DTT

Die Puffer A und B enthielten den EDTA-freien Protease-Inhibitor-Coctail complete EDTA-free (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) und der Gelfiltrationspuffer complete (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), wobei eine Tablette auf 500 ml Puffer eingesetzt wurden.

### 3.5.3 Massenspektroskopie

Das Molekulargewicht des intakten APC10 Proteins, des Degradationsproduktes sowie von APC10 $\Delta$ C14 wurden mit einem Triple-Quadrupol Ionenspray-Massenspektrometer API365 (Fa. SciEx, Thornhill, Ontario, Kanada) bestimmt (Covey *et al.*, 1988). Die Messungen wurden freundlicherweise von Frau Sylvia Koerner am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried, Abteilung für Proteinanalytik durchgeführt und ausgewertet.

### 3.5.4 Proteinreinigung von APC10 $\Delta$ C14

Das abzentrifugierte Zellysat wurde im Verhältnis 100 ml Lysat auf 200 ml Auftragspuffer verdünnt und durch eine PVDF-Membran (Porendurchmesser 0,22  $\mu$ m) filtriert. An einer FPLC-Anlage (Amersham Pharmacia Biotech AP, Uppsala, Schweden) wurde das verdünnte Lysat bei Raumtemperatur mit einer Flussrate von 2 ml/min auf eine MonoS Säule (Amersham Pharmacia Biotech AP, Uppsala, Schweden) aufgetragen. Danach wurde die Säule mit Auftragspuffer gewaschen, bis kein Protein mehr von der Säule eluierte. In einem linearen Gradienten von 50 – 500 mM NaCl konnte APC10 $\Delta$ C14 bei ~ 300 mM NaCl nahezu ohne Verunreinigungen von der Säule eluiert werden. Das eluierte Protein wurde mit einem Ultrafree-Konzentrator (cutoff 3 oder 5 kDa) (Millipore, Eschborn) bis ~ 30 mg/ml Protein eingengt und 4 ml des konzentrierten Proteins auf eine mit Gelfiltrationspuffer equilibrierte Superdex<sup>TM</sup> 75 HighLoad 26/60 Säule (Amersham Pharmacia Biotech AP, Uppsala, Schweden) aufgetragen. Bei einer Flussrate von 3 mL/min eluierte das Protein nach 172 ml und wurde fraktioniert gesammelt. Die vereinigten Fraktionen des APC10-Peaks wurden entweder in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert, oder für die Kristallisation mit einer NAP10-Säule (Amersham Pharmacia Biotech AP, Uppsala, Schweden) in Kristallisationspuffer umgepuffert.

Auftragspuffer:

10 mM MES pH 6,0

50 mM NaCl

3 mM DTT

Elutionspuffer:

10 mM MES pH 6,0

1 M NaCl

3 mM DTT

Gelfiltrationspuffer:  
10 mM HEPES pH 7,5  
100 mM NaCl  
3 mM DTT

Kristallisationpuffer:  
10 mM HEPES pH 7,5  
0,05 % Natriumazid

### 3.5.5 Proteinreinigung der GcdA –Untereinheit der Glutaconyl-CoA-decarboxylase

Für die Reinigung der GcdA wurde die Eigenschaft des Proteins, bei geringer Salzkonzentration auszukristallisieren ausgenutzt. Das Zellysat wurde langsam mit dem gleichen Volumen H<sub>2</sub>O 1:2 verdünnt und bei 4 °C stehengelassen, bis sich das Protein als weisser Niederschlag abgesetzt hatte. Nach dem Abzentrifugieren (8000 rpm, 30 min, 4°C) wurde der Niederschlag in Gelfiltrationspuffer gelöst und mehrere Stunden bei 4°C gegen 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5 dialysiert (Spectrapor-Dialysemembran, cutoff 10 kDa), bis das Protein wieder komplett auskristallisiert war. Nach nochmaligem Abzentrifugieren (8000 rpm, 30 min, 4°C) wurde das Protein bis zu einer maximalen Proteinkonzentration von 50 mg/ml in Gelfiltrationspuffer gelöst. Um Verunreinigungen mit einem geringeren Molekulargewicht als die GcdA abzutrennen, wurden 4 ml der Proteinlösung auf eine mit Gelfiltrationspuffer equilibrierte Superdex<sup>TM</sup>75 26/60 High Load Säule aufgetragen. Das Protein eluierte bei einer Flussrate von 2,5 ml/min nach 115 ml. Die vereinigten Fraktionen wurden entweder in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei –80 °C aufbewahrt oder mit einer NAP10 Säule (Amersham Pharmacia Biotech AP, Uppsala, Schweden) in Kristallisationspuffer umgepuffert.

Gelfiltrationspuffer:  
500 mM NaCl  
150 mM Phosphatpuffer pH 7,5

Kristallisationspuffer:  
500 mM Ammoniumsulfat  
3 mM Tris/HCl pH 7,0  
0,05 % Natriumazid

### 3.6 Kristallographie und Strukturbestimmung

Für die Analyse der dreidimensionalen Struktur eines Proteins stehen zur Zeit drei etablierte Methoden zur Verfügung. Die Elektronenmikroskopie ermöglicht eine dreidimensionale Darstellung der Oberfläche von Molekülen. Ein atomares Modell der Proteinstruktur liefern die Kernresonanzspektroskopie NMR (*nuclear magnetic resonance*) und die Röntgenkristallographie. Die NMR untersucht Proteine in Lösung und kann somit Informationen über dynamische Prozesse sammeln. Eine entscheidende Limitation ist jedoch die Beschränkung auf Proteine mit einem Molekulargewicht von maximal 35 kDa. Im Gegensatz dazu kann die Röntgenkristallographie auch Proteine mit höherem Molekulargewicht untersuchen. Voraussetzung dafür ist die Herstellung von Proteinkristallen mit hoher Qualität, welche den Röntgenstrahl beugen können.

#### 3.6.1 Kristallisation

Alle Kristallisationsexperimente wurden im Dampfdiffusionsverfahren durchgeführt. Dabei kommt es in einem abgeschlossenen Volumen über die Gasphase zur Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen einem Tropfen (2-10  $\mu$ l), der die Proteinlösung enthält, und einer Reservoirlösung (0,25 – 5 ml) (Übersichtsartikel: (McPherson, 1990)). Bei der Methode des „sitzenden Tropfens“ befindet sich der Tropfen in; mit CrystalClear-Band (Hampton, Laguna Hills, USA) versiegelten; CrysChem-Platten (Charles Supper Company, Natick, USA) auf einer Erhöhung oberhalb des Reservoirs. Nach der Methode des „hängenden Tropfens“ hängen die Tropfen in Linbro-Platten (ICN, Eschwege), an der Unterseite eines silikonisierten Glasdeckgläschens (Hampton, Laguna Hills, USA), über dem Reservoir. Eine für die Kristallisation geeignete Startbedingung wurde mit einem *incomplete factorial* Ansatz (Suche im vieldimensionalen Raum der Lösungszusammensetzung durch gleichmäßig gestreute Stichproben) (Carter und Carter, 1979) mit den kommerziell erhältlichen *Hampton-crystal-screens* (Hampton, Laguna Hills, USA) und einem abteilungseigenen *Screen* ermittelt. Die Startbedingung kann durch Variation verschiedener Bedingungen wie Temperatur (von 4 °C bis 37 °C), Größe der Kristallisationstropfen, Mischungsverhältnis von Protein und Reservoirlösung, Proteinkonzentration oder verschiedenste Zusätze (Additive) wie Salze, Aminosäuren, Detergenzien, PEG oder Glycerin optimiert werden. Eine weitere Technik zur Optimierung der Kristalle ist das *Seeding*. Hierbei wird das Kristallwachstum unabhängig von der Nucleation optimiert, da Kristallisationskeime von einem bereits bestehenden Kristall in den neuen Tropfen überführt werden. Beim *Microseeding* wird ein Kristallisationskeim durch Berühren eines bereits bestehenden Kristalls mit einem Haar, das dann durch die neuen



Proteintropfen gezogen wird, übertragen. Durch *Macroseeding*, bei dem ganze Kristalle in den neuen Tropfen übertragen werden, können Kristalle vergrößert werden.

### 3.6.2 Theoretischer Hintergrund

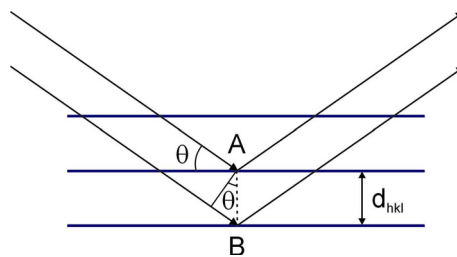
Die Methode der Röntgenkristallographie ist in einer Reihe hervorragender Lehrbücher (Blundell und Johnson, 1976; Drenth, 1992; Rhodes, 1993; Massa, 1996) sehr detailliert beschrieben, so dass hier nur auf einige grundlegende Prinzipien sowie die zur Strukturlösung eingesetzten Methoden eingegangen wird.

#### 3.6.2.1 Kristallaufbau

Ein Kristall ist eine regelmäßige dreidimensionale Anordnung von Molekülen, die durch nichtkovalente Wechselwirkungen zusammengehalten werden. Es werden sieben Kristallsysteme unterschieden: triclinic, monocinic, orthorhombic, tetragonal, trigonal, hexagonal und kubisch. Die sieben Kristallsysteme und die möglichen Symmetrieelemente ergeben 230 mögliche Raumgruppen, von denen aber nur 65 enantiomorph sind und damit das Kristallgitter von chiralen Molekülen, wie Proteinen, bilden können. Die Einheitszelle ist das kleinste Volumenelement, durch dessen periodische Anordnung der Kristall aufgebaut wird. Sie enthält alle kristallographischen Symmetrieelemente des Kristalls und wird durch die Achsen  $a$ ,  $b$  und  $c$ , sowie die Winkeln  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  zwischen den Achsen definiert. Die asymmetrische Einheit der Einheitszelle ist die kleinste sich wiederholende Baugruppe im Kristall, die durch Anwendung der kristallographischen Symmetrie die Einheitszelle aufbaut. Das Kristallgitter entsteht durch die Eckpunkte der Einheitszellen. Verbindet man diese Gitterpunkte durch parallele Ebenen entsteht eine Schar von Netzebenen. Diese Ebenen schneiden die zu den Kristallachsen parallel laufenden Gitterachsen  $a$ ,  $b$  und  $c$  bei  $x = a/h$ ,  $y = b/k$  und  $z = c/l$  ( $h$  – Abstand zwischen den Netzebenen). Die ganzzahligen Variablen  $h$ ,  $k$  und  $l$  werden als *Miller Indices* bezeichnet. In multimeren Proteine sind die Monomeren ebenfalls durch Symmetrieelemente miteinander verbunden. Oft sind diese Symmetrieelemente Teil der kristallographischen Symmetrie. Enthält eine asymmetrische Einheit jedoch mehr als ein Monomer spricht man von lokaler Symmetrie oder nichtkristallographischer Symmetrie (NCS). Diese nichtkristallographische Symmetrie ist völlig unabhängig von der des kristallographischen Systems zu betrachten.

### 3.6.2.2 Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen

Der einfallende Röntgenstrahl regt die Elektronen in den Elektronenhülle der Atome im Proteinkristall an, so dass sie als oszillierende Dipole mit der Frequenz des Röntgenstrahls schwingen. Dabei emittieren sie Sekundärstrahlung, die im Phasenwinkel um  $180^\circ$  zum Primärstrahl verschoben ist, in alle Raumrichtungen. Dies ist die sogenannte kohärente Streuung. Vereinfacht kann die Streuung des Röntgenstrahls durch ein Kristallgitter als Reflexion des einfallenden Strahls an den imaginären Netzebenen die durch die *Miller Indices* beschrieben werden.



**Abbildung 3-1: Reflexion des einfallenden Röntgenstrahls an einer Netzebenenschar.** Der Einfallswinkel  $\theta$  ist gleich dem Reflexionswinkel. Nach dem Bragg'schen Gesetz sind nur die Winkel  $\theta$  erlaubt, bei denen der Gangunterschied  $2d\sin\theta$  zwischen den an den verschiedenen Ebenen einer Netzebenenschar gestreuten Röntgenstrahlen ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge  $\lambda$  ist..

Bragg zeigte dass eine Netzebenenschar mit den Indices  $hkl$  und dem Netzebenenabstand  $d_{hkl}$  einen Reflex, d.h. konstruktive Interferenz, produziert, wenn der Gangunterschied zwischen den an den verschiedenen Ebenen einer Netzebenenschar gebeugten Röntgenstrahlen ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ist. In allen anderen Fällen tritt Auslöschung, d.h. destruktive Interferenz auf (Abb. 3-1).

Bragg'sches Gesetz:  $n \cdot \lambda = 2d_{hkl} \cdot \sin \theta_{hkl}$

$\lambda$  -Wellenlänge des Röntgenstrahls

$d_{hkl}$  – Abstand der Netzebenen

$\theta_{hkl}$  - Einfallswinkel des Röntgenstrahls

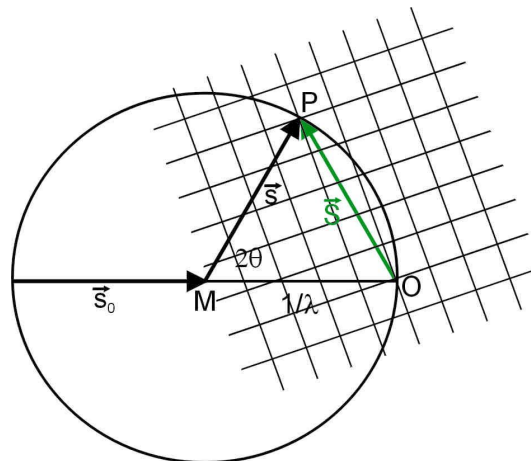
### 3.6.2.3 Das reziproke Gitter

Ein Modell, um viele Prinzipien der Röntgenkristallographie vereinfacht zu beschreiben, ist das reziproke Gitter. Jede Netzebenenschar kann durch einen Vektor  $d$  beschrieben werden, der in Richtung ihrer Flächennormale zeigt und die Länge des Netzebenenabstandes besitzt. Es gilt  $d_{hkl} \sim 1/\sin \theta_{hkl}$ . Daher werden diese Vektoren um so kürzer, je größer die  $hkl$ -Indices und die Beugungswinkel werden. Die Endpunkte des Vektors werden durch die Achsenabschnitte  $a/h$ ,  $b/k$  und  $c/l$  definiert. Wird statt dem normalen Gitter ein Koordinatensystem mit reziproken Achsen  $a^* = 1/a$ ,  $b^* = 1/b$  und  $c^* = 1/c$  verwendet, ergibt sich, da die  $hkl$ -Indices immer ganzzahlig sind, aus den Endpunkten der reziproken

Netzebenen-Abstandsvektoren  $d^* = 1/d_{hkl}$  ein weiteres echtes Gitter, das reziproke Gitter. Jeder Gitterpunkt im reziproken Gitter entspricht einem möglichen Reflex  $hkl$ .

#### 3.6.2.4 Die Ewald-Konstruktion

Das Bragg'sche Gesetz kann mit Hilfe des reziproken Gitters als Vektordiagramm, der Ewald-Konstruktion (Ewald, 1921) (Abb. 3-2), dargestellt werden. Die dreidimensionale Projektion der Ewald-Konstruktion ist die Ewald-Kugel. Das Bragg'sche Gesetz und somit die Beugungsbedingung für konstruktive Interferenz ist für eine Netzebene erfüllt, wenn der Gittervektor der Netzebene vom Ursprung des reziproken Gitters (O) aus aufgetragen die Ewald-Kugel schneidet (P). Verbindet man P mit dem Kristall in O ergibt sich die Richtung des gebeugten Strahls  $s$ . Durch die Rotation des Kristalls und somit auch des reziproken Gitters erfüllen immer andere Gitterpunkte die Beugungsbedingung.



**Abbildung 3-2: Zweidimensionale Darstellung der Ewald-Konstruktion.** Um den in Punkt M befindlichen Kristall wird eine Kugel mit dem Radius  $1/\lambda$  konstruiert. Der Vektor des einfallenden Röntgenstrahl ist mit  $s_0$  gekennzeichnet. Der Ursprung des reziproken Gitters befindet sich nun in O, wo der über den Kristall hinaus verlängerte Vektor  $s_0$  die Ewald-Kugel schneidet. Der einfallende Strahl wird um  $2\theta$  gebeugt und wird zu  $s$ .

#### 3.6.2.4 Friedel'sches Gesetz

Selbst Raumgruppen ohne Inversionszentrum in der Kristallsymmetrie haben im reziproken Raum ein Inversionszentrum. Die durch die Inversion am Ursprung des reziproken Gitters miteinander verknüpften Reflexe  $hkl$  und  $\bar{h}\bar{k}\bar{l}$  besitzen die gleiche Amplitude, haben aber unterschiedliche Vorzeichen der Phasenwinkel. Für die Strukturfaktoren gilt daher:

$$|F_{PH}(h, k, l)| = |F_{PH}(\bar{h}, \bar{k}, \bar{l})|$$

#### 3.6.2.5 Die Elektronendichtefunktion und die Pattersonfunktion

Jedes Atom  $i$  an den Positionen  $x, y$  und  $z$  in der Einheitszelle streut den Röntgenstrahl und wird so Ausgangspunkte einer neuen Welle mit der Amplitude  $f_i$  (atomarer Streufaktor) und

der Phase  $\alpha_i$ . Aus der Summation der einzelnen Streubeiträge ergibt sich ein Strukturfaktor  $F(h, k, l)$ :

$$F(h, k, l) = \sum_i^N f_i \exp(2\pi i(hx + ky + lz))$$

Die Elektronendichte  $p(x, y, z)$ , in die später das Modell eingebaut werden soll, kann als Fouriersumme über alle Strukturfaktoren  $F(h, k, l)$  berechnet werden:

$$p(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l} F(h, k, l) \exp(2\pi i(hx + ky + lz))$$

Dabei ist  $V$  das Volumen der Einheitszelle.

Werden statt der Strukturfaktoren die experimentiell bestimmbaren Strukturfaktoramplituden  $|F(h, k, l)|$  eingesetzt sieht die Fouriersumme wie folgt aus:

$$p(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l} |F(h, k, l)| \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha(h, k, l)]$$

Um die Elektronendichteverteilung in der Einheitszelle berechnen zu können, muss für die einzelnen Strukturfaktoren neben der Amplitude auch der Phasenwinkel  $\alpha$  experimentiell bestimmt werden. Das Problem der Bestimmung des Phasenwinkels für die einzelnen Reflexe wird auch als „Phasenproblem“ bezeichnet.

Die Pattersonfunktion  $P(u, v, w)$  ist eine Fouriersynthese die die gemessenen Intensitäten (Strukturfaktoramplituden) ohne Phasenwinkel ( $\alpha = 0$ ) direkt als Fourierkoeffizienten einsetzt. Dabei sind  $u$ ,  $v$  und  $w$  die Achsen der Patterson-Zelle. Die Dimensionen der Patterson-Zelle sind identisch mit den Dimensionen der realen Einheitszelle  $x$ ,  $y$  und  $z$ .

$$P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l} |F(h, k, l)|^2 \cos 2\pi(hu + kv + lw)$$

Der dadurch entstehende Pattersonraum mit den Koordinaten  $(u, v, w)$  wird durch alle von einem Punkt aus aufgetragene interatomare Abstandsvektoren aufgespannt, welchen am Ende eine Elektronendichte zugeordnet ist. Ein solchen Vektor ergibt sich, wenn ein beliebiger Vektor durch die Einheitszelle geschoben wird und die Elektronendichten an beiden Enden multipliziert und dem Vektor zugeordnet werden. Dabei entstehen nur positive Werte, wenn an beiden Enden des Vektors Elektronendichte vorhanden ist.

Die Patterson-Map enthält bei  $N$  Atomen in der Einheitszelle  $N^2$  interatomare Abstandvektoren mit positiver Elektronendichte, die sich als Peaks in der Patterson-map darstellen. Werden in den Proteinkristall gezielt Schweratome eingebracht, heben sich deren interatomare Abstandsvektoren als Maxima vom Hintergrund der Abstandsvektoren der leichteren Atome wie C, N und O ab.

### 3.6.2.6 Das Phasenproblem

Jeder Strukturfaktor  $F(h, k, l)$  repräsentiert eine Reflexion an einer Gitterebene. Er kann als Wellenfunktion mit einer Amplitude und einem Phasenwinkel beschrieben werden.

$$F(h, k, l) = \underbrace{|F(h, k, l)|}_{\text{Amplitude}} \underbrace{\exp(i\alpha(h, k, l))}_{\text{Phasenwinkel}}$$

Die Strukturfaktoramplitude  $|F(h, k, l)|$  kann experimentiell ermittelt werden, da sie der Quadratwurzel der gemessenen Intensität  $I(h, k, l)$  proportional ist.

$$I(h, k, l) \sim |F(h, k, l)|^2$$

Um aus den gemessenen Intensitäten die Strukturfaktoren zu berechnen, muss für jeden Strukturfaktor der Phasenwinkel ermittelt werden.

Für die Lösung dieses Phasenproblems sind eine Reihe von Methoden etabliert:

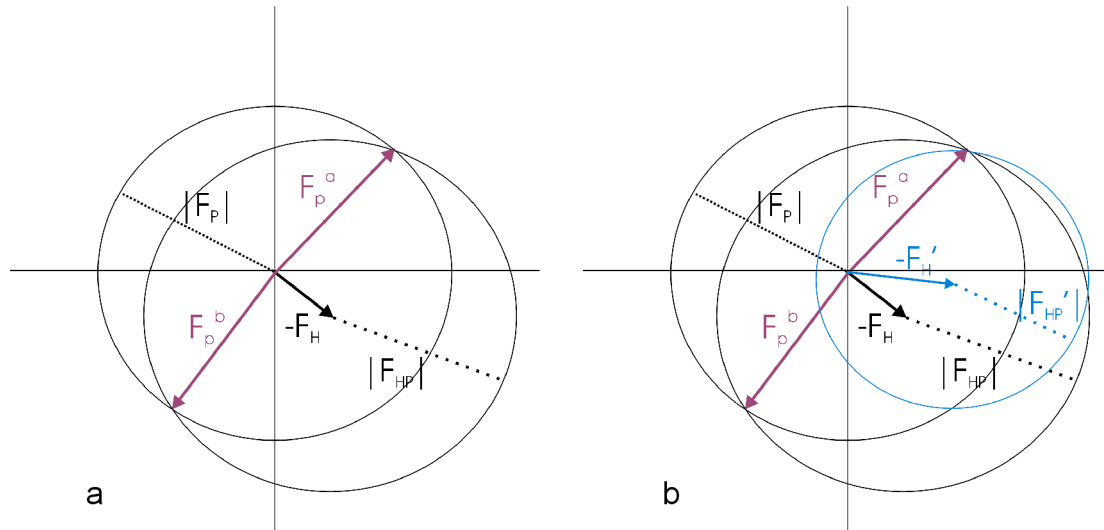
1. Direkte Methoden
2. Molekularer Ersatz (*Molecular Replacement*)
3. Isomorpher Ersatz: SIR (einfacher isomorpher Ersatz) oder MIR (multipler isomorpher Ersatz)
4. *Multi-wavelength anomalous dispersion* (MAD)

Die direkten Methoden stehen noch am Beginn ihrer Entwicklung und sind bisher nur für sehr kleine Moleküle einsetzbar. Für den molekularen Ersatz ist die Struktur eines Proteins mit einer hohen Sequenzähnlichkeit zum gesuchten Protein erforderlich, welche als Strukturmodell zur Generierung von Phasen benutzt wird. Im Folgenden werden die für die Strukturlösung in dieser Arbeit eingesetzten Methoden Isomorpher Ersatz und MAD näher erläutert.

### 3.6.2.7 Multipler isomorpher Ersatz

Für die Methode des multiplen isomorphen Ersatzes müssen verschiedene Schwermetallatome spezifisch an das Protein gebunden werden, ohne seine Struktur oder den Kristall zu verändern. Weiterhin sollte das Schweratome ausreichend Elektronen enthalten, um messbare Änderungen in den Intensitäten der Reflexe zu erhalten. Gelingt das, kann die

Position der Schweratome anhand einer Differenz-Patterson-map aus den gemessenen Strukturfaktoramplituden des derivatisierten Kristalls und des nativen Kristalls bestimmt werden. Die Abbildung 3-3 zeigt die Lösung des Phasenproblems durch multiplen isomorphen Ersatz anhand einer Harker-Konstruktion.



**Abbildung 3-3: Zweidimensionale graphische Darstellung der Lösung des Phasenproblems mit 2 Schweratomderivaten.** a) Die Amplitude und damit der Betrag des Vektors  $F_P$  ist für die gemessenen Reflexe bekannt. Der Betrag des Vektors  $F_H$  wird in einem Kreis um den Ursprung eines Koordinatensystems aufgetragen. Für das erste Derivat werden die Schweratompositionen und damit der Vektor  $F_H$  bestimmt. Von der Spitze dieses Vektors aus wird in einem Kreis der Betrag des Vektors  $F_{HP}$  abgetragen. Die zwei Schnittpunkte der Kreise zeigen die zwei möglichen Lösungen  $F_P^a$  und  $F_P^b$  für den Phasenwinkel des Reflexes. Diese Ambiguität muss für jeden Reflex aufgelöst werden. In Abbildung b) wird daher noch ein zweites Schweratomderivat mit dem Vektor  $F'_H$  (blauer Kreis) hinzugezogen, um den wiederum der Betrag des Vektors  $F'_{HP}$  abgetragen wird. Der Schnittpunkt der drei Kreise  $F_P^a$  stellt nun die einzige Lösung für den Phasenwinkel dar.

Der Strukturfaktor jedes Reflexes ergibt sich aus der Vektorsumme:

$$\vec{F}_{HP} = \vec{F}_P + \vec{F}_H$$

$F_P$  – Strukturfaktor des nativen Reflexes

$F_{HP}$  – Strukturfaktor des zugehörigen Derivat-Reflexes

$F_H$  – Strukturfaktor des Schweratoms

Der Strukturfaktor  $F_P$  kann durch  $\vec{F}_P = \vec{F}_{HP} - \vec{F}_H$  ermittelt werden, die graphische Lösung dieser Gleichung ist in Abbildung (Abb. 3-3 a) dargestellt.  $|F_{HP}|$  und  $|F_P|$  sind aus dem gemessenen Derivat und dem nativen Kristall bekannt. Der Vektor  $F_H$  ist durch Lokalisierung und Berechnung der Strukturfaktoren der Schweratome bekannt. Bei einem Schweratom-Derivat (SIR) ergeben sich zwei Schnittpunkte der Kreise und somit zwei mögliche Lösungen für jeden Strukturfaktor. Wird ein weiteres Derivat ( $F_{PH}'$  und  $F_H'$ ) hinzugezogen das an einer anderen Stelle des Proteins bindet, ergibt sich (wie in Abb. 3-3b) dargestellt, eine einzige Lösung.

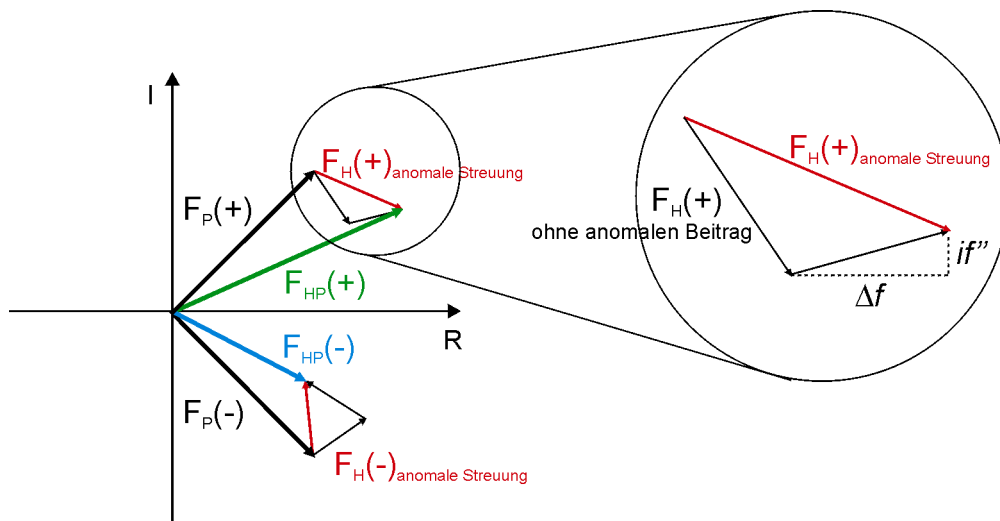
### 3.6.2.8 Die anomale Streuung

Bei elementspezifischen Bereichen des Röntgenspektrums können die Elektronen nicht mehr unabhängig vom Atomkern betrachtet werden. Ist die Energie des eingesetzten Röntgenstrahls etwas größer als die Anregungsenergie der Elektronen in der äußeren Schale einer beteiligten Atomsorte, wird durch die Anregung eines Elektrons Röntgenstrahlung absorbiert und es kommt zur ungerichteten Emission von  $K\alpha$ -Strahlung des betreffenden Elementes. Es findet keine elastische Streuung der Elektronen an der Atomhülle mehr statt. Der restliche gestreute Strahl erfährt eine kleine Änderung in Phase und Amplitude, was auch als anomale Streuung oder anomale Dispersion bezeichnet wird. Diese zusätzlichen Streubeiträge können in einen Realteil  $\Delta F_r$  (dispersiver Beitrag), welcher ein positives oder ein negatives Vorzeichen besitzt, und in einen Imaginärteil  $\Delta F_i$  (Absorption), der immer ein positives Vorzeichen besitzt, zerlegt werden. Das Vektordiagramm in Abbildung 3-4 zeigt, dass bei anomaler Streuung die Struktur Faktoren von Reflexen mit gleichen Strukturfaktoramplituden und Phasenwinkeln mit umgekehrtem Vorzeichen (Friedel-Paare) nicht mehr gleich sind. Die Unterschiede zwischen den Friedel-Partnern, jetzt Bijvoet-Paare, werden als Bijvoet-Differenzen bezeichnet. Das Friedel'sche Gesetz wird ungültig. Die Bijvoet Differenzen können genutzt werden, um die Position der anomal streuenden Atome anhand einer anomalen Differenz-Patterson-Map zu bestimmen, bei der die aus den Bijvoet Partnern berechneten  $(\Delta|F_{ano}|)^2$  als Koeffizienten in die Fouriertransformation eingesetzt werden. Die Bijvoet-Differenzen können aus den Strukturfaktoramplituden der Friedel-Partner nach der folgenden Gleichung berechnet werden:

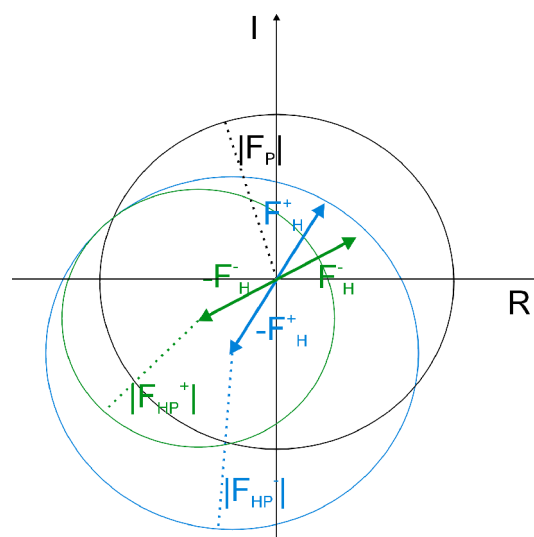
$$\Delta|F_{ano}| = \left( |F_{PH}^+| - |F_{PH}^-| \right) \frac{f'}{2f''}$$

$f'$ - realer Beitrag der anomalen Streuung (Absorption)

$f''$ - imaginärer Beitrag der anomalen Streuung (dispersiver Beitrag)



**Abbildung 3-4: Auswirkung der anomalen Streuung auf die Friedel-Paare.** Ohne anomale Streuung gilt  $|F_{HP(+)}| = |F_{HP(-)}|$  bei entgegengesetztem Phasenwinkel. Mit einem anomalen Beitrag, der sich aus dem realen Beitrag  $\Delta f$  und dem imaginären Beitrag  $if''$  zusammensetzt, unterscheiden sich die resultierenden Strukturformfaktoren der Friedel-Paare  $F_{HP(+)}$  und  $F_{HP(-)}$  in Phasenwinkel und Amplitude.



**Abbildung 3-5: Verwendung des anomalen Beitrags der anomalen Streuung zur Überwindung der Phasenunsicherheit bei einem einzigen Derivat (nach (Drenth, 1992)).**  $|F_P|$  ist die Strukturfaktoramplitude für den Referenzdatensatz ohne anomalen Beitrag.  $|F_{PH}^+|$  und  $|F_{PH}^-|$  sind die Strukturfaktoramplituden der Bijvoet-Paare im Datensatz mit maximiertem anomalem Beitrag  $f''$ .

### 3.6.2.9 Multiple Anomale Dispersion (MAD)

Die Strukturlösung mit Hilfe der anomalen Streuung wurde erst durch die Verwendung von Synchrotronstrahlung möglich, da hier Röntgenstrahlung über ein breites Wellenlängenspektrum exakt eingestellt werden kann. Wie beim Isomorphen Ersatz werden Schweratome eingesetzt um die Proteinphasen zu ermitteln. Der Beitrag der anomalen Streuung zum Strukturfaktor ist nur gering, so dass eine perfekte Isomorphie der Datensätze und eine gute Auflösung nötig sind. Die Isomorphie wird erreicht, indem der gleiche Kristall bei verschiedenen Wellenlängen vermessen wird. Wird der Absorptionskoeffizient für



Röntgenstrahlung des Schweratoms gegenüber der Wellenlänge der Röntgenstrahlung aufgetragen, ergibt sich eine Kurve mit sehr scharfen Peaks die als Absorptionskanten bezeichnet werden. An diesen Kanten ist der Einfluss der anomalen Streuung auf die Strukturformfaktoren am größten. Am Synchrotron werden die optimalen Wellenlängen anhand eines Röntgenfluoreszenz-Spektrums bestimmt. Der Datensatz mit maximalem  $f''$  wird am Maximum der Fluoreszenz aufgenommen und der Datensatz mit maximalem  $f'$  bei geringfügig höherer Wellenlänge.

### 3.6.3 Datensammlung und Datenauswertung

Für die Röntgenaufnahmen müssen Kristalle zerstörungsfrei von Mutterlösung auf die Messapparatur überführt werden. Um die Kristalle bei Raumtemperatur zu vermessen, werden sie zusammen mit einer kleinen Menge Reservoirlösung in eine dünne Glaskapillare eingebracht, die mit Dentalwachs verschlossen wird. Durch die ionisierende Strahlung des Röntgenlichts werden im Kristall radikalische Kettenreaktionen ausgelöst, die irreversible Schäden am Kristallgitter verursachen können. Diese Röntgenschäden vermindern die Qualität der Datensammlung zum Teil extrem. Daher werden die Kristalle, vor allem für die Messungen mit der besonders intensiven Synchrotronstrahlung, in einem Stickstoffstrom bei 100 K eingefroren. Das Einfrieren bei 100 K minimiert die Auswirkungen der Röntgenschäden auf das Kristallgitter. Um eine Eisbildung während des Einfrierens zu verhindern, werden die Kristalle vorher kurzzeitig mit einem Kryoloop durch einen Kryopuffer gezogen, welcher Kryoprotektantien wie Glycerin, Ethylenglycol oder niedrigmolekulare Polyethylenglycole in geeigneter Konzentration enthält. Alternativ kann der Kristall in einem glasartig erstarrenden Öl eingefroren werden. Diese Technik erfordert allerdings eine vollständige Entfernung des den Kristall umgebenden Wassers. Bei ungenügender Qualität der eingefrorenen Kristalle kann diese manchmal durch *crystal annealing*, d.h. mehrmaliges Auftauen und Einfrieren der Kristalle, verbessert werden (Kriminski *et al.*, 2002) Die Datensammlung erfolgt entweder mit  $\text{CuK}\alpha$ -Röntgenstrahlung ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) an einem RIGAKU-Drehanodengenerator mit Kupferanode (Rigaku, Tokyo) und MAR-*Image plate* Detektor oder an der BW6 *beamline* des Deutschen Elektronensynchrotron (DESY, HASYLAB, Hamburg) mit einem MAR-CCD (*charge-coupled-device*)-Detektor. Die Bestimmung von Kristallorientierung, Raumgruppe und Gitterkonstanten sowie die Integration der Bilder erfolgt mit den Programmen MOSFLM (Leslie, 1999) oder DENZO (Otwinowski *Z.*, 1997). Zur Datenreduktion werden die Programme SCALA und TRUNCATE (Collaborative Computational Project, 1994) oder

SCALEIT (Otwinowski Z., 1997) eingesetzt. Die Bestimmung der Schwermetallpositionen kann mit mehreren Programmen des CCP4-Paketes (RSPS, PEAKMAX, FFT etc.) (Collaborative Computational Project, 1994) aber auch mit dem Programm SHAKE&BAKE (Weeks und Miller, 1999) vorgenommen werden. Die Berechnung der Phasen wurde bei APC10 mit MLPHARE (Collaborative Computational Project, 1994) und im Fall der GcdA mit SHARP (Farruggio *et al.*, 1999) vorgenommen. Die Optimierung der Elektronendichte erfolgt durch Dichtemodifikation mit dem Programm DM (Cowtan und Zhang, 1999). Ein Parameter zur Kontrolle der Phasenwahrscheinlichkeit ist die *figure of merit* (FOM), die nach der folgenden Gleichung berechnet wird.:

$$FOM = \sqrt{(\sin \varphi)^2 + (\cos \varphi)^2} \quad \varphi\text{-Phasenunsicherheit}$$

### 3.6.4 Modellbau und Verfeinerung

Elektronendichten wurden mit den Programmen FFT (Collaborative Computational Project, 1994) oder CNS (Brunger *et al.*, 1998) berechnet. Der manuelle Einbau des Modells in die 2F<sub>0</sub>F<sub>C</sub>- und die F<sub>0</sub>F<sub>C</sub>- Elektronendichte erfolgte mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991). Bei der Verfeinerung des Strukturmodells mit dem Programm CNS wurden 5 % der Reflexe bei der Verfeinerung nicht berücksichtigt und zur Kontrolle der Verfeinerung anhand eines freien R-Faktors herangezogen. Die Verfeinerung der Parameter wie Atompositionen und B-Faktoren in CNS erfolgte unter Berücksichtigung der Parameter von Huber&Engh (Engh und Huber, 1991). Die Analyse der durch nichtkristallographische Symmetrie (NCS) verwandten Moleküle in der asymmetrischen Einheit und die Bestimmung der Symmetrioperationen erfolgte mit der Option LSQman im Programm O (Jones *et al.*, 1991). Im Fall der GcdA konnte zunächst nur ein unvollständiges Modell in die experimentiell gewonnene Elektronendichte eingefügt werden. Aus diesem Modell wurden mit dem Programm SFALL (Otwinowski, 1991) Phasen berechnet, die mit Hilfe des Programms SIGMAA (Read, 1986) mit den experimentiellen Phasen kombiniert wurden. Der so gewonnene Phasensatz hatte eine höhere Phasenwahrscheinlichkeit als die experimentiell ermittelten Phasen.

Die Mittelung der Elektronendichte im direkten Raum mittels der NCS-Symmetrie wurde mit der Option AVE im Programm DM (Kleywegt und Jones, 1999) durchgeführt. Die dafür nötige Maske um das Dimer wurde mit dem Programm MAMA (Kleywegt und Jones, 1999) entlang der sichtbaren Protein-Solvens-Grenze um das Dimer angepasst.

### 3.6.5 Geometrische Analysen der Strukturen sowie der Proteinoberfläche

Die Analyse der geometrischen Parameter wie Bindungslängen, Bindungswinkel und dihedrale Winkel erfolgte mit den Programmen CNS (Brunger *et al.*, 1998), MOLEMAN (Kleywegt und Jones, 1999) und PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1996). Die Sekundärstrukturelemente wurden mit dem Programm PROMOTIF (Hutchinson und Thornton, 1996) ermittelt. Die lösungsmittelzugänglichen Bereiche des GcdA Proteins sowie die Protein-Protein Interaktionsbereiche wurden mit NAccess (Hubbard und Thornton, 1993) berechnet.

### 3.6.6 Suche nach Sequenz und Strukturhomologie

Der Vergleich der Strukturen mit den bekannten Strukturen der RCSB-Proteindatenbank (Bermann *et al.*, 2000) wurde mit dem DALI-Server (Holm und Sander, 1993) des European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/dali/>) durchgeführt. Die Suche nach Sequenzhomologen Proteinen erfolgte mit dem BLAST-Server der National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

### 3.6.7 Graphische Darstellungen

Die Oberfläche der Proteine sowie die Oberflächenpotentiale wurden mit dem Programm GRASP (A. Nicholls & B. Honig, Columbia University, USA) berechnet. Die Abbildungen der Proteinstrukturen sowie der Oberflächen wurden mit den Programmen MOLSCRIPT (Kraulis, 1991), BOBSCRIPT und RASTER3D (Merrit und Murphy, 1994) erstellt. Die schematischen Darstellungen der Formel erfolgten mit dem Programm ISIS Draw 2.2.1. (MDL Information Systems Inc., Köln). Die Sequenzalignments wurden mit den Programmen CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) und ALSCRIPT (Barton, 1993) hergestellt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die Kristallstruktur von humanem APC10

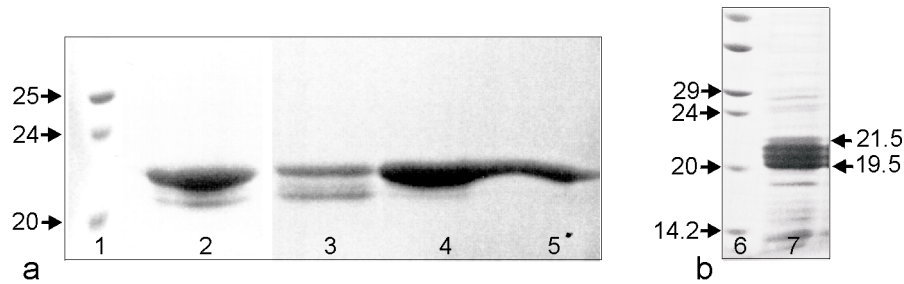
#### 4.1.1 Expression und Reinigung von humanem APC10 sowie von APC10 $\Delta$ C14

Der für das humane APC10 codierende Bereich wurde mit den Primern Doc1vorn und Doc1hin aus der c-DNA, welche freundlicherweise von Dr. Christian Gieffers (IMP, Wien) zur Verfügung gestellt wurde, amplifiziert und in den Expressionsvektor pET11d kloniert. Für eine bessere Initiation der Translation wurde die N-terminale Aminosäure Valin gegen Alanin ausgetauscht. Trotz verschiedener Expressionsversuche mit mehreren *E.coli*-Stämmen bei unterschiedlichen Temperaturen ließ sich nur ein geringer Teil des Proteins löslich exprimieren. Die Aminosäuresequenz des APC10 besitzt einen hohen theoretischen pI von 9,19 so dass Kationenaustauschermaterialien für die Reinigung des Proteins getestet wurden. Das lösliche Protein ließ sich bei pH 6-8 nicht an Q-Sepharose oder CM-Sepharose binden, was auf eine Mißfaltung des löslichen Teils des APC10 Proteins hindeutet. Um für die Kristallisation einer größeren Menge korrekt gefaltetes Protein herstellen zu können, wurde nach einem geeigneten Protokoll gesucht, um das in den *Inclusion bodies* akkumulierte Protein zu renaturieren.

#### 4.1.2 Renaturierung von APC10

Das Protein wurde in dem Methionin-auxotrophen Stamm B834(DE3) (Novagen) pUBS 250 (Brinkmann *et al.*, 1989) bei 37°C überexprimiert und die *Inclusion bodies* gereinigt. Die Ausbeute betrug 1-2 g *Inclusion bodies* pro Liter Kulturmedium. Das Protein aus den *Inclusion bodies* konnte nach einem für dieses Protein optimierten Verfahren renaturiert und gereinigt werden (Abb. 4-1). Da die Ausbeute bei der Rückfaltung von APC10 nur etwa 0,5 % betrug, wurden Rückfaltungen mit bis zu 10 L Puffer durchgeführt und das Protein vor der Dialyse auf 200 ml aufkonzentriert.

Durch 1D-NMR-Spektroskopie konnte eine einheitliche Faltung des Proteins mit einem großen Anteil  $\beta$ -Faltblatt nachgewiesen werden. Während der Renaturierung und Reinigung des Proteins wurde eine fortlaufende Degradation des Proteins bis zu einem stabilen Fragment festgestellt. Die Degradation war auch durch Aufreinigung bei 4 °C in Gegenwart von Protease-Inhibitoren nicht aufzuhalten.



**Abbildung 4-1: Reinigung des renaturierten APC10 Proteins**

**a)** Auftragung der verschiedenen Reinigungsstufen des renaturierten APC10 Proteins auf ein 15 %iges reduzierendes SDS-Polyacrylamid-Gel.

1 Molekulargewichtsmarker

2 Fraktion nach der Hydroxylapatit-Säule

3 Fraktion am Anfang des Proteinpeaks bei der Gelfiltration mit einer Superdex<sup>TM</sup>75 10/30 Säule

4 Fraktion in der Mitte des APC10 Peaks der Gelfiltration

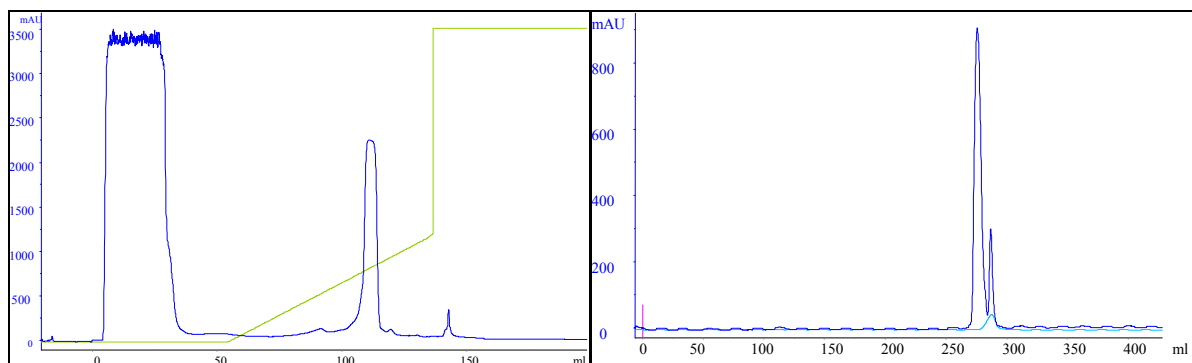
5 Fraktionen am Ende des APC10 Peaks der Gelfiltration

**b)** Degradation des Proteins in diskreten Schritten von 21,5 kDa auf 19,5 kDa während der Reinigung.

6 Molekulargewichtsmarker

7 Probe aus den Mitte des Peaks der Gelfiltration, ca. 1 Tag bei 4 °C aufbewahrt

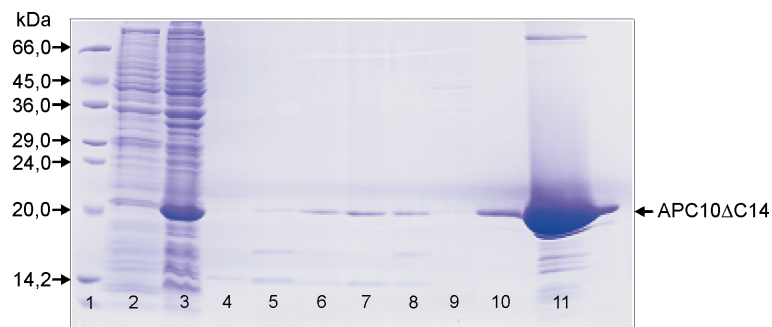
Die Analyse des stabilsten APC10-Fragmentes durch N-terminale Proteinsequenzierung und Massenspektroskopie zeigten, dass bei einem intakten N-Terminus lediglich die 14 C-terminalen Aminosäuren von APC10 durch die Proteolyse betroffen waren.



**Abbildung 4-2: Reinigung von APC10 $\Delta$ C14; links:** Elution des Proteins durch einen Salzgradienten von 50-500 mM NaCl in einem einheitlichen Peaks von einer Kationenaustauscher-Säule. Die Detektion erfolgte bei 280 nm (blau). Die Säule wurde gezielt mit protein überladen, was im Bereich zwischen 0 und 30 ml zu sehen ist. Der Verlauf des Salzgradienten ist durch die grüne Kurve dargestellt. Der Gradient steigt von 50 mM NaCl linear auf 500 mM NaCl an und danach in einem Schritt auf 1 M NaCl. Das APC10 $\Delta$ C14 Protein eluierte bei einer Salzkonzentration von 300 mM nach einem Volumen von 115 ml. **rechts:** Das Protein eluierte von der Gelfiltrationssäule nach einem Retentionsvolumen von 270 ml sehr dicht vor den Salzen, welche den zweiten kleineren Peak nach dem Hauptpeak verursachen. Die Detektion des Proteins erfolgte bei 280 nm (blaue Kurve). Zusätzlich ist der Verlauf Leitfähigkeit aufgetragen (hellblaue Kurve).

Um ein für die Kristallisation geeignetes stabiles und homogenes Protein zu erhalten, wurde durch PCR mit den Primern Doc1vorn und Doctrunc ein DNA-Konstrukt generiert, welches das um 14 Aminosäuren C-terminal verkürzte Protein APC10 Protein APC10 $\Delta$ C14 kodiert. Unerwarteterweise ließ sich das verkürzte Protein im gleichen Expressionsvektor und im gleichen *E.coli*-Expressionsstamm wie das Ausgangsprotein gut löslich und korrekt gefaltet exprimieren. Das Protein wurde wie im Methodenteil beschrieben durch Kationenaustausch-

Chromatographie und Grössenausschluss-Chromatographie gereinigt (Abb. 4-2 und 4-3). Die Affinität des Proteins zum Kationenaustauscher-Material S-Sepharose war unter den gewählten Bedingungen so hoch, dass die Säule gezielt mit dem Protein überladen werden konnte und bei einer Salzkonzentration von 300 mM NaCl das Protein nahezu rein von der Säule eluierte. Die bleibenden Verunreinigungen konnten durch die Gelfiltration mit einer High Load Superdex<sup>TM</sup>75 26/60 Säule abgetrennt werden. Das APC10 $\Delta$ C14-Protein eluierte von der Gelfiltrationssäule bei einem Volumen von 270 ml kurz vor dem Salzpeak in einer einheitlichen Monomerfraktion. Die Ausbeute an APC10 $\Delta$ C14 betrug 20 mg Protein pro Liter Kulturmedium.



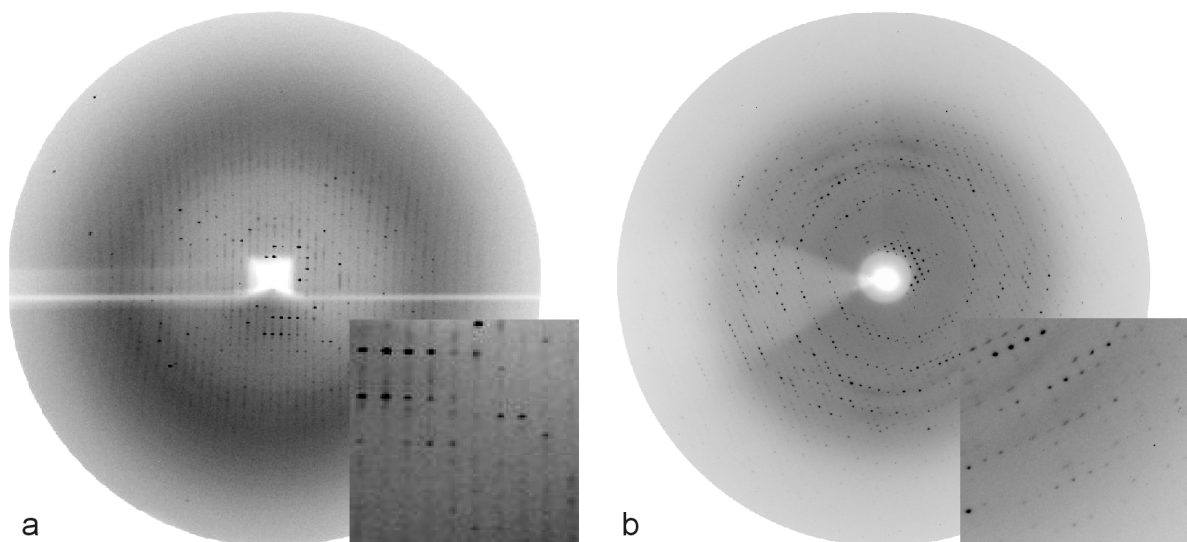
**Abbildung 4-3: Reinigung von APC10 $\Delta$ C14.** Die verschiedenen Reinigungsschritte des APC10 $\Delta$ C14 Proteins wurden auf ein 15 %iges reduzierendes SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

- |        |   |     |  |
|--------|---|-----|--|
| 1      | Molekulargewichtsmarker   | 2   | Zellysate vor Induktion der Expression |
| 3      | Gesamtllysate 6 h nach der Induktion                                    | 4–9 | Fraktionen der MonoS Elution           |
| 10, 11 | Protein nach der Gelfiltration 1:10 verdünnt und unverdünnt aufgetragen |     |  |

#### 4.1.3 Kristallisation von APC10 $\Delta$ C14

Initiale Kristallisationsbedingungen für APC10 $\Delta$ C14 konnten mit einem *incomplete factorial screen* (Carter und Carter, 1979) gefunden werden der mit Hilfe eines Pipettierroboters (Plato3000, Qiagen, Dreieich) hergestellt wurde und 168 verschiedene Bedingungen umfasste. Nach der Methode des „sitzenden Tropfens“ wurden 2  $\mu$ l einer Proteinlösung (20 mg/ml) mit 1  $\mu$ l der Reservoirlösung gemischt und bei 18 ° C nach der Dampfdiffusionsmethode über einem Reservoirvolumen von 0,5 ml aufkonzentriert. Nach 3-4 Monaten bildeten sich in einer Bedingung mit 0.1 M Mes/NaOH pH 6,5, 1,6 M Ammoniumsulfat und 10 % Dioxan erste Proteinkristalle. Die Reproduktion und Optimierung dieser Bedingung war nur durch Microseeding möglich. Der Zusatz von 0.1 M MgCl<sub>2</sub> und 5 mM Nickelacetat als Additiv zur Kristallbedingung führte zum Wachstum von Kristallen mit einer hexagonalen Grundfläche und einem Durchmesser von 100  $\mu$ m innerhalb von 24 Stunden ohne das Microseeding notwendig war. Diese Kristalle zeigten im Diffraktionsexperiment eine schwere Fehlordnung in einer Raumrichtung und waren daher zur Strukturlösung ungeeignet (Abb. 4-4a). Ein systematischer Austausch des organischen

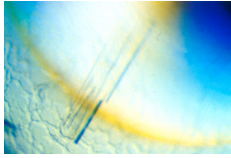
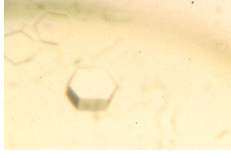
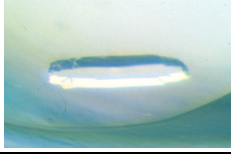
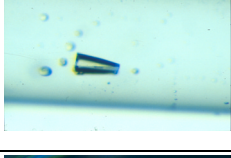

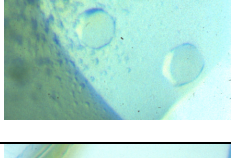
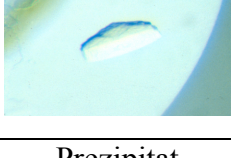
Lösungsmittels Dioxan in der Kristallbedingung gegen Lösungsmittel ähnlicher Polarität wie Aceton, Ethylacetat, Amylalkohol, Dimethylsulfoxid, Anilin und Acetonitril führte in allen Fällen zu Kristallen (Tab. 4-1), aber nur die mit Anilin erzeugten Kristalle wiesen keine Fehlordnung mehr auf (Abb. 4-4b) und beugten den Röntgenstrahl bei Messungen in einer Röntgenkapillare bis zu einer Auflösung von 2 Å. Die Kristalle konnten nach kurzzeitigem Einlegen in einen Kryopuffer bestehend aus 20 % Glycerin und Reservoirpuffer in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Um einer Auflösung der Kristalle im Kryopuffer vorzubeugen wurde das Glycerin vor der Zugabe zum Reservoirpuffer mit NaCl gesättigt. Für die Phasenbestimmung wurde das Protein definiert mit den notwendigen Schweratomen markiert, indem das mit Selenomethionin gelabelte Protein wie in den Methoden beschrieben hergestellt und kristallisiert wurde.



**Abbildung 4-4: Diffractionsbilder von APC10ΔC14 Kristallen**

- a)** Der mit DMSO als Additiv gewachsene Kristall streut bis 3,5 Å und zeigt eine deutliche Fehlordnung.  
**b)** Der mit Anilin statt DMSO hergestellte Kristall streute bei Messungen am Synchrotron bis 1.6 Å.

Tabelle 4-1: Verschiedene organische Lösungsmittel als Additive für die Kristallisation von APC10ΔC14

Lösungsmittel	Polarität in $\epsilon_0$ ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) <sup>1</sup> nach (Küster und Thiel, 1985)	Kristalle
Hexan	0,00	-
Aceton	0,56	
Dioxan	0,56	
Ethylacetat	0,58	
Amylalkohol	0,61	
Dimethylsulfoxid	0,62	
Anilin	0,62	
Acetonitril	0,65	
Ethanol	0,88	Prezipitat
Wasser	>> 1	-

<sup>1</sup> Unter der Bezeichnung Polarität sind die relativen Adsorptionsenergien für jedes Lösungsmittel an Aluminiumoxid aufgeführt (Snyder, 1968) (Küster und Thiel, 1985).

#### 4.1.4. Bestimmung von Raumgruppe und Zellkonstanten

Um die Raumgruppe sowie die Zellkonstanten der Kristalle zu bestimmen wurden Testbilder eines bei 100 K eingefrorenen Kristalls bis zu einer Auflösung von 2 Å aufgenommen. Die Auswertung der Daten ergab ein hexagonales Kristallgitter der Raumgruppe P622 mit den Zellkonstanten  $a = b = 97,64 \text{ \AA}$ ;  $c = 67,77 \text{ \AA}$  und  $\alpha = \beta = 90^\circ$ ;  $\gamma = 120^\circ$ . Da keinerlei systematische Auslöschungen zu beobachten waren, wurde das Vorhandensein einer



Schraubenachse ausgeschlossen. Das Verhältnis von Zellvolumen zum Molekulargewicht des Proteins betrug bei einem Molekül in der asymmetrischen Einheit  $2,39 \text{ \AA}^3/\text{Dalton}$ , woraus ein Solvensgehalt des Proteinkristalls von 49 % resultiert.

**Tabelle 4-2: Datensammlung und Statistik der Phasierung**

Datensammlung	f' Se	f'' Se	remote	f' Ni	nativ
Wellenlänge (Å)	0,9791	0,9797	0,9500	1,4800	1,600
Auflösung (Å)	2,05	2,05	2,05	2,25	1,600
Completeness (%)	99,56	99,56	99,82	74,57	100
R <sub>merge</sub> (overall) <sup>1</sup>	6,2	4,4	4,7	5,3	3,7
I / σ(I)	35,14	36,09	35,86	18,52	35,20
Phasing Statistik					
Phasing Power (iso) <sup>2</sup>	0,80	1,30	-	1,04	-
Phasing Power (ano) <sup>2</sup>	0,67	1,13	-	0,97	-
R <sub>cullis</sub> (iso)	0,81	0,63	-	0,68	-

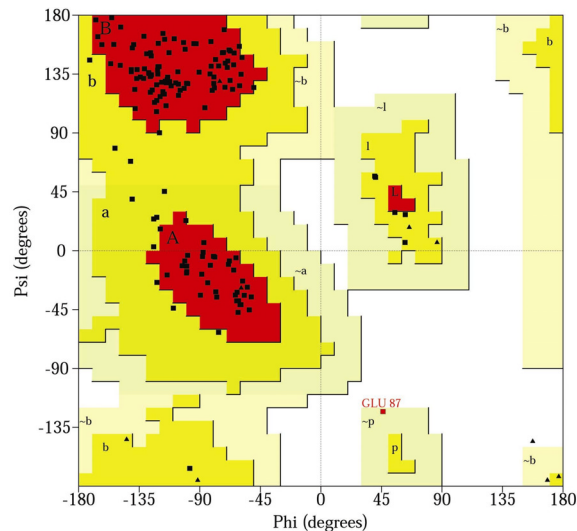
$$^1 R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{h,k,l} \sum_i |I_{h,k,l}(i) - \langle I_{h,k,l} \rangle|}{\sum_{h,k,l} \sum_i I_{h,k,l}(i)}, \quad ^1 I_{h,k,l}(i) \text{ Intensität des Reflexes für die individuelle Messung, } \langle I_{h,k,l} \rangle \text{ ist der}$$

Mittelwert des entsprechenden Reflexes

<sup>2</sup> Phasing Power, r.m.s.d. =  $(|F_H|/E)$ ,  $F_H$  ist die Strukturfaktoramplitude der Schweratomstruktur,  $E$  ist der *residual lack of closure*

#### 4.1.5 MAD-Experiment und Berechnung der initialen Elektronendichte

Die Kristallisierbarkeit des mit Selenomethionin markierten Proteins sowie das Vorhandensein von Nickel-Ionen im Kristall ermöglichten die Ermittlung experimentieller Phasen durch ein MAD-Experiment, welches an der BW6 beamline am DESY in Hamburg durchgeführt wurde. Es wurden 5 verschiedene Datensätze (Tab. 4-2) bei verschiedenen Wellenlängen und Auflösungen gemessen. Um die Vollständigkeit der Friedel-Paare zu gewährleisten, wurde jeder Datensatz in zwei um  $180^\circ$  versetzten Sektoren von jeweils  $60^\circ$  bei einer Rotation von  $0,5^\circ$  pro Bild aufgenommen. Die Lokalisierung der zwei Selen-Lagen sowie einer Nickel-Lage erfolgte mit dem Programm RSPS (Knight, 2000). Mit dem Programm MLPHARE (Otwinowski, 1991) konnten die Lagen unter Einbeziehung der anomalen Daten verfeinert und experimentielle Phasen bis  $2,5 \text{ \AA}$  Auflösung mit einer *figure of merit* von 0,287 berechnet werden. Durch Optimierung der Phasen und sowie ein *solvens flattening* mit mehreren Zyklen mit dem Programm DM (Cowtan, 1994) konnte eine Ausdehnung der Phasen bis zu einer Auflösung von  $2,05 \text{ \AA}$  bei einer *figure of merit* von 0,531 erreicht werden.



**Abbildung 4-5: Ramachandran-Plot der verfeinerten APC10 Struktur.** Für jede Aminosäure ist ihr  $\Phi$  (Abszisse) und  $\Psi$  (Ordinate) - Winkel dargestellt. Die energetisch günstigsten Regionen sind rot und die energetisch erlaubten Regionen gelb dargestellt. Hellgelb bezeichnet energetisch noch möglichen Regionen und weiß energetisch verbotene Bereiche. Für Glycine ( $\blacktriangle$ ) gelten aufgrund der fehlenden Seitenketten keine Beschränkungen. Alle anderen Aminosäuren ( $\blacksquare$ ) befinden sich außerhalb verbotener Bereiche. In der Region A befinden sich die Winkel für  $\alpha$ -helikale Strukturelemente, in B die Winkel von  $\beta$ -Faltblattsträngen, L steht für linksgängige  $\alpha$ -Helices und P für  $\epsilon$ -Regionen.

#### 4.1.6 Modellbau und Verfeinerung

Die resultierende Elektronendichte war so gut, dass sich mehr als 80 % der Proteinsequenz mit Seitenketten in die initiale Elektronendichte einbauen ließen. Die kristallographische Verfeinerung sowie die Berechnung der  $2F_o - F_c$  und  $F_o - F_c$ -Elektronendichten wurde mit dem Programm CNS Version 1.0 (Brunger *et al.*, 1998) unter Verwendung des hochaufgelösten nativen Datensatzes durchgeführt. Trotz der guten Qualität der Elektronendichte wurde für 9 C-terminale Reste von APC10 $\Delta$ C14 auch im Laufe der weiteren Verfeinerung keine Elektronendichte sichtbar, was auf eine hohe Flexibilität in dieser Region schließen lässt. Nach einer Moleküldynamik-Simulation während der ersten Verfeinerungsrunde sowie mehrmaligem Überbauen und Verfeinern von Atompositionen und B-Faktoren sank der R-Faktor von 34,4 % (freier R-Faktor 36,8 %) auf 26,4 % (freier R-Faktor 30,1 %). Nach dem Einbau von 157 Wassermolekülen und einem Nickel-Ion betrug der endgültige R-Faktor 20,9 % (freier R-Faktor 24,4 %). Die nur sehr schlecht sichtbaren Seitenketten der Reste 127-129 wurden eingebaut aber während der Verfeinerung nicht berücksichtigt. Das für eine erfolgreiche Kristallisation notwendige Anilin war in der Elektronendichte nicht sichtbar. Mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1996) wurde ein Ramachandran-Plot erstellt, (Abb. 4-5) um die Geometrie der Struktur zu überprüfen. Demnach befinden sich 86,5 % der dihedralen Winkel des Proteinerückgrats in energetisch günstigen Regionen und kein einziger in nicht erlaubten Regionen des Plots. Der Rest Glu 87 liegt in einem energetisch unfünstigen Bereich des Plots, ist aber durch die Elektronendichte eindeutig definiert. Die Struktur von

APC10 $\Delta$ C14 wurde unter der Bezeichnung 1JHJ in der RCSB Protein-Strukturdatenbank hinterlegt.

**Tabelle 4-3: Das Strukturmodell der APC10 Untereinheit des humanen APC**

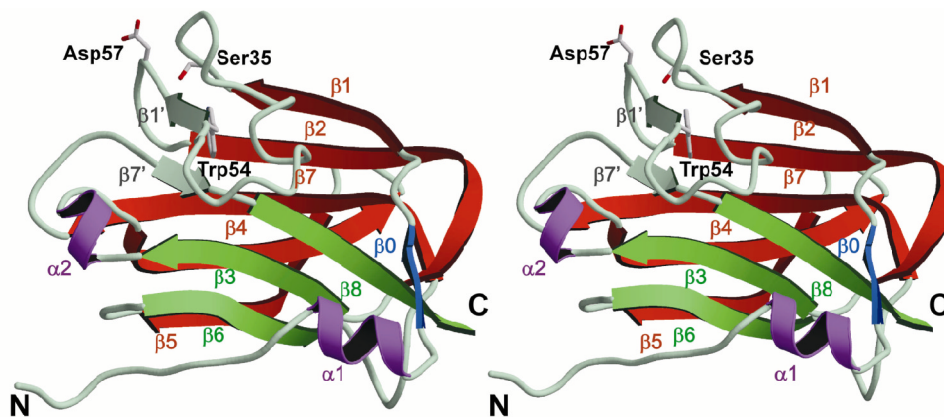
	Verfeinerung des Strukturmodells	
Anzahl Atome in der asymmetrischen Einheit	Proteinatome	1292
	Heteroatome (Nickel)	1
	Wasser	157
R-Faktor <sup>1</sup> / freier R-Faktor <sup>2</sup> [%]		20,09 (24,35)
r.m.s. Abweichungen von den Idealwerten	Bindungslängen [Å]	0,011
	Bindungswinkel [°]	1,71
	B-Faktoren gebundener Atome [Å <sup>2</sup> ]	3,284
B-Faktoren	alle Atome [Å <sup>2</sup> ]	30,482
	Proteinatome [Å <sup>2</sup> ]	29,371
	Rückgrat [Å <sup>2</sup> ]	26,848
	Lösungsmittel [Å <sup>2</sup> ]	39,574
Verteilung der $\Phi$ und $\Psi$ Winkel im Ramachandran Plot (Abb. 4-5)	energetisch bevorzugter Bereich [%]	86,5
	energetisch erlaubter Bereich [%]	12,1
	energetisch möglicher Bereich [%]	1,4
	verbotener Bereich [%]	0

$$^1 R = \frac{\sum \| |F_{obs}| - k |F_{calc}| \|}{\sum |F_{obs}|}, \quad |F_{obs}| \text{-experimentiell ermittelte Strukturfaktoren, } |F_{calc}| \text{-berechnete Strukturfaktoren,}$$

k-Skalierungsfaktor

<sup>2</sup> Der freie R-Faktor wurde mit einem Referenzdatensatz berechnet, der aus 5 % der Strukturfaktoren besteht, die nicht bei der Verfeinerung berücksichtigt wurden.

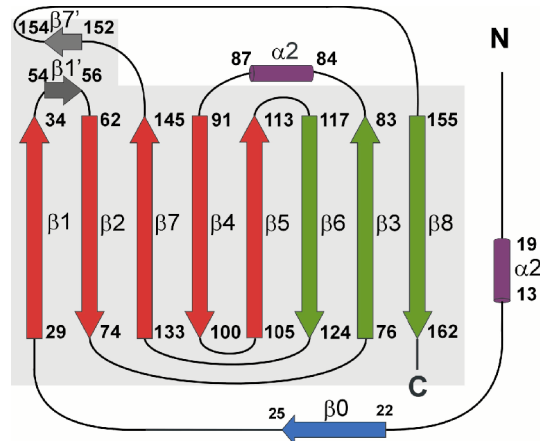
#### 4.1.7 Strukturbeschreibung



**Abbildung 4-6: Stereoabbildung des APC10 Strukturmodells mit Sekundärstrukturelementen.** Die Stränge welche die beiden Seiten des Sandwiches bilden sind grün und rot gefärbt. Die Seitenketten von Ser 35, Asp 57 und Trp54 sind als *stick*-Modell dargestellt.

Von den 185 Aminosäuren des humanen APC10 sind nur 162 in der Kristallstruktur enthalten. Für die Kristallisation mussten 14 C-terminale Reste entfernt werden, neun weitere C-terminale waren in der Elektronendichte nicht sichtbar. Das zentrale Element der Struktur ist ein  $\beta$ -Sandwich (Abb. 4-6), in welchem ein dreisträngiges Falblatt, bestehend aus  $\beta 3$ ,  $\beta 6$  und  $\beta 8$ , auf ein fünfsträngiges antiparalleles Falblatt, bestehend aus  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 7$ ,  $\beta 4$  und  $\beta 5$ ,

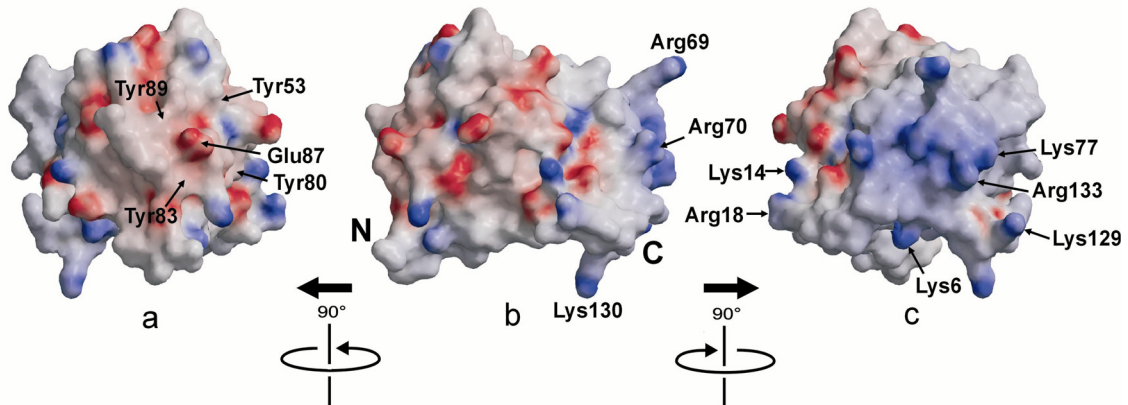
gepackt ist. Die Verbindung zwischen den Faltblättern wird auf der einen Seite durch den Loop  $\beta 3$ – $\beta 4$  mit der kurzen  $\alpha$ -Helix  $\alpha 2$ , den Loop  $\beta 7$ – $\beta 8$  mit dem Faltblatt  $\beta 7'$  und den verhältnismäßig großen  $\beta 1$ – $\beta 2$  Loop mit dem Faltblatt  $\beta 1'$  gebildet. Auf dieser Seite des Faltblattes befindet sich der N-Terminus, daher wird diese Region im Folgenden als N-terminale Loop-Region bezeichnet.



**Abbildung 4-7: Topologie der APC10 Struktur.** Die  $\beta$ -Faltblätter sind als Pfeile und die  $\alpha$ -Helices als Zylinder dargestellt. Die Faltblattstränge die das *jelly roll* Motiv bilden sind mit einer grauen Box unterlegt. Die Colorierung der Strukturelemente entspricht Abbildung 4-6.

Die gegenüberliegende Seite des Sandwiches, als C-terminale Loop-Region bezeichnet, wird durch die Loops  $\beta 2$ – $\beta 7$  und  $\beta 6$ – $\beta 7$  geschlossen. Weitere Strukturelemente sind die kurze  $\alpha$ -Helix  $\alpha 1$  und das Faltblatt  $\beta 0$ . Der N-Terminus wird aus 17 Resten in gestreckter Konformation gebildet, ist aber aufgrund eines hohen Prolin-Gehaltes (23 %) in diesem Bereich relativ rigide. Im Kristall wird der N-Terminus zusätzlich fixiert, indem die freie Aminogruppe des N-terminalen Alanins zusammen mit der gleichen Gruppe eines symmetrieverwandten Moleküls ein Nickel-Ion koordiniert. Die charakteristische Anordnung der  $\beta$ -Stränge im  $\beta$ -Sandwich (Abb. 4-7) wird auch als *jelly roll* oder *swiss roll* bezeichnet und ist von einer Klasse als „Discoidin-ähnlich“ oder „Galactose Oxidase D1 Domänen-ähnlich“ bezeichneter Proteine bekannt (Baumgartner *et al.*, 1998).

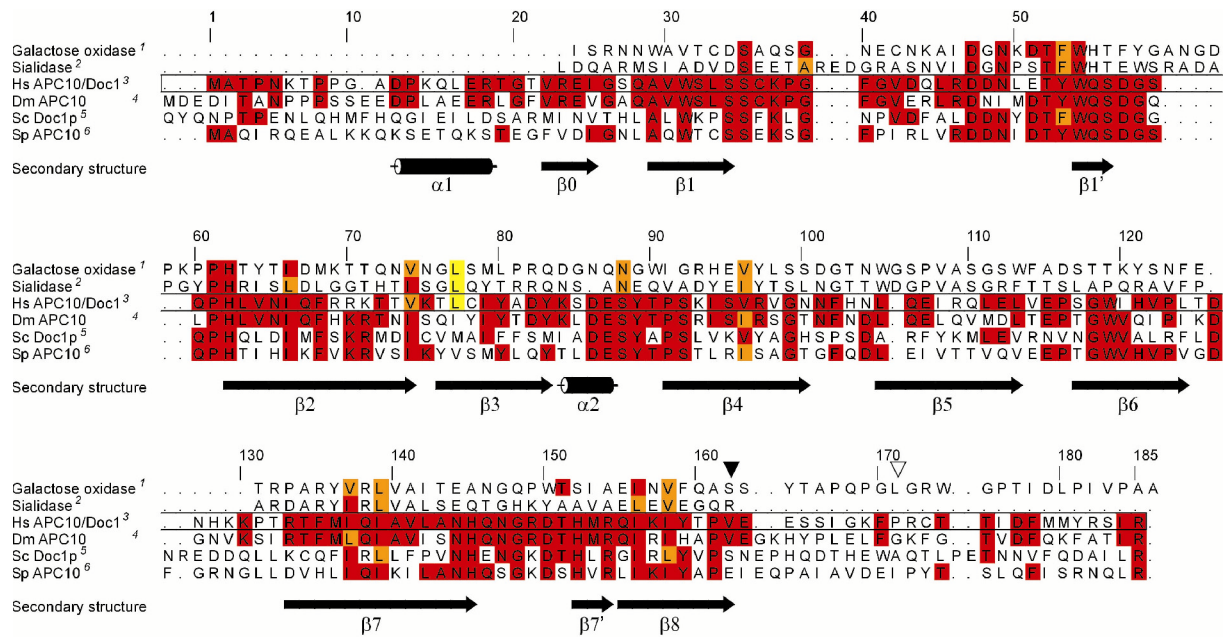
Die Verteilung der Oberflächenladung über das Protein ist ungleichmäßig. Im Bereich der C-terminalen Loop-Region fällt ein ausgeprägter Cluster positiver Ladungen bestehend aus den Seitenketten von Arg 18, Arg 23, Arg 69, Arg 70, Lys 71, Lys 75, Lys 129, Lys 130 und Arg 13 auf (Abb. 4-8c). In der N-terminalen Loop-Region befindet sich der negativ geladene Rest Glu 87, der durch einen Ring von Tyrosinen Tyr 53, Tyr 80, Tyr 83 und Tyr 89 sowie weiterer hydrophober Reste wie Pro 38, Phe 40 und Leu 50 umgeben ist.



**Abbildung 4-8: Oberfläche der APC10 Struktur.** Die Oberfläche ist in verschiedenen Orientierungen dargestellt und entsprechend dem elektrostatischen Potential von negativ (rot) bis positiv (blau) eingefärbt. **a)** Blick auf die N-terminale Loop Region, **b)** Standardorientierung entsprechend Abbildung 4-6, **c)** Blick auf die C-terminale Loop-Region mit einem Cluster positiver Ladungen.

#### 4.1.8 Strukturell homologe Proteine

Die Suche mit einem Poly-Alanin Modell der APC10-Struktur gegen die RCSB-Protein-Datenbank (Berman *et al.*, 2000) mit dem Dali-Suchalgorithmus (Holm und Sander, 1993) ergab eine unvermutet hohe strukturelle Homologie zu Proteinen aus Prokaryonten und Eukaryonten mit sehr unterschiedlicher Funktion (Tab. 4-4). Die größte Strukturähnlichkeit besteht zur D1 Domäne der Galactose Oxidase aus *Dactylium Dendroides*, zur Sialidase aus *Micromonospora viridifaciens*, zur C2 Domäne des humanen Gerinnungsfaktors Va und zum DNA-Reparaturprotein XRCC1 aus *Xenopus laevis*. Die D1 Domäne der Galactose Oxidase (Ito *et al.*, 1991), sowie die Galactose-bindende Domäne der Sialidase (Gaskell *et al.*, 1995) interagieren mit auf der pflanzlichen Zelloberfläche befindlichen Kohlenhydratketten und positionieren diese Substrate so gegenüber dem katalytisch aktiven Zentrum, das sich in einer anderen Domäne befindet. Die C2 Domäne von Gerinnungsfaktor Va (Macedo-Ribeiro *et al.*, 1999) bindet an Phospholipide in der Zellmembran von Mammalia während die N-terminale Domäne von XRCC1, das einzige cytoplasmatische strukturhomologes Protein, an einen Komplex aus gebrochener einzelsträngiger DNA und DNA-Polymerase  $\beta$  bindet (Marintchev *et al.*, 1999). Alle 4 Proteine weisen wie APC10 den *jelly roll*-Faltungstyp auf und gehören somit ebenfalls zu den Discoidin-ähnlichen Proteinen (Baumgartner *et al.*, 1998). Ihnen ist weiterhin gemeinsam, dass sie eine analoge Region auf der Oberfläche des Proteins, die in der APC10 Struktur dem  $\beta 1$ - $\beta 1'$ - $\beta 2$  Loop entspricht, zur Bindung eines Liganden nutzen.

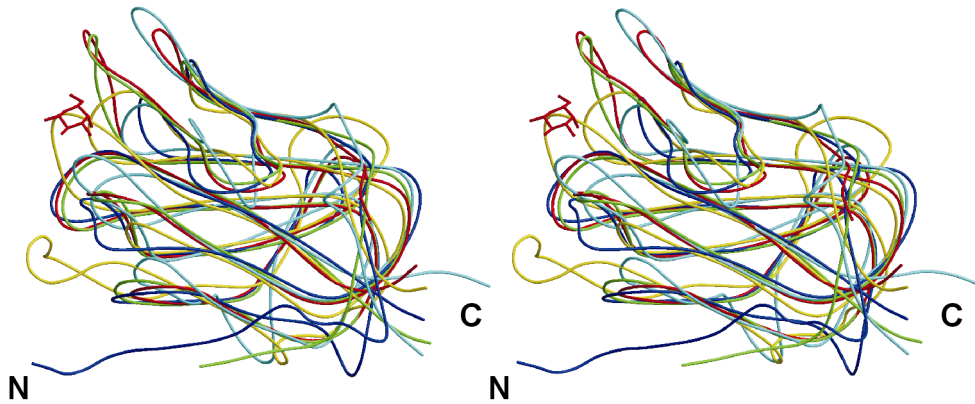


- <sup>1</sup> D1 Domäne der Galactose Oxidase (*Dactylium dendroides*)
- <sup>2</sup> Galactose-bindende Domäne der Sialidase (*Micromonospora viridifaciens*)
- <sup>3</sup> APC10/Doc1 (*Homo sapiens*)
- <sup>4</sup> APC10 (*Drosophila melanogaster*)
- <sup>5</sup> Doc1p (*Saccharomyces cerevisiae*)
- <sup>6</sup> APC10 (*Schizosaccharomyces pombe*)

**Abbildung 4-9: Strukturbasiertes Sequenzalignment.** Das humane APC10 Protein wurde zusammen mit strukturhomologen Proteinen, sowie den APC10 Untereinheiten aus anderen Spezies dargestellt. Die Nummerierung bezieht sich auf die Sequenz des humanen APC10 in der Box. Der schwarze Pfeil markiert das Ende der in der Kristallstruktur von APC10ΔC14 sichtbaren Sequenz und der weiße Pfeil den C-Terminus von APC10ΔC14. Rot unterlegte Bereiche zeigen Identität zwischen den Proteinsequenzen und orange Bereiche zeigen einen niedrigeren Grad der Konservierung zwischen den Sequenzen. Eine Sequenzähnlichkeit zwischen den oberen drei Sequenzen ist gelb dargestellt. Die Sekundärstrukturelemente der APC10-Struktur sind unterhalb der Sequenzen eingezeichnet.

Eine Überlagerung der Strukturen (Abb. 4-10) zeigt, dass die Ähnlichkeit zur APC10 Struktur bei Faktor Va und XRCC1, die keine Sequenzähnlichkeit zum APC10 besitzen, hauptsächlich in der Topologie der Sekundärstruktur und im  $\beta$ -Sandwich besteht. Galactose Oxidase und Sialidase zeigen auch in den Loops eine ausgeprägte Strukturhomologie zu APC10. Lediglich der  $\beta 1'$ - $\beta 2$ -Loop, welcher in den Strukturen der Galactose Oxidase und der Sialidase eine Wand der Galactose-Bindungstasche bildet, ist bei APC10 etwas verkürzt. Im Gegensatz zu der ausgeprägten Strukturähnlichkeit besteht zwischen den Proteinsequenzen der Galactose Oxidase D1 Domäne sowie der Galactose-bindenden Domäne der Sialidase und APC10 nur eine geringe Ähnlichkeit (Abb. 4-9). Aminosäuren, die in der Galactose Oxidase und in der Sialidase zu Bindung des Substrates beitragen, sind im APC10 Protein nicht konserviert. Die bestehenden invarianten Reste sind nahezu vollständig im  $\beta 1$ - $\beta 1'$ - $\beta 2$ -Loop lokalisiert. Dabei sind besonders die auch in den APC10 verschiedener Spezies invarianten Reste Ser 35, Trp 54 hervorzuheben. Ser 35 stabilisiert den Loop durch Wasserstoffbrücken zwischen dem

Carbonyl-Sauerstoff und dem Ne von Trp 54 und dem Oy der Seitenkette zum N von Asp 57 (Abb. 5-2).



**Abbildung 4-10: Überlagerung strukturähnlicher Proteine.** Stereodarstellungen des Proteinrückgrates der überlagerten Strukturen von APC10 (blau), der Galactose oxidase D1 Domäne (grün), der Galactose-bindenden Domäne aus Sialidase (rot), der N-terminalen Domäne aus XRCC1 (türkis) und der C2 Domäne des Gerinnungsfaktors Va (gelb). Das gebundene Galactose-Molekül aus der Kristallstruktur der Sialidase ist als rotes *Stick*-Modell dargestellt.

**Tabelle 4-4: Proteine mit der grössten Strukturhomologie zu APC10**

Protein	Species	PDB-Code	Überlagerte C <sub>α</sub> Atome <sup>1</sup>	r.m.s.d der C <sub>α</sub> Atome <sup>2</sup> [Å]
Galactose Oxidase	<i>Dactylium dendroides</i>	1GOF	139	2,3
Sialidase	<i>Micromonospora viridifaciens</i>	1EUT	143	2,5
Gerinnungsfaktor Va C2 Domäne	<i>Homo sapiens</i>	1CZT	127	2,8
DNA-Reparaturprotein XRCC1	<i>Xenopus laevis</i>	1XNA	124	3,0

<sup>1</sup> Überlagerte C<sub>α</sub> Atome: Anzahl der C<sub>α</sub>-Atome zweier überlagerter Strukturen, bei denen der Abstand zwischen beiden Strukturen bei mindestens 3 Resten hintereinander nicht mehr als 3,8 beträgt.

<sup>2</sup> r.m.s.d.-*root mean square deviation*

N-Anzahl der überlagerten Ca-Atome

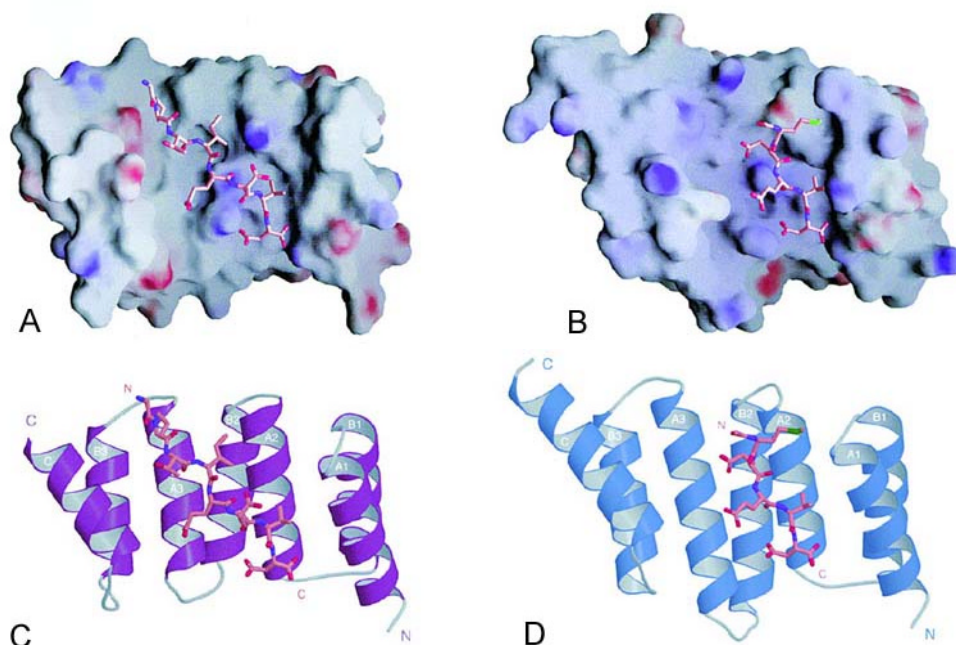
d<sub>i</sub>-Abstand von Atom i in Struktur 1 und 2

$$r.m.s. = \sqrt{\frac{\sum_i^N (d_i)^2}{N}}$$

#### 4.1.9 Der C-Terminus von APC10

Die Anwesenheit der 14 C-terminalen Reste bei der Expression in *E. coli* führt zu einer Missfaltung des Proteins und nach der Renaturierung sind die Reste für eine stufenweise proteolytische Abspaltung zugänglich. In der Kristallstruktur von APC10ΔC14 sind noch weitere 9 C-terminale Aminosäuren nicht sichtbar. Der C-Terminus von APC10 interagiert wahrscheinlich nicht mit dem APC10 Protein, sondern könnte *in vivo* durch eine Interaktion mit anderen Untereinheiten des APC-Komplexes stabilisiert werden. Deshalb wurden in einer Kooperation mit der Abteilung von J. M. Peters am Institut für Molekulare Pathologie in Wien die Wechselwirkungen von APC10, C-terminal verkürzten APC10-Varianten und einem Peptid, welches den 23 in der Kristallstruktur fehlenden C-terminalen Resten

entspricht, mit anderen APC-Untereinheiten untersucht. Bei Coexpression verschiedener (His-HA)- oder (GST-HA)-mrkierter APC-Untereinheiten in Insektenzellen durch rekombinante Baculoviren kann CDC27/APC3 die vollständige Form von APC10 präzipitieren. Bei diesen Experimenten blieb ein N-terminal intaktes, verkürztes APC10 Fragment in Lösung, das wahrscheinlich APC10 $\Delta$ C14 entspricht. Ein (GST-HA)-APC10 Fusionsprotein ohne die 23 C-terminalen Aminosäuren und auch das APC10 $\Delta$ C14 Konstrukt konnten bei *in vitro* Bindungsstudien im Gegensatz zum APC10 nicht mehr an CDC27/APC3 binden. Das synthetische Peptid, das den in der Kristallstruktur fehlenden 23 Resten entspricht, war allein in der Lage CDC27 zu präzipitieren (Wendt *et al.*, 2001). Die APC-Untereinheit CDC27/APC3 enthält 10 *tetratricopeptide-repeats* (TPR) (Siehe 2.1.5.). Für dieses verbreitete Strukturmotiv wurde bereits nachgewiesen, dass es unstrukturierte N-terminale oder C-terminale Peptidabschnitte binden kann. Das Chaperon-Adapterprotein Hop ist ein Beispiel für die Bindung von Proteinen durch TPR-Domänen über Peptide in gestreckter Konformation. Hop koordiniert die Chaperone Hsp70 und Hsp90, indem die TPR1 Domäne von Hop das C-terminale Heptapeptid von Hsp70 spezifisch bindet, während die TPR2A Domäne das C-terminale Pentapeptid von Hsp90 bindet (Abb. 4-11) (Gatto *et al.*, 2000; Scheufler *et al.*, 2000).



**Abbildung 4-11: TPR-Domänen von Hop1 im Komplex mit Peptiden, Abbildung aus (Scheufler *et al.*, 2000)** **A+C:** TPR1 Domäne mit dem gebundenen Peptid welches den 12 C-terminalen Resten von Hsp70 entspricht; **B+D:** TPR2A Domäne im Komplex mit einem Peptid welches den 12 C-terminalen Resten von Hsp90 entspricht. A und B zeigen eine Oberflächendarstellung des elektrostatischen Potentials in der Bindungstasche, rot stellt negative Ladungen und blau positive Ladungen dar. Die Abbildungen C und D stellen das Proteinrückgrat der TPR-Domänen zusammen mit den gebundenen Peptiden dar. Die Peptide sind als Stick-Modelle dargestellt.



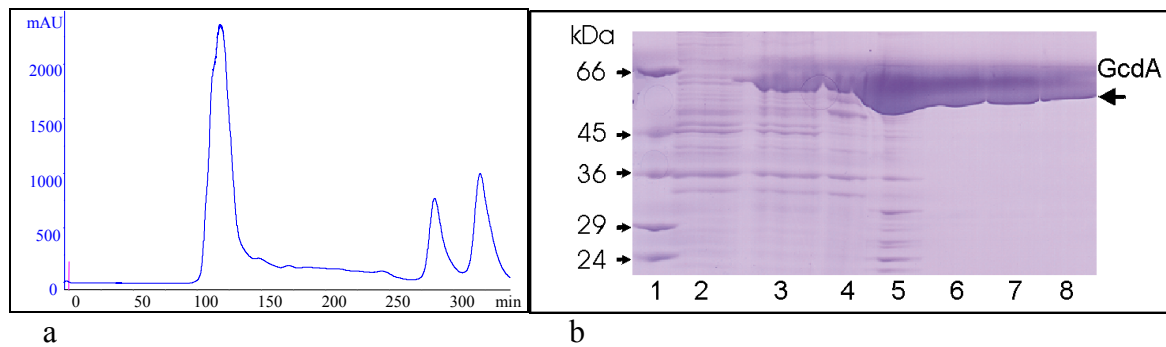
## 4.2 Die Kristallstruktur der Carboxytransferase-Untereinheit (GcdA) der Glutaconyl-CoA Decarboxylase aus *Acidaminococcus fermentans*

Das gereinigte Protein für die ersten Kristallansätze sowie die in den Expressionsvektor pJF118HE (Furste *et al.*, 1986) klonierte, für die Carboxytransferase-Untereinheit der Glutaconyl-CoA Decarboxylase (GcdA) aus *Acidaminococcus fermentans*, codierende DNA-Sequenz (Bendrat und Buckel, 1993; Braune *et al.*, 1999) wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Professor Buckel, Laboratorium für Mikrobiologie des Fachbereiches Biologie der Philipps-Universität Marburg bereitgestellt. Die Reinigung erfolgte dort wie in Braune *et al.*, 1999 beschrieben (Braune *et al.*, 1999). Da jedoch größere Mengen des Proteins sowie das mit Selenomethionin markierte Protein hergestellt werden mussten, wurde die Reinigung in Martinsried neu etabliert.

### 4.2.1 Proteinexpression und Reinigung der GcdA

Die Proteinexpression mit dem pJF119HE-Vektor in dem *E.coli*-Stamm B834 mit dem Helferplasmid pUBS250 (Brinkmann *et al.*, 1989) ergab eine grosse Ausbeute an GcdA-Protein. Der Testaufschluss einer kleinen Menge Zellen ergab, dass sich das Protein vollständig im Überstand befand. Nach dem Aufschluss der Zellen einer 12 L Expression und dem Abzentrifugieren der Zellrückstände trübte sich das Zelllysate jedoch und eine Analyse auf einem 12,5 % SDS-Polyacrylamid-Gel ergab, dass das rekombinant exprimierte GcdA-Protein sedimentierte. Der Niederschlag ließ sich jedoch durch eine Erhöhung der Salzkonzentration auf 0,5 M vollständig lösen. Eine Dialyse des in 0,5 M NaCl/1×PBS gelösten Niederschlages gegen Wasser in einem Dialyseschlauch über 2 Stunden zeigte wieder einen Niederschlag, bei dem es sich aber um Mikrokristalle handelte. Aufgrund dieses Verhaltens wurde wie in den Methoden beschrieben ein erster Reinigungsschritt durch zweifache Umkristallisation etabliert. Das wieder gelöste Protein war bereits so sauber, dass als zweiter Reinigungsschritt nur noch eine Gelfiltration mit einer Superdex75 26/60 High Load Säule angeschlossen wurde (Abb. 4-12). Das Protein eluierte von dieser Säule sehr nahe am Ausschlussvolumen, was auf das Vorhandensein eines Multimers hinweist. Da das Molekulargewicht sogar eines Dimers nicht mehr dem optimalen Grössenbereich für die Superdex<sup>TM</sup>75 High load Säule entspricht, wurden Testläufe mit einer Superose12 10/30 Säule sowie einer Superdex 200 10/30 Säule durchgeführt, welche aber keine Verbesserung der Reinheit zeigten. Die Ausbeute betrug bei dieser Reinigung bis zu 100 mg gereinigtes Protein pro Liter Kultur. Das mit Selenomethionin markierte Protein wurde auf die gleiche

Weise gereinigt. Das Protein war in dem Hochsalzpuffer (500 mM NaCl, 50 mM Phosphat, pH 7,5) bis zu Konzentrationen von mehr als 30 mg/ml Protein löslich.

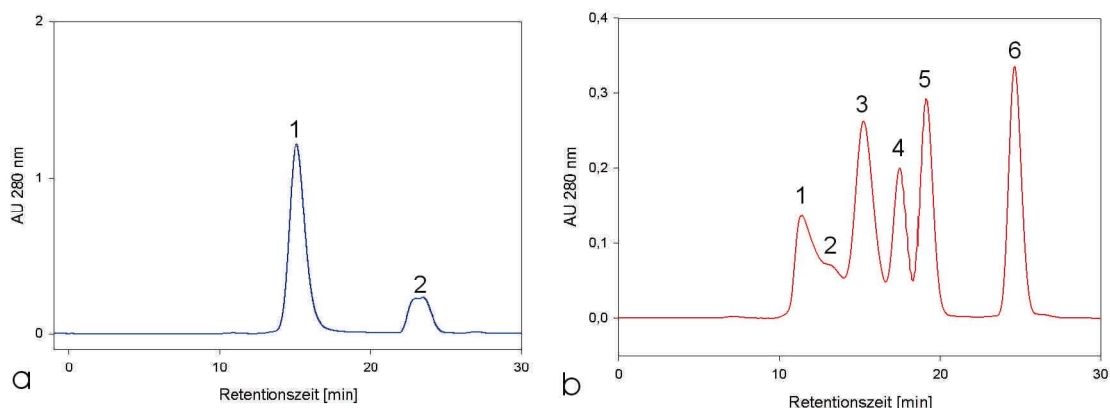


**Abbildung 4-12: Reinigung des GcdA-Proteins** a) Das GcdA-Protein eluiert nach 120 min (Flussrate von 1 ml/min) von der Superdex<sup>TM</sup>75 HighLoad Säule. Die Verunreinigungen eluieren nach dem Hauptpeak. Der Peak zeigt eine leichte Schulter, die nicht auf eine Verunreinigung zurückzuführen ist, da das Protein auf dem Gel (b) und auch bei dem mit dieser Charge durchgeführten Experiment in 4.2.2 homogen erscheint. Möglicherweise bildet sich bei der hohen Proteinkonzentration im Peak ein Tetramer aus, welches auch in der Kristallstruktur beobachtet wurde (Siehe 4.2.5). Die zwei Peaks oberhalb von 250 min zeigen Verunreinigungen mit sehr geringem Molekulargewicht, die im Gel nicht sichtbar sind, sowie Salze. Die Detektion des Proteins erfolgte bei 280 nm. b) Verschiedenen Stufen der Expression sowie der Reinigung, aufgetragen auf ein 10 %iges reduzierendes SDS-Polyacrylamid-Gel. Der Schatten oberhalb der GcdA-Banden ist ein Artefakt das durch das Einscannen des Gels entsteht.

1	Molekulargewichtsmarker	2	Zellen vor Induktion
3	Zellen 8 h nach Induktion	4	Proteinsediment nach der Lyse
5	Protein nach der Umkristallisation		
6-8	Fraktionen der Gelfiltration an Anfang, Mitte und Ende des Peaks		

#### 4.2.2. Molekulargewichtsbestimmung der GcdA

Um das Molekulargewicht des gereinigten Proteins zu bestimmen wurden analytische Gelfiltrationen mit einer Superose12 PC 3.2/30 Säule an einem SMART System durchgeführt. Die Retentionszeit des GcdA Proteins lag mit 15,12 min leicht unter der Retentionszeit von 15,21 min eines 158 kDa Eichproteins aber deutlich über der Retentionszeit von 17,17 min eines 44 kDa Proteins (Abb. 4-13).



**Abbildung 4-13: Analytische Gelfiltration zur Abschätzung des Molekulargewichts des GcdA Proteins**

Die analytische Gelfiltration wurde mit einer Superose12 PC 3.2/30 Säule an einem SMART System mit einer Flussrate von 80 l/min durchgeführt (Puffer: 50 mM TRIS pH 7,5; 500 mM NaCl) a) Elution des GcdA Proteins im Peak 1 mit einer Retentionszeit von 15,12 min. Peak 2 zeigt den Salzpeak . b) Eichung des Superose12 Säule mit einem Gemisch von Eichproteinen in den gleichen Puffer wie in a)

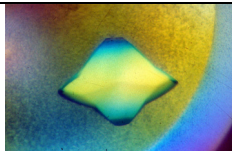
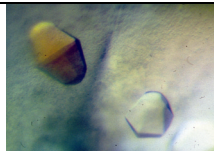
Peak 1	11,39 min	Thyroglobulin	670 kDa	Peak 4	17,49 min	Ovalbumin	44,0 kDa
Peak 2	~13,13 min	Schulter vom Thyroglobulin-Peak		Peak 5	19,15 min	Myoglobin	17,0 kDa
Peak 3	15,24 min	IgG	158 kDa	Peak 6	24,67 min	Vitamin B12	1,35 kDa

Das Ergebnis dieses Experimentes zeigt, dass das Protein in einem Hochsalzpuffer (500 mM NaCl) bei pH 7,5 möglicherweise als Dimer von 130 kDa vorliegt. Wäre das Protein ein Trimer von 195 kDa, müsste die Retentionszeit deutlich größer als 15,21 min sein. Das Monomer würde etwas unterhalb von 17,17 min eluieren.

### 4.2.3. Kristallisation

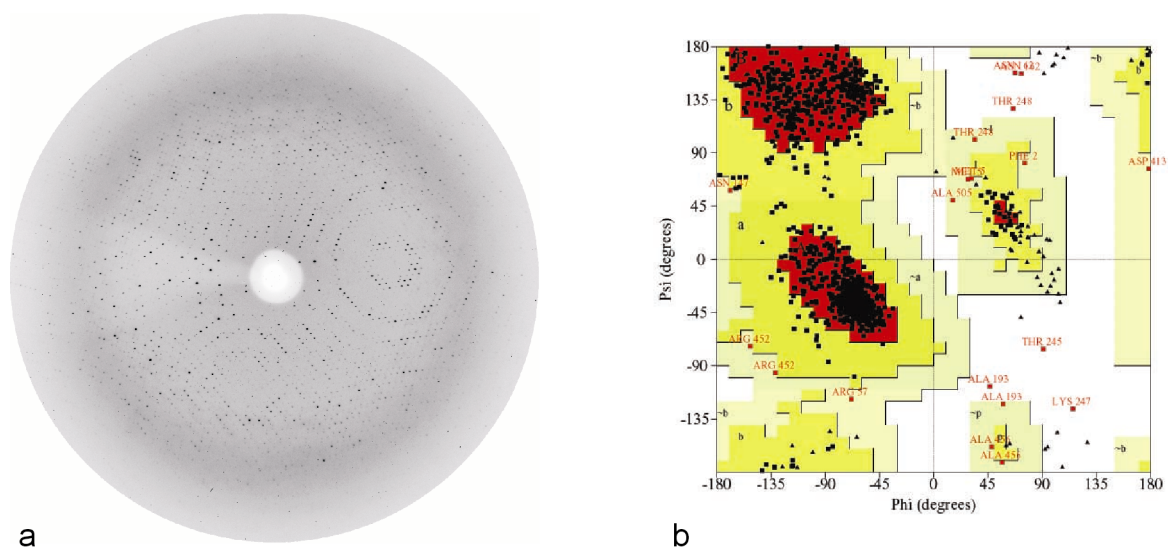
Durch einen *incomplete factorial screen* (Carter und Carter, 1979) mit den *Crystal screen* und *Crystal screen II* Kits (Hampton, Laguna Hills, USA) wurden mehrere geeignete Startbedingungen für die Kristallisation des GcdA Proteins gefunden. Die Mehrheit der Bedingungen führte zu Verzwilligung oder Fehlordnung der Kristalle. Zwei Kristallisationsbedingungen (Tab. 4-5) konnten optimiert werden, so dass sie für Röntgenexperimente ausreichend große, den Röntgenstrahl beugende Kristalle ergaben.

**Tabelle 4-5: Kristallisation der GcdA**

Raumgruppe	P41212	P6422
Kristallisationsbedingungen	 0,1 M Acetatpuffer pH 4,7 1,6 M Natriumformiat -	 0,1 M Mes pH 6,6 2,2 M Ammoniumsulfat 5 % Dioxan
Zellkonstanten	$a = b = 151,80 \text{ \AA}$ , $c = 162,45 \text{ \AA}$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$a = b = 101,96 \text{ \AA}$ , $c = 248,04 \text{ \AA}$ $\alpha = \beta = 90^\circ$ , $\gamma = 120^\circ$
Auflösung	2,5 $\text{\AA}$	3 – 4 $\text{\AA}$ , unterschiedlich gutes Streuvermögen in den verschiedenen Raumrichtungen
Moleküle per ASU	2	2

Innerhalb von 6 Tagen wuchsen die Kristalle bis zu einer Größe von maximal 0,5 mm in allen Dimensionen und blieben ca. 1 Woche für Röntgenexperimente brauchbar. Für erste Messungen bei Raumtemperatur wurden die Kristalle in Röntgenkapillaren eingeschlossen. Die Zellkonstanten der Kristalle sind in Tabelle 4-5 zusammengestellt. Das Vorhandensein von Schraubenachsen wurde durch die systematischen Auslöschungen bei  $h = 0$ ,  $k = 0$  und  $l \neq 4n$  sowie  $h \neq 2n$ ,  $k = 0$  und  $l = 0$  (P41212) und  $h = 0$ ,  $k = 0$  und  $l \neq 2n$  (P6422) bestimmt. Die Orientierung der Schraubenachsen wurde in der ersten berechneten Elektronendichte anhand der Händigkeit der  $\alpha$ -Helices bestimmt. Die Kristalle der Raumgruppe P41212 waren für die Aufnahme eines kompletten Datensatzes bei Raumtemperatur nicht geeignet. Der

Schaden an den Kristallen durch die energiereiche Röntgenstrahlung war so gross dass sich die Kristalle während der Messung vollständig auflösten. Die Kristalle wurden daher mit einem Kryoloop durch einen Kryopuffer (40 % v/v Reservoirpuffer, 30 % 4 M Ammoniumsulfatlösung, 30 % Ethylenglycol) gezogen und im Stickstoffstrom bei 100 K schockgefroren. Die Kristalle der Raumgruppe P6422 verhielten sich stabiler, zeigten aber eine Anisotropie, die eine vollständige Datensammlung bei einer höheren Auflösung als 3,5 Å verhinderte. Das mit Selenomethionin markierte Protein wurde in der Raumgruppe P41212 kristallisiert.



**Abbildung 4-14: Diffraktionsbild eines GcdA Kristalls und der Ramachandran-Plot der GcdA Struktur**  
**a)** Röntgendiffraktionsbild eines bis 2,5 Å streuenden bei 100 K eingefrorenen GcdA Kristalls der Raumgruppe P41212. **b)** Ramachandran-Plot der verfeinerten Struktur des GcdA Dimers. Für jede Aminosäure ist ihr  $\Phi$  (Abszisse) und  $\Psi$  (Ordinate)-Winkel dargestellt. Die energetisch günstigsten Regionen sind rot und die energetisch erlaubten Regionen gelb dargestellt. Hellgelb bezeichnet energetisch noch möglichen Regionen und weiss energetisch verbotene Bereiche. Für Glycine ( $\blacktriangle$ ) gelten aufgrund ihrer fehlenden Seitenketten keine Beschränkungen. Die anderen Aminosäuren ( $\blacksquare$ ) befinden sich fast alle ausserhalb der verbotenen Bereiche. Bei den 6 Resten in der verbotenen Region handelt es sich um Aminosäuren in dem sehr schlecht definierten Bereich in der Aminosäuresequenz von Rest 220 bis Rest 250.

#### 4.2.4 MAD-Experiment, Lösung des Phasenproblems und Modellbau

In der asymmetrischen Einheit der P41212-Kristalle befinden sich nach dem Matthews Koeffizienten 2 Moleküle mit je 17 Methioninen pro Molekül, somit 34 mögliche Selen-Positionen in den Kristallen des Selenomethionin-markierten Proteins. Da die grosse Anzahl der Selen-Positionen deren Lokalisierung in einem MAD-Experiment erschwert, wurden die Kristalle zusätzlich 4 Tage in eine 10 mM Lösung von Platinterpyridin in Kristallisationspuffer eingelegt. Mit diesen Kristallen wurden an der BW6 Beamline des HASYLAB (DESY, Hamburg) ein MAD-Experimente durchgeführt (Tab. 4-6). Um die zu messenden Wellenlängen zu bestimmen, wurden ebenfalls an der BW6 Beamline Fluoreszenzscans zur Bestimmung der  $K\alpha$ -Absorptionskante durchgeführt. Da zur

Auswertung der anomalen Daten möglichst vollständige Friedel-Partner nötig sind, wurde jeder Datensatz in zwei um 180 ° versetzten Sektoren von jeweils 69 ° bei einer Rotation von 0,75 ° pro Bild aufgenommen.

**Tabelle 4-6: Datensammlung und Phasierungsstatistik**

	f' Pt	f Pt	f' Se	f Se	remote Pt	nativ	Komplex
Wellenlänge (Å)	1,07175	1,0723	0,9799	0,9793	0,9500	1,0500	1,5418
Auflösung (Å)	2,50	2,50	2,30		2,50	2,65	3,20
Completeness (%)	99,2	99,2	97,5	98,3	97,8	99,9	90,2
R <sub>merge</sub> (overall) <sup>1</sup>	7,2	7,1	9,2	7,9	7,5	9,9	12,2
I / σ(I)	17,1	17,3	13,1	16,1	17,0	11,8	5,6
Phasierungsstatistik							
Phasing Power (iso)	2,170	2,183	-	-	2,340	0	-
Phasing Power (ano)	2,163	2,253	-	-	1,21	0	-
R <sub>cullis</sub> (iso)	0,6266	0,6254	-	-	0,6242	0	-

$$^1 R_{merge} = \frac{\sum_{h,k,l} \sum_i |I_{h,k,l}(i) - \langle I_{h,k,l} \rangle|}{\sum_{h,k,l} \sum_i I_{h,k,l}(i)}$$

<sup>1</sup>  $R_{merge}$  =  $\frac{\sum_{h,k,l} \sum_i |I_{h,k,l}(i) - \langle I_{h,k,l} \rangle|}{\sum_{h,k,l} \sum_i I_{h,k,l}(i)}$ ,  $I_{h,k,l}(i)$  Intensität des Reflexes für die individuelle Messung,  $\langle I_{h,k,l} \rangle$  ist der

Mittelwert des entsprechenden Reflexes

<sup>2</sup> Phasing Power, r.m.s.d. =  $(|F_H|/E)$ ,  $F_H$  ist die Strukturfaktoramplitude der Schweratomstruktur,  $E$  ist der *residual lack of closure*

Mit dem Programm RSPS (Knight, 2000) konnten über anomale-Differenz-Patterson-maps 4 Platin-Lagen lokalisiert werden. Weiterhin setzten sich noch eine Reihe von Peaks deutlich von Hintergrund ab, die den Selen-Positionen zuzuordnen waren. Das Programm SHAKE&BAKE (Weeks und Miller, 1999) konnte anhand der Unterschiede in den anomalen Streubeiträgen zwischen den Friedel-Partnern im f'(Pt) Datensatz mit direkten Methoden die 4 Platin-Positionen sowie 27 Selen-Positionen lokalisieren. Diese Lagen konnten ebenfalls vollständig mit RSPS verifiziert werden. Das Programm MLPHARE erwies sich aber als ungeeignet für eine Phasierung einer so grossen Anzahl von Schweratompositionen. Die MAD-Phasierung mit den kompletten Selen und Platin-Lagen mit dem Programm SHARP (de La Fortelle und Bricogne, 1997) war zu zeitaufwendig, da die Berechnungen nach 14 Tagen noch keine Konvergenz erreicht hatten. Daher wurde eine Strukturlösung mit SHARP (de La Fortelle und Bricogne, 1997), bei der nur die 4 Platin-Positionen und deren anomale Beiträge zur MAD-Phasierung benutzt wurden, angestrebt. Die zusätzlich enthaltenen Selen-Positionen störten bei diesem Vorgehen. Deshalb wurde ein Datensatz des Selenoproteins

ohne weitere Schweratome als nativer Datensatz benutzt, mit der Konsequenz, dass die Struktur mit Selenomethioninen gebaut werden musste.

Aus der Phasierung mit nur 4 Platinpositionen ergab sich eine Elektronendichte, die für den Einbau der Sekundärstrukturelemente ausreichend war. Die Selen-Positionen wurden für die Phasierung nicht benötigt, waren aber beim Einpassen der Proteinsequenz sehr hilfreich. Alle 27 durch Shake&Bake (Weeks und Miller, 1999) gefundenen Seleno konnten in der Elektronendichte wiedergefunden werden.

Die *overall figure of merit* nach der Phasierung mit SHARP betrug 0,602. Durch *solvent flattening* mit dem Programm DM (Cowtan, 1994) konnte die Elektronendichte bis zu einer *overall figure of merit* von 0,712 optimiert werden. Die mit den experimentiellen Phasen berechnete Elektronendichte war ausreichend, um mit dem Programm O (Jones *et al.*, 1991) nahezu alle Sekundärstrukturelemente als Poly-Alanin-Modell in beide Monomere einzubauen. Aus dem Poly-Alanin-Modell wurden mit dem Programm SFALL (Otwinowski, 1991) theoretische Phasen berechnet, welche durch das Programm SIGMAA (Read, 1986) mit den experimentiell bestimmten Phasen kombiniert wurden. Die aus den kombinierten Phasen berechnete Elektronendichte wurde mit der Option AVE im Programm DM mit Hilfe des NCS-Operators über die beiden Monomere in der ASU gemittelt. Die *figure of merit* betrug nach dieser Optimierung 0,773. Der NCS-Operator wurde durch die Überlagerung der Sekundärstrukturelemente der beiden Monomere mit der Option LSQman im Programm O (Jones *et al.*, 1991) bestimmt. Die nötigen Maske um das Dimer wurde mit dem Programm MAMA (Kleywegt und Jones, 1999) erstellt. Die verbesserte Elektronendichte erlaubte die Zuordnung des größten Teils der Aminosäuresequenz zur Elektronendichte. Dabei wurden die gefundenen Positionen der Selen-Atome als Referenz für die Lage der Methionine benutzt. Nach der ersten Moleküldynamik-Simulation und der Verfeinerung unter Verwendung des NCS-Operators mit dem Programm CNS (Brunger *et al.*, 1998) betrug der R-Faktor 32,09 % (freier R-Faktor 34,84 %). Die Sequenz konnte bis auf die Reste A220-A255 und B220-B255 in beide Monomere eingebaut werden. Nach einer weiteren Verfeinerung mit Verwendung des Symmetrieoperators konnten alle Reste außer A221-A231 und B221-B231 eingebaut werden.

Diese Reste sind in beiden Monomeren nicht sichtbar, was auf eine hohe Flexibilität in der Region schließen lässt. Die daran anschließenden Reste, 232 bis 249, sind im Molekül B komplett sichtbar, verfeinern aber mit erhöhten B-Faktoren. Im Molekül A ist nur das Proteinrückgrat dieses Sequenzabschnittes sichtbar, so dass die Reste korrespondierend zu Molekül B eingebaut wurden. Für die Verfeinerung in CNS wurde die Besetzungszahl dieser

Aminosäuren auf 0,5 gesetzt. (Statistik Tab. 4-7) In den weiteren Verfeinerungszyklen wurde die NCS-Symmetrie nicht mehr verwendet, um eine individuelle Anpassung der Monomere an die Elektronendichte zu erlauben. Nach mehrmaligem Überbauen sank der R-Faktor auf 26,42 % (freier R-Faktor 29,61 %). Die Struktur enthält zusätzlich 5 Natrium-Ionen (Abb. 4-16) und 9 Formiat-Anionen, die aus der Kristallisationslösung stammen. Nach dem Einbau von Ionen und 350 Wassermolekülen, sank der R-Faktor auf 20,01 % (freier R-Faktor 24,01 %). Tabelle 4-7 enthält detaillierte Angaben zur Verfeinerung und zur Struktur. Da der native Datensatz ebenfalls Selenomethionine enthielt, wurde die Struktur mit Selenomethionin-Resten gebaut und verfeinert. In der Struktur eines Monomers sind 586 Reste enthalten, davon 17 Selenomethionine. Der N-terminale Methioninrest wurde während der Expression in *E.coli* prozessiert.

**Tabelle 4-7: Verfeinerung der Strukturmodelle**

		native Struktur	Komplex
Maximale Auflösung [Å]		2,6	3,2
Anzahl Atome in der asymmetrischen Einheit (Dimer)	Proteinatome	8880	8880
	Heteroatome	47	18
	Lösungsmittel	350	194
	Ligand		52
R-Faktor <sup>1</sup> / freier R-Faktor <sup>2</sup> [%]		20,01 / 24,01	17,94 / 22,6
r.m.s. Abweichungen von Idealwerten	Bindungslängen [Å]	0,00985	0,008
	Bindungswinkel [°]	1,3741	1,6119
	B-Faktoren gebundener Atome [Å <sup>2</sup> ]	1,695	1,561
B-Faktoren	alle Atome [Å <sup>2</sup> ]	42,38	24,85
	Proteinatome [Å <sup>2</sup> ]	42,81	25,31
	Hauptkette [Å <sup>2</sup> ]	42,57	25,07
	Lösungsmittel [Å <sup>2</sup> ]	36,21	29,75
Verteilung der Φ und Ψ Winkel im Ramachandran Plot	energetisch bevorzugten Bereich [%]	87,8	82,7
	energetisch erlaubten Bereich [%]	10,3	14,7
	energetisch möglicher Bereich [%]	1,3	1,8
	verbotenen Bereich [%]	0,6	0,9

$$^1 R = \frac{\sum \| |F_{obs}| - k |F_{calc}| \|}{\sum |F_{obs}|}, \quad |F_{obs}| \text{-experimentiell ermittelte Strukturfaktoren, } |F_{calc}| \text{-berechnete Strukturfaktoren,}$$

k-Skalierungsfaktor

<sup>2</sup> Der freie R-Faktor wurde mit einem Referenzdatensatz berechnet, der aus 5 % der Strukturfaktoren besteht, die nicht bei der Verfeinerung berücksichtigt wurden.

Die Geometrie der Struktur wurde anhand eines Ramachandran-Plots (Abb. 4-14b) der mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1996) erstellt wurde überprüft. Es befinden sich 87,8 % der dihedralen Winkel des Proteinerückgrats in energetisch günstigen Regionen, 10,3 % in energetisch erlaubten, 1,3 % in zusätzlich erlaubten und 0,6 % in nicht erlaubten Regionen des Plots. Die Aminosäuren Thr 245, Thr 248 und Lys 247 befinden sich in einer Region mit einer sehr schlecht definierten Elektronendichte. Der Rest Ala 193 befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft eines Prolines, worauf die Abweichungen in den Diederwinkeln zurückzuführen sind.

#### 4.2.5 Strukturbeschreibung

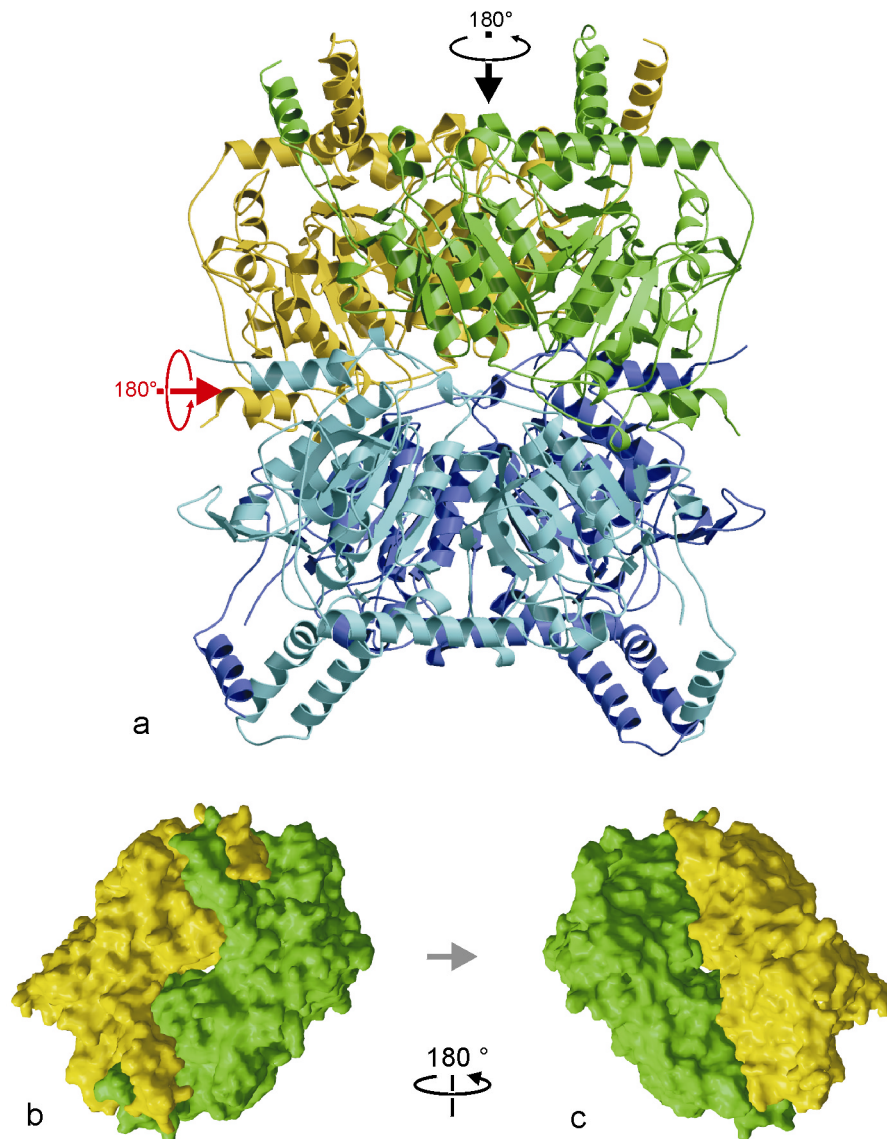
In der asymmetrischen Einheit liegt die Carboxytransferase-Untereinheit (GcdA) der Glutaconyl-CoA-Decarboxylase als Homodimer vor (Abb. 4-15b, 4-16). Die beiden Monomere sind durch eine zweizählige nichtkristallographische Symmetrieachse miteinander verwandt und können durch Rotation um  $180^\circ$  ineinander überführt werden.

In der Kristallstruktur liegt die GcdA jedoch als Homotetramer vor, bei dem die Dimeren durch eine Rotation von  $180^\circ$  um eine kristallographische Achse und durch eine Rotation von  $180^\circ$  um die nichtkristallographische Symmetrieachse gegeneinander versetzt sind (Abb. 4-15a). Zu dem durch die kristallographische Symmetrieoperation (Y, X, -Z) verwandten Dimer besteht ein intensiver großflächiger Kontakt über eine ausgedehnte hydrophobe Oberfläche (Abb. 4-22). Von der Gesamtoberfläche des Dimers von  $42912 \text{ \AA}^2$  (berechnet mit dem CCP4-Programm AREAIMOL, (Otwinowski, 1991)), sind mit  $13932 \text{ \AA}^2$  32,5 % der Oberfläche am Kontakt zwischen den Dimeren beteiligt. Die beiden Monomere in der asymmetrischen Einheit sind strukturell fast identisch. Molekül B erlaubt gegenüber Molekül A einen leichteren Einbau der Helix Ia7 (Abb. 4-17) in die Elektronendichte. Die *r.m.s.*-Abweichung der C $\alpha$ -Atome beider Monomere beträgt 0,65 %.

Die Struktur der Glutaconyl-CoA Decarboxylase Carboxytransferase Untereinheit kann in zwei sehr ähnliche Domänen I und II unterteilt werden. Die Grenze zwischen den Domänen liegt zwischen den Resten 284 und 290. Beide Domänen enthalten etwa die gleiche Anzahl Sekundärstrukturelemente. Die Anordnung der Monomere im Dimer, indem jeweils Domäne I mit Domäne II des anderen Monomers interagiert (Abb. 4-19b) führt zur Ausbildung eines Kanals im Inneren der Struktur, so dass die Aufeinanderlagerung der Dimeren zum Tetramer eine Art Hohlzylinder entstehen lässt. In Inneren des Kanals sind mehrere Wassermoleküle sowie ein Sulfat-Anion lokalisiert (Abb. 4-16). Das Sulfat-Ion befindet sich direkt auf der



nichtkristallographischen Symmetrieachse. Zwei weitere Sulfate finden sich an den Außenflächen des Moleküls.



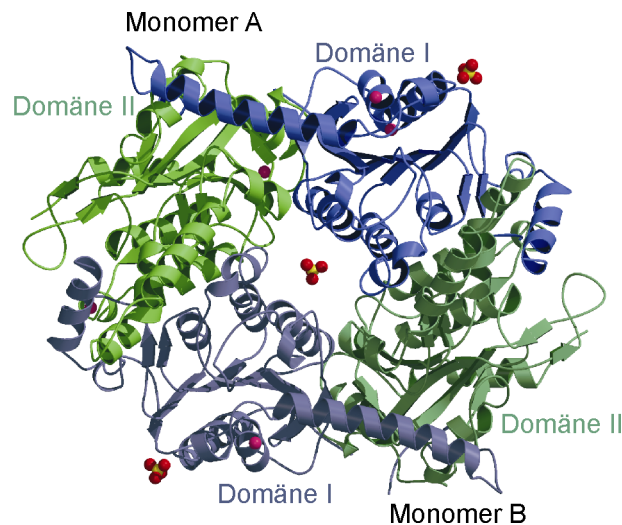
**Abbildung 4-15: Anordnung der GcdA-Monomere im Tetramer**

**a)** Das Tetramer in der Röntgenkristallstruktur wird aus zwei Dimeren aufgebaut, die durch eine Rotation von  $180^\circ$  um eine kristallographische Achse (roter Pfeil) und eine Rotation von  $180^\circ$  um die NCS-Achse (schwarzer Pfeil) gegeneinander versetzt sind. Die zum oberen Dimer gehörenden Monomere sind grün und gelb dargestellt, die beiden Monomere des unteren Dimers sind blau und hellblau dargestellt.

**b)** Oberflächendarstellung des oberen Dimers, Ansicht von oben auf das Molekül entlang der NCS. **c)** Ansicht in b) um  $180^\circ$  gedreht, um die Unterseite des Dimers darzustellen, welche die Kontaktfläche im Tetramer bildet.

Die beiden Domänen der GcdA enthalten jeweils mehrere  $\alpha$ - $\beta$ -Motive die dem Rossmann-Faltungstyp ähneln. Die spezifische Anordnung der  $\alpha$ - $\beta$ -Motive und weiterer Faltblätter erlauben eine Zuordnung der Struktur zur Superfamilie des Clp/Crotonase Faltungstyps. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie katalysieren einen weiten Bereich von Reaktion welche alle

über ein Oxyanion-Intermediat an der Thioester-Carbonylgruppe eines acylierten Coenzym A Derivates verlaufen (Benning *et al.*, 2000).



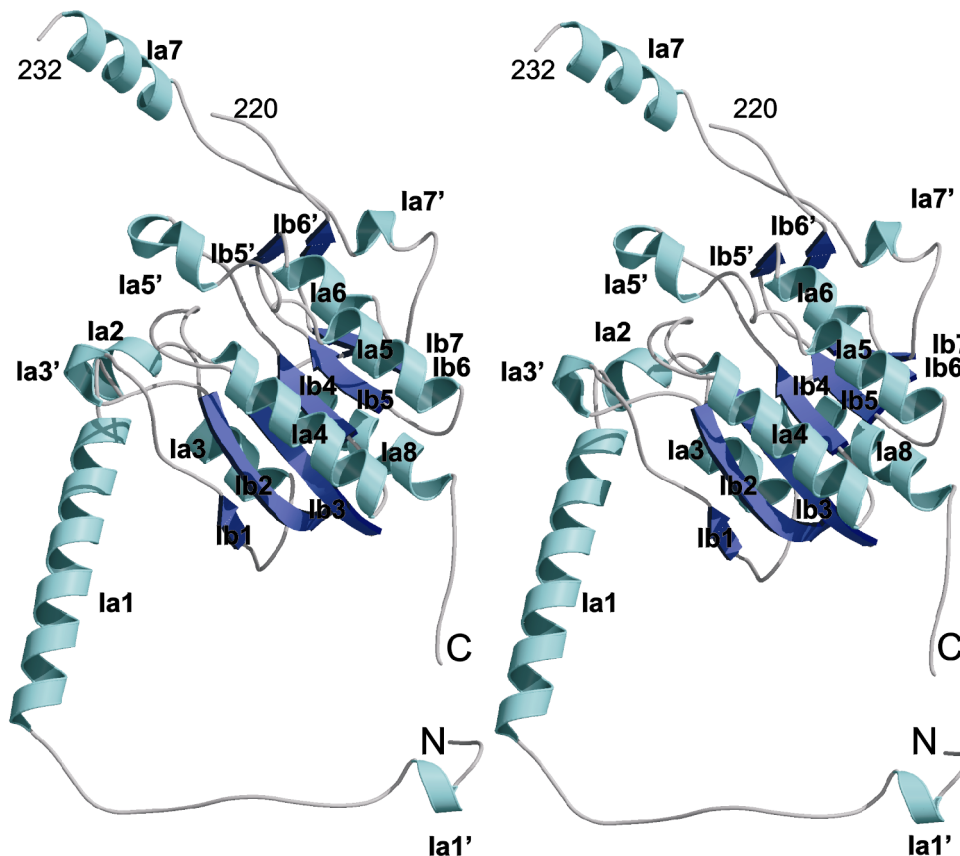
**Abbildung 4-16: Aufbau des GcdA-Dimers**

Die Abbildung stellt einen Blick von oben entlang der NCS-Achse auf das Tetramer (Siehe Abb. 4-15). Zur besseren Übersicht wurde das untere Dimer nicht dargestellt. Die beiden Domänen der GcdA sind unterschiedlich gefärbt um ihre Anordnung zu verdeutlichen. Zusätzlich sind die in der Kristallstruktur enthaltenen Natrium-Ionen (rosa Kugeln) und Sulfat-Ionen (Sauerstoff = rote Kugeln, Schwefel = gelbe Kugeln) dargestellt. Das in dem von Helices ausgekleideten Kanal liegende Sulfat befindet sich genau auf der Achse der nichtkristallographischen Symmetrie.

### Domäne I

Die Domäne I (Abb. 4-17) gehört zu dem offenen  $\alpha/\beta$ -Faltungstyp. Ein charakteristisches  $\alpha$ - $\beta$ -Motiv wiederholt sich in ihr dreimal. Ein siebensträngiges  $\beta$ -Faltblatt mit zwei antiparallelen (Ib1 und Ib2) und fünf parallelen (Ib3, Ib4, Ib5, Ib6 und Ib7) Strängen, die ähnlich einer rechtsläufigen Spirale gegeneinander verkippt sind, wird auf beiden Seiten von drei (Ia4, Ia5 und Ia6) sowie zwei (Ia3 und Ia8) parallel laufenden  $\alpha$ -Helices flankiert. Die kurzen Stränge Ib5' und Ib6' bilden ein zusätzliches kleines Faltblatt das von oben auf das große Faltblatt sowie die Helix Ia6 gepackt ist. N-terminal des Faltblattes schließen sich eine ausschließlich aus  $\alpha$ -Helices bestehende Region an. Auf die das Faltblatt abschirmende Helix Ia3 folgt die kurze  $\alpha$ -Helix Ia2. Die sehr große Helix Ia1 interagiert mit Domäne II, so dass der N-Terminus mit einer gestreckten Peptidkonformation in einem weiten Bogen die Domäne II fast vollständig umfasst und nach einer helikalen Schleife Ia1' in der Nähe des C-Terminus von Domäne I zurückbindet. Eine weitere Helix, Ia5', welche aus einem kurzen Anteil einer  $3_{10}$ -er Helix und einem  $\alpha$ -helikalen Anteil besteht ist von oben auf das Faltblatt aufgelagert. Bemerkenswert ist der weit in den Raum greifende fingerartige Loop zwischen den Faltblättern Ib7 und Ib8 der die  $\alpha$ -Helices Ia7' und Ia7 sowie die kleine Helix Ia5', deren

Wasserstoffbrückenmuster einer  $3_{10}$ -Helix entspricht, enthält (Abb. 4-17). Aufgrund von Flexibilität in dieser Region konnten die Aminosäuren 221 bis 231 nicht gebaut werden. Die Seitenketten der Aminosäuren 215-220 sowie 232-250 sind nur schlecht definiert. Daher besitzt dieser Bereich erheblich höhere B-Faktoren als der Rest der Struktur. Innerhalb des Dimers wird dieser „Finger“ durch einen ähnlichen Loop der Domäne II jedoch des anderen Monomers stabilisiert.



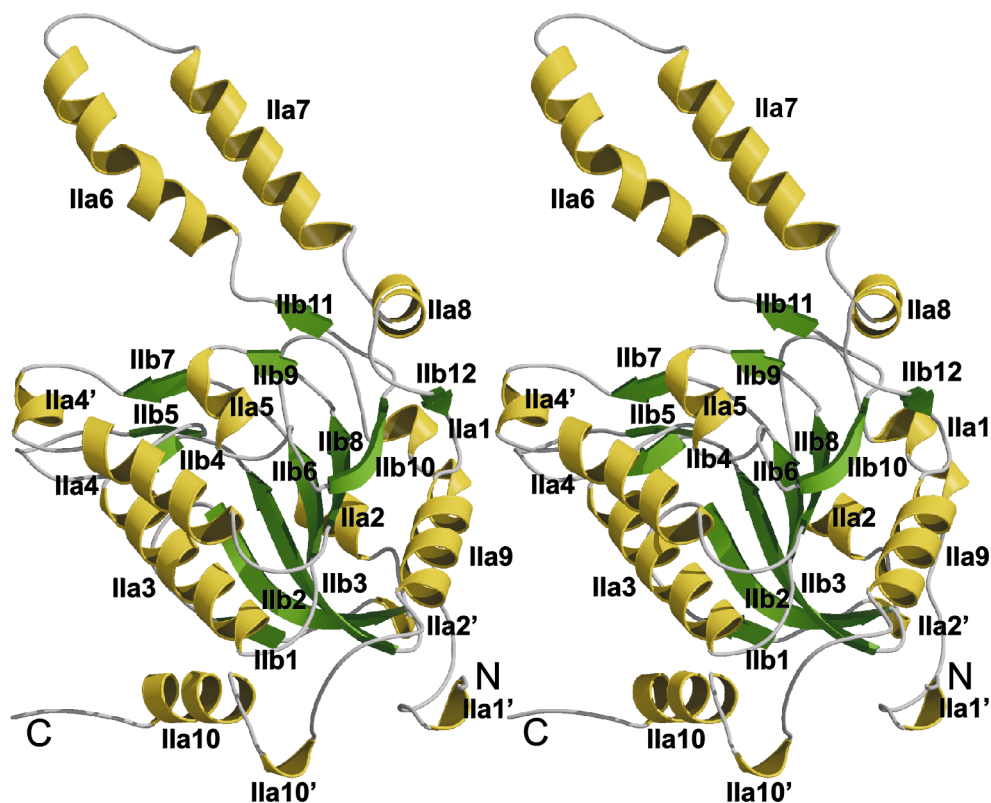
**Abbildung. 4-17: Stereoabbildung der Domäne I der GcdA-Struktur**

Die Sekundärstrukturelemente wurden als blaue Helices und hellblaue Faltblattstränge dargestellt und gekennzeichnet. Weiterhin wurde der N- und C-Terminus und die Unterbrechung in der Struktur von Domäne I zwischen Rest 220 und Rest 232 gekennzeichnet.

## Domäne II

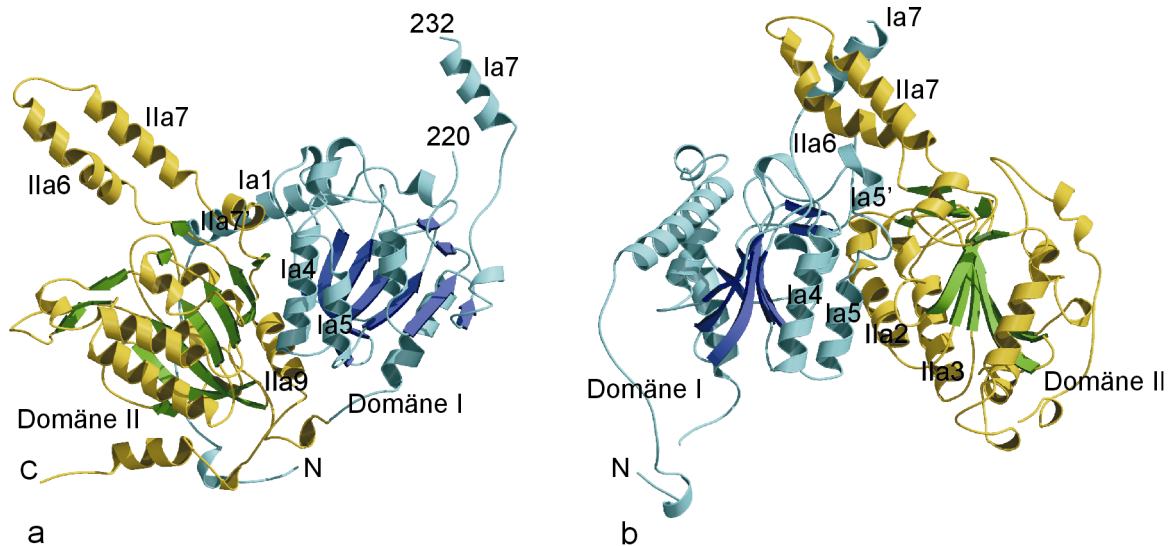
Die C-terminale Domäne II (Abb. 4-18) enthält wie die Domäne I mehrere  $\alpha$ - $\beta$ -Motive, die jedoch wesentlich schwächer ausgeprägt sind. Der Kern der Struktur wird von einem siebensträngigen  $\beta$ -Faltblatt gebildet. Die beiden äußersten Stränge sind extrem kurz. Wie in Domäne I sind zwei der Faltblattstränge antiparallel und fünf Faltblattstränge parallel angeordnet sowie rechtsgängig gegeneinander verkippt. Die Stränge Iib3, Iib6, Iib8 und Iib10 sind unterbrochen und setzen sich nach einem kurzen Turn in den Strängen Iib4, Iib7, Iib9 und Iib11 fort. Dadurch ergeben sich ein weiteres antiparalleles Faltblatt bestehend aus den Strängen Iib4, Iib5 und Iib7 und ein paralleles Faltblatt bestehend aus den Strängen Iib9 und

Iib11 ergibt. Das gesamte Faltblatt wird dadurch in Richtung der Innenseite des Dimers geknickt. Die beiden kurzen Stränge Iib6 und Iib7 formen ein zusätzliches kleines antiparalleles Faltblatt. Die beiden Seiten des großen Faltblattes werden von den Helices Iia3, Iia4, Iia5 und Iia10 auf der einen und auf der gegenüberliegenden Seite von den Helices Iia1, Iia2 und Iia9 flankiert und vom Lösungsmittel abgeschirmt. Wie in Domäne I besitzt diese Domäne ebenfalls einen weit aus der Struktur herausragenden, fingerartigen Loop zwischen den Faltblättern Iib11 und Iib12, der die zueinander gegenläufigen  $\alpha$ -Helices Iia6 und Iia7 sowie die kleine Helix Iia8 enthält. Innerhalb des Dimers stabilisieren sich diese Finger der beiden Domänen gegenseitig, indem jeweils der Finger von Domäne I von Molekül A mit dem Finger der Domäne II von Molekül B interagiert (Abb. 4-19b). Die weiteren Interaktionen zwischen den Monomeren erfolgen über die Helices Iia5, Iia6 in einem Monomer und den Helices Iia3 und Iia4 im anderen Monomer. In Abbildung 5-6 sind die Sekundärstrukturelemente beider Domänen im Zusammenhang mit der Proteinsequenz dargestellt.



**Abbildung 4-18: Stereoabbildungen der Domäne II der GcdA-Struktur**

Die Sekundärstrukturelemente sind als gelbe Helices und als grüne Faltblattstränge dargestellt und markiert. Der N-Terminus sowie der C-Terminus sind gekennzeichnet.



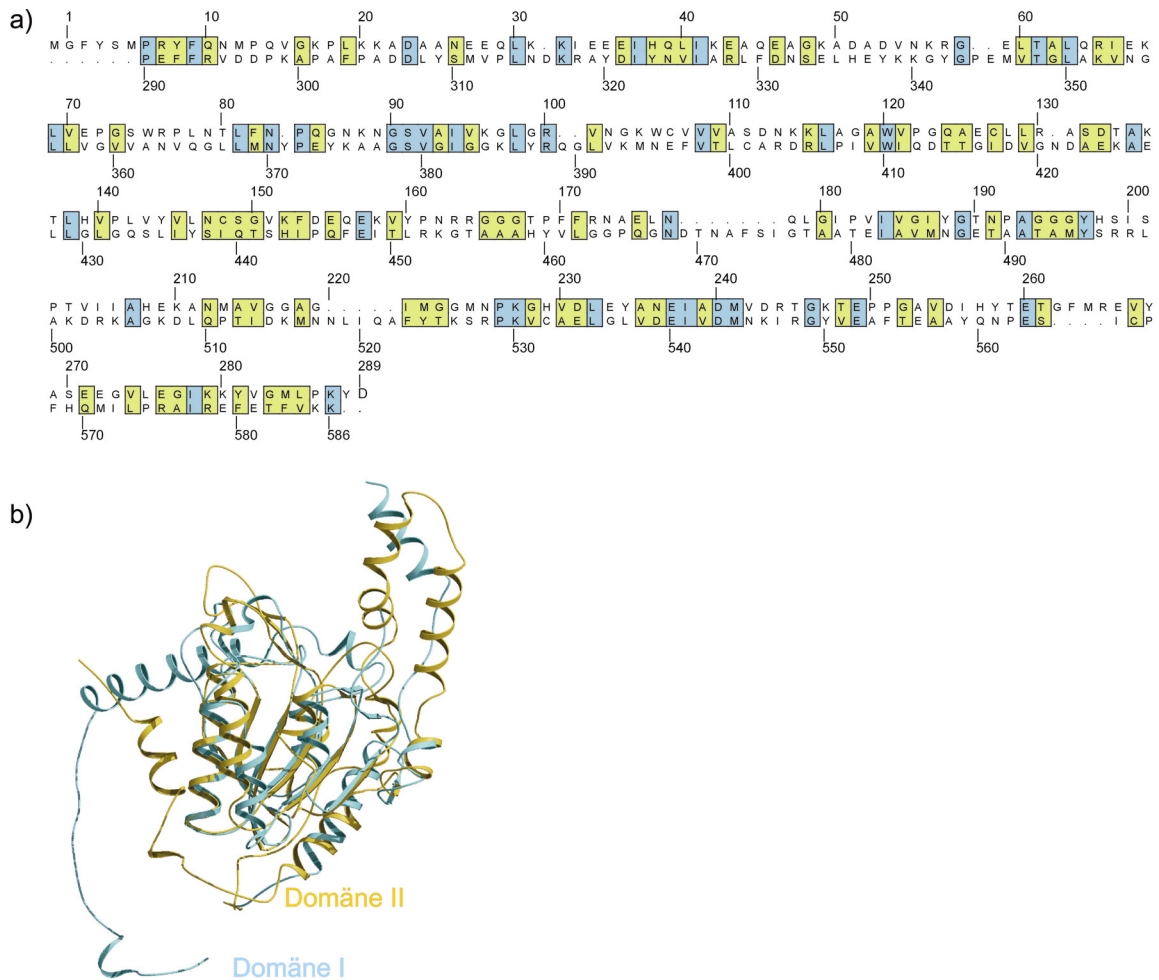
**Abbildung 4-19: Interaktionen zwischen den zwei Domänen in der GcdA-Struktur**

Die Moleküle sind jeweils so orientiert, dass der Betrachter sich innerhalb des Dimers auf der NCS-Achse befindet und nach aussen auf die Wand des Kanals schaut.

a) Kontakte zwischen den Domänen I und II im Monomer. b) Kontakte zwischen den Domänen unterschiedlicher Monomere, über die das Dimer aufgebaut wird. In Domäne I sind die Faltblattsrümpfe blau und die Helices hellblau gekennzeichnet. Domäne II ist durch grüne Faltblattstränge und gelbe Helices gekennzeichnet. Die bezeichneten Helices sind an den Kontakten zwischen den Domänen beteiligt.

#### 4.2.6 Die Strukturähnlichkeit zwischen den Domänen I und II

Die Domänen I und II interagieren durch die Helices Ia1, Ia4 sowie die Helices Ila8 und Ila9 (Abb. 4-19a). Verbunden werden sie durch einen Sequenzabschnitt in gestreckter Konformation zwischen Helix Ia8 und Helix Ila1. Für weitere Analysen wurde die Domänengrenze zwischen Rest 289 und Rest 290 angenommen. Die Domänen sind mit 289 und 296 Resten fast gleich groß. Eine Überlagerung von Domäne II mit Domäne I zeigt dass die Domänen eine sehr große Ähnlichkeit im Faltblatt und in den Helices besitzen (Abb. 4-20b). Mit dem Programm TOP3D (Guoguang, 2000) wurde eine 15,7 %ige Identität der Domänen mit einer *root mean square deviation* (r.m.s.d.) der C $\alpha$ -Atome von 1,55 ermittelt. Ein Sequenzalignment beider Domänen in Abb. 4-20 zeigt ihre hohe Sequenzähnlichkeit. In den Proteinsequenzen sind 15,2 % der Aminosäuren sind identisch und 29,1 % enthalten ähnliche Aminosäuren.

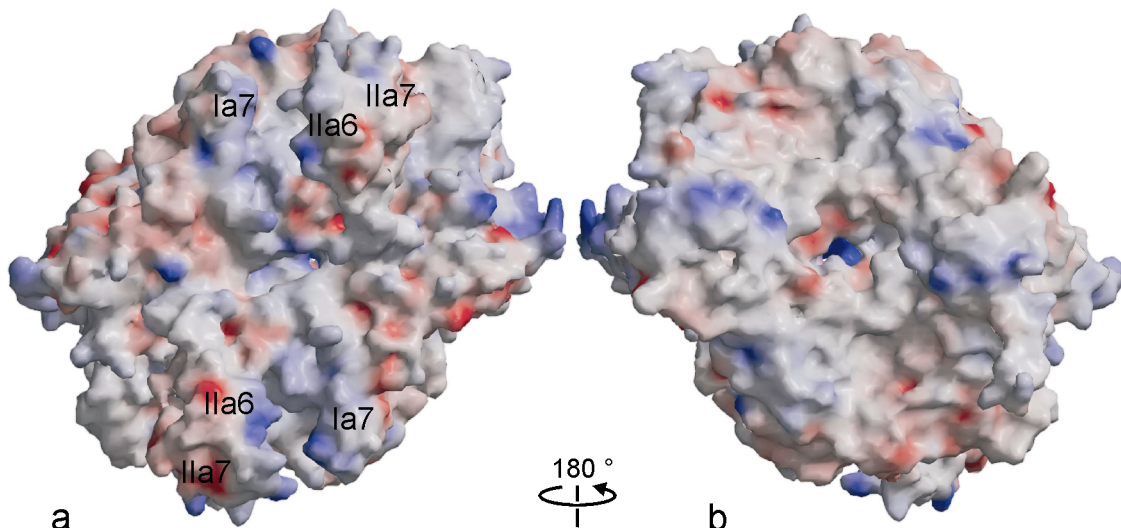


**Abbildung 4-20: Sequenzhomologie und Strukturähnlichkeit zwischen den Domänen I und II**

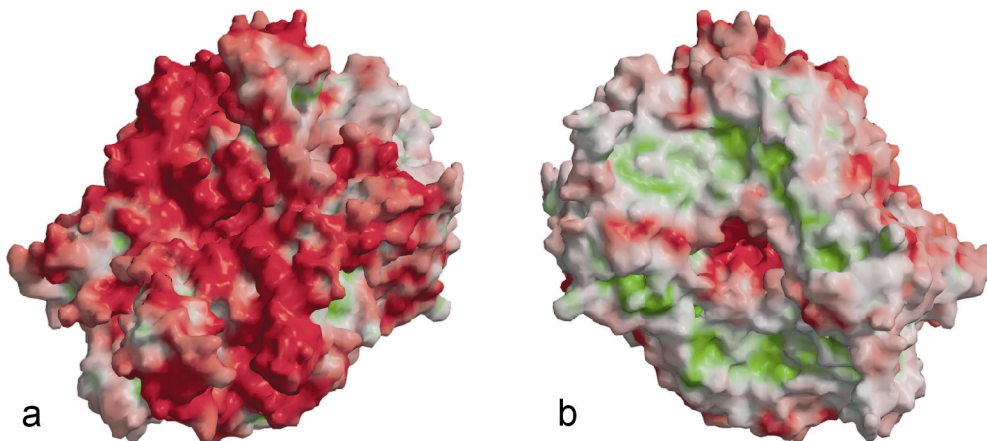
a) Alignment der Sequenzen von Domäne I in der oberen und Domäne II in der unteren Sequenz. Hellblau unterlegte Reste sind identisch, gelb unterlegte Reste zeigen ähnliche Aminosäuren. b) Überlagerung der Röntgenstrukturen von Domäne I (hellblau) und II (gelb).

#### 4.2.7 Die Oberfläche der GcdA-Struktur

Auf der Oberfläche des GcdA-Dimers (Abb. 4-21a) sind die weit herausragenden fingerartigen Strukturen, die durch die Helices Ia7 sowie IIa6 und IIa7 gebildet werden, charakteristische Elemente. Während ein großer Teil der Proteinoberfläche auf der Oberseite des Dimers eine negative Ladung trägt (Abb. 4-21a) ist der Raum zwischen den Helix-Fingern mit positiven Ladungen ausgekleidet (Abb. 4-21a). Der zwischen den Monomeren befindliche Kanal trägt an seinem Eingang positive Ladungen (Abb. 4-21a), die aber bei der Erweiterung des Kanals an der Unterseite des Moleküls (Abb. 4-21b) in negative Ladungen übergehen. Eine Projektion von geladenen und ungeladenen Regionen auf die Oberfläche des Dimers zeigt einen ungeladenen, hydrophoben Ring auf der Unterseite des Moleküls, welcher zur Kontaktfläche innerhalb des Tetramers gehört (Abb. 4-22b).



**Abbildung 4-21: Ladungsverteilung auf der Oberfläche des GcdA Dimers.** Die Orientierung entspricht der Darstellung in Abbildung 4-15b. Positive Ladungen auf der Proteinoberfläche sind blau und negative Ladungen rot dargestellt. Die aus der Oberfläche herausragenden Helices Ia7, Ila6 und Ila7 sind markiert. Die Abbildung **a)** stellt die Ansicht von oben entlang der NCS-Achse auf den durch das Dimer gebildeten Kanal dar. Diese Seite des Dimers wird im Folgenden als Oberseite bezeichnet. Der Raum zwischen den „Helix-Fingern“ Ia7, Ila6 und Ila7 ist durch positive Ladungen ausgekleidet. Abbildung **b)** zeigt das um 180° gegenüber a) rotierte Dimer und somit die Unterseite des Dimers. Abbildung a) zeigt einen Zoom auf den. Der Kanal wird an seiner engsten Stelle von zwei Arginin-Seitenketten blockiert, die sich aufeinanderlagern und ein Sulfat-Ion koordinieren. Der Ausgang des Kanals trägt negative Ladungen.



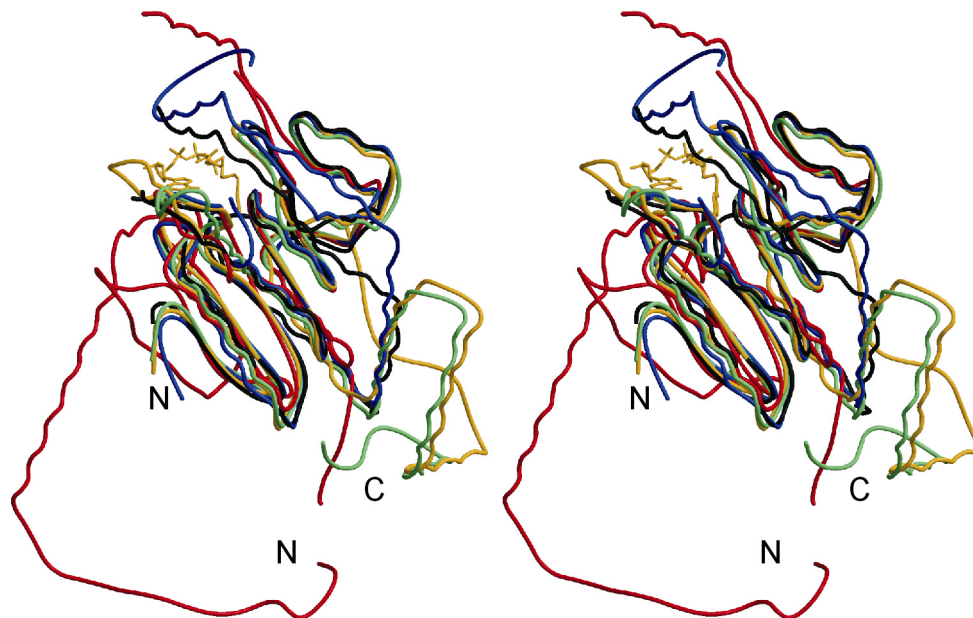
**Abbildung 4-22: Verteilung von geladenen und ungeladenen Bereichen auf der Oberfläche des GcdA Dimers.** Geladene Regionen sind rot und ungeladene Regionen grün dargestellt. **a)** Draufsicht auf das Dimer, korrespondieren zu Abbildung 4-21a. **b)** Unterseite des GcdA Dimers welche die Kontaktfläche zum Aufbau des Tetramers bildet, korrespondierend zur Ansicht in Abbildung 4-21b.

#### 4.2.8 Strukturverwandte Proteine

Der Vergleich mit strukturähnlichen Proteinen kann oft wertvolle Informationen über die Funktion von Sekundärstrukturelementen sowie über die Lokalisation aktiver Zentren liefern. Mit einem Poly-Alanin-Modell der GcdA-Struktur wurde daher mit Hilfe des Programs DALI (Holm und Sander, 1993) eine Suche nach ähnlichen Strukturen in der RCSB-Proteindatenbank (Berman *et al.*, 2000) durchgeführt. Die Strukturen mit den geringsten

Abweichungen gegenüber der GcdA-Struktur gehören ebenfalls zur Superfamilie des Clp/Crotonase-Faltungstypes:

1. 4-Chlorobenzoyl-CoA Dehalogenase aus *Pseudomonas spez.*, ein Enzym das die Hydrolyse von 4-Chlorobenzoyl-CoA zu 4-Hydroxybenzoyl-CoA im Chlorobenzoat-Abbaupfad katalysiert (Benning *et al.*, 1996),
2. Dienoyl-CoA Isomerase aus der Ratte welche die Isomerisierung von 3-trans, 5-cis-Dienoyl-Coa im Abbaupfad ungesättigter Fettsäuren katalysiert (Modis *et al.*, 1998),
3. Methylmalonyl-CoA Decarboxylase aus *Escherichia coli* (Benning *et al.*, 2000)
4.  $\delta 2$ ,  $\delta 3$  Enoyl-CoA Isomerase aus *Saccharomyces cerevisiae*, ein Enzym das ebenfalls beim Abbau ungesättigter Fettsäuren beteiligt ist und 3-cis –Enoyl-CoA sowie 3-trans-Enoyl-CoA in 2-trans-Enoyl-CoA transformiert (Mursula *et al.*, 2001).



**Abbildung 4-23: Stereoabbildung einer Überlagerung der zur GcdA-Struktur homologen Proteine.** Die Domäne I der GcdA-Struktur (rot) wurde mit den folgenden strukturähnlichen Proteinen überlagert: 4-Chlorobenzoyl-CoA Dehalogenase aus *Pseudomonas spez.* mit dem Substrat Chlorobenzoyl-Coenzym A (gelb), Dienoyl-CoA Isomerase aus der Ratte (grün), Methylmalonyl-CoA Decarboxylase aus *Escherichia coli* (blau) und  $\delta 2$ ,  $\delta 3$  Enoyl-CoA Isomerase aus *Saccharomyces cerevisiae* (schwarz).

Im Unterschied zur GcdA bestehen die Kristallstrukturen der beiden Isomerasen und der Methylmalonyl-CoA Decarboxylase aus sechs identischen Untereinheiten welche als Trimer von Dimeren angeordnet sind. Die Chlorobenzoyl-CoA Dehalogenase ist im Kristallgitter ein Trimer. Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen den Molekülen basiert vor allem auf dem gleichen Faltblatt im Zentrum der Struktur, das von mehreren Helices flankiert wird (Abb. 4-22). Die größten Unterschiede betreffen die aus der GcdA-Struktur herausragenden Helix-Finger, die aus den Helices Ia7 sowie Ila6 und Ila7 (Abb. 4-18, 4-19) gebildet werden. Dieser Bereich ist in den anderen Proteinen in den Kern der Struktur integriert.



Neben der Ähnlichkeit in der Sekundärstruktur besitzen die Strukturhomologen auch funktionelle Ähnlichkeit. Alle vier Proteine setzen Substrate um, die zur Aktivierung mit Coenzym A verknüpft wurden, und katalysieren die Reaktionen über ein Oxyanion-Intermediat, bei dem der Carbonylsauerstoff des Thioesters von zwei Wasserstoffbrücken zu Aminogruppen des Proteins koordiniert wird (Benning *et al.*, 2000). Die zum größten Teil hydrophobe Substratbindungstasche befindet sich bei allen genannten Proteinen in der gleichen Oberflächenregion oberhalb des  $\beta$ -Faltblattes.

Da zwischen den beiden Domänen der GcdA-Struktur eine sehr große Strukturähnlichkeit besteht, wurden beide Domänen getrennt mittels des Programms TOP3D (Guoguang, 2000) mit den gefundenen Strukturverwandten überlagert. Wie gut beide Domänen mit den anderen Strukturen überlagern zeigt die Statistik in Tabelle 4-8. In Abbildung 4-23 wurde die Überlagerung der Strukturen am Beispiel der Domäne I dargestellt, zusammen mit dem Substrat Chlorobenzoyl-CoA der Chlorobenzoyl-CoA Dehalogenase, um die Lokalisation der Bindungstasche in den strukturähnlichen Proteinen in Beziehung zur GcdA-Struktur zu setzen. Die strukturverwandten Proteine besitzen nur jeweils eine substratbindende Domäne, die aber mit den beiden Domänen der GcdA-Struktur etwa gleich gut überlagert. Deshalb ergeben sich für die GcdA zwei Möglichkeiten A und B für eine Bindung des Substrates (Abb. 4-24).

**Tabelle 4-8: Überlagerung der GcdA Domänen mit strukturähnlichen Proteinen**

	PDB-Code	Domäne I			Domäne II		
		r.m.s.d. C $\alpha$ Atoms <sup>1</sup> [Å]	d <sub>mean</sub> <sup>2</sup> [Å]	matching residues <sup>3</sup>	r.m.s.d. C $\alpha$ Atoms <sup>1</sup> [Å]	d <sub>mean</sub> <sup>2</sup> [Å]	matching residues <sup>3</sup>
4-Chlorobenzoyl-CoA Dehalogenase	1NZY	1,51	1,34	118	1,40	1,23	105
Dienoyl-CoA Isomerase	1DCI	1,53	1,35	130	1,57	1,43	104
Methylmalonyl-CoA Decarboxylase	1EF8	1,81	1,64	121	1,68	1,54	103
$\delta$ 2, $\delta$ 3 Enoyl-CoA Isomerase	1HNO	1,47	1,34	108			

<sup>1</sup> r.m.s.d.-root mean square deviation

$$r.m.s. = \sqrt{\frac{\sum_i^N (d_i)^2}{N}}$$

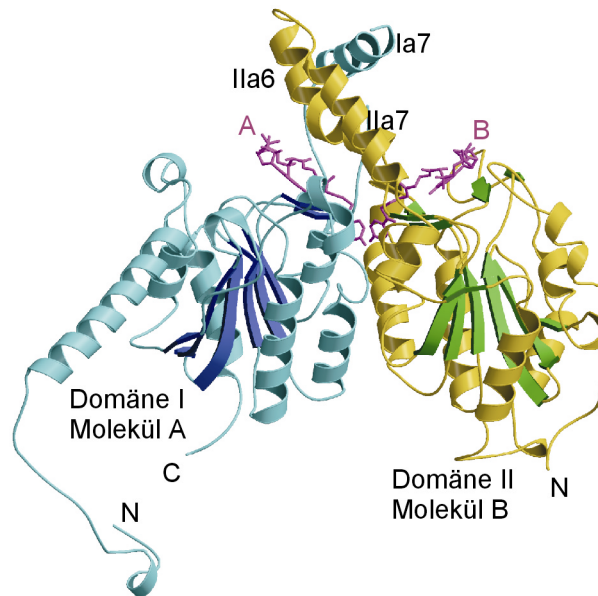
N-Anzahl der überlagerten Ca-Atome

d<sub>i</sub>-Abstand von Atom i in Struktur 1 und 2

<sup>2</sup> d<sub>mean</sub> mittlerer Abstand: Wenn die Homologie zwischen beiden Strukturen über die ganze Sequenz verteilt ist liegen die Werte für r.m.s. und d<sub>mean</sub> dicht zusammen.

$$d_{mean} = \frac{\sum_i^N (d_i)}{N}$$

<sup>3</sup> matching residues: Anzahl der C $\alpha$ -Atome zweier überlagelter Strukturen, bei denen der Abstand zwischen beiden Strukturen bei mindestens 3 Resten hintereinander nicht mehr als 3,8 Å beträgt.



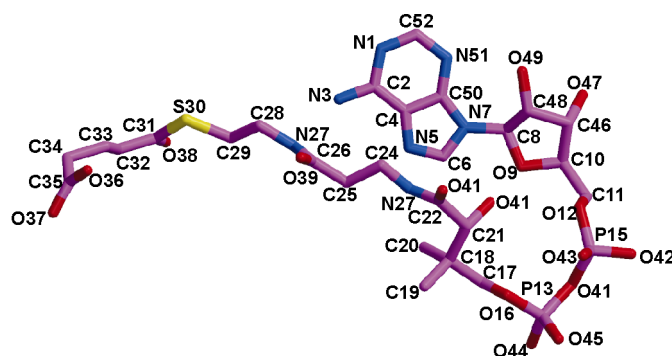
**Abbildung 4-24: Zwei Möglichkeiten der Substratbindung in der GcdA-Struktur.** Die zwei Möglichkeiten A und B für die Substratbindungstasche in der GcdA-Struktur ergibt sich aus der Ähnlichkeit beider Domänen der GcdA zur Struktur der Chlorobenzoyl-CoA Dehalogenase, deren Substrat Chlorobenzoyl-Coenzym A hier als violettes Stick-Modell dargestellt ist.

Die potentielle Substratbindungstasche wird in beiden Fällen aus dem Interface von Domäne I und Domäne II verschiedener Monomere gebildet. An der Bildung der potentiellen Substratbindungstaschen sind bei Möglichkeit A das kleine Faltblatt Ib5', Ib6', sowie die Helix Ia5' aus Domäne I beteiligt und in Möglichkeit B die zu den bereits genannten Strukturelementen äquivalenten Elemente in Domäne II: das Faltblatt Iib9, Iib11 und die Helix Iia5 (Abb. 4-24). Das aktive Zentrum befindet sich jedoch in beiden Fällen in einer Höhlung der Proteinoberfläche, die nach oben von den Helices Ia7, Iia6 und Ila7 abgeschlossen wird (Abb. 4-24). Da das Dimer zwei identische Kontaktflächen zwischen den Monomeren besitzt, an denen das Substrat gebunden werden kann, enthält es zwei katalytisch aktive Zentren.

#### 4.2.9 Identifizierung der Substratbindungsstelle in der GcdA-Struktur

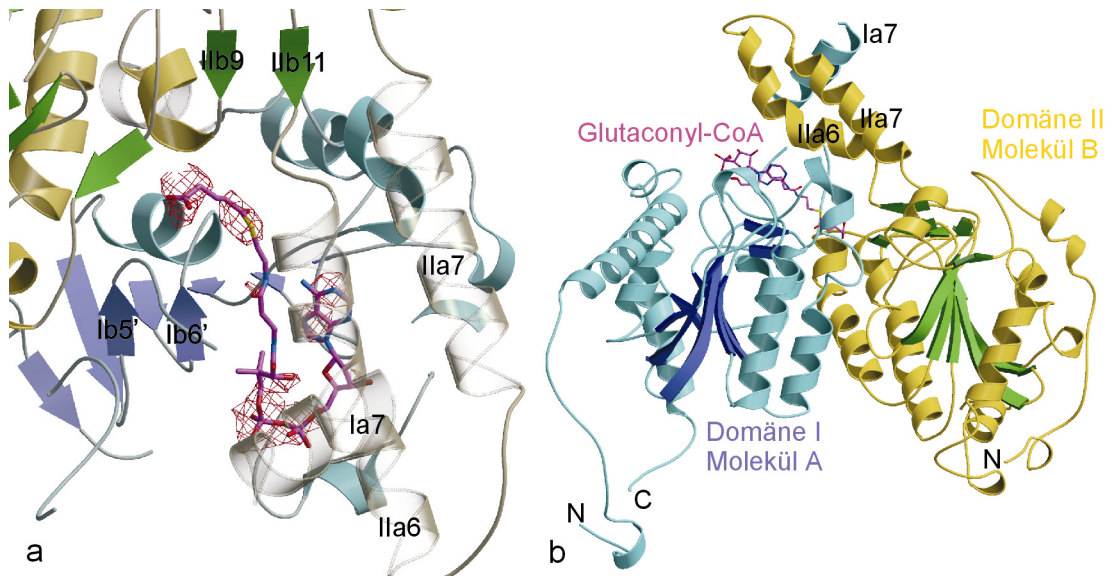
Während der Anfertigung dieser Arbeit war es möglich, das Substrat in der Kristallstruktur der GcdA entsprechend der Bindungsmöglichkeit A (Abb. 4-24) zu lokalisieren. Kristalle der Raumgruppe P41212 des nativen Proteins wurden 3 Tage in eine 5mM Lösung des Substrates Glutaconyl-Coenzym A eingelegt. Das Substrat ist im Kristall stabil, da zur Umsetzung die Anwesenheit von Biotin als Akzeptor der Carboxylgruppe notwendig ist. Die eingelegten Kristalle konnten nicht mit dem gleichen Kryopuffer wie die nativen Kristalle eingefroren werden. Das Substrat veränderte das Kristallgitter aber so, dass im Gegensatz zu

den nativen Kristallen das Röntgenexperiment bei Raumtemperatur durchgeführt werden konnte (Tab. 4-6). Die maximale Auflösung des Datensatzes betrug 3,2 Å.



**Abbildung 4-25: Benennung des Glutaconyl-CoA-Substrates.** Die Kohlenstoff-Atome sowie die 2 Phosphor-Atome sind magenta gefärbt. Die restlichen Atomsorten sind entsprechend den allgemeinen Konventionen gefärbt

Die Zellkonstanten des nicht eingefrorenen Kristalls waren mit  $a = b = 153,72 \text{ \AA}$  und  $c = 164,09 \text{ \AA}$  sowie  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$  nur geringfügig anders als die des eingefrorenen Kristalls des Apoenzyms, so dass die Startphasen der nativen Struktur mit den Amplituden des Komplexes kombiniert werden konnten. Um die Seitenketten der Aminosäuren korrekt zu orientieren wurden eine Moleküldynamik-Simulation mit dem Strukturmodell der GcdA gerechnet, das Modell einmal manuell überbaut und in CNS verfeinert. Abweichungen im Proteinerückgrat zu der nativen Struktur konnten nicht beobachtet werden. Lediglich die Orientierung einiger Seitenketten war verändert und die Helix Ia7 war in der Elektronendichte des Komplexes besser definiert als in der nativen Elektronendichte. Die Statistiken des Komplex-Datensatzes sowie des Modells sind in den Tabellen 4-6 und 4-7 enthalten. Die ausschließlich in der potentiellen Substratbindungstasche der Substratbindungsmöglichkeit A sichtbare zusätzliche Dichte (Abb. 4-26) besteht nur aus nicht verbundenen Abschnitten, die aber eindeutig dem Adeninring sowie den zwei Phosphaten und der Thioester-Gruppe des Coenzym A und der Carbonylgruppe des Glutaconyl-Restes (Abb. 4-26a) zugeordnet werden konnten. Der Einbau des Substrates ließ sich mittels der Informationen über die Lage des Chlorobenzoyl-Coenzym A Substrates in der strukturähnlichen Chlorobenzoyl-CoA Dehalogenase-Struktur (Benning *et al.*, 1996) (Abb. 4-23 + 4-24) vornehmen. Die Auflösung von 3,2 Å ist für eine genaue Darstellung des Substrates allerdings kaum ausreichend. Obwohl das GcdA Dimer an beiden Kontaktstellen zwischen den Monomeren eine Substratbindungsstelle besitzt und in beiden Bindungsstellen positive ( $F_O - F_C$ )-Differenzdichte sichtbar ist, wurde das Substrat nur in die Bindungsstelle mit der am besten definierten Elektronendichte eingebaut.



**Abbildung 4-26: Lokalisierung des Substrates Glutaconyl-Coenzym A in der GcdA-Struktur**

**a)** Glutaconyl-CoA als Stick-Modell in der bei  $2,5 \sigma$  konturierten (FoFc)-Differenzdichte des GcdA-Glutaconyl-CoA Komplexes., welche ohne das Substrat berechnet wurde. Die an der Ausbildung der Bindungstasche beteiligten Strukturelemente sind entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu den verschiedenen Domänen gefärbt und bezeichnet. **b)** Lokalisierung des Substrates im Interface zwischen den beiden Domänen im Vergleich zu Abbildung 4-24.

#### 4.2.10 Die Architektur der Substratbindungstasche

Die Unterseite der zumeist hydrophoben Substratbindungstasche (Abb. 5-5) wird von dem Faltblatt Ib5', Ib6', der Helix Ia5' und von dem Loop zwischen dem Faltblatt Ib3 und der Helix Ia4 gebildet und damit hauptsächlich von Domäne I geformt. Die Bindung der Carbonylgruppe des Glutaconyl-Restes erfolgt jedoch in einem Bereich, der auf einer Seite von Domäne I und auf der anderen Seite durch Domäne II abgeschlossen wird. Die dabei beteiligten Strukturelemente Iib9 und Iib11 und die Helix Ila5 entsprechen den vorher genannten Strukturelementen der Domäne I. Ein ähnliche Bildung des aktiven Zentrums durch zwei verschiedene Untereinheiten ist von der Struktur der Chlorobenzoyl-CoA Dehalogenase bekannt (Benning *et al.*, 1996). Der grösste Teil der Bindungstasche liegt offen und ist gut zugänglich. Das aktive Zentrum liegt jedoch in einer Kavität der Proteinoberfläche verborgen, die nach oben hin durch die Helix-Finger Ia7, Ila6 und Ila7 abgeschlossen wird. Das Substrat liegt in der Bindungstasche in einer sehr geschlossenen Konformation, so dass eine Reihe von intramolekularen Wasserstoffbrücken ausgebildet werden kann. Die Fixierung des Substrates erfolgt über mehrere Wasserstoffbrücken zu Domäne I von Molekül A, die in Tabelle 4-9 aufgeführt sind. Die während der Katalyse auf Biotin zu übertragende Carbonylgruppe des Glutaconyl-Restes wird durch eine Wasserstoffbrücke mit einem Abstand von  $2,6 \text{ \AA}$  zu einem Wassermolekül, welches durch Ile 417 in Domäne II von Molekül B koordiniert wird, fixiert. Für eine Stabilisierung des Oxyanionen-

Übergangszustandes kommen die Peptid-NH Gruppen von Gly 194 sowie Val 151 in Frage. Im Fall der Chlorobenzoyl-CoA Dehalogenase werden die Phosphate wie im GcdA-Glutaconyl-CoA Komplex durch ein Arginin (Arg 257 b) koordiniert und die Carbonylgruppe des Thioesters wird durch Wasserstoffbrücken zum Peptid-Stickstoff von Phe 64a und Gly 114a koordiniert. In der substratfreien, nativen Proteinstruktur der GcdA wird die Substratbindungstasche von mehreren Wassermolekülen, sowie einem Formiat-Anion besetzt, das etwa an der gleichen Stelle wie die Carbonylgruppe des Thioesters lokalisiert ist.

**Tabelle 4-9: Wasserstoffbrücken zwischen Glutaconyl-Coenzym A (GCA)<sup>1</sup> und dem Protein**

Wasserstoffbrücken-Donor	Wasserstoffbrücken-Akzeptor	Abstand [Å]
Arg A57 NH2	GCA O43	3,20
Arg A57 NH2	GCA O42	3,21
GCA N5	Ser A149 OG	2,47
GCA N27	Ser A149 O	2,73
GCA N1	Val A151	3,08
GCA N3	Val A151	2,55
Gly A194 N	GCA O38	2,83

<sup>1</sup> Die Benennung des Substrates entspricht der Abbildung 4-25.

**Tabelle 4-10: Wasserstoffbrücken des Substrates zum Lösungsmittel und Intramolekulare Wasserstoffbrücken im Glutaconyl-Coenzym A (GCA)<sup>1</sup>**

Wasserstoffbrücken-Donor	Wasserstoffbrücken-Akzeptor	Abstand [Å]
H <sub>2</sub> O 632	GCA O42	2,76
H <sub>2</sub> O 645	GCA O37	2,60
H <sub>2</sub> O 688	GCA O36	2,40
GCA N51	GCA O49	3,07
GCA N7	GCA O49	2,99
GCA N7	GCA O41	3,49
GCA N7	GCA O9	3,22
GCA N23	GCA O41	3,02
GCA N23	GCA O40	2,29
GCA N27	GCA O39	2,28

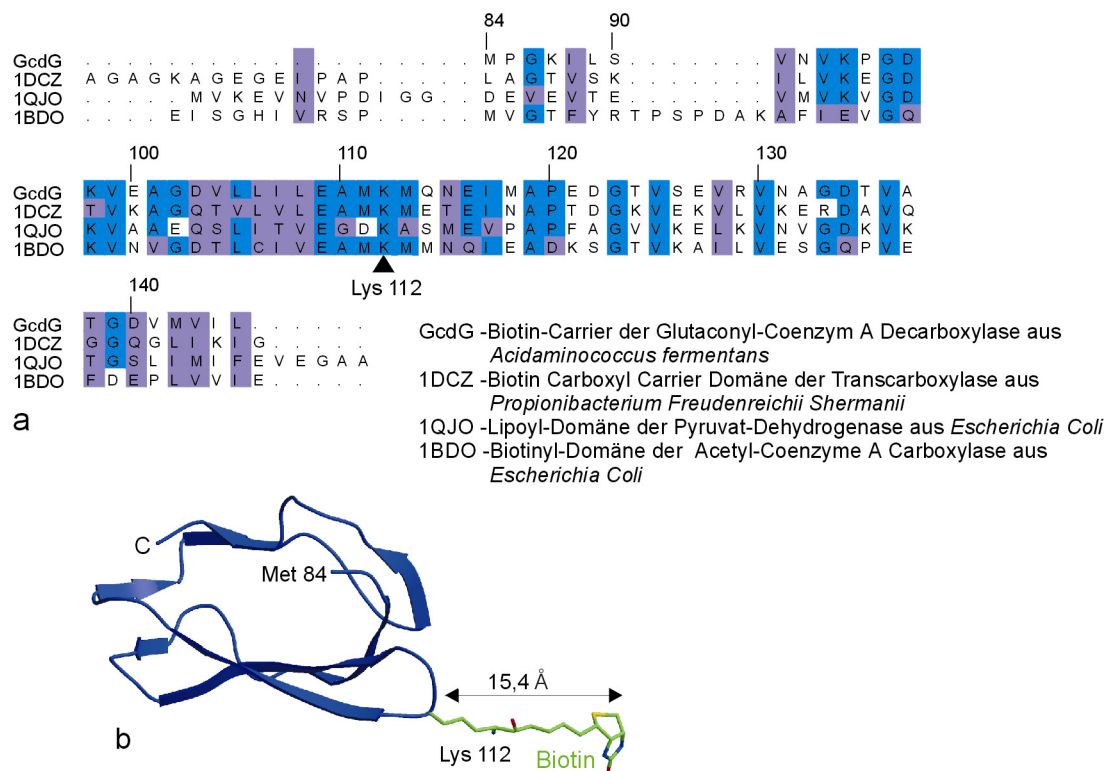
<sup>1</sup> Die Benennung des Substrates entspricht der Abbildung 4-25.

Ein weiterer Hinweis für die korrekte Lokalisierung der Substratbindungstasche ist die Beobachtung von Bedrat *et al.*, dass mindestens ein Cystein-Rest des Monomers sensitiv bei der Behandlung mit N-Ethylmaleimid ist, was zum Verlust der enzymatischen Aktivität führt (Bedrat und Buckel, 1993). Von den 6-Cystein-Resten des GcdA Monomers befindet sich nur Cystein 148 in der Nähe der Substratbindungsstelle. Es befindet sich mit zugänglicher

Seitenkette auf dem Boden der Bindungstasche neben den Resten Ser 149 und Val 151, welche Wasserstoffbrücken zum Adeninring des Glutaconyl-CoA ausbilden (Abb. 5-5). Eine Modifikation an dieser Stelle würde die Bindung des Adeninringes und somit des gesamten Substrates stören und in einem Verlust der Enzymaktivität resultieren.

#### 4.2.11 Der Biotin-Carrier der Glutaconyl-Coenzym A Decarboxylase

Die freie Energie der Decarboxylierung durch die GcdA-Untereinheit wird in einem energiereichen aber relativ stabilen Intermediat, Carboxybiotin, gespeichert. Als Biotin-Carrier arbeitet die gamma-Untereinheit (GcdC) der Glutaconyl-Coenzym A Decarboxylase. Das Biotin ist an die  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lys 112 gekoppelt das von zwei Methioninresten flankiert wird (Abb. 4-27) (Braune *et al.*, 1999), ein für Biotincarrier charakteristisches Sequenzmotiv (Samols *et al.*, 1988).

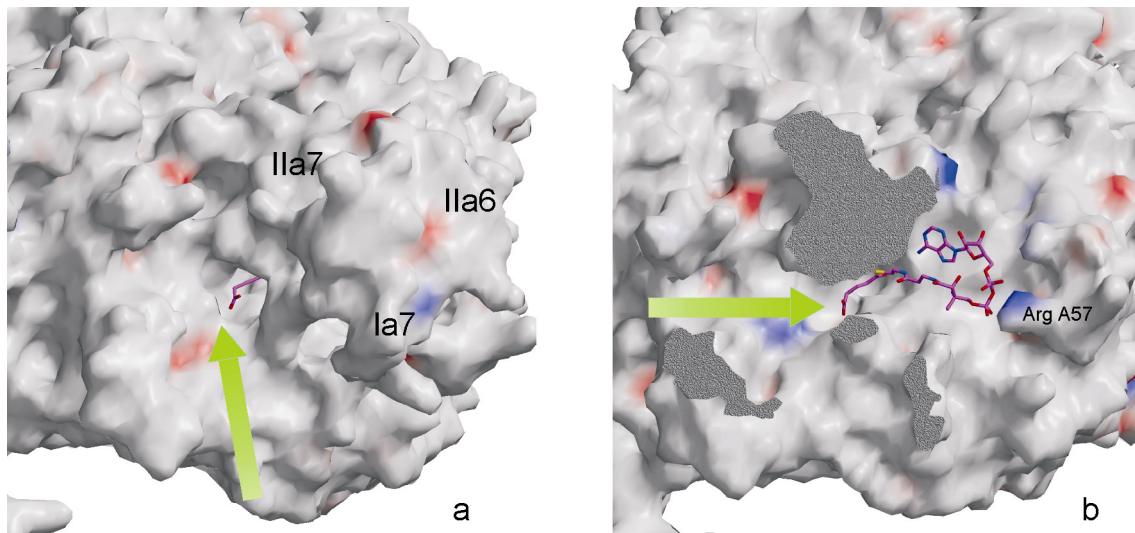


**Abbildung 4-27: Theoretisches Strukturmodell für die Reste 84-146 der GcdC Untereinheit.** Das Strukturmodell wurde anhand der bekannten Strukturen sequenzähnlicher, biotintragender Proteine ermittelt. **a)** Sequenzalignment der 63 C-terminalen Reste der GcdC mit den Proteinsequenzen der für das *Homology-Modelling* eingesetzten Strukturen. Die blau unterlegten Reste zeigen Identität in mindestens 3 der Sequenzen, die violett unterlegten Reste Ähnlichkeit in der Proteinsequenz. **b)** Theoretisches Strukturmodell für die 63 C-Terminalen Reste der GcdC Untereinheit. Das Biotin wurde an Lys 112 gekoppelt dargestellt, wodurch sich ein flexibler Arm mit einer Länge von 15,4 Å ergibt. Charakteristisch für das Biotin ist die geknickte Form des Ringes.

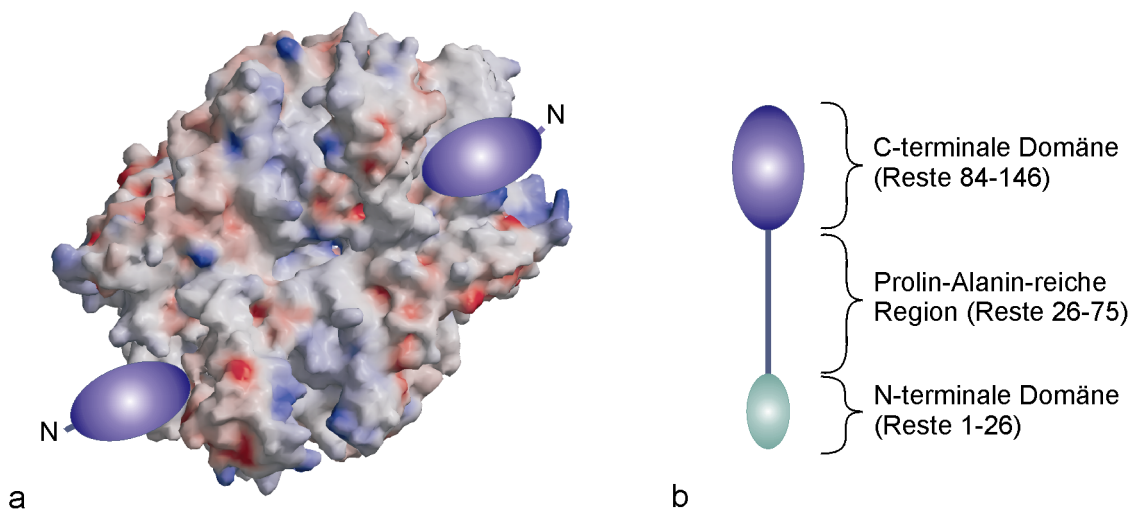
Ein großer Teil der Proteinsequenz (146 Aminosäuren) besteht aus einer sehr Prolin und Alanin-reichen Linker-Region (Reste 26-75, 14 Proline und 34 Alanine) (Braune *et al.*, 1999). Für den Bereich C-terminal von dieser Region (Reste 84-146) gibt es eine große Anzahl sequenzähnlicher Proteine. Von einigen dieser Proteine ist die dreidimensionale Struktur durch NMR-Spektroskopie oder Röntgenkristallographie bekannt ist. Daher konnte anhand der Strukturen der Biotin-Carboxylcarrier-Domäne der Transcarboxylase aus *Propionibacterium freudenreichii shermanii* (1DCZ) (Reddy *et al.*, 2000), der Dihydrolipoamid-Acetyltransferase aus *E. coli* (1QJO) (Jones *et al.*, 2000) und der Biotinyl-Domäne aus Acetyl-Coenzym A Carboxylase aus *E. coli* (1BDO) mit dem über das Internet verfügbaren Programm SWISS\_MODEL (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>) (Peitsch, 1996) ein theoretisches Modell für die 63 C-terminalen Reste der GcdC Untereinheit berechnet werden (Abb. 4-27b). Das theoretische Modell des GcdC Fragmentes besteht aus einem  $\beta$ -Sandwich bei dem ein zweisträngiges Faltblatt gegen ein dreisträngiges Faltblatt gelagert ist. Das Lysin 112, an dessen Seitenkette das Biotin gekoppelt ist, befindet sich an der Spitze eines aus der Struktur herausragenden Loops. Das hier vorgestellte theoretische Modell kann nur einen Hinweis auf das mögliche Aussehen des C-terminalen GcdC Fragmentes geben.

#### 4.2.12 Die Interaktion mit dem Biotin-Carrier

Die Carbonylgruppe des Glutaconyls ist in einer Kavität der Proteinoberfläche gebunden, die nach Anlagerung des Glutaconyl-Coenzym A nur noch von der gegenüberliegenden Seite zugänglich ist. In Abbildung 4-28 ist diese Bindungsstelle dargestellt. Der grüne Pfeil deutet die Eintrittsrichtung des insgesamt etwa 15,4 Å langen Biotinyllysins an. Anhand dieser räumlichen Beschränkungen kann die Lokalisierung des in 4.2.11. beschriebenen C-terminalen Fragmentes, auch als C-terminale Domäne der GcdG Untereinheit bezeichnet, auf der Oberfläche der GcdA abgeschätzt werden (Abb. 4-29). Über die Interaktionen der Prolin-Alanin-reichen Region sowie der N-terminalen Domäne der GcdC-Untereinheit (Abb. 4-29b) mit der GcdA-Untereinheit sowie dem Holoenzym gibt es noch keine Informationen.



**Abbildung 4-28: Die Substratbindungstasche der GcdA.** Die Abbildung zeigt einen Blick auf die Oberfläche des Proteins im Bereich der Substratbindungsstelle. Die Oberfläche ist entsprechend der Ladung des Proteins rot (negative Ladung) und blau (positive Ladung) gefärbt. Das Substrat Glutaconyl-Coenzym A ist als Stick-Modell dargestellt. Kohlenstoff-Atome und die Phosphor-Atome sind violett, Stickstoff-Atome blau, Sauerstoffatome rot und das Schwefel-Atom gelb dargestellt. Der grüne Pfeil markiert die mögliche Zutrittsrichtung für den Biotinyllysine-Arm der GcdC-Untereinheit zum Glutaconyl-Rest. In Abbildung **a**) verdecken die Helices Ia7, IIa6 und IIa7 die Bindungsstelle. Gegenüber **b**) ist die Darstellung etwas gedreht und die Carbonylgruppe des Glutaconyl-CoA wird auf der anderen Seite sichtbar. In Abbildung **b**) sind die Helices entfernt und das Substrat ist vollständig sichtbar. Arg A57, dessen Seitenkette mit den Sauerstoffen der Phosphate wechselwirkt, ist markiert.



**Abbildung 4-29: Oberflächendarstellung der Oberseite des GcdA Dimers mit den theoretischen Kontaktstellen zur GcdC-Untereinheit.** **a**) Die Oberfläche ist entsprechend der Ladung des Proteins positiv (blau) und negativ (rot) eingefärbt (Abb. 4-21). Die hypothetischen Kontaktflächen des Dimers mit der C-terminalen Domäne der GcdG-Untereinheit sind durch zwei blaue Ellipsoide angedeutet. **b**) Hypothetischer Aufbau der GcdC-Untereinheit.

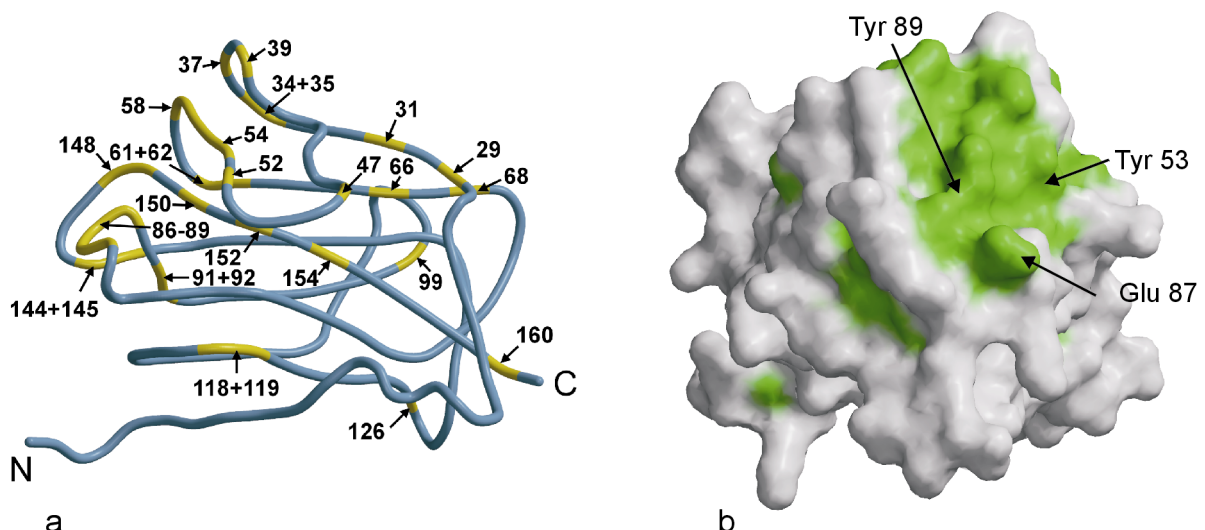


## 5 Diskussion

### 5.1. Die APC10-Untereinheit des humanen APC

#### 5.1.1 Invariante Aminosäuren in den Apc10 Untereinheiten verschiedener Spezies

Um einen Hinweis auf die möglicherweise an der Funktion von APC10 beteiligten Aminosäuren zu bekommen, wurden die Proteinsequenzen einiger bekannter APC10 Untereinheiten verschiedener Spezies verglichen (Abb. 4-9). Die größten zusammenhängenden konservierten Sequenzabschnitte sind das Konsensus-Motiv im  $\beta 1$ - $\beta 1'$  Loop (28-AXWXXSSXKXG-40), das (53-WQSDGXXPH-63) Motiv im  $\beta 1'$ - $\beta 2$  Loop, das (84-DESYXPS-93) Motiv in der  $\alpha 2$ -Helix und im  $\alpha 2$ - $\beta 4$  Loop, sowie das (143-NHXXGR(K)DXHXRXI-157) Motiv den  $\beta 7$  Strang, den  $\beta 7'$ -Strang und den  $\beta 8$  Strang einschließt. Werden die zwischen den Apc10 Proteinen verschiedener Spezies hochkonservierten Reste auf einer Darstellung des Proteinrückgrates (Abb. 5-1a) oder auf der Oberfläche des Proteins (Abb. 5-1b) markiert, zeigt sich, dass die zwischen *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* invarianten Reste im Bereich der N-terminalen Loop-Region anhäufen und dort eine zusammenhängende Oberfläche bilden (Abb. 5-1b).



**Abbildung 5-1: Invariante Aminosäuren in der APC10 Untereinheit verschiedener Spezies.** Die in den APC10 Untereinheiten von *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* (Sequenzalignment in Abbildung. 4-9) wurden in verschiedenen Darstellungen der APC10 Struktur hervorgehoben. **a)** Die invarianten Reste sind in der Darstellung des Proteinrückgrats von APC10 gelb dargestellt. **b)** Auf der Oberflächendarstellung der APC10-Struktur sind die invarianten Reste grün hervorgehoben.

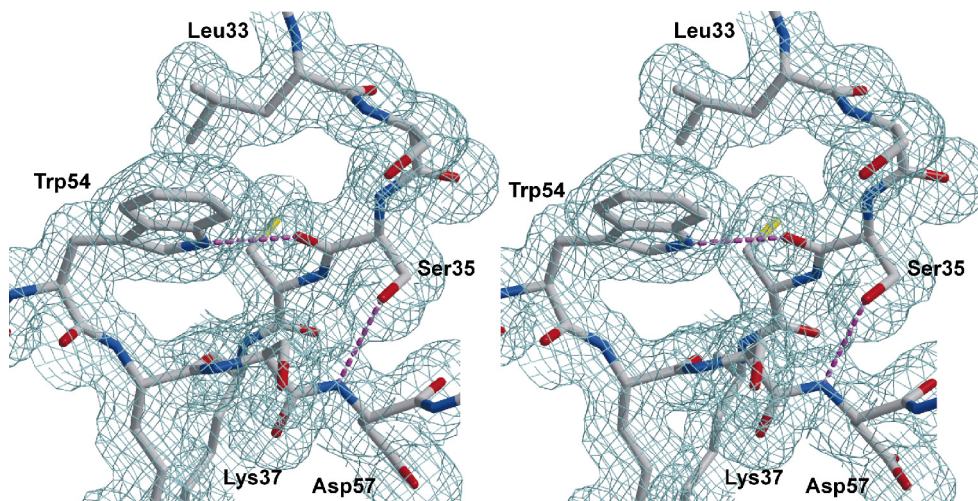
Diese Reste befinden sich vorrangig in den Loops, so dass ihnen keine Funktion bei der Ausbildung des  $\beta$ -Sandwiches zukommt. Die evolutionäre Konservierung dieser Reste deutet

vielmehr darauf hin, dass es sich bei diesen Resten um einen Bereich im Protein handelt, der an der Funktion des APC10 im Holo-APC beteiligt ist.

### 5.1.2 Einblicke in eine mögliche Funktion von APC10 innerhalb des Holo-APC

Obwohl APC10 mit 20 kDa nur einen kleinen Teil des APC (870 kDa) bildet, ist diese Untereinheit für die Funktion des APC essentiell. Eine vollständige Entfernung oder eine Mutation des Proteins führt nicht zu einer Destabilisierung des APC Komplexes aber zu schweren Funktionsstörungen wie verzögertem Wachstum und Temperatursensitivität (siehe 2.1.5.). Da die enzymatische Aktivität des APC von zwei anderen Untereinheiten APC11 und APC2 ausgeübt wird, könnte APC10 eine Rolle in der Regulation oder Substraterkennung besitzen. Die Kristallstruktur von APC10 gibt einige Hinweise auf die mögliche Rolle des Proteins innerhalb des Holo-APC, vor allem durch die unerwartete Strukturhomologie der Doc-Domäne zu Proteinen mit sehr unterschiedlichen Funktionen. Gemeinsam ist diesen strukturhomologen Proteinen, dass ihre zur Doc-Domäne homologe Domäne verschiedene Nicht-Protein-Liganden bindet. Die strukturähnlichen Proteine wie die D1 Domäne der Galactose Oxidase (Ito *et al.*, 1991), die Galactose-bindende Domäne in Sialidase (Gaskell *et al.*, 1995), die C2 Domäne von Gerinnungsfaktor Va (Macedo-Ribeiro *et al.*, 1999) und die N-terminale Domäne von XRCC1 benutzen die gleiche Oberflächenregion mit einem kurzen  $\beta$ -Faltblatt für die Ligandenbindung. Diese Region entspricht in der APC10 Struktur der Oberfläche in der N-terminalen Loop-Region die durch das kleine  $\beta$ -Faltblatt  $\beta 1' - \beta 7'$  gebildet wird. Die Strukturähnlichkeit der Proteine kann durch eine divergente Evolution eines gemeinsamen Ursprungsmoleküls hin zu verschiedenen Funktionen erklärt werden. Obwohl die Aminosäuren, die in der Galactose Oxidase und in der Sialidase für die Bindung der Galactose verantwortlich sind, im APC10 nicht konserviert sind, besteht bei Resten welche die Substruktur des  $\beta 1 - \beta 1' - \beta 2$ -Loops stabilisieren, wie Ser 35 und Trp 54 eine strikte Konservierung innerhalb der APC10 Untereinheiten der verschiedenen Spezies aber auch in Galactose Oxidase, Sialidase (Abb. 4-9), Gerinnungsfaktor Va und XRCC1. Ser 35 und Trp 54 im APC10 entsprechen in der Gerinnungsfaktor Va Sequenz Ser 20 und Trp 47 (Macedo-Ribeiro *et al.*, 1999) sowie Ser 14 und Trp 33 in der XRCC1 Sequenz (Marintchev *et al.*, 1999). Diese strikte Konservierung deutet daraufhin, dass die Interaktionen zwischen den beiden Resten für die Stabilisierung des, zwischen den beiden Resten liegenden, Loops essentiell sind. Die Mutation von Ser 137 zu Phe in der Apc10 Untereinheit des *S. cerevisiae* APC führt zu Sterilität, allgemein verzögertem und temperatursensitivem Wachstum und Defekten in der Chromosomentrennung (Hwang und Murray, 1997). Der Rest Ser 137 im

*S.cerevisiae* Apc10 entspricht Ser 35 des humanen APC10. Ser 35 befindet sich für Solvensmoleküle nicht zugänglich im Inneren der APC10 Struktur und bildet zwei Wasserstoffbrücken vom Sauerstoff der Seitenkette zum Peptidstickstoff von Asp 57 und vom Carbonylsauerstoff zum Trp 54 (Abb. 5-2). Der Austausch der Seitenkette des Serins gegen die voluminöse hydrophobe Seitenkette des Phenylalanins zerstört die Wasserstoffbrücke von Ser 35 zu Asp 57, weiterhin kann es zu Veränderungen des Proteinrückgrates kommen, da die Seitenkette des Phenylalanins mehr Raum beansprucht als Serin und andere Wechselwirkungen eingehen wird. Die zweite Wasserstoffbrücke des Peptidstickstoffes von Rest 35 zum Trp 54 wird daher möglicherweise ebenfalls gestört.



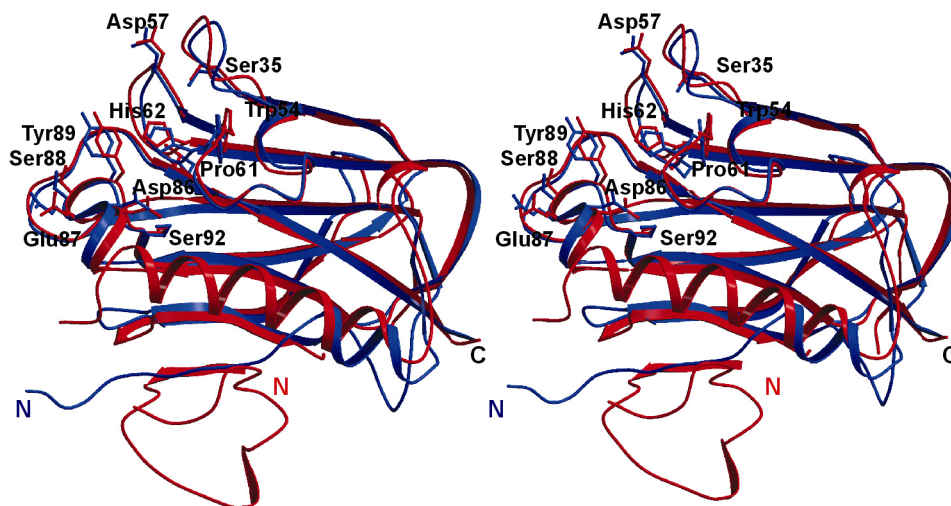
**Abbildung 5-2:** Stereodarstellung der auf  $1 \sigma$  kontourierten  $2F_o-F_c$ -Elektronendichte der APC10 Struktur in der Umgebung von Ser 35. Die Wasserstoffbrücken zwischen Ser 35, Trp 54 und Asp 57 sind in magenta dargestellt.

Die grosse Strukturhomologie zu Proteinen mit Ligandbindungsstelle in der, der N-terminalen Loop-Region entsprechenden Region, und die Sequenzkonservierung in der N-terminalen Loop-Region lässt auf eine Rolle der N-terminalen Loop Region, speziell des  $\beta 1$ - $\beta 1'$ - $\beta 2$  Loops, in der Funktion von APC10 schliessen. Die Strukturhomologen zeigen, dass diese Rolle in der Bindung eines anderen Biomoleküls bestehen könnte. Das Spektrum der Interaktionspartner der Strukturhomologen reicht von Zuckern, Nucleotiden und Phospholipiden bis zu DNA. Für die Natur des potentiellen Bindungspartners von APC10 gibt es noch keine Hinweise.

### 5.1.3 Die Struktur des APC10 aus *Saccharomyces cerevisiae*

Mittlerweile wurde auch die Kristallstruktur der APC10 Untereinheit des APC aus *Saccharomyces cerevisiae* gelöst (PDB-Code 1GQP) (Au *et al.*, 2002). Das Hefe-Protein (33 kDa) besteht aus 285 Aminosäuren, deren Sequenz zu 35 % mit dem humanen Protein

identisch ist. Gegenüber dem humanen Protein besitzt das Hefe-Protein noch eine N-terminale Verlängerung um 99 Reste, die in keiner der anderen bekannten APC10 Untereinheiten vorkommt. In der Kristallstruktur ist aber nur ein kleiner Abschnitt dieser zusätzlichen Sequenz enthalten. Die Überlagerung der beiden Kristallstrukturen zeigt, dass das Rückgrat der Strukturen und auch die Orientierung markanter Seitenketten nahezu identisch sind (Abb. 5-3). Die bestehenden Unterschiede lassen sich auf die unterschiedlichen Kristallkontakte in den verschiedenen Raumgruppen zurückführen. Die nicht mehr zum *jelly-roll* Motiv gehörende N-terminale Helix  $\beta_0$  ist in der *S. cerevisiae* Struktur sehr verlängert aber die weiteren N-terminalen Reste besitzen keine Sekundärstrukturelemente. Der C-Terminus beider Strukturen ist flexibel und daher in der Elektronendichte nicht definiert.



**Abbildung 5-3:** Stereodarstellung der überlagerten Kristallstrukturen des humanen APC10 (blau) und des Apc10 aus *S. cerevisiae* (rot). Ausgewählte Seitenketten in der N-terminalen Loop-Region sowie die Termini sind markiert.

#### 5.1.4 Die APC10 Struktur als Leitstruktur für andere Doc-Domänen Proteine

Der *Anaphase-promoting Complex* ist eine Ubiquitin-Protein-Ligase die wichtige Übergänge in der Mitose und während der G1-Phase des Zellzyklus kontrolliert. Verschiedene Untereinheiten des APC haben Homologe in anderen E3-Enzymen, deren Struktur bereits bekannt ist. Wie die mögliche Interaktion des RING-Finger Proteins APC11 mit einem E2-Enzym aussehen könnte, zeigt die Kristallstruktur des c-CBL-RING-Fingers im Komplex mit dem E2-Enzym UbcH7 (Zheng *et al.*, 2000). Die Strukturen der TPR-Domänen wie sie in den APC-Untereinheiten Apc3/Cdc27, Apc6/Cdc16, Apc8/Cdc23 und Apc 7 vorkommen, sowie ihre möglichen Interaktionen mit Liganden sind aus Kristallstrukturen wie beispielweise der Protein Phosphatase 5 (Das *et al.*, 1998) und dem Chaperon-Adaptor-Protein Hop1 (Scheufler *et al.*, 2000) bekannt. Für das Verständnis des Zusammenwirkens der verschiedenen

Untereinheiten im APC, auch der Untereinheiten deren Funktion noch nicht geklärt ist, ist die Kristallstruktur des Holo-APC notwendig. Die aufwendige Reinigung des Holo-APC (Gieffers *et al.*, 2001) lieferte bis jetzt zu wenig Protein für eine Kristallisation. Daher wurde in dieser Arbeit der Schwerpunkt auf die Aufklärung der Struktur von Untereinheiten mit bisher unbekannter Aufgabe gelegt, um über eventuelle Homologien zu bekannten Strukturen Einblicke in ihre Funktion zu erhalten.

Die Kristallstruktur des APC10 ist die erste Struktur einer APC-Untereinheit mit atomarer Auflösung und ebenfalls die erste Struktur einer Doc-Domäne. Sie kann als Leitstruktur für die anderen Doc-Domänen-Proteine dienen, wie die in der Einleitung erwähnten Proteine KIAA0076, KIAA0708, RJS/HERC2 und PAM, die möglicherweise ebenfalls an Ubiquitinierungsreaktionen beteiligt sind.

## 5.2 Die GcdA-Untereinheit der Glutaconyl-CoA-Decarboxylase

### 5.2.1 Das Molekulargewicht der nativen GcdA

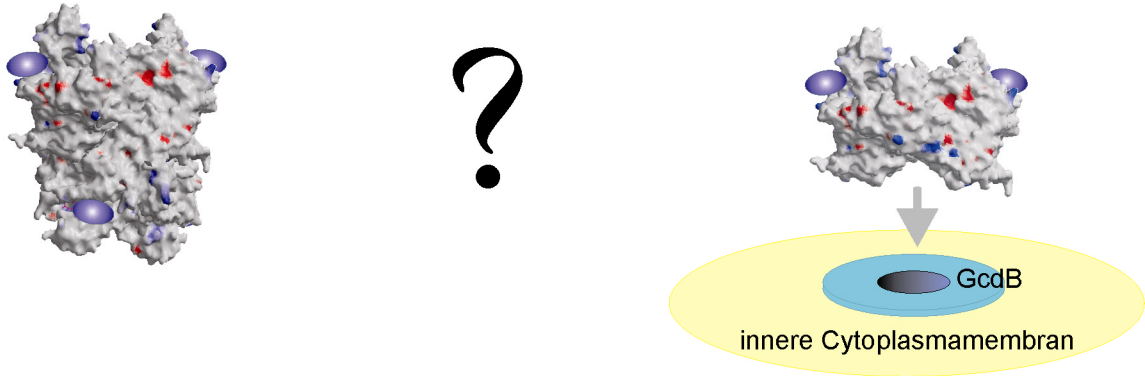
Die Molekulargewichte der Untereinheiten konnten bei den verschiedenen Na<sup>+</sup>-abhängigen Ionenpumpen bisher nur für die Monomere durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anhand der Proteinsequenz bestimmt werden. Über die Assoziation der Monomere zu Multimeren oder die Stöchiometrie der Untereinheiten in den funktionellen Ionenpumpen ist nur sehr wenig bekannt.

Unter den Kristallisationsbedingungen ist die GcdA ein Tetramer enthalten, welches über eine große hydrophobe Oberflächenregion an der Unterseite des Dimers aufgebaut wird (Abb. 4-22). Die Gelfiltrationsexperimente (Abb. 4-13) zeigen jedoch, dass das Protein bei einer Salzkonzentration von 500 mM in Lösung wahrscheinlich als Dimer vorkommt. In der Kristallisationsbedingung liegt noch eine wesentlich höhere Salzkonzentration (1,6 M Natriumformiat + 0,5 M Ammoniumsulfat aus dem Proteinpuffer) als im Gelfiltrationspuffer vor. Durch diese hohe Salzkonzentration kommt es zu einer Abschwächung der ionischen Wechselwirkungen und die Zusammenlagerung der hydrophoben Oberflächenregionen zweier Dimere unter Bildung eines Tetramers wird gefördert. Die Kristallisation des Proteins wird möglicherweise durch die Aggregation des Proteins zu Tetrameren gefördert.

Die Ergebnisse der Gelfiltrationsexperimente stehen im Gegensatz zu dem durch Braune *et al.* (Braune *et al.*, 1999) gefundenen Molekulargewicht von 197 kDa für das aus *E.coli* gereinigte rekombinante GcdA Protein, das einem Trimer entsprechen würde. Dieses Molekulargewicht wurde ebenfalls mit einer Superose 12 Säule (HR 10/30, Amersham Pharmacia Biotech AP, Uppsala) aber mit einer wesentlich geringeren Salzkonzentration (20 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0, 150 mM NaCl, 16 µM Dodecyl β-D-Maltosid) bestimmt. Unter diesen Salzbedingungen war das Protein nur bis zu einer Konzentration von 0,8 mg/ml ohne Aggregation konzentrierbar (Braune *et al.*, 1999). Möglicherweise handelte es sich bei den beobachteten Aggregaten um die in 4.2.1. beschriebenen Mikrokristalle.

Die Kristallstruktur zeigt jedoch, dass ein homotrimerer Aufbau des GcdA Proteins wie er bei anderen Decarboxylasen und den strukturhomologen Proteinen beobachtet wurde, sehr unwahrscheinlich ist. Liegt das Protein nativ als Dimer vor, so könnte der hydrophobe Ring auf der Unterseite des Dimers (Abb. 4-22) als Kontaktfläche zu anderen Untereinheiten der Decarboxylase wie beispielsweise dem Ionenkanal GcdB dienen (Abb. 5-4). Bei dieser Anordnung wirft sich eine Reihe von Frage auf, beispielsweise welche Funktion der Kanal im Inneren des Dimers hat. Möglich wäre ein Austritt des entstehenden CO<sub>2</sub>. Die Informationen aus der Kristallstruktur der GcdA reichen leider nicht ausreichend um Aussagen über die

Quartärstruktur des Gcd-Holoenzym, sowie über den Transfer des Carboxybiotins auf die decarboxylierende Untereinheit und den darauffolgenden Aufbau eines Ionengradienten zu treffen.



**Abbildung 5-4: Mögliche multimere Formen der GcdA.** Das C-terminale Fragment der GcdG Untereinheit wurde als blauer Ellipsoid dargestellt und auf der Oberfläche der GcdA an seiner wahrscheinlichen Interaktionsstelle positioniert. Unter den Kristallisationsbedingungen liegt die GcdA als Tetramer vor (links) und unter nahezu physiologischen Bedingungen wahrscheinlich als Dimer. Liegt das Protein als Dimer vor, käme der hydrophobe Ring auf der Unterseite des Dimers als Kontaktfläche zum Ionenkanal in Frage (rechts), aber auch als Kontaktfläche zu den anderen Gcd-Untereinheiten.

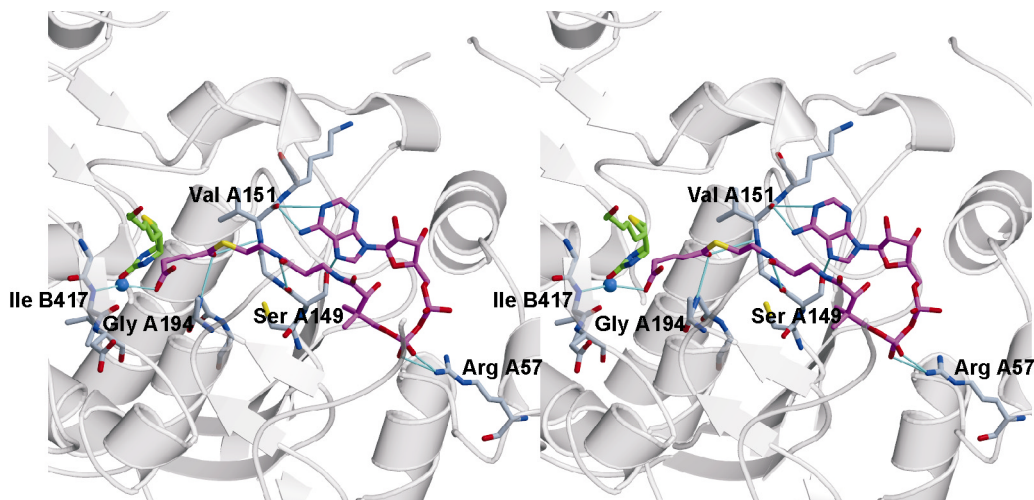
### 5.2.2 Die Entwicklung von zwei Substratbindungsstellen mit unterschiedlicher Spezifität in der GcdA

Die strukturverwandten Proteine 4-Chlorobenzoyl-CoA Dehalogenase (279 Aminosäuren), Dienoyl-CoA Isomerase (327 Aminosäuren), Methylmalonyl-CoA Decarboxylase (296 Aminosäuren) und  $\delta 2$ ,  $\delta 3$  Enoyl-CoA Isomerase (280 Aminosäuren) sind alle Homotrimere bzw. Homohexamere. Ein Monomer dieser Proteine ist etwa so groß wie eine einzige Domäne (~ 290 Aminosäuren) der GcdA. Weiterhin besteht zwischen den beiden Domänen I und II der GcdA eine Sequenzidentität von 15,7 % Sequenzidentität (Abb. 4-20a). Die Überlagerung der Domänen zeigt dass die Sekundärstruktur der Domänen nahezu identisch ist (Abb. 4-20b). Das GcdA-Dimer entspricht also vielmehr einem Pseudotetramer. Wahrscheinlich sind die beiden Domänen der GcdA durch Exonduplikation eines ursprünglichen Monomers entstanden. Die Substratbindungsstellen der beiden Domänen haben sich nachfolgend unterschiedlich entwickelt. Domäne I wurde zur Bindungsstelle des Glutaconyl-CoA Substrates während Domäne II sich zu einer Bindungsstelle für das Biotinyllysine und den Biotincarrier entwickelte.

### 5.2.3 Der GcdA/Glutaconyl-CoA-Komplex :

#### Einblicke in den Mechanismus der Carboxytransferase

Die Qualität der positiven Differenzdichte Komplex erlaubt eine Positionierung des Substrates in der Bindungstasche anhand des analogen Chlorobenzoyl-CoA/Chlorobenzoyl-CoA Dehalogenase-Komplexes (Abb. 4-23 + 4-24), der den einzigen bisher gelösten Substrat-Komplex eines strukturhomologen Proteins darstellt (Benning *et al.*, 1996). Parallelen vom Glutaconyl-CoA/GcdA Komplex zum Chlorobenzoyl-CoA/Chlorobenzoyl-CoA Dehalogenase-Komplex sind die Fixierung der Phosphate über Arginin-Seitenketten, Arg A57 bei der GcdA und Arg 24a sowie Arg 257b bei der Dehalogenase. Weiterhin bilden Val A151 wie Phe 64a bei der Dehalogenase zwei Wasserstoffbrücken zu verschiedenen Teilen des Substrates aus. Der Carbonylsauerstoff von Val A 151 bildet eine Wasserstoffbrücke zu N1 und N3 des Adeninringes (Siehe Abb. 2-8, 4-25) aus und der Peptid-Stickstoff kann zusammen mit der NH-Gruppe von Gly A194 das Oxyanionen-Loch bilden, welches den Enolat-Übergangszustand während der Decarboxylierung stabilisiert (Siehe 2.2.5.). Im Komplex wird der Carbonylsauerstoff durch ein Wassermolekül koordiniert, was wiederum vom Ile B417 fixiert wird.



**Abbildung 5-5: Die Interaktionen des Substrates Glutaconyl-CoA zur Bindungstasche.** Das Glutaconyl-CoA Molekül ist zusammen mit den damit interagierenden Aminosäuren als Stick-Modell dargestellt. Das Sauerstoffatom des Wassers, das im Komplex eine Wasserstoffbrücke zur Carbonylgruppe und zum Ile B417 ausbildet, ist als blaue Kugel dargestellt. Die Wasserstoffbrücken zum Protein sind als cyanfarbene Linien eingezeichnet. Der Abstand des Thioester-Carbonylsauerstoffes zu Val A151 ist mit 3,6 Å zu groß für eine Wasserstoffbrücke. Da das Substrat bei Anwesenheit von Biotin in der Bindungstasche etwas anders positioniert sein könnte und aus diesem Kontakt möglicherweise eine Wasserstoffbrücke entsteht, wurde diese Verbindung trotzdem dargestellt. Das grün dargestellte Biotin wurde manuell unter Einbeziehung der räumlichen Zugänglichkeit des Carbonylrestes und der Informationen über den Mechanismus und das zu carboxylierende Stickstoffatom positioniert.

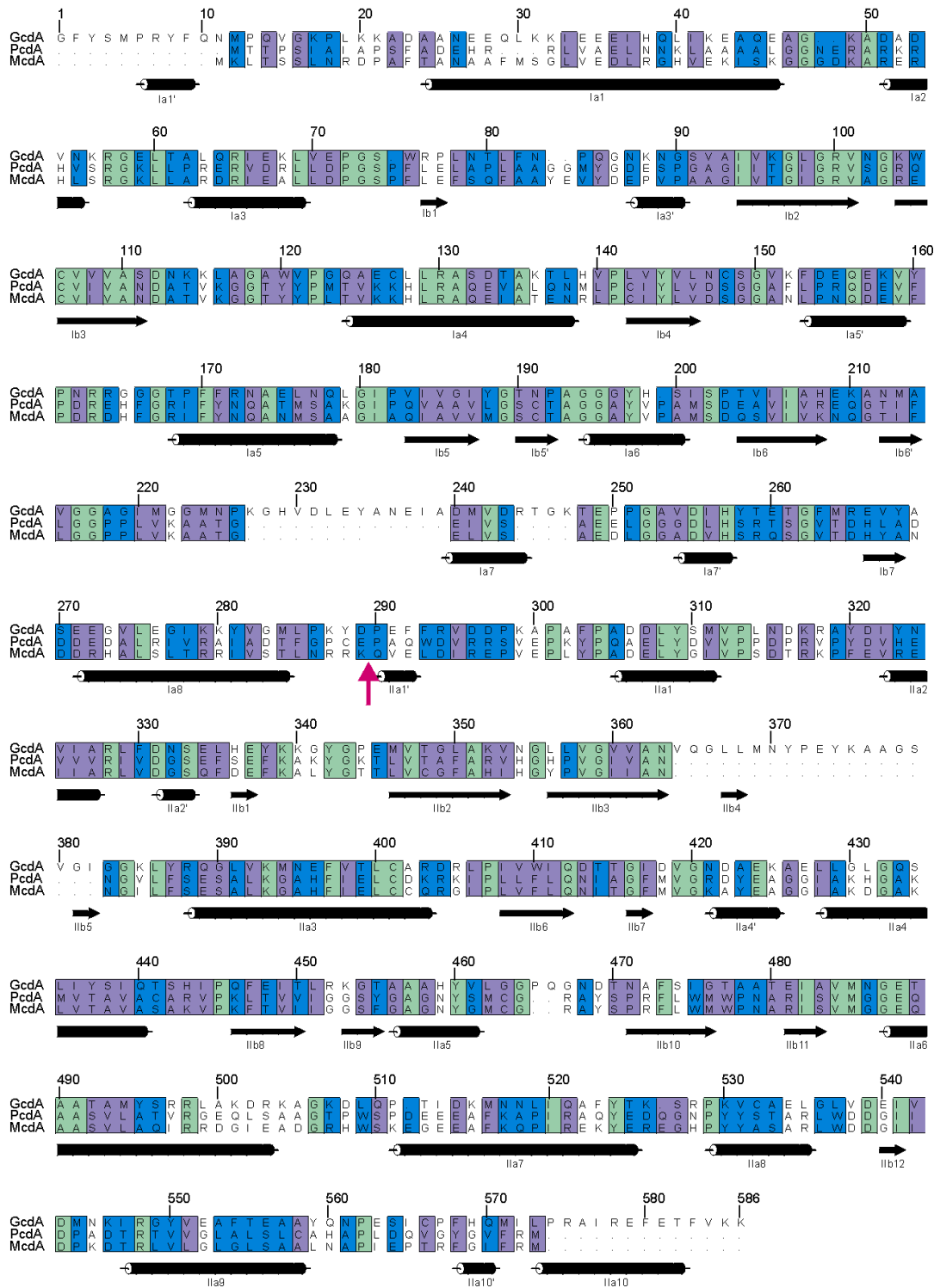
Das zweite Substrat der Decarboxylierungsreaktion, Biotin kann nur durch die dem Glutaconyl-CoA gegenüberliegenden Öffnung im aktiven Zentrum an die Carbonylgruppe des Substrates herangeführt werden. Aufgrund der Informationen über den postulierten



Mechanismus der Transcarboxylierung wurde das Biotin in Abb. 5-5 positioniert. Der Sauerstoff der Ureido-Gruppe tritt dabei möglicherweise an die Stelle eines Wassermoleküls im Komplex (HOH 645). Eine Carboxylatgruppe, die als temporärer Protonenzeptor dient, wie in (Buckel, 2001b) (Abb. 2-8) postuliert, konnte im Aktivzentrum des Komplexes bisher nicht identifiziert werden.

#### 5.2.4 Sequenzähnliche Decarboxylasen

Neben der Glutaconyl-CoA Decarboxylase sind noch weitere Na<sup>+</sup>-abhängige Ionenpumpen bekannt wie die Oxalacetat-Decarboxylase aus den Enterobakterien *K. Pneumoniae* und *Salmonella typhimurium*, Malat-Decarboxylase aus *Malomonas rubra* sowie die Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase aus *Veilonella Parvula* und *Propiogenium modestum*. Zwischen den funktionell gleichen Untereinheiten der verschiedenen Ionenpumpen besteht eine ausgeprägte Sequenzähnlichkeit (Braune *et al.*, 1999), die aber zwischen den Carboxytransferase-Untereinheiten am geringsten ausgeprägt ist (Braune *et al.*, 1999; Buckel, 2001b). Trotzdem kann die GcdA-Struktur als Leitstruktur für diese Carboxytransferase-Untereinheiten betrachtet werden. Eine größere Sequenzähnlichkeit des GcdA-Proteins besteht zu Untereinheiten mehrerer Decarboxylasen aus verschiedenen pathogenen Organismen. Die zwei Proteine mit der größten Sequenzähnlichkeit sind die  $\beta$ -Untereinheit der Propionyl-CoA Decarboxylase aus *Mycobacterium tuberculosis* und die  $\beta$ -Untereinheit 3-Methylcrotonyl-CoA Decarboxylase aus *Agrobacterium tumefaciens*. Gegenüber der GcdA Sequenz sind lediglich die Reste 227 bis 239 vor der Helix Ia7 und die Reste 364 bis 383, welche die zwei kleinen Faltblätter Iib4 und Iib5 enthalten, in den anderen beiden Proteinen deletiert. Die Sequenzidentität zwischen den drei Proteinsequenzen beträgt 18,8 %. Das Alignment der Proteinsequenzen in Abbildung 5-6 zeigt, dass neben den in der Sequenz identischen Resten ein sehr großer Teil der Sequenzen aus sehr ähnlichen Aminosäuren besteht. Die Sequenzidentität ist dabei gleichmäßig über die gesamte Sequenz verteilt. Das weist darauf hin, dass zwischen diesen Proteinen sehr wahrscheinlich eine große Strukturähnlichkeit besteht und dass es sich bei diesen Proteinen ebenfalls um die Untereinheiten von Ionenkanälen handeln könnte. Von den substratbindenden Aminosäuren (Tab. 4-9) ist nur Arg 57 konserviert, die einzige positiv geladene Aminosäure in der Substratbindungstasche, welche im Glutaconyl-CoA/GcdA-Komplex über ihre Seitenkette die Sauerstoffe der Phosphate im Substrat koordiniert (Abb. 5-5). Alle anderen Wechselwirkungen mit dem Substrat erfolgen fast vollständig über das Proteinrückgrat, so dass es sich trotzdem um einen ähnlichen Mechanismus wie bei der GcdA handeln könnte.



GcdA - Glutaconyl-Coenzym A Decarboxylase alpha Untereinheit (*Acidaminococcus fermentans*)  
 PcdA - Propionyl-Coenzym A Carboxylase beta Untereinheit (*Mycobacterium tuberculosis*)  
 McdA- 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase beta Untereinheit (*Agrobacterium tumefaciens*)

**Abbildung 5-6: Sequenzalignement der Proteinsequenzen der Glutaconyl-CoA Carboxytransferase-Untereinheit und der zwei Proteine mit der höchsten Sequenzhomologie.** Die Sequenz ist entsprechend der Sequenz der GcdA nummeriert. Unterhalb des Alignments sind die Sekundärstrukturelemente der GcdA eingezeichnet. Die Sequenzen sind von grün für Sequenzidentität über blau für große Ähnlichkeit und violett für einen geringeren Grad an Homologie farbig unterlegt. Der rote Pfeil markiert die Grenze zwischen Domäne I und II in der GcdA-Struktur.

### 5.2.5 Weitere Ziele

Um den Mechanismus des Carboxyltransfers von Glutaconyl-CoA auf das Biotin detaillierter beschreiben zu können, ist es nötig, die Auflösung des Komplexdatensatzes zu erhöhen, um die in der Bindungstasche sichtbare Elektronendichte zu verbessern. Weiterhin soll ein Biotin-Fragment wie Imidazolindinon kokristallisiert werden. Möglicherweise kann auch der Komplex mit einem nicht umsetzbaren Biotin-Derivat, Glutaconyl-CoA und GcdA kokristallisiert werden. Erste Kokristallisationsexperimente mit Biotin führten bisher nur zu unbrauchbaren verwachsenen Kristallen und das Einlegen intakter Kristalle in Biotin-Lösung führte zu deren Zerstörung.

Die Kristallisation des Gcd-Holoenzym ist durch die membranständige GcdB Untereinheit schwierig. Bisher konnten noch keine Kristalle des vollständigen Komplexes erzeugt werden. Durch Butanol kann der Ionenkanal selektiv aus dem Holoenzym entfernt werden während die anderen Untereinheiten assoziiert und aktiv bleiben (Buckel und Liedtke, 1986b). Die Stöchiometrie und der Aufbau des Komplexes könnte so möglicherweise durch die Kristallisation von Subkomplexen geklärt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Amon, A. (2001). "Together until separin do us part." Nat. Cell Biol **3**(1): E12-4.
- Athappilly, F. K. and W. A. Hendrickson (1995). "Structure of the biotinyl domain of acetyl-coenzyme a carboxylase determined by mad phasing." Structure **3**(12): 1407-19.
- Au, S. W., X. Leng, et al. (2002). "Implications for the ubiquitination reaction of the anaphase-promoting complex from the crystal structure of the doc1/apc10 subunit." J. Mol. Biol. **316**(4): 955-68.
- Barton, G. J. (1993). "Alscript: A tool to format multiple sequence alignments." Protein Eng. **6**(1): 37-40.
- Baumgartner, S., K. Hofmann, et al. (1998). "The discoidin domain family revisited: New members from prokaryotes and a homology-based fold prediction." Protein Sci. **7**(7): 1626-31.
- Bembenek, J. and H. Yu (2001). "Regulation of the anaphase-promoting complex by the dual specificity phosphatase human cdc14a." J. Biol. Chem. **276**(51): 48237-42.
- Bendrat, K. and W. Buckel (1993). "Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the carboxytransferase subunit of the biotin-dependent na<sup>+</sup> pump glutaconyl-coa decarboxylase from acidaminococcus fermentans in escherichia coli." Eur. J. Biochem. **211**(3): 697-702.
- Benning, M. M., T. Haller, et al. (2000). "New reactions in the crotonase superfamily: Structure of methylmalonyl coa decarboxylase from escherichia coli." Biochemistry **39**(16): 4630-9.
- Benning, M. M., K. L. Taylor, et al. (1996). "Structure of 4-chlorobenzoyl coenzyme a dehalogenase determined to 1.8 a resolution: An enzyme catalyst generated via adaptive mutation." Biochemistry **35**(25): 8103-9.
- Berman, H. M., J. Westbrook, et al. (2000). "The protein data bank." Nucl. Acids Res. **28**(1): 235-42.
- Blatch, G. L. and M. Lasse (1999). "The tetratricopeptide repeat: A structural motif mediating protein-protein interactions." Bioessays **21**(11): 932-9.
- Blundell, T. L. and L. N. Johnson (1976). Protein crystallography. London, Academic Press.
- Bott, M., K. Pfister, et al. (1997). "Methylmalonyl-coa decarboxylase from propionigenium modestum--cloning and sequencing of the structural genes and purification of the enzyme complex." Eur. J. Biochem. **250**(2): 590-9.

- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal. Biochem. **72**: 248-54.
- Brady, D. M. and K. G. Hardwick (2000). "Complex formation between mad1p, bub1p and bub3p is crucial for spindle checkpoint function." Curr. Biol. **10**(11): 675-8.
- Braune, A., K. Bendrat, et al. (1999). "The sodium ion translocating glutaconyl-coa decarboxylase from acidaminococcus fermentans: Cloning and function of the genes forming a second operon." Mol. Microbiol. **31**(2): 473-87.
- Brinkmann, U., R. E. Mattes, et al. (1989). "High-level expression of recombinant genes in escherichia coli is dependent on the availability of the dnaX gene product." Gene **85**(1): 109-14.
- Brunger, A. T., P. D. Adams, et al. (1998). "Crystallography & nmr system: A new software suite for macromolecular structure determination." Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. **54**(Pt 5): 905-21.
- Buckel, W. (1980a). "Analysis of the fermentation pathways of clostridia using double labelled glutamate." Arch. Microbiol. **127**(2): 167-9.
- Buckel, W. (2001a). "Unusual enzymes involved in five pathways of glutamate fermentation." Appl. Microbiol. Biotechnol. **57**(3): 263-73.
- Buckel, W. (2001b). "Sodium ion-translocating decarboxylases." Biochim. Biophys. Acta **1505**(1): 15-27.
- Buckel, W. and H. A. Barker (1974). "Two pathways of glutamate fermentation by anaerobic bacteria." J. Bacteriol. **117**(3): 1248-60.
- Buckel, W., U. Dorn, et al. (1981b). "Glutaconate coa-transferase from acidaminococcus fermentans." Eur. J. Biochem. **118**(2): 315-21.
- Buckel, W. and H. Liedtke (1986b). "The sodium pump glutaconyl-coa decarboxylase from acidaminococcus fermentans. Specific cleavage by n-alkanols." Eur. J. Biochem. **156**(2): 251-7.
- Buckel, W. and R. Semmler (1982). "A biotin-dependent sodium pump: Glutaconyl-coa decarboxylase from acidaminococcus fermentans." FEBS Lett. **148**(1): 35-8.
- Buckel, W. and R. Semmler (1983). "Purification, characterisation and reconstitution of glutaconyl-coa decarboxylase, a biotin-dependent sodium pump from anaerobic bacteria." Eur. J. Biochem. **136**(2): 427-34.

- Budisa, N., B. Steipe, et al. (1995). "High-level biosynthetic substitution of methionine in proteins by its analogs 2-aminohexanoic acid, selenomethionine, telluromethionine and ethionine in escherichia coli." Eur. J. Biochem. **230**(2): 788-96.
- Carter, C. W., Jr. and C. W. Carter (1979). "Protein crystallization using incomplete factorial experiments." J. Biol. Chem. **254**(23): 12219-23.
- Charles, J. F., S. L. Jaspersen, et al. (1998). "The polo-related kinase cdc5 activates and is destroyed by the mitotic cyclin destruction machinery in s. Cerevisiae." Curr. Biol. **8**(9): 497-507.
- Cheeseman, G. C. and R. Fuller (1966). "A study by high voltage electrophoresis of the amino acid decarboxylases and arginine dihydrolase of bacteria isolated from the alimentary tract of pigs." J. Appl. Bacteriol. **29**(3): 596-606.
- Chen, J. and G. Fang (2001). "Mad2b is an inhibitor of the anaphase-promoting complex." Genes Dev. **15**(14): 1765-70.
- Cohen-Fix, O. (2001). "The making and breaking of sister chromatid cohesion." Cell **106**(2): 137-40.
- Collaborative Computational Project, N. (1994). "The ccp4 suite: Programs for protein crystallography." Acta Cryst. D **50**: 760-763.
- Cook, G. M., J. E. Wells, et al. (1994). "Ability of acidaminococcus fermentans to oxidize trans-aconitate and decrease the accumulation of tricarballylate, a toxic end product of ruminal fermentation." Appl. Environ. Microbiol. **60**(7): 2533-7.
- Covey, T. R., R. F. Bonner, et al. (1988). "The determination of protein, oligonucleotide and peptide molecular weights by ion-spray mass spectrometry." Rapid Commun. Mass Spectrom. **2**(11): 249-56.
- Cowtan, K. (1994). "Joint ccp4 and esf-eacbm." Newsletter on Protein Crystallography **31**: 34-38.
- Cowtan, K. D. and K. Y. Zhang (1999). "Density modification for macromolecular phase improvement." Prog. Biophys. Mol. Biol. **72**(3): 245-70.
- Das, A. K., P. W. Cohen, et al. (1998). "The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: Implications for tpr-mediated protein-protein interactions." EMBO J. **17**(5): 1192-9.
- de La Fortelle, E. and G. Bricogne (1997). "Macromolecular crystallography." Methods in Enzymology **276**: pp. 472-494.

- Descombes, P. and E. A. Nigg (1998). "The polo-like kinase plx1 is required for m phase exit and destruction of mitotic regulators in xenopus egg extracts." EMBO J. **17**(5): 1328-35.
- Dimroth, P. (1987). "Sodium ion transport decarboxylases and other aspects of sodium ion cycling in bacteria." Microbiol. Rev. **51**(3): 320-40.
- Dobles, M., V. Liberal, et al. (2000). "Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein mad2." Cell **101**(6): 635-45.
- Drenth, J. (1992). Principles of x-ray crystallography. New York, USA, Springer Verlag.
- Engh, R. and R. Huber (1991). "Accurate bond and angle parameters for x-ray protein structure refinement." Acta Cryst. A **47**(392-400).
- Fang, G., H. Yu, et al. (1998). "The checkpoint protein mad2 and the mitotic regulator cdc20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation." Genes Dev. **12**(12): 1871-83.
- Fang, G., H. Yu, et al. (1999). "Control of mitotic transitions by the anaphase-promoting complex." Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. **354**(1389): 1583-90.
- Farruggio, D. C., F. M. Townsley, et al. (1999). "Cdc20 associates with the kinase aurora2/aik." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **96**(13): 7306-11.
- Furste, J. P., W. Pansegrau, et al. (1986). "Molecular cloning of the plasmid rp4 primase region in a multi-host-range tacp expression vector." Gene **48**(1): 119-31.
- Gaskell, A., S. Crennell, et al. (1995). "The three domains of a bacterial sialidase: A beta-propeller, an immunoglobulin module and a galactose-binding jelly-roll." Structure **3**(11): 1197-205.
- Gatto, G. J., B. V. Geisbrecht, et al. (2000). "Peroxisomal targeting signal-1 recognition by the tpr domains of human pex5." Nature Struct. Biol. **7**(12): 1091-5.
- Gieffers, C., P. Dube, et al. (2001). "Three-dimensional structure of the anaphase-promoting complex." Mol. Cell **7**(4): 907-13.
- Gill, S. C. and P. H. von Hippel (1989). Anal. Biochem. **182**: 319-326.
- Glotzer, M., A. W. Murray, et al. (1991). "Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway." Nature **349**(6305): 132-8.
- Gmachl, M., C. Gieffers, et al. (2000). "The ring-h2 finger protein apc11 and the e2 enzyme ubc4 are sufficient to ubiquitinate substrates of the anaphase-promoting complex." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **97**(16): 8973-8.

- Gorbsky, G. J. (2001). "The mitotic spindle checkpoint." Curr. Biol. **11**(24): R1001-4.
- Grossberger, R., C. Gieffers, et al. (1999). "Characterization of the doc1/apc10 subunit of the yeast and the human anaphase-promoting complex." J. Biol. Chem. **274**(20): 14500-7.
- Guo, Q., J. Xie, et al. (1998). "Identification of a large myc-binding protein that contains rcc1-like repeats." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **95**(16): 9172-7.
- Guoguang, L. (2000). "A new method for protein structure comparisons and similarity searches." Journal of Appl. Cryst. **33**: 176-183.
- Hartel, U. and W. Buckel (1996). "Sodium ion-dependent hydrogen production in acidaminococcus fermentans." Arch. Microbiol. **166**(5): 350-6.
- He, X., M. H. Jones, et al. (1998). "Mph1, a member of the mps1-like family of dual specificity protein kinases, is required for the spindle checkpoint in s. Pombe." J. Cell Sci. **111**(Pt 12): 1635-47.
- Hilpert, W. and P. Dimroth (1984). "Reconstitution of na<sup>+</sup> transport from purified methylmalonyl-coa decarboxylase and phospholipid vesicles." Eur. J. Biochem. **138**(3): 579-83.
- Hirano, T. (2000). "Chromosome cohesion, condensation, and separation." Annu. Rev. Biochem. **69**: 115-44.
- Holm, L. and C. Sander (1993). "Protein structure comparison by alignment of distance matrices." J. Mol. Biol. **233**(1): 123-38.
- Hu, F., Y. Wang, et al. (2001). "Regulation of the bub2/bfa1 gap complex by cdc5 and cell cycle checkpoints." Cell **107**(5): 655-65.
- Hubbard, S. J. and J. M. Thornton (1993). Naccess, computer program. London, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London.
- Huder, J. B. and P. Dimroth (1993). "Sequence of the sodium ion pump methylmalonyl-coa decarboxylase from veillonella parvula." J. Biol. Chem. **268**(33): 24564-71.
- Huibregtse, J. M., M. Scheffner, et al. (1993). "Localization of the e6-ap regions that direct human papillomavirus e6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins." Mol. Cell Biol. **13**(8): 4918-27.
- Hutchinson, E. G. and J. M. Thornton (1996). "Promotif--a program to identify and analyze structural motifs in proteins." Protein Sci. **5**(2): 212-20.
- Hwang, L. H., L. F. Lau, et al. (1998). "Budding yeast cdc20: A target of the spindle checkpoint." Science **279**(5353): 1041-4.



- Hwang, L. H. and A. W. Murray (1997). "A novel yeast screen for mitotic arrest mutants identifies *doc1*, a new gene involved in cyclin proteolysis." Mol. Biol. Cell. **8**(10): 1877-87.
- Irniger, S., S. Piatti, et al. (1995). "Genes involved in sister chromatid separation are needed for b-type cyclin proteolysis in budding yeast [published erratum appears in cell 1998 may 1;93(3):487]." Cell **81**(2): 269-78.
- Ito, N., S. E. Phillips, et al. (1991). "Novel thioether bond revealed by a 1.7 Å crystal structure of galactose oxidase." Nature **350**(6313): 87-90.
- Jacob, U., M. Mack, et al. (1997). "Glutaconate coa-transferase from *acidaminococcus fermentans*: The crystal structure reveals homology with other coa-transferases." Structure **5**(3): 415-26.
- Jallepalli, P. V., I. C. Waizenegger, et al. (2001). "Securin is required for chromosomal stability in human cells." Cell **105**(4): 445-57.
- Jaspersen, S. L., J. F. Charles, et al. (1999). "Inhibitory phosphorylation of the apc regulator *hct1* is controlled by the kinase *cdc28* and the phosphatase *cdc14*." Curr. Biol. **9**(5): 227-36.
- Joazeiro, C. A. and A. M. Weissman (2000). "Ring finger proteins: Mediators of ubiquitin ligase activity." Cell **102**(5): 549-52.
- Jones, D. D., K. M. Stott, et al. (2000). "Restricted motion of the lipoyl-lysine swinging arm in the pyruvate dehydrogenase complex of *escherichia coli*." Biochemistry **39**(29): 8448-59.
- Jones, T. A., J. Y. Zou, et al. (1991). "Improved methods for binding protein models in electron density maps and the location of errors in these models." Acta Cryst. A **47**(Pt 2): 110-9.
- Jorgensen, P. M., S. Graslund, et al. (2001). "Characterisation of the human *apc1*, the largest subunit of the anaphase-promoting complex." Gene **262**(1-2): 51-9.
- Kim, S. H., D. P. Lin, et al. (1998). "Fission yeast *slp1*: An effector of the *mad2*-dependent spindle checkpoint." Science **279**(5353): 1045-7.
- Kleywegt, G. J. and T. A. Jones (1999). "Software for handling macromolecular envelopes." Acta Cryst. D Biol. Crystallogr. **55**(Pt 4): 941-4.
- Knight, S. D. (2000). "Rsp version 4.0: A semi-interactive vector-search program for solving heavy-atom derivatives." Acta Cryst. D Biol. Crystallogr. **56**(Pt 1): 42-7.

- Kominami, K., H. Seth-Smith, et al. (1998). "Apc10 and ste9/srw1, two regulators of the apc-cyclosome, as well as the cdk inhibitor rum1 are required for g1 cell-cycle arrest in fission yeast." EMBO J. **17**(18): 5388-99.
- Kotani, S., H. Tanaka, et al. (1999). "Regulation of apc activity by phosphorylation and regulatory factors." J. Cell Biol. **146**(4): 791-800.
- Kramer, E. R., C. Gieffers, et al. (1998). "Activation of the human anaphase-promoting complex by proteins of the cdc20/fizzy family." Curr. Biol. **8**(22): 1207-10.
- Kraulis, P. J. (1991). "Molscript: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures." J. Appl. Crystallogr. **24**: 946-950.
- Kriminski, S., C. L. Caylor, et al. (2002). "Flash-cooling and annealing of protein crystals." Acta Cryst. D Biol. Crystallogr. **58**(Pt 3): 459-71.
- Kurasawa, Y. and K. Todokoro (1999). "Identification of human apc10/doc1 as a subunit of anaphase promoting complex." Oncogene **18**(37): 5131-7.
- Küster, F. W. and A. Thiel (1985). Rechentafeln für die chemische analytik. Berlin, Walter de Gruyter.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4." Nature **227**(259): 680-5.
- Lamb, J. R., W. A. Michaud, et al. (1994). "Cdc16p, cdc23p and cdc27p form a complex essential for mitosis." EMBO J. **13**(18): 4321-8.
- Lamb, J. R., S. Tugendreich, et al. (1995). "Tetratricopeptide repeat interactions: To tpr or not to tpr?" Trends Biochem. Sci. **20**(7): 257-9.
- Laskowski, R. A., J. A. Rullmann, et al. (1996). "Aqua and procheck-nmr: Programs for checking the quality of protein structures solved by nmr." J. Biomol. NMR **8**(4): 477-86.
- Lehman, A. L., Y. Nakatsu, et al. (1998). "A very large protein with diverse functional motifs is deficient in rjs (runty, jerky, sterile) mice." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **95**(16): 9436-41.
- Leslie, A. G. (1999). "Integration of macromolecular diffraction data." Acta Cryst. D Biol. Crystallogr. **55**(Pt 10): 1696-702.
- Levenson, J. D., C. A. Joazeiro, et al. (2000). "The apc11 ring-h2 finger mediates e2-dependent ubiquitination." Mol. Biol. Cell. **11**(7): 2315-25.
- Li, Y., C. Gorbea, et al. (1997). "Mad2 associates with the cyclosome/anaphase-promoting complex and inhibits its activity." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **94**(23): 12431-6.

- Lilie, H., E. Schwarz, et al. (1998). "Advances in refolding of proteins produced in e. Coli." Curr. Opin. Biotechnol. **9**(5): 497-501.
- Löw, U. The cell: Structure and function. Heidelberg, Springer Verlag.
- Lukas, C., C. S. Sorensen, et al. (1999). "Accumulation of cyclin b1 requires e2f and cyclin-a-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex." Nature **401**(6755): 815-8.
- Macedo-Ribeiro, S., W. Bode, et al. (1999). "Crystal structures of the membrane-binding c2 domain of human coagulation factor v." Nature **402**(6760): 434-9.
- Mack, M., K. Bendrat, et al. (1994). "Location of the two genes encoding glutaconate coenzyme a-transferase at the beginning of the hydroxyglutarate operon in acidaminococcus fermentans." Eur. J. Biochem. **226**(1): 41-51.
- Marcinka, K. (1975). "Staining of rna after polyacrylamide gel electrophoresis." Methods Cell Biol. **10**: 49-68.
- Marintchev, A., M. A. Mullen, et al. (1999). "Solution structure of the single-strand break repair protein xrcc1 n-terminal domain." Nature Struct. Biol. **6**(9): 884-93.
- Massa, W. (1996). Kristallstrukturbestimmung. Stuttgart, B.G. Teubner.
- McPherson, A. (1990). "Current approaches to macromolecular crystallization." Eur. J. Biochem. **189**(1): 1-23.
- Merrit, E. A. and M. E. P. Murphy (1994). "Raster3d version 2.0 a program for photorealistic molecular graphics." Acta Cryst. D **50**: 869-873.
- Modis, Y., S. A. Filppula, et al. (1998). "The crystal structure of dienoyl-coa isomerase at 1.5 a resolution reveals the importance of aspartate and glutamate sidechains for catalysis." Structure **6**(8): 957-70.
- Muller, U. and W. Buckel (1995). "Activation of (r)-2-hydroxyglutaryl-coa dehydratase from acidaminococcus fermentans." Eur. J. Biochem. **230**(2): 698-704.
- Mursula, A. M., D. M. van Aalten, et al. (2001). "The crystal structure of delta(3)-delta(2)-enoyl-coa isomerase." J. Mol. Biol. **309**(4): 845-53.
- Nigg, E. A. (1998). "Polo-like kinases: Positive regulators of cell division from start to finish." Curr. Opin. Cell Biol. **10**(6): 776-83.
- Ohta, T., J. J. Michel, et al. (1999). "Roc1, a homolog of apc11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity." Mol. Cell **3**(4): 535-41.

- Otwinowski, Z. (1991). Daresbury study weekend proceedings.
- Otwinowski Z., M. W. (1997). Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode, Academic Press part A.
- Page, A. M. and P. Hieter (1999). "The anaphase-promoting complex: New subunits and regulators." Annu. Rev. Biochem. **68**: 583-609.
- Peitsch, M. C. (1996). "Promod and swiss-model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling." Biochem. Soc. Trans. **24**(1): 274-9.
- Peters, J. M. (1994). "Proteasomes: Protein degradation machines of the cell." Trends Biochem. Sci. **19**(9): 377-82.
- Peters, J. M. (1998). "Scf and apc: The yin and yang of cell cycle regulated proteolysis." Curr. Opin. Cell Biol. **10**(6): 759-68.
- Peters, J. M. (1999). "Subunits and substrates of the anaphase-promoting complex." Exp. Cell Res. **248**(2): 339-49.
- Pfleger, C. M. and M. W. Kirschner (2000). "The ken box: An apc recognition signal distinct from the d box targeted by cdh1." Genes Dev. **14**(6): 655-65.
- Pfleger, C. M., A. Salic, et al. (2001). "Inhibition of cdh1-apc by the mad2-related protein mad2l2: A novel mechanism for regulating cdh1." Genes Dev. **15**(14): 1759-64.
- Pravtcheva, D. D. and T. L. Wise (2001). "Disruption of apc10/doc1 in three alleles of oligosyndactylism." Genomics **72**(1): 78-87.
- Read, R. J. (1986). Acta Cryst. A **42**: 140-149.
- Reddy, D. V., B. C. Shenoy, et al. (2000). "High resolution solution structure of the 1.3s subunit of transcarboxylase from propionibacterium shermanii." Biochemistry **39**(10): 2509-16.
- Reimann, J. D., E. Freed, et al. (2001b). "Emi1 is a mitotic regulator that interacts with cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex." Cell **105**(5): 645-55.
- Reimann, J. D., B. E. Gardner, et al. (2001a). "Emi1 regulates the anaphase-promoting complex by a different mechanism than mad2 proteins." Genes Dev. **15**(24): 3278-85.
- Rhodes, G. (1993). Crystallography made crystal clear: A guide for users of macromolecular models. San Diego, Academic Press.
- Rogosa, M. (1969). "Acidaminococcus gen. N., acidaminococcus fermentans sp. N., anaerobic gram-negative diplococci using amino acids as the sole energy source for growth." J. Bacteriol. **98**(2): 756-66.

- Saiki, R. K., T. L. Bugawan, et al. (1986). "Analysis of enzymatically amplified beta-globin and hla-dq alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes." Nature **324**(6093): 163-6.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour, USA, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Samols, D., C. G. Thornton, et al. (1988). "Evolutionary conservation among biotin enzymes." J. Biol. Chem. **263**(14): 6461-4.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **74**(12): 5463-7.
- Scheffner, M., U. Nuber, et al. (1995). "Protein ubiquitination involving an e1-e2-e3 enzyme ubiquitin thioester cascade." Nature **373**(6509): 81-3.
- Scheufler, C., A. Brinker, et al. (2000). "Structure of tpr domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the hsp70-hsp90 multichaperone machine." Cell **101**(2): 199-210.
- Schweiger, G., R. Dutsch, et al. (1987). "Purification of 2-hydroxyglutaryl-coa dehydratase from acidaminococcus fermentans. An iron-sulfur protein." Eur. J. Biochem. **169**(2): 441-8.
- Shah, J. V. and D. W. Cleveland (2000). "Waiting for anaphase: Mad2 and the spindle assembly checkpoint." Cell **103**(7): 997-1000.
- Shirayama, M., W. Zachariae, et al. (1998). "The polo-like kinase cdc5p and the wd-repeat protein cdc20p/fizzy are regulators and substrates of the anaphase promoting complex in saccharomyces cerevisiae." EMBO J. **17**(5): 1336-49.
- Snyder, L. R. (1968). Principles of adsorption chromatography. New York, Dekker.
- Sorensen, C. S., C. Lukas, et al. (2001). "A conserved cyclin-binding domain determines functional interplay between anaphase-promoting complex-cdh1 and cyclin a-cdk2 during cell cycle progression." Mol. Cell Biol. **21**(11): 3692-703.
- Tang, Z., R. Bharadwaj, et al. (2001). "Mad2-independent inhibition of apccdc20 by the mitotic checkpoint protein bubr1." Dev. Cell **1**(2): 227-37.
- Tang, Z., B. Li, et al. (2001). "Apc2 cullin protein and apc11 ring protein comprise the minimal ubiquitin ligase module of the anaphase-promoting complex." Mol. Biol. Cell. **12**(12): 3839-51.

- Taylor, S. S., E. Ha, et al. (1998). "The human homologue of bub3 is required for kinetochore localization of bub1 and a mad3/bub1-related protein kinase." J. Cell Biol. **142**(1): 1-11.
- Taylor, S. S., D. Hussein, et al. (2001). "Kinetochore localisation and phosphorylation of the mitotic checkpoint components bub1 and bubr1 are differentially regulated by spindle events in human cells." J. Cell Sci. **114**(Pt 24): 4385-4395.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, et al. (1994). "Clustal w: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucl. Acids Res. **22**(22): 4673-80.
- Visintin, R., K. Craig, et al. (1998). "The phosphatase cdc14 triggers mitotic exit by reversal of cdk-dependent phosphorylation." Mol. Cell **2**(6): 709-18.
- Voet, D. and J. Voet (1992). Biochemie. Weinheim, VCH.
- Waldrop, G. L., I. Rayment, et al. (1994). "Three-dimensional structure of the biotin carboxylase subunit of acetyl-coa carboxylase." Biochemistry **33**(34): 10249-56.
- Weeks, C. M. and R. Miller (1999). "Optimizing shake-and-bake for proteins." Acta Cryst. D Biol. Crystallogr. **55**(Pt 2): 492-500.
- Weissman, A. M. (2001). "Themes and variations on ubiquitylation." Nat Rev Mol. Cell Biol. **2**(3): 169-78.
- Wendt, K. S., H. C. Vodermaier, et al. (2001). "Crystal structure of the apc10/doc1 subunit of the human anaphase-promoting complex." Nature Struct. Biol. **8**(9): 784-8.
- West, I. C. and P. Mitchell (1974). "Proton/sodium ion antiport in escherichia coli." Biochem J. **144**(1): 87-90.
- Williams, D. C., R. M. Van Frank, et al. (1982). "Cytoplasmic inclusion bodies in escherichia coli producing biosynthetic human insulin proteins." Science **215**(4533): 687-9.
- Wohlfarth, G. and W. Buckel (1985). "A sodium ion gradient as energy source for peptostreptococcus asaccharolyticus." Arch. Microbiol. **142**(2): 128-35.
- Yu, H., J. M. Peters, et al. (1998). "Identification of a cullin homology region in a subunit of the anaphase-promoting complex." Science **279**(5354): 1219-22.
- Zachariae, W. and K. Nasmyth (1996). "Tpr proteins required for anaphase progression mediate ubiquitination of mitotic b-type cyclins in yeast." Mol. Biol. Cell. **7**(5): 791-801.
- Zachariae, W. and K. Nasmyth (1999). "Whose end is destruction: Cell division and the anaphase-promoting complex." Genes Dev. **13**(16): 2039-58.

Zachariae, W., M. Schwab, et al. (1998). "Control of cyclin ubiquitination by cdk-regulated binding of hct1 to the anaphase promoting complex." Science **282**(5394): 1721-4.

Zachariae, W., A. Shevchenko, et al. (1998). "Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: Identification of a subunit related to cullins." Science **279**(5354): 1216-9.

Zachariae, W., T. H. Shin, et al. (1996). "Identification of subunits of the anaphase-promoting complex of *saccharomyces cerevisiae*." Science **274**(5290): 1201-4.

Zheng, N., P. Wang, et al. (2000). "Structure of a c-cbl-ubch7 complex: Ring domain function in ubiquitin-protein ligases." Cell **102**(4): 533-9.