Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung für Molekulare Strukturbiologie

Röntgenkristallographische und NMR-spektroskopische Untersuchungen an den substratbindenden Domänen des Thermosoms, des Chaperonins aus *Thermoplasma acidophilum*

Gundula Bosch

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung für Molekulare Strukturbiologie

Röntgenkristallographische und NMR-spektroskopische Untersuchungen an den substratbindenden Domänen des Thermosoms, des Chaperonins aus *Thermoplasma acidophilum*

Gundula Bosch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauf

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. W. Baumeister

2. Univ.-Prof. Dr. H. Kessler

Die Dissertation wurde am 12.03.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 21.05.2003 angenommen.

Erfahrung ist fast immer eine Parodie auf die Idee.

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis V
1. Zusammenfassung 1
2. Einleitung 3
2.1. Molekulare Chaperone 3
2.2. Die Rolle von HSP60- und HSP70-Familien bei der Proteinfaltung in der Zelle 3
2.3. Die Chaperonine 5
2.4. Zielsetzung 9
3. Material und Methoden 10
3.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial 10
3.2. Gentechnische Methoden 11
3.2.1. Stämme, ihre Kultivierung und Transformation 11
3.2.2. Klonierung der Expressionsplasmide 13
3.2.3. DNA-analytische Methoden 15
3.3. Proteinbiochemische Methoden 16
3.3.1. Expression der apikalen Domänen des Thermosoms 16
3.3.2. Proteinreinigung und Probenpräparation der apikalen Domänen des Thermosoms 18
3.3.3. Proteinanalytische Methoden 20
3.4. Kristallographische Methoden 27
3.4.1. Kristallisation 27
3.4.2. Datensammlung 27
3.4.3. Strukturlösung 28
3.4.4. Graphische Darstellung 29
3.5. Kernspin-Resonanz-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie) 30

4. Ergebnisse 33

4.1. Kristallisation der β-apikalen Domäne des Thermosoms (βADT) 33

4.1.1. Optimierung der Expressions- und Proteinreinigungsstrategie 33

4.1.2. Analyse des Oligomerisierungszustandes mittels analytischer Gelfiltration 37

4.1.3. Optimierung der Kristallisationsbedingungen und Datensammlung 38

4.1.4. Strukturauflösung durch Molekularen Ersatz (Molecular Replacement) 40

4.1.5. Der Einfluss von Schwermetallverbindungen auf die βADT-Kristalle 41

4.1.6. Die Kristallstruktur der β-apikalen Domäne des Thermosoms 42

4.1.7. Der Einfluss der Kristallpackung 44

4.1.8. Die Hydrophobizität der βADT 45

4.2. Analyse der apikalen Domänen in Lösung 46

4.2.1. Probenpräparation für die NMR-Spektroskopie 46

4.2.2. Analyse der β-apikalen Domäne 48

4.2.3. Analyse der α-apikalen Domäne 55

5. Diskussion 63

5. Strukturvergleich von substratbindenden Domänen archaealer und eukaryotischer Gruppe II Chaperonine 63

5.1. Kristall- und NMR-Strukturen unterscheiden sich häufig in kleinen, aber bedeutsamen Eigenschaften 63

5.2. Eine vergleichende Kristallstruktur-Analyse der apikalen Domänen des Thermosoms zeigt segmentale Plastizität 64

5.3. NMR-spektroskopische Untersuchungen an den thermosomalen Substrat-Bindungsdomänen beweisen die hohe Flexibilität der Fortsatz-Segmente 71

5.4. Bewertung der vorliegenden Strukturinformationen und mögliche Implikationen für Substratinteraktionen bei Gruppe II Chaperoninen 72

5.5. Schlussbemerkung und Ausblick 90

6. Literatur 94

7. Abkürzungen 107

8. Anhang 110

1. Zusammenfassung

Der Begriff „molekulare Chaperone“ umfasst eine Reihe spezialisierter Proteine, die Faltungsintermediate anderer Proteine von unproduktiven Reaktionen wie Aggregation und Fehlfaltung abhalten. Eine Unterfamilie stellen die HSP60–Proteine (Hitze-Schock-Proteine mit einer Masse von 60 kDa pro Untereinheit) oder Chaperonine dar, zylindrische Doppelring-Komplexe, welche Polypeptiden nicht-nativer Konformation ein hydrophiles, abgeschlossenes Kompartiment bieten, in dem der Faltungsvorgang ATP-abhängig und unbeeinflusst von der dicht konzentrierten Umgebung in der Zelle stattfinden kann. Die in Bakterien und eukaryotischen Organellen vorkommenden Gruppe I oder GroEL-homologen Chaperonine schließen hierzu ihre Faltungskammer mit Hilfe des Ko-Chaperonins GroES ab. Statt dessen besitzen die archaealen Thermosomen und das eukaryotische CCT oder TRiC [1] als Vertreter der Gruppe II Chaperonine ein eingebautes Deckelsegment in Form eines helikalen Fortsatzmotivs, das aus dem globulären Kernbereich der substratbindenden Domänen herausragt. Im offenen Zustand der Gruppe II Chaperonine sind diese helikalen und vornehmlich hydrophoben Fortsätze ringsum an den Rändern der zentralen Zylinderhöhlung exponiert. Während des Übergangs zum geschlossenen Zustand kommt es zu quarternären Konformationsänderungen im Komplex. Die substratbindenden oder apikalen Domänen rotieren im Uhrzeigersinn einwärts, so dass nun alle Fortsätze gemeinsam ähnlich einer Irisblende das Deckelsegment bilden, ihre hydrophoben Flächen gegenseitig verdecken und zum hydrophilen Inneren der Kavität beitragen (Ditzel et al., 1998, Nitsch et al., 1998).

Die Kristallstrukturen der separat exprimierten apikalen Domäne der α-Untereinheit des Thermosoms (αADT) aus *Thermoplasma acidophilum* (Klumpp et al., 1997) sowie der geschlossenen Form des Gesamtkomplexes (Ditzel et al., 1998) wiesen in den Fortsatzregionen, nicht aber in den globulären Kernbereichen strukturelle Diskrepanzen auf. Ihm Rahmen dieser Arbeit wurde zusätzlich die Röntgenstruktur der β-apikalen Domäne (βADT) aufgeklärt und mit den bereits vorhandenen Strukturen verglichen. Dabei wurde deutlich, dass besonders die N-terminale Fortsatzhälfte trotz hoher Sequenzhomologie in jeder der Kristallstrukturen unterschiedliche Sekundärstruktur-elemente aufwies und im Fall der αADT sogar die Merkmale einer Chamäleonsequenz erfüllte.

[1] CCT für Chaperonin Containing TCP-1, TRiC für TCP-1 Ring Complex.

Der starke Einfluss der Kristallkontakte in allen Strukturen gab Anlass zur weiteren Untersuchung der Domänen mittels NMR-Spektroskopie. Während sich die Kernregionen als relativ rigide Strukturen herausstellten, zeigten die N-terminalen Fortsatzhälften der Domänen in Lösung im Unterschied zu den Röntgenstrukturen keinerlei Tendenz zu distinkten Sekundärstrukturelementen, dagegen hohe Flexibilität sowie eine ausgeprägte Neigung zu ungeordneter Konformation.
Schon aufgrund ihrer Hydrophobizität und ihrer Konserviertheit innerhalb der Gruppe II Chaperonine waren die Fortsatzregionen für eine Beteiligung an der Substratbindung zusätzlich zur Verschlussfunktion für die Faltungskammer vorgeschlagen worden (Klumpp et al., 1997). Die Ergebnisse der strukturellen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit deuteten ebenfalls auf eine derartige Möglichkeit hin.
Zusätzliche Sequenzanalysen zeigten einige hochkonservierte Cluster auf, die aufgrund ihrer Lage in einem hypothetischen, offenen Zustand des Thermosoms und ihrer hohen Konserviertheit in allen Gruppe II Chaperoninen prinzipiell für die Erkennung von Substraten geeignet wären.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht bzw. sind in Vorbereitung:

Bosch, G.; Baumeister, W.; Essen, L.-O. .(2000).
Crystal structure of the β-apical domain of the thermosome reveals structural plasticity in the protrusion region. J. Mol. Biol. 301, 19-25

John, M.; Heller, M.; Coles, M.; Bosch, G.; Baumeister, W.; Kessler, H. (2003).
Structural disorder in the substrate binding domains of group II chaperonins,
in Vorbereitung

John, M.; Heller, M.; Coles, M.; Bosch, G.; Baumeister, W.; Kessler, H. (2003).
Backbone 1H, 15N and 13C resonance assignments of α-ADT and β-ADT,
Journal of Biomolecular NMR, in Vorbereitung.

2. Einleitung

2.1. Molekulare Chaperone

Molekulare Chaperone sind eine Gruppe von Proteinen welche nicht-native Zustände anderer Proteine binden und diese dabei unterstützen, ihre funktionell aktive Konformation zu erlangen (Ellis, 1987; Bukau & Horwich, 1998). Bis auf einige kleinere Polypeptide bilden die meisten neu translatierten Proteine zunächst kompakte, globuläre Zustände, sogenannte *molten globules*. Hier lagern sich hydrophobe Kernbereiche zu einer kompakten, aber noch flexiblen Struktur zusammen. Sekundärstrukturelemente, die mehr oder weniger dem späteren nativen Zustand ähneln, können bereits vorhanden sein. *Molten globules* weisen aber noch keine definierte Tertiärstruktur auf, exponieren somit noch hydrophobe Reste, welche im funktionell aktiven Faltungszustand von der Umgebung weitgehend abgeschirmt wären, und neigen daher zur Aggregation.
Molekulare Chaperone assoziieren reversibel mit solchen Faltungsintermediaten und verhindern so deren unerwünschte Bindungen an andere Proteine, was in der makromolekular dicht konzentrierten Umgebung des Zytosols von großer Wichtigkeit ist. Dabei wirken sie nicht direkt als Katalysatoren der Faltungsreaktion, vielmehr erhöhen sie die Anzahl derjenigen Moleküle, welche sich in einem produktiven Faltungszustand befinden. Die Dissoziation von ihren Substraten erfolgt häufig durch einen ATP-abhängigen Konformationswechsel des Chaperones und unter Mitwirkung von Ko-Chaperonen. Sie spielen bei vielen biologischen Vorgängen eine bedeutende Rolle, beispielsweise bei der Faltung, der Degradation oder dem Transport von Proteinen (Bukau & Horwich, 1998; Bukau, B. et al., 1999).

2.2. Die Rolle von HSP60- und HSP70–Familien bei der Proteinfaltung in der Zelle

Die beiden am besten erforschten Familien, die HSP60 und HSP70 – Proteine (HSP für *Heat Shock Protein*), sind in Pro- und Eukaryoten weit verbreitet und wirken in einigen wichtigen zellulären Prozessen zusammen (Netzer & Hartl, 1998).

Die 70 kDa großen, monomeren HSP70-Moleküle unterstützen die Chance eines Polypeptids, einen nativen Faltungszustand zu erreichen, indem sie unter ATP-Verbrauch wiederholt kurze, hydrophobe, gestreckte Segmente in Faltungszwischenstufen binden und wieder freisetzen.
Mitglieder der HSP60 - Familie, die in der Regel als Chaperonine bezeichnet werden, haben in der Zelle einen besonderen Vorteil: Sie bestehen aus zylindrischen Doppelring-Komplexen mit Rücken an Rücken ausgerichteten, etwa 60 kDa großen Untereinheiten, welche eine hydrophile Kavität einschließen, in der die Faltung der Substrate ATP-abhängig und abgeschirmt von der dicht konzentrierten Umgebung des Zytosols stattfindet.

Chaperonine und HSP70-Moleküle sind sowohl an Bewältigung von Stress-Situationen (beispielweise infolge von Hitze) als auch an der Bindung und Faltung neu translatierter Polypeptide unter normalen Wachstumsbedingungen beteiligt.

Stress-denaturierte Zwischenzustände zytosolischer Proteine sind freier Partitionierung zwischen einem nativen Faltungszustand, Aggregation, (wiederholtem) Binden an ein Chaperon oder Degradation durch eine Protease unterworfen (Abb. 2.1.b). Die Bindung dieser Zwischenstufen durch molekulare Chaperone verringert die Konzentration an freien Faltungsintermediaten und erhöht die Ausbeute an korrekt gefaltetem Protein (Buchberger et al., 1996; Farr et al., 1997; Fenton und Horwich, 1997).

Bei der Faltung neu synthetisierter Proteine scheinen HSP70 Proteine und Chaperonine dagegen zusammenzuarbeiten (Netzer & Hartl, 1996; Hartl, 1996; Ellis 1999). Um zu verhindern, dass naszierende Peptidketten Opfer unproduktiver und irreversibler Faltungsvorgänge werden, steht eine Kaskade von molekularen Chaperonen bereit, um sicherzustellen, dass die richtigen Faltungen zum richtigen Zeitpunkt ablaufen. Demnach würden kotranslational zunächst Ribosom-assoziierten Chaperone an naszierende Ketten binden. Anschließend könnten diejenigen Polypeptide, die ihre native Konformation nicht spontan erreichen können, von HSP70 und / oder anderen kleineren Chaperonen stabilisiert werden. Danach würden sie entweder durch die alleinige Unterstützung von HSP70 oder durch Transfer zu einem Chaperonin insgesamt so lange in einer abgeschirmten Umgebung gehalten, bis die Aggregationsgefahr vorüber wäre und das Substrat seinen biologisch aktiven Zustand erreichen könnte (Abb 2.1.a).

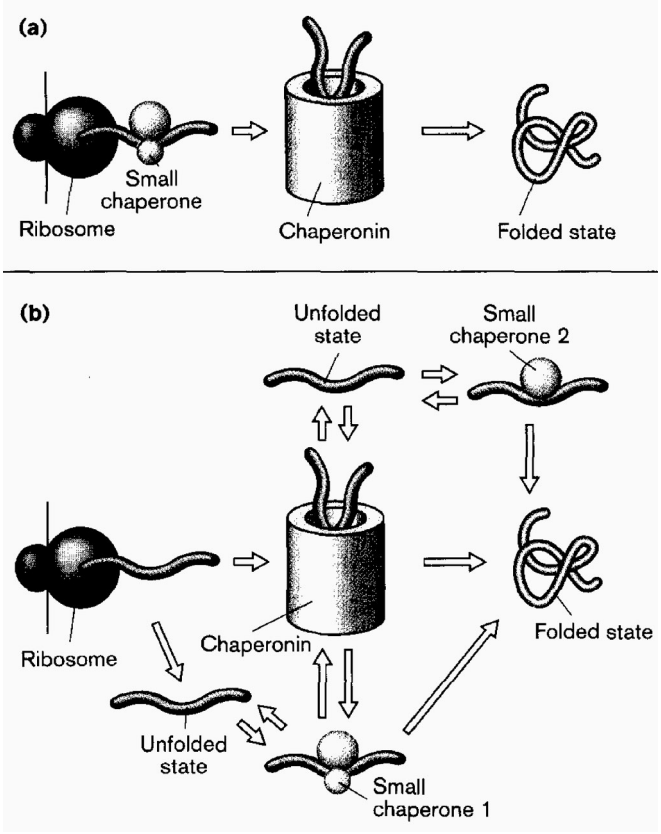


Abb. 2.1.: Schematischer Vergleich zwischen den Modellen für die Chaperon-unterstützte Faltung nicht-nativer Polypeptide im Zytosol (Ellis, 1999). Der Begriff „small chaperone“ bezeichnet HSP70 –Moleküle mit ihren Ko-Chaperonen sowie deren Homologe.

2.3. Die Chaperonine

Chaperonine lassen sich in zwei entfernt verwandte Familien (etwa 40 % Sequenzidentität) einteilen (Willison & Kubota, 1994):

Gruppe I Chaperonine, deren Prototyp GroEL ist, kommen in Bakterien und eukaryotischen Zellorganellen bakteriellen Ursprungs (Mitochondrien und Chloroplasten) vor und setzen sich aus sieben gleichen Untereinheiten pro Ring zusammen (Fenton & Horwich, 1997).

Dagegen sind die archaealen Vertreter der Gruppe II Chaperonine, die Thermosomen, je nach Spezies entweder Homo- oder Heterooligomere aus acht oder neun Untereinheiten pro Ring und haben ein bis drei verschiedene Typen von Untereinheiten, die alternierend angeordnet sind.

Den komplexesten Aufbau findet man bei den eukaryotischen Gruppe II Chaperoninen, die in jedem Ring acht verschiedene Untereinheiten in genau festgelegter Reihenfolge tragen und mit CCT [3] oder TRiC (für Chaperonin Containing TCP-1 bzw. TCP-1 Ring Complex) bezeichnet werden (Willison & Horwich, 1996; Liou & Willison, 1997; Gutsche et al., 1999).

Sequenzvergleiche von Gruppe I und Gruppe II Chaperoninen ließen vermuten, dass allen Chaperoninen die Einteilung der Untereinheiten gemein ist, welche schon in der Kristallstruktur von GroEL (Braig et al., 1994) gezeigt wurde: Eine äquatoriale oder ATPase – Domäne, eine apikale oder substratbindende Domäne und eine intermediäre Domäne, welche als flexible Verbindung zwischen den beiden anderen fungiert (Waldmann et al., 1995a). Die Kristallstrukturen des Thermosoms aus *Thermoplasma acidophilum* sowie der isolierten apikalen Domäne seiner α-Untereinheit (Ditzel et al., 1998 bzw. Klumpp et al., 1997) bestätigten diese Einteilung trotz der begrenzten Sequenzidentität zwischen beiden Gruppen (Kim et al., 1994). Außerdem zeigte sich eine strukturelle Besonderheit der thermosomalen apikalen Domänen, die im entsprechenden Bereich von GroEL fehlte: Ein 25 Å langes, helikales Fortsatzmotiv ragte aus dem globulären Kernbereich der apikalen Domänen hervor (Abb 2.2), das in allen Gruppe II, aber nicht in Gruppe I Chaperoninen vorkommt, wie Klumpp et al. (1997) in einer Sequenzalignierung zeigen konnten.

Die bis dato vorhandenen, hochaufgelösten Strukturinformationen für Gruppe II Chaperonine beschränkten sich auf die Röntgenstruktur des Thermosoms, welche den Komplex in einer geschlossenen Konformation zeigte (Ditzel et al., 1998), sowie ein Modell eines offenen Zustandes, das auf einer kryo-elektronentomographischen 3D-Rekonstruktion von gekippten Seitenansichten rekombinanter α-only Thermosomen beruhte (Nitsch et al., 1998) (Abb.2.2).

Durch einen Vergleich der beiden Zustände des Thermosoms wurde deutlich, dass die helikalen Fortsätze den Zylinderrand in der offenen Konformation mit Blick auf die Kavität säumen, während sie den Zugang zum Kompartiment in der geschlossenen Form verdecken. Dazu drehen sich die apikalen Domänen um 70 ° im Uhrzeigersinn hin zur Zentralachse des Komplexes und bilden mit Teilen der Fortsatzsegmente benachbarter Untereinheiten gemeinsam ein zirkuläres β-Faltblatt (Ditzel et al., 1998; Nitsch et al., 1998).

[3] Im Folgenden wird der Begriff CCT weiterverwendet.

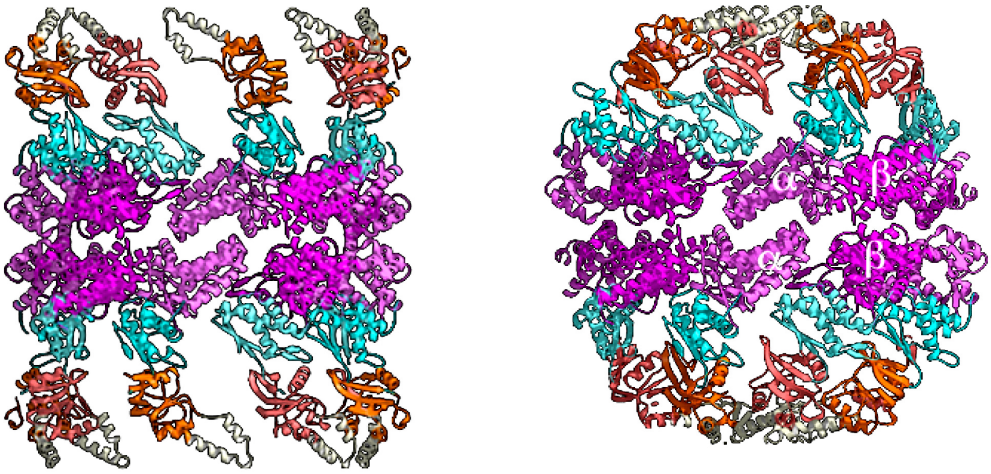


Abb. 2.2. Domänenanordnung und beobachtete Konformationen des Thermosoms aus *Thermoplasma acidophilum*. Die Untereinheiten sind gemäß der Einteilung in äquatoriale (pink), intermediäre (blau) und apikale (orange) Domänen gekennzeichnet. Die Fortsatzsegmente sind in Grau gezeigt. Links: Modell des offenen Zustandes nach Einpassung in die KryoEM-3D-Rekonstruktion rekombinanter α-only Thermosomen (Nitsch et al., 1998). Rechts: Kristallstruktur des geschlossenen Thermosoms (Ditzel et al., 1998). (Die Abbildungen wurden aus Gutsche et al., (1999) adaptiert).

Im Gegensatz zum Prototyp der Gruppe I Chaperonine, GroEL, das seine Faltungskammer mit Hilfe des heptameren Ko-Chaperonins GroES abschließt (Xu et al., 1997), wurde in Archaeen und Eukaryoten bisher kein derartiges Ko-Chaperonin gefunden. Durch den Vergleich der beiden Zustände des Thermosoms wurde nun für die Fortsätze der Gruppe II Chaperonine eine Kontrollfunktion für Öffnung und Schließung der Kavität angenommen (Klumpp et al., 1997; Ditzel et al., 1998).

In Mutagenese-Experimenten sowie mehreren kristallographischen und NMR-spektroskopischen Studien wurde die Substratbindungsregion für die GroEL - apikale Domäne auf eine exponierte, hydrophobe Tasche zwischen zwei Helices festgelegt (Fenton et al., 1994; Braig et al., 1994; Buckle et al., 1997). Zudem schien GroEL mit nicht nativen Proteinen hauptsächlich über hydrophobe Reste zu interagieren (Fenton & Horwich, 1997). Im Vergleich der Oberflächenprofile der apikalen Domänen von GroEL und Thermosom fiel jedoch auf, dass der Bereich, welcher der GroEL - Bindungstasche entsprach, in der thermosomalen Substratbindungsdomäne hydrophil war. Dagegen wies das

Fortsatzsegment eine ausgeprägt große, hydrophobe Fläche auf, deren beteiligte Reste innerhalb der Gruppe II Chaperonine stark konserviert waren (Klumpp et al., 1997). Deshalb wurden die Fortsätze, zusätzlich zur Schließung der Kavität, als mögliche Substratbindungsregionen vorgeschlagen.

Der Mechanismus der Substratbindung ist für GroEL bereits weitgehend bekannt, wenn auch noch nicht in allen Details (Fenton & Horwich, 1997; Bukau & Horwich, 1998). GroEL ist in seiner offenen Form in der Lage, ein breites Spektrum an Proteinen hauptsächlich über hydrophobe Interaktionen zu binden. Nach einer ATP-abhängigen, quarternären Konformationsänderung und GroES-Bindung ist das Innere der *cis*-Kammer fast durchgehend hydrophil und das Substrat ist gegenüber den hohen makromolekularen Konzentrationen im Zytosol abgeschlossen. Nach ATP-Hydrolyse im *cis*- sowie ATP- und GroES-Bindung an den *trans*-Ring wird das Substrat wieder freigesetzt.
Sogar isolierte Substratbindungsdomänen besitzen noch Chaperon-Eigenschaften. So konnte die Bindung und Rückfaltung kleinerer, denaturierter Modellproteine an einer separat exprimierten GroEL-apikalen Domäne („Minichaperone“) *in vitro* gezeigt werden (Zahn et al., 1996; Altamirano et al., 1997). Chatellier und Kollegen konnten 1998 in einer genetischen Studie zeigen, dass die Expression solcher Minichaperone das Wachstum zweier Temperatur-sensitiver Bakterienstämme förderte. Jedoch können apikale Domänen natürlich nur einen Teil der Aufgaben erfüllen, für die sonst das holo-Chaperonin notwendig wäre (Wang et al., 1998; Weber et al., 1998)

Gruppe II Chaperonine sind besonders im Hinblick auf ihre Substratinteraktionen weniger weit erforscht. Bislang konnten für die archaealen Thermosomen keinerlei *in vivo* Substrate gefunden werden. *In vitro* Bindungsstudien mit Modellsubstraten zeigten zwar die Fähigkeit einiger Thermosomen, denaturierte Modellproteine zu binden, deren Aggregation oder Spontanrückfaltung zu inhibieren (Trent et al., 1991; Quaite-Randall, 1995; Waldmann et al., 1995b), echte Chaperonin-unterstützte Rückfaltung konnte aber nur selten beobachtet werden, was eventuell auf unphysiologische Versuchstemperaturen zurückzuführen war. Lediglich für das *Sulfolobus shibatae* – Thermosom TF55 konnte die korrekte Faltung mehrerer, auch thermophiler Substrate in einer ATP-abhängigen Reaktion nachgewiesen werden (Guagliardi et al., 1994 und 1995).
Im Fall des eukaryotischen Chaperonins CCT kristallisierten sich schon früh Aktin und Tubulin als natürliche Substrate heraus (Frydman et al., 1992; Gao et al., 1992;

Sternlicht et al., 1993; Yaffe et al., 1992). Obwohl auch CCT *in vitro* eine Reihe von Modellproteinen bindet, konnten (außer Gα-Transducin, Farr et al., 1997) lange keine weiteren *in vivo* Substrate mehr gefunden werden. Mögliche Gründe hierfür könnte einerseits die mengenmäßige Vorherrschaft der beiden Zytoskelettproteine Aktin und Tubulin in den jeweiligen Testverfahren gewesen sein, wodurch andere, eventuell weniger stark exprimierte Substrate übersehen worden sein könnten. Andererseits fehlte in allen Tests bis *dato* das erst kürzlich entdeckte, hexamere Chaperonin Prefoldin bzw. Gim (für *Genes involved in microtubule biogenesis*), welches bei der Suche in γ-Tubulin defekten Hefestämmen mit synthetischer Lethalität bei Gendisruption identifiziert wurde (Geissler et al., 1998). Prefoldin bindet ungefaltetes Aktin und Tubulin und transferiert sie an CCT zur weiteren Faltung (Vainberg et al., 1998).

2.4. Zielsetzung

Wie die oben genannten Experimente mit isolierten Substratbindungsdomänen von GroEL gezeigt haben, können auch derart reduktive Ansätze wertvolle Einblicke in die Funktionsweise des gesamten Komplexes bieten. Die Kristallstruktur der α-apikalen Domäne und der geschlossenen Form des Thermosoms (Klumpp et al., 1997; Ditzel et al., 1998), hatte bereits wichtige Erkenntnisse zum möglichen Substratbindungsmodus sowie zu mechanistischen Fragestellungen bei Gruppe II Chaperoninen geliefert. Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun diese Einblicke mit Hilfe von hochauflösenden Untersuchungsmethoden an beiden thermosomalen apikalen Domänen vertieft werden, um zusätzliche Informationen über die Lokalisation der Substratbindungsregion zu bekommen. Anhand eines Vergleichs der Strukturinformationen sollten auch Rückschlüsse über die möglichen Gründe für die Heterooligomerisierung bei vielen archaealen Thermosomen und CCT gewonnen werden.

3. Material und Methoden

3.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Soweit nicht anders angegeben wurden Chemikalien für Puffer von *Sigma-Aldrich* (*St. Louis, MI, USA*) oder *Merck* (*Darmstadt, BRD*) in höchster Reinheit bezogen. Sämtliche Puffer wurden mit MilliQ-Wasser (*Millipore, Eschborn, BRD*) hergestellt und entweder sterilfiltriert oder autoklaviert.

Amersham Biosciences (Little Chalfont, UK): Ready-to-go T4 DNA-Ligation-Kit, Superose 12 PC 3.2 – Säule; Säulenmaterialien: Superdex75 prep grade, Sephadex G25, Gel filtration Calibration Kit;
Applied Biosystems (Foster City, CA, USA): ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit;
Bio-Rad (Hercules, CA, USA): Bio-Rad Protein Assay; Macroprep™-HighQ-Support;
Difco (Detroit, MI, USA): Bacto-Trypton, Bacto-Hefeextrakt, Bacto-Agar;
Eppendorf (Hamburg, BRD): Reaktionsgefäße;
FMC (Philadelphia, PA, USA): Agarose SeaKem LE;
Greiner Labortechnik (Frickenhausen, BRD): Petrischalen, Zentrifugenröhrchen;
Hampton Research (Laguna Niguel, CA, USA): Kristallisationsplatten (Typ VDX), Deckgläschen, Kristallisationspuffer CrystalScreen™ und CrystalScreen™ II;
Invitrogen (Karlsruhe, BRD): DNA- und Protein-Standards; Serva Blue G 250;
Martek Biosciences (Columbia, MD, USA): Martek9N- und Martek9CN-Medium;
Merck (Darmstadt, BRD): Benzonase, EDTA, NaN_3, APS, TEMED, Glucose, Schwermetallverbindungen;
Millipore (Eschborn, BRD): Sterilfilter (0.22 und 0.45 µm Porengröße); Immobilon-P Transfermembranen
National Diagnostics (Altanta, GA, USA): Protogel;
New England Biolabs (Beverly, MA, USA): Restriktionsenzyme und Puffer;
Novagen (Madison, WI, USA): pET22b-Vektor;

Pall Life Sciences (Ann Arbor, MI, USA): Nanosep®-, Microsep®- und Macrosep®-Konzentratoren;
Pierce (Rockford, IL, USA): Slide-A-Lyzer Dialysecassetten, BSA-Standards;
Qiagen (Valencia, CA, USA; Hilden, BRD): QiaQuick PCR Purification Kit, Qiagen Plasmid Mini Kit, NiNTA-Agarose;
Roche Diagnostics / Boehringer Mannheim (Basel, Schweiz): Protease-Inhibitor-Cocktail Complete™ mini (ohne EDTA);
Schleicher und Schuell (Dassel, BRD): Optitran Nitrozellulose Membranen;
Sigma-Aldrich / Riedl-de-Haën / Fluka (St. Louis, MI, USA): Ampicillin, Chloramphenicol, IPTG, BSA, Lysozym, NTB, BCIP, SDS, PEG20000, Dioxan, Schwermetallverbindungen, Vitamine (Riboflavin, Niacinamid, Thiamin, Biotin, Folsäure), $^{15}NH_4Cl$, Anti-Kaninchen-IgG (gekoppelt mit alkalischer Phosphatase), Eichprotein Carboanhydrase;
Stratagene (La Jolla, CA, USA): *E. coli* Stämme XL1-Blue und BL21-CodonPlus™(DE3)-RIL, Pfuturbo® DNA Polymerase;
United States Biochemicals (Cleveland, OH, USA): Tricin, Bicin;

3.2. Gentechnische Methoden

3.2.1. Stämme, ihre Kultivierung und Transformation

Stamm zur Vermehrung und Isolierung von Plasmid-DNA:
Epicurian Coli® XL1 Blue *{recAI endAI gyrA96, thi-I hsdRI7 supE44 relAI lac [F⁻proAB lacI^{q}ZΔMI5 TnI0(Tet^R)]}* (*Stratagene, La Jolla, CA, USA*)

Stamm zur Protein-Expression:
BL21-CodonPlus™(DE3)-RIL *{E. coli B F-ompT hsdS (rB-mB-) dem + Tet^R gal λ (DE3) endA hte [argU ileY leuW cam^R]}* (*Stratagene, La Jolla, CA, USA*)

Medien: (Sambrook et al., 1989**):**

LB- (Luria-Bertani) – Medium, 1l	10 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl
SOC-Medium, 1l	5 g Hefeextrakt, 20 g Bactotrypton, 0.5 g NaCl, 25 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 20 mM Glucose, pH 7.0

Für Agarplatten wurden dem jeweiligen Medium 15 g/l Bactoagar zugesetzt.

Zur Herstellung von ^{15}N- bzw. $^{15}N^{13}C$-markiertem Protein wurden die Anzuchtmedien Martek-9N und Martek-9CN der Firma *Martek Biosciences* (*Columbia, MD, USA*) verwendet.

Herstellung chemisch kompetenter Zellen:

Um transformationsfähige Zellen zu erhalten wurde eine Einzelkolonie der oben genannten Bakterienstämme von einer 20 Stunden zuvor ausgestrichenen LB-Agarplatte zum Animpfen einer 5 ml Übernachtkultur in LB-Medium verwendet [3]. Von dieser wurde 1 ml in eine 300 ml LB-Flüssigkultur gegeben, welche in einem *Cellstar*-Schüttelinkubator der Firma *Nunc GmbH* (*Wiesbaden, BRD*) bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer Zelldichte von OD_{600} ~ 0.5 inkubiert wurde. Die Kultur wurde 10 min auf Eis gekühlt und anschließend bei 4°C und 2000 x g für 10 min in einem JA-10 Rotor der Firma *Beckmann* (*Fullerton, CA, USA*) geerntet. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellpellets vorsichtig in 40 ml sterilem, eisgekühltem TFB1-Puffer resuspendiert, 90 min auf Eis inkubiert und anschließend wie zuvor zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 4 ml sterilem, eisgekühltem TFB2-Puffer aufgenommen, nach Aliquotieren zu je 80 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

TFB1-Puffer	100 mM RbCl, 50 mM $MnCl_2$, 30 mM KAcetat, 10 mM $CaCl_2$, 15 % Glyzerin, pH 5.8
TFB2-Puffer	10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM $CaCl_2$, 15 % Glyzerin, pH 8,0

[3] Bei der Herstellung kompetenter Zellen des Expressionsstammes BL21-CodonPlus™(DE3)-RIL wurde sämtlichen Medien 34 µg/ml Chloramphenicol (Endkonzentration) zugesetzt.

Transformation chemisch kompetenter Zellen:

Zur Transformation von Plasmiden in die jeweiligen Bakterienstämme wurden ca. 0.5 µg DNA aus Ligationsansätzen und 0.2 µg DNA von gereinigten Plasmiden mit 80 µl kompetenten Zellen gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde für 90 s bei 42 °C im Wasserbad und 2 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit 1 ml vorgewärmtem SOC-Medium versetzt und 60 min bei 37 °C und 200 rpm in einem Schüttelinkubator regeneriert. Nach Zentrifugation der Zellen für 60 s bei 4000 x g wurde der Überstand bis auf 100 µl entfernt und die Zellen im verbleibenden Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum als Selektionsmarker ausgestrichen und 10-16 Stunden bei 37 °C inkubiert, bis Kolonien sichtbar wurden. Aus willkürlich ausgewählten Einzelkolonien wurden jeweils 3 ml LB-Flüssigkulturen mit den erforderlichen Antibiotika angeimpft und für ca. 15 Stunden unter Schütteln herangezogen. Anschließend wurde durch Plasmid Mini-Präparation (*Qiagen*) und Restriktionsverdau auf positive Klone getestet. Diese wurden wie oben geschildert neu transformiert, herangezogen und als Glyzerinkulturen (20 %) nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei –80 °C gelagert.

3.2.2. Klonierung der Expressionsplasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die codierenden Bereiche für die α-apikale Domäne und die β-apikale Domäne des Thermosoms (αADT bzw. βADT[4]) (Waldmann et al., 1995a) aus dem ursprünglichen Vektor pRSET6a in den Vektor pET22b(+) der Firma *Novagen* (T7 *lac* Promoter, pBR322 origin, Ampicillin-Resistenz) umkloniert, da die Domänen während der Expression bereits vor der Induktion in beträchtlichem Maße produziert wurden. Der Zusatz von IPTG ergab kaum mehr nennenswerte Erhöhung der Expressionsrate.

[4] Die apikalen Domänen werden im Folgenden mit αADT und βADT bezeichnet.

Die entsprechenden Gensegmente aus den vorhandenen Template-Plasmiden αAD/pRSET6a (Klumpp et al., 1997) und $\beta AD_{C\text{-}S}$/pRSET6a (siehe Diplomarbeit G. Bosch (geb. Ilg), 1998) wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und geeigneten Oligonukleotid-Primern (bezogen von Firma *Metabion, Martinsried, BRD*) in einem GeneAmp® PCR System 2400 Thermal Cycler (*Perkin Elmer Lifesciences, Boston, MA, USA*) amplifiziert.

Primer für die Amplifikation der α-apikalen Domäne α–ADT
(vgl. Klumpp et al., 1997):

Forward: 5' ATAAGCCATATGAGCGGTATCGTCATAGACAAGG 3'
↳*Schnittstelle für Nde I*

Schnittstelle für EcoR I ↰ ↱ *$His_{(6)}$Tag*
Revers: 5' AAATAAGAATTCTCAGTGATGGTGATGGTGATGATTCTTGCATCC 3'

Primer für die Amplifikation der β-apikalen Domäne β–ADT mit C-terminalem $His_{(6)}$Tag und Punktmutation an Position B364 [5] (vgl. Diplomarbeit G. Bosch, 1998)

Forward: 5' AATAAGCCATATGAATGGTATAATCGTTGACAAGG 3'
↳*Schnittstelle für Nde I*

Schnittstelle für EcoR I ↰ ↱ *$His_{(6)}$Tag* ↱ *Cys B364 Ser*
Revers: 5' AAATAAGAATTCTCAGTGATGGTGATGGTGATGATTCTTGGA
GCCCGTCACGAACG 3'

[5] Diese Angabe bezieht sich auf die entsprechende Position in der Primärsequenz der vollständigen β-Untereinheit des Thermosoms (Waldmann, 1995a).

Für die PCR-Reaktionen wurde folgendes Protokoll verwendet:

Reaktionsansatz (50 µl):

5 µl Pfuturbo®-Reaktionspuffer (10x)
50 ng ds Template
25 pmol Forward-Primer
25 pmol Reverse-Primer
dNTP Lösung (250 nM/dNTP)
2.5 U Pfuturbo® DNA Polymerase
MilliQ ad 50 µl

Programm-Schema:

1) Denaturierung des Template-Plasmids bei 95 °C für 4 min.
2) 25 Zyklen mit: 1 min 95 °C, 90 s 55 °C, 2 min 72 °C.
3) 20 min Inkubation bei 72 °C zur Vervollständigung der Nukleotidketten.

Anschließend wurden PCR-Produkte und der Vektor pET22b mit den oben angegebenen Restriktionsenzymen in 20 µl Ansätzen gespalten, wobei pro µg DNA 3-5 U Enzym eingesetzt und bei 37 °C 1-2 Stunden inkubiert wurden. Die Ligation erfolgte mit Hilfe des Ready-to-go T4 DNA-Ligation-Kit (*Amersham Biosciences*) nach Angaben des Herstellers. Auf eine Dephosphorylierung der DNA-Fragmente wurde verzichtet. Die Menge an eingesetztem Vektor betrug 20-50 ng, das Insert wurde in fünffachem molarem Überschuss hinzugefügt.

3.2.3. DNA-analytische Methoden

DNA-Konzentrationen wurden durch Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt (1 OD_{260} ~ 50 µg/ml für doppelsträngige DNA und 40 µg/ml für einzelsträngige DNA).

Agarose-Gelelektrophorese wurde in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, pH 8.0, 80 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8.0) mit 1.5 %igen horizontalen Flachbett-Agarosegelen bei

80 mV konstanter Spannung durchgeführt. Die DNA-Banden wurden nach 15 minütigem Anfärben in 0.4 %iger Ethidiumbromid-Lösung unter UV-Licht identifiziert und ihre Fragmentgrößen mit DNA-Standardmarkern verglichen.

Plasmidisolierung: Plasmide wurden aus transformierten DH5*a*-Zellkulturen durch Plasmid-Präparation anhand des Qiagen-Plasmid-Mini-Kits isoliert und in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0) bei –20 °C aufbewahrt.

DNA-Sequenzierung: Für die Sequenzierungsreaktionen zur Kontrolle der Plasmidkonstrukte wurde der ABI Prism™ Big Dye Terminator Kit (Firma *Applied Biosystems*) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Auftrennung und Detektion der DNA-Fragmente wurde von Herrn Marius Boicu (MPI für Biochemie, Martinsried) mit einem 337A DNA Sequencer (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) durchgeführt.

3.3. Proteinbiochemische Methoden

3.3.1. Expression der apikalen Domänen des Thermosoms

Expression von unmarkiertem Protein:

Für die Expression von unmarkiertem Protein wurden Epicurian coli® Zellen vom Typ BL21-CodonPlus™(DE3)-RIL (*Stratagene*), die α- bzw. die βADT von einem pET22b(+)-Vektor (*Novagen*) exprimierten, aus Glyzerinstocks in 50 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol inokuliert und bei 37 °C und 210 rpm 15 – 20 Stunden lang in einem Schüttelinkubator angezogen. Diese Vorkultur wurde 1:60 in LB-Medium mit Ampicillin und Chloramphenicol überimpft und bei 30 °C und 210 rpm bis zu einer OD_{600} von 0.7 inkubiert. Die Proteinproduktion wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kultur für 4 Stunden weiter inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000 x g und 4 °C in einem JA10 Rotor der Firma Beckmann geerntet und die Zellpellets entweder nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei –80 °C gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

Expression von einfach (^{15}N) und doppelt ($^{15}N^{13}C$) markiertem Protein:

Zur Herstellung markierter Proben wurde zunächst eine 25 ml LB-Vorkultur wie oben geschildert über Nacht herangezogen. Die Zellen wurden bei 4 °C und 5000 x g in einem Beckmann JA10 Rotor geerntet. Nach sorgfältigem Abdekantieren des Überstandes wurden die Zellen einmal in Martek 9–Medium gewaschen, abzentrifugiert und in 50 ml modifiziertem Martek9–Medium (Zusammensetzung siehe unten) der gewünschten Markierung resuspendiert. Dieses Nährmedium war zuvor mit Vitaminlösung angereichert und mit zusätzlichem 10 x M9-Puffer (zur Stabilisierung des pH-Wertes) sowie 100 µg / ml Ampicillin und 34 µg /ml Chloramphenicol versetzt worden. Nachdem diese zweite Vorkultur unter Schütteln bei 210 rpm und 30 °C auf OD_{600} ~ 0.7 herangewachsen war, wurde sie in die Hauptkultur überimpft (2 l Martek 9-Medium der gewünschten Markierung, verteilt auf vier Erlenmeyerkolben zu je 2 l). Auch hier waren zuvor Antibiotika, Vitaminlösung und zusätzlicher Puffer zugegeben worden. Nach 6-7 Stunden Wachstum bei 210 rpm und 30 °C (OD_{600} ~ 0.8 – 0.9) wurde die Kultur mit 1 mM IPTG induziert und 8 Stunden bei gleichen Bedingungen weiterkultiviert. Die Zellen wurden schließlich wie oben geschildert geerntet und entweder nach Schockfrieren gelagert oder sofort verwendet.

1 l Martek 9-Medium (modifiziert) (je nach Bedarf Martek9 N oder Martek9-CN)	985 ml Martek-9-Medium, 2 ml Vitamin-Lösung, 10 ml 10 x M9-Medium (^{15}N), pH ad 7.2
1 l 10 x M9 Puffer (^{15}N-markiert)	10 g $^{15}NH_4Cl$, 30 g KH_2PO_4, 68 g Na_2HPO_4 (wasserfrei), ad 1 l mit Milli Q
Vitaminlösung	Je 1 mg / ml: Riboflavin, Niacinamid, Thiamin, Biotin, Folsäure

3.3.2. Proteinreinigung und Probenpräparation der apikalen Domänen des Thermosoms [6]

Herstellung von Proteinextrakten und Reinigung über Ni-NTA-Agarose (*Qiagen*):

Hierzu wurden die Zellpellets im fünffachen Volumen an Lysepuffer resuspendiert und nach Zugabe von Lysozym (1 mg/ml Resuspendat), 4 mM $MgCl_2$, Benzonase (1 U/ml Resuspendat) und Protease-Inhibitor-Cocktail Complete™ mini ohne EDTA (nach Angaben des Herstellers) 30 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte schließlich mit Hilfe eines EmulsiFlex-C5 Zell-Disruptors der Firma *Avestin Inc.* (*Ottawa, CA*). Die unlöslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (4 °C, 25000 x g, JA 25.5 Rotor der Firma Beckmann) abgetrennt und der nun klare Proteinextrakt für 90 min mit 6 ml 50 % Ni-NTA-Matrix, die zuvor in Lysepuffer äquilibriert worden war, bei 4 °C vorsichtig gerührt. Das Auswaschen der nicht gebundenen Proteine mit Lysepuffer sowie der schwach bindenden Proteine mit Waschpuffer erfolgte in einer Säule bei 4 °C gemäß den Angaben des Herstellers. Histidin-Fusionsproteine wurden mit einem linearen Imidazolgradienten von 10-500 mM in 40 ml Waschpuffer eluiert und in Fraktionen von 0.5 ml gesammelt. Nach Analyse über SDS-PAGE wurden die Fraktionen, die die apikalen Domänen enthielten, vereinigt, anschließend mit Macrosep®-Konzentratoren der Firma *Pall Life Sciences* auf 15 ml einkonzentriert und über eine Sephadex G25 – Entsalzungssäule (Chromatographie-Material von *Amersham Lifesciences*) in 20 mM Tris/HCl pH 8.0 überführt.

Lysepuffer	50 mM NaPhosphat pH 8.0, 300 mM NaCl
Waschpuffer	50 mM NaPhosphat pH 6.0, 300 mM NaCl, 10 % Glyzerin
Elutionspuffer	0.5 M Imidazol in Waschpuffer

[6] Chromatographische Proteinreinigungsschritte wurden in der Regel an einer FPLC-Anlage oder einem Äkta-Purifier der Firma *Amersham Biosciences* (*Little Chalfont, UK*) durchgeführt.

Anionenaustausch-Chromatographie für αADT [7]:

Hierfür wurde das Eluat der Entsalzungssäule direkt auf eine 25 ml HighQ-Support-Säule (Chromatographie-Material von *Bio-Rad, Hercules, CA, USA*) aufgetragen und die bei diesem pH nicht an die Säulenmatrix bindende αADT mit 3 Säulenvolumina Startpuffer ausgewaschen. (Der theoretische pI von αADT liegt laut Berechnung anhand des Programms ProtParam (http:\\www.expasy.ch) bei 7.8).
Kontaminierende Proteine banden dagegen größtenteils an die Säule (Klumpp et al., 1997). Die Anionenaustauscher-Säule wurde anschließend durch Waschen mit 5 Säulenvolumina Elutionspuffer regeneriert und der Reinheitsgrad von αADT im Durchfluss per SDS-PAGE überprüft. Um Aggregatbildung zu verhindern, wurden der αADT 100 mM NaCl zugesetzt.

Startpuffer	20 mM Tris / HCl pH 8.0
Elutionspuffer	20 mM Tris / HCl, 1 M NaCl, pH 8.0

Anionenaustausch-Chromatographie für die βADT:

Auch für βADT wurde das Eluat der Entsalzungssäule auf eine 25 ml HighQ-Support-Säule (Chromatographie-Material von *Bio-Rad, Hercules, CA, USA*) aufgetragen, allerdings bindet die βADT, deren pI laut Berechnung mit ProtParam bei 6.3 liegt, bei pH 8 an die Säulenmatrix. Kontaminierende Proteine dagegen finden sich im Durchfluss oder werden durch das Anlegen eines Salzgradienten von 0 - 1 M NaCl im Elutionspuffer (Zusammensetzung siehe αADT) deutlich von der βADT abgetrennt. Fraktionen, die reine βADT enthielten, wurden nach SDS-PAGE-Analyse vereinigt.

[7] Die Prozedur von Klumpp et al. (1997) wurde modifiziert.

Gelfiltration für die apikalen Domänen:

Um Aggregate und Oligomere abzutrennen und gleichzeitig einen geeigneten Puffer für nachfolgende Experimente einzustellen, wurden die Domänen abschließend über eine Superdex 75 prep grade Säule (120 ml) gereinigt, nachdem die vereinigten Fraktionen aus dem Anionenaustauscher-Schritt anhand von Macrosep®-Konzentratoren auf 2 ml eingeengt worden waren. Die Reinheit der Proteinlösungen wurde anschließend nochmals mittels SDS-PAGE überprüft und die geeigneten Fraktionen mit Macrosep®- und Microsep®- Konzentratoren einkonzentriert. Die Ausbeuten betrugen (je nach Protein und Anzuchtmethode) 20-40 mg pro Liter Kultur.

Verwendungszweck der Domänen:	Laufpuffer für die Gelfiltration:	Eingestellte Proteinkonzentration nach Gelfiltration
αADT für NMR-Messungen	25 mM Natriumphosphat pH 5.5, 100 mM NaCl	22 mg /ml (1.2 mM)
βADT für NMR-Messungen	25 mM Natriumphosphat pH 7.8, 100 mM NaCl	22 mg/ml (1.2 mM)
βADT für Kristallisation	20 mM Tris / HCl pH 8.0	10 mg / ml (570 µM)

Die Domänen erwiesen sich bei längerer Lagerung bei 4 °C oder nach Schockfrieren und Lagerung bei –80 °C als instabil und neigten zur Aggregation. Deshalb mussten die Proben für jedes neue Kristallisations- bzw. NMR-Experiment frisch präpariert werden.

3.3.3. Proteinanalytische Methoden

Konzentrationsbestimmung von Proteinen:

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde routinemäßig kolorimetrisch nach der Methode von Bradford (1976) mit Farbreagenz der Firma *Bio-Rad* gegen eine Eichkurve mit BSA-Standards der Firma *Pierce* bestimmt. Die Extinktion wurde bei 595 nm an einem

Lambda 40-UV/VIS-Spektrometer der Firma *Perkin Elmer Lifesciences* (*Boston, MA, USA*) gemessen.
Zur exakteren Bestimmung von gereinigten Proteinlösungen wurde die Konzentration mit Hilfe der Absorption bei 280 nm und des theoretischen molaren Extinktionskoeffizienten [8] nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet.

Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure:

Die Anreicherung von verdünnten Proben vor Auftrag auf SDS-Gele erfolgte nach einer Methode von T. Hohl (persönliche Mitteilung von Dr. Martin Klumpp). Hierzu wurde die Probe zunächst mit dem entsprechenden Puffer auf 500 µl aufgefüllt, anschließend wurden 6.3 µl 1.5 % (w/v) Deoxycholat zugesetzt, gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 125 µl 50 % (w/v) Trichloressigsäure und erneutem Mischen wurde die Probe 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 30 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das nach Absaugen des Überstandes verbleibende Pellet wurde mit 500 µl Aceton, welches auf –20 °C gekühlt worden war, gewaschen und erneut abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet für 10 Minuten bei 40 °C getrocknet und in Probenpuffer für die SDS-Gelelektrophorese aufgenommen.

Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
(Schägger & von Jagow, 1987**)**

Proteinlösungen wurden mit konzentriertem Auftragspuffer versetzt und 5 min bei 85 °C erhitzt. Die Auftrennung erfolgte vertikal (Studier, 1973) in diskontinuierlichen Tricine-SDS-Polyacrylamid-Trenngelen (12 %) mit 4 %igen Sammelgelen bei konstanten 40 mA unter Kühlwasser-Kühlung (etwa 15 °C) für 90 min (Gelgröße: 10 x 10 x 0.1 cm).

[8] Die molaren Extinktionskoeffizienten wurden mit dem Programm ProtParam (http://www.expasy.ch) berechnet.

Probenpuffer (2x)	2 % (w/v) SDS, 40 mM DTT, 100 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 20 % (v/v) Glyzerin, 0.01 % Bromphenolblau
Gelpuffer (3x)	3 M Tris-Base, 0,3 % SDS, pH ad 8.9 mit HCl
Sammelgel (4 %) [9]	8.4 ml Protogel (37.5:1), 12.4 ml Gelpuffer, 29.2 ml MilliQ, 500 µl 10 % APS, 50 µl TEMED
Trenngel (12 %) [9]	36 ml Protogel (37.5:1), 30 ml Gelpuffer, 15 ml Glyzerin (87 %), 9 ml MilliQ, 500 µl 10 % APS, 60 µl TEMED
Kathodenpuffer	100 mM Tris-Base, 100 mM Tricin, 0.1 % (w/v) SDS
Anodenpuffer	200 mM Tris/HCl pH 8.9

Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese – Blue-Native (BN)- PAGE für wasserlösliche Proteine (nach Schägger & von Jagow, 1991 und 1994**)**

Die zu analysierenden Proteinlösungen werden bei dieser Form der nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese ohne Vorbehandlung mit konzentriertem Probenpuffer vermengt, welcher den negativ geladenen, hydrophoben und an Proteine bindenden Farbstoff Serva Blue G (Coomassie) enthält. Somit wandern - entgegen anderen Formen der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese - auch solche Proteine im elektrischen Feld, die bei dem eingestellten pH aufgrund ihres isoelektrischen Punktes kaum Nettoladung aufweisen. Proteine oder oligomere Formen bzw. Komplexe werden auf einem Gel analysiert, während der Kathodenpuffer den Coomassie-Farbstoff nachliefert. Bei der Auftrennung in nur einer Dimension ist das Ladungs-Masse-Verhältnis verschiedener Proteinkomplexe nicht konstant (im Gegensatz zur SDS-PAGE), somit ist auch keine Molekulargewichtsbestimmung möglich, allenfalls eine grobe Orientierung.
In dieser Arbeit wurden 6-16 % Gradientengele und 4 % Sammelgele (Gelgröße: 10 x 10 x 0.1 cm) in einer Vertikalapparatur (Studier, 1973) verwendet. Auf den Zusatz von Detergenzien wurde verzichtet, da hier nur gut lösliche, cytosolische Proteine analysiert wurden. Die Gesamtlaufzeit betrug bei konstanten 15 mA und 6 °C 15 Stunden, wobei die Spannung zunächst im 60-Minuten-Takt von 60 auf 250 V erhöht und schließlich über Nacht bei 100 V belassen wurde.

[9] Die Mengenangaben beziehen sich auf 8 Gele, die in einem Gelgießkasten gegossen wurden.

Probenpuffer (2x)	30 % Glyzerin, 100 mM Bistris/HCl pH 7.0
Gelpuffer (4x)	2 M Aminocapronsäure, 200 mM Bistris/HCl pH 7.0; ad pH 7.0
Sammelgel-Lösung (4 %) [10]	6.7 ml Protogel (37.5:1), 12.5 ml Gelpuffer, 30.4 ml MilliQ, 400 µl 10 % APS, 40 µl TEMED
Trenngel-Lösung 6 % [10]	6.8 ml Protogel (37.5:1), 8.5 ml Gelpuffer, 100 µl 10 % APS, 10 ml TEMED
Trenngel-Lösung 16 % [10]	19.2 ml Protogel (37.5:1), 9 ml Gelpuffer, 6.2 ml 87 % Glyzerin, 1.5 ml MilliQ, 60 µl 10 % APS, 6 ml TEMED
Kathodenpuffer	50 mM Tricin, 15 mM Bistris/HCl pH 7.0, 0.02 % Serva Blue G, pH 7.0
Anodenpuffer	50 mM Bistris, mit HCl ad pH 7.0

Anfärbung von Proteinbanden in Elektrophorese-Gelen:

Zur Anfärbung von Proteinbanden wurde die Methode von Neuhoff et al. (1988) angewandt, da ihre Nachweisgrenze bei etwa 1 ng Protein pro mm^2 Gel liegt und somit empfindlicher ist als die alkoholische Coomassie-Färbung. Nach der Elektrophorese wurden die Gele zunächst 20 min in 12 % TCA fixiert und 5 min in deionisiertem Wasser geschwenkt. Anschließend wurden die Gele entweder über Nacht bei Raumtemperatur oder 2–3 Stunden bei 50 °C in Färbelösung (80 ml 10 % $(NH_4)_2SO_4$ / 2 % H_3PO_4, 20 ml Methanol, 1 ml 5 % Serva Blue G Coomassie in MilliQ) eingelegt. Überschüssiger Farbstoff wurde mit deionisiertem Wasser ausgewaschen. Dann wurden die Gele über Nacht in MilliQ-Wasser eingelegt und zur Dokumentation und Aufbewahrung getrocknet.

[10] Die Mengenangaben beziehen sich auf 8 Gele, die in einem Gelgießkasten gegossen wurden.

Western Blot-Analyse:

Zum immunologischen Nachweis im Anschluss an eine elektrophoretische Trennung wurden die Proteine zunächst aus dem Polyacrylamidgel auf eine 0.2 µm Optitran Nitrocellulose-Membran (Firma *Schleicher und Schuell*) überführt. Hierzu wurden die Gele nach Abschluss einer denaturierenden oder nativen Elektrophorese für 5 min in Transfer-Puffer gelagert und danach im gleichen Puffer mit Hilfe einer Semi-Dry-Blot-Apparatur (Firma *Bio-Rad*) bei konstanter Stromstärke von 100 mA/25 cm^2 für 1 h geblottet.
Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulose-Membran kurz mit TBS-Puffer gewaschen und anschließend für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in Block-Puffer geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Nach Spülen mit TBST-Puffer (zweimal 5 min) wurde mit dem ersten Antikörper (aus Kaninchen gegen die α-Untereinheit des Thermosoms, Firma *Eurogentec* (*Seraing, Belgien*); affinitätsgereinigt von Dr. Izaskun Echabe) in TBST-Puffer (Verdünnung 1:2000) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörperlösung wurde verworfen und nicht gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit TBST-Puffer (je 10 min) entfernt. Danach wurde 30 min bei Raumtemperatur mit dem zweiten Antikörper inkubiert (Firma *Sigma*, gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase, 1:7500 in TBST verdünnt). Nach Abgießen der Antikörperlösung erfolgte einmaliges Waschen mit TBST und zweimaliges Waschen mit Substratpuffer. Antikörper-bindende Proteine wurden durch Zugabe von 60 µl NTB-Lösung und 33 µl BCIP-Lösung in 10 ml Substrat-Puffer detektiert. Die Färbereaktion wurde durch Zugabe von Stopplösung beendet.

Transfer-Puffer	39 mM Glycin, 48 mM Tris-Base, 0.037 % SDS, 20 % Methanol
TBS-Puffer	25 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.02 % NaN_3
TBST-Puffer	0.05 % Tween 20 in TBS-Puffer
Block-Lösung	2 % Gelatine, 0.05 % NaN_3 in TBST-Puffer
Substrat-Lösung	100 mM Tris/HCl, pH 9,0, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, pH 9.5
NTB-Lösung	50 mg Nitrotetrazolium-Chloridblau, 1 ml 70 % Dimethylformamid
BCIP-Lösung	50 mg 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat, 1 ml Dimethylformamid
Stopp-Lösung	20 mM Tris/HCl pH 8.0, 5 mM EDTA pH 8.0

Aminosäure-Sequenzanalyse:

Zu sequenzierende Proteine wurden zunächst über Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe einer Semi-Dry-Blot-Apparatur der Firma Bio-Rad auf eine Polyvinyliden-Difluorid-Membran (Firma *Millipore*) transferiert, die zuvor mit 100 % Methanol aktiviert und in Transfer-Puffer äquilibriert worden war. Der Transfer erfolgte dann wie unter dem Punkt „Western Blot“ geschildert, allerdings wurde die Membran nach dem Blot sofort 10 min in eine alkoholische Coomassie-Färbelösung eingelegt. Entfärbt wurde für 10 min mit Entfärber I und, falls nötig, für 10 min mit Entfärber II; anschließend wurde die Membran zwischen Whatman-Filterpapier getrocknet.
Der anschließende Verdau der Banden mit Endoproteinase LysC (Firma *Roche Diagnostics*, Basel, Schweiz) und die Aminosäure-Sequenzanalyse wurde von Reinhard Mentele (MPI für Biochemie, Martinsried) an einem Gasphasen-Sequenziergerät der Firma *Applied Biosystems* (Weiterstadt, BRD) durchgeführt.

Coomassie-PVDF-Färbelösung	0.1 % Coomassie Blue R-250, 40 % Ethanol, 10 % Essigsäure
Entfärber I	40 % Ethanol, 10 % Essigsäure
Entfärber II	90 % Ethanol, 5 % Essigsäure

Analytische Gelfiltration:

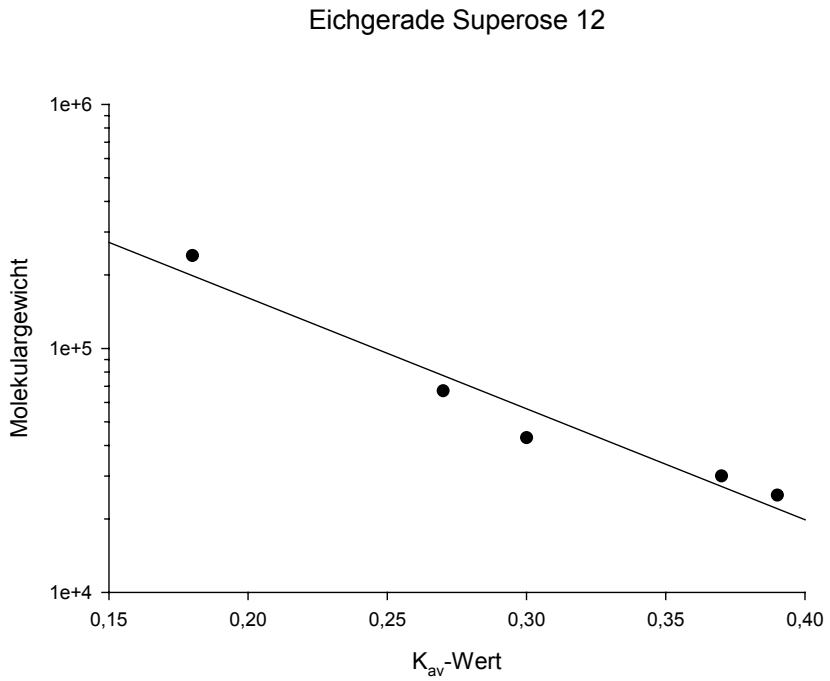
Die Oligomerisierungstendenzen der apikalen Domänen wurden über analytische Molekularsiebchromatographie mit einer Superose 12 PC 3.2/20 – Säule (Trennbereich 1 – 300 kDa) an einem SMART-System der Firma Amersham Biosciences untersucht. Die Kalibrierung der Säule erfolgte mit Hilfe von geeigneten Eichproteinen (unter anderem aus dem Gel Filtration Calibration Kit, Firma Amersham Biosciences) bei 40 µl/min in 20 mM Tris / HCl pH 7.5, 0.1 M NaCl, 5 % Glyzerin. Zur Erstellung einer Eichkurve wurden die jeweiligen K_{av}-Werte nach der unten angegebenen Formel berechnet und gegen die entsprechenden Molekulargewichte halblogarithmisch aufgetragen. Zur anschließenden Bestimmung des Molekulargewichts der apikalen Domänen (Auftrag: je 50 µg) wurden deren Elutionsvolumina unter verschiedenen Pufferbedingungen (20 mM Tris/HCl pH 7.5,

mit und ohne 5 % Glyzerin, mit und ohne 0.1 M NaCl) bestimmt und die daraus berechneten K_{av}-Werte mit denen der Eichproteine verglichen.

$$K_{av} = V_e - V_0 / V_t - V_0$$

K_{av} = Verteilungskoeffizient der Probe
V_e = Elutionsvolumen der Probe
V_0 = Ausschlussvolumen der Säule[11]
V_t = Gelbettvolumen (hier: 2.3 ml)

Eichprotein	MGW (in kDa)	V_e (in ml)	K_{av}-Wert
Dextran Blau 2000	2000	0.9	-
Chymotrypsinogen A	25	1.79	0.39
Carboanhydrase	30	1.45	0.37
Ovalbumin	43	1.34	0.3
BSA	67	1.25	0.27
Katalase	240	1.16	0.18



[11] entspricht dem Elutionsvolumen von Dextran Blau 2000

3.4. Kristallographische Methoden

3.4.1. Kristallisation

Das gereinigte Protein wurde mit Macrosep®- und Microsep®-Konzentratoren auf eine Konzentration von 10 mg/ml eingestellt und im hängenden Tropfen nach der Dampfdiffusionsmethode kristallisiert. Dabei wird die Gleichgewichtseinstellung zwischen zwei über einen abgeschlossenen Gasraum verbundenen Lösungen und die daraus folgende allmähliche Änderung der Konzentrationen zur Kristallbildung genutzt (eine Übersicht findet sich z.B. bei Drenth (1999). Kristallansätze wurden in VDX-Platten der Firma *Hampton Research* angesetzt, deren Reservoirs mit eingefetteten Kunststoff-Deckgläschen der Firma *Plano* abgedichtet wurden. Für anfängliche *sparse-matrix-Screening*-Versuche dienten die von Hampton Research erhältlichen Pufferlösungen Crystal Screen und Crystal Screen II (Janckarik & Kim, 1991; Cudney et al., 1994). Darin finden sich diverse Kombinationen von Präzipitanten, Puffern verschiedener pHs und Additiven. Erste Ergebnisse dieser Screens (z.B. Präzipitat, Nadeln, mikrokristalliner Niederschlag, erste 3D-Kristalle) ermöglichen die Entwicklung von Strategien zur Optimierung der gefundenen Kristallisationsbedingungen. Hierzu wurden Stammlösungen der verschiedenen Komponenten angesetzt und in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt. Meist betrug das Reservoir-Volumen 500 µl; der zu äquilibrierende Tropfen setzte sich aus 1 µl Proteinlösung und 1 µl Reservoir-Lösung zusammen. Es wurden Kristallansätze bei 4, 20 und 30 °C getestet.

3.4.2. Datensammlung

Da sich die Kristalle als sehr instabil bei mechanischer Beanspruchung und Veränderung der Pufferbedingungen erwiesen, konnten keine Test-Messungen in einer Kapillare durchgeführt werden. Deshalb wurde ein Gefrierpuffer gesucht, um das Schockfrieren und Messen der Kristalle bei 100 K zu ermöglichen. Hierbei ist zu beachten, dass die Gefrierbedingungen die Struktur des Kristalls morphologisch nicht oder nur sehr geringfügig schädigen; gleichzeitig sollte der Puffer beim Schockfrieren vitrifizieren, also bei der Aufnahme von Beugungsbildern keine störenden Eisringe verursachen. Für die βADT-Kristalle konnte keine Gefrierbedingung gefunden werden, die diese Kriterien

vollständig erfüllte. Deshalb wurden die Messungen in 10 % (w/v) PEG20000, 20 % (v/v) Glyzerin, 0.1 M Bicin pH 9.1 durchgeführt, da dieser Puffer den Wachstumsbedingungen der Kristalle relativ ähnlich und somit deren Schädigung begrenzt war. Vor jeder Messung wurden die Kristalle 60-90 s lang in Gefrierpuffer eingelegt, mit Hilfe einer Nylon-Schlaufe herausgefischt und dann sofort im Stickstoffstrahl eines Cryostream Coolers (Firma *Oxford Cryosystems, Oxford, UK*) gefroren.
Bei der Suche nach Schwermetallderivaten wurden die Kristalle zuerst mehrere Stunden in verschiedene Schwermetall-Salz-Lösungen (siehe Anhang) eingelegt, kurz in einem Tropfen Gefrierpuffer gewaschen und danach sofort (wie oben) schockgefroren.

Test-Messungen der Kristalle wurden zunächst als eine Reihe von Rotationsaufnahmen (Oszillationswinkel ω = 0.5°, Belichtungszeit: 10 min) an einem Röntgengenerator durchgeführt. Hierzu diente die RU 200-Anlage (50 kV, 100 mA, Kupferdrehanode mit CuKα: λ=1.5418 Å, Firma *Rigaku, Berlin, BRD*) der Abteilung Membranbiochemie, MPI für Biochemie, Martinsried. Die Aufzeichnung erfolgte auf einer 300 mm Bildplatte der Firma *MARresearch* (*Hamburg, BRD*) im Abstand von 200-250 mm.
Da die Streukraft der Kristalle am Röntgengenerator nicht ausreichend war, wurden die zur Strukturlösung verwendeten Daten gemeinsam mit Prof. Dr. Lars-Oliver Essen [12] an der Beamline BW 7A (λ = 0.99 Å) des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) am Speicherring DORIS III des Deutschen Elektronensynchrotrons (DESY, Hamburg) aufgezeichnet (Detektor-Durchmesser (*MARreasearch* Bildplatte): 300 mm, Abstand zum Kristall: 240 mm, Oszillationswinkel: 1.5°, Belichtungszeit: 1 min, Temperierung auf 100 K).

3.4.3. Strukturlösung

Die Auswertung der aufgezeichneten Daten sowie die Lösung der Kristallstruktur erfolgte unter Mithilfe von Prof. Dr. Lars-Oliver Essen.

[12] Abteilung Membranbiochemie, MPI für Biochemie, Martinsried;
derzeitige Adresse: Fachbereich Chemie-Biochemie, Phillips-Universität Marburg

Zur Datenreduktion wurde das Programmpaket HKL (Otwinowski & Minor, 1997) verwendet. Hierbei wurden die Beugungsbilder mit DENZO indiziert und prozessiert, um die Zellkonstanten zu bestimmen. Anschließend erfolgte die Integration der Reflexintensitäten und die Skalierung mit SCALEPACK. Für eine komplette Beschreibung eines Reflexes benötigt man zusätzlich zu Position und Intensität auch seine Phase. Diese fehlende Information erhält man auf klassische Weise durch den Einsatz von Derivat-Kristallen, die sich von den nativen Kristallen nur durch die Präsenz von Schwermetallatomen unterscheiden (Bragg & Perutz, 1954). Dabei nutzt man die Veränderung der Reflexintensitäten aus (Isomorpher Ersatz, IR). Mit Hilfe von vergleichender Differenz-Patterson-Funktion eines nativen und eines derivatisierten Datensatzes können die Phasenanteile der nativen Strukturfaktoren zunächst abgeschätzt und später durch Modellbau verfeinert werden.

Für die βADT-Kristalle konnten jedoch keine Schwermetallpositionen in den vergleichenden Patterson-Differenzkarten (*Difference Patterson Maps*) ermittelt werden, so dass die Strukturlösung mittels Molekularem Ersatz (*Molecular Replacement*, MR) mit Hilfe des Programms AMoRe (Navaza, 1994) erfolgte. Die fehlende Phaseninformation wird bei diesem Verfahren zunächst aus einer sehr ähnlichen, bereits bekannten Proteinstruktur erhalten, welche dann als erstes, grobes Modell für die unbekannte Struktur dient und später weiter verfeinert wird. In dieser Arbeit wurde nur der globuläre Teil der bereits von Klumpp et al. (1997) gelösten Kristallstruktur der α-apikalen Domäne des Thermosoms als Suchmodell verwendet, um die Konformation des helikalen Fortsatzes unabhängig bestimmen zu können. Dieser wurde mit Hilfe des Programms CNS (Brünger et al., 1998) mit F_{obs}-F_{calc} und $2F_{obs}$-F_{calc} – *Difference Fourier Maps* in anschließenden Verfeinerungsdurchgängen schrittweise modelliert und wiederholt in *Composite-Omit-Maps* überprüft. Für die Verfeinerung wurden Daten von 15-2.8 Å herangezogen.

3.4.4. Graphische Darstellung

Bändermodelle und Superpositionierungen wurden mit den Programmen MOLSCRIPT (Kraulis, 1991), RASTER3D (Merritt & Murphy, 1994) und Rasmol (Sayle, & Milnerwhite, 1995).erstellt.

3.5. Kernspin-Resonanz-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie)

Die Analysen von α- und βADT durch Kernspin-Resonanz-Spektroskopie wurden von Dr. Murray Coles, Dr. Tammo Diercks, Dipl. Chem. Markus Heller und Dipl. Chem. Michael John, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kessler, Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität München durchgeführt.
Proteinproben für die NMR-Spektroskopie wurden mit Micro- und Nanosep®-Konzentratoren (Ausschlussvolumen 3 kDa) auf eine Konzentration von 1.2 mM in 500 µl aufkonzentriert und vor der Messung mit 10 % (v/v) D_2O (99.9 %) versetzt.
Die Spektren wurden bei 315 K an *Bruker AVANCE* DMX-600 und DMX-750 Spektrometern aufgenommen.

1D-^{1}H-Spektrum

Mit dem eindimensionalen Protonenspektrum kann man qualitativ zwischen ungefaltetem / aggregiertem und gefaltetem Protein unterscheiden, da Aussagen über die direkte Umgebung der Atome getroffen werden. Signale ungefalteter Proteine sind verbreitert und zeigen kaum Dispersion, weil die ^{1}H-Frequenzen der verschiedenen Aminosäuren überlappen. Gefaltete Proteine dagegen erzeugen eine breitere Dispersion der Signale, die je nach Anteil an α-Helices, β-Faltblättern und aromatischen Seitenketten unterschiedlich ausfällt.

2D ^{1}H-^{15}N-HSQC - Spektrum

(*heteronuclear single quantum coherence* – heteronukleare Einquanten-Kohärenz)

Um Aussagen für komplexere Moleküle treffen zu können, müssen die Signale in zwei Dimensionen aufgetrennt werden, da sich im 1D-^{1}H-Spektrum für eine genauere Interpretation zu starke Überlagerungen ergeben. Für Proteine >10 kDa müssen zusätzlich zu den Protonen noch Frequenzen anderer magnetisch aktiver Kerne (Heterokerne) gemessen werden (heteronukleare NMR). Zu diesem Zweck wurden ^{15}N-markierte Proben hergestellt. Beim ^{1}H-^{15}N-HSQC-Experiment wird die Stickstoff-Frequenz mit der des gebundenen Amidprotons innerhalb einer NH-Gruppe verknüpft. Bis auf Prolin liefert jede Aminosäure ein Signal, das ein an ein ^{15}N-Atom gebundenes Proton repräsentiert. Durch die zweidimensionale Auftragung können die meisten Amidprotonen-Resonanzen entzerrt

dargestellt werden. Je nach pH-Wert der Probe und Lösungsmittel-Exponiertheit sind auch Seitenketten (NHx-Gruppen) zu sehen.

Sequentielle Zuordnung des Proteinrückgrats

Um den Resonanzsignalen einzelne Aminosäuren zuordnen zu können, werden Kombinationen von Tripelresonanzexperimenten an doppelt markierten Proben durchgeführt (HNCO, H(CA)CO, HNCA, HNCACB, CBCA(CO)NH, HNHA, HNHB und HBHA(CBCACO)NH). Eine Beschreibung der wichtigsten Experiment-Reihen findet sich bei Sattler et al. (1999).

Bestimmung der Sekundärstrukturelemente

Im Rahmen dieses Projekts wurde die *chemical shift index* (CSI) - Methode nach Wishart & Sykes (1994) zur Identifizierung der Sekundärstrukturelemente angewendet. Die Resonanzen NMR-aktiver Kerne eines Proteins verschieben sich gegenüber dem unstrukturierten Zustand in Abhängigkeit von der Sekundärstruktur. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die chemischen Verschiebungen (*chemical shifts*) für eine Auswahl an Kernen (H^{α}, C^{α}, C^{β}) mit den für einzelne Peptide tabellierten *random-coil*-Werten verglichen und miteinander abgestimmt. Aus signifikanten Abweichungen dieser Werte wurden anschließend für jeden Rest Schlussfolgerungen für den tendenziellen konformationellen Unterschied zum unstrukturierten Zustand (Wert Null) gezogen. So ist eine Verschiebung nach hohem Feld (kleine ppm-Werte) ein Indiz für die Propensität zur Bildung einer α-Helix (Wert –1), eine Verschiebung nach tieferem Feld (höhere ppm-Werte) spricht für β-Faltblatt-Präferenz (Wert +1). Diese Experimente liefern jedoch keine Informationen über die relative räumliche Lage der Elemente zueinander oder die globale Faltung.

Über die Höhe der $^{3}J(H^{N}H^{\alpha})$-Kopplungskonstanten kann man zusätzliche Hinweise auf strukturelle Präferenzen des Proteinrückgrats erlangen. Sie liegen für β-Stränge im Bereich von 8-10 Hz, für α-Helices von 4-5 Hz.

Zudem können Amidprotonen-Austauschraten als indirekte Informationsquelle herangezogen werden, da sie Aussagen zu Wasserstoffbrückenbindungen und Abschirmungseffekten von der Umgebung zulassen.

Schließlich liefert auch der *Nuclear Overhauser Effect* (Kern-Overhauser-Effekt, NOE) durch Aussagen zu Abständen und Winkeln zwischen Kernen Erkenntnisse über die Sekundärstruktur. Sequenzielle NOE-Werte aufeinander folgender Aminosäuren (H^N(i)-H^N(i+1) and H^α(i)-H^N(i+1) NOEs) geben dabei Auskunft über die lokale Konformation des Proteinrückgrats. Durch eine Kombination von NOE-Konnektivitäten (*short, medium und long range NOEs*) kann man Rückschlüsse auf das Vorliegen gefalteter Elemente ziehen.

Dynamik-Untersuchungen

Mit Experimenten zum internen dynamischen Verhalten eines Moleküls kann man Aussagen über die Beweglichkeit des Gesamtmoleküls, schnelle, lokale Bewegungen des Proteinrückgrats sowie räumliche Einschränkungen solcher Bewegungen aufgrund von Tendenzen zu kompakten Strukturelementen treffen. Diese Vorgänge können sowohl langsamer (Milli- bis Microsekundenbereich) als auch schneller (Pico- bis Nanosekundenbereich, z.B. rasche, interne Bewegungen) als die Rotation des Proteins als Ganzes (Nanosekundenbereich) sein. Durch Messung des ^{1}H-^{15}N heteronuklearen Kern-Overhauser-Effekts (^{15}N{^{1}H}-NOE oder hetNOE) und der Relaxationszeiten kann man unter anderem Rückschlüsse auf die Bewegungsvorgänge im Proteinrückgrat erhalten. Dabei ist der hetNOE besonders auf der sub-Microsekunden-Zeitskala (schnellere Beweglichkeit), nicht so sehr dagegen im Millisekundenbereich empfindlich. Für jeden Rest (außer Prolin, das kein NH-Proton trägt) kann quantitativ festgestellt werden, wie definiert seine lokale Konformation ist. Man kann somit zwischen flexiblen bis ungefalteten und rigiden Bereichen unterscheiden (negative bzw. positive NOE-Werte).

4. Ergebnisse

4.1. Kristallisation der β-apikalen Domäne des Thermosoms (βADT)

4.1.1. Optimierung der Expressions- und Proteinreinigungsstrategie

Die Kristallstruktur der α-apikalen Domäne des Thermosoms (αADT) war bereits von Dr. Martin Klumpp und Kollegen (1997) gelöst worden. Um weitere Einblicke in Struktur und Funktion der substratbindenden Bereiche des Thermosoms zu erhalten, wurden im Rahmen dieser Arbeit, wie schon in der vorangegangenen Diplomarbeit (G. Bosch, geb. Ilg, 1998), Versuche unternommen, auch die Kristallstruktur der β-apikalen Domäne (βADT) zu lösen.

Bereits bei früheren Experimenten (vgl. Diplomarbeit) hatte sich die starke Tendenz der βADT zur Bildung von Assoziaten als problematisch für die Kristallisation erwiesen. Deshalb war die Domäne auf der Suche nach einer neuen Kristallisationsbedingung in ihrer mutierten Form (Cys B364 → Ser, vgl. Punkt 3.2.2.) verwendet worden, um die Möglichkeit intermolekularer Disulfidbrücken auszuschließen. Erste Tests mit *sparse-matrix-screens* der Firma Hampton Research hatten zwar Hinweise auf eine mögliche neue Kristallisationsbedingung geliefert, allerdings erwiesen sich diese Kristalle als qualitativ minderwertig. Darum wurden in dieser Arbeit zunächst Expressions- und Reinigungsstrategie verbessert, um bessere Kristalle zu erhalten.

Der ursprünglich verwendete Vektor pRSET6a (Schoepfer, 1993) erwies sich für die Überexpression von βADT als ungeeignet, da die Domäne während der Anzucht der transformierten *E.coli*-Zellen schon vor der Induktion in erheblichem Maß exprimiert wurde. Für die Experimente in dieser Arbeit musste außerdem die Induktionsphase verlängert werden, um die Ausbeute zu erhöhen. Eine Expression der Domäne bereits vor der Induktion hätte also die Gefahr vorzeitigen Abbaus durch *E.coli*-eigene Proteasen erhöht und somit die Proteinqualität vermindert. Zudem hätte das Zellwachstum gebremst werden können.

Der codierende Bereich für die mutierte βADT einschließlich sechs C-terminaler Histidin-Codons wurde wie unter Punkt 3.2.2. geschildert mittels PCR aus dem vorhandenen Template-Plasmid pRSET6a/β-$AD_{(Cys\ B364\ Ser)}$ amplifiziert und in den Vektor pET22b(+)

kloniert.[13] Der eingefügte DNA-Abschnitt wurde sequenziert, um eine korrekte Aminosäure-Sequenz der exprimierten Proteine sicherzustellen.

Proteinextrakte aus 3 l - Expressionskulturen (siehe Punkt 3.3.1. und 3.3.2.) wurden zunächst über Metallchelat-Affinitätschromatographie grob gereinigt, um die Domäne anhand ihres Histidin-Tags anzureichern (Abb. 4.1.). Fraktionen, welche die Domäne enthielten, wurden vereinigt, entsalzt und mittels anschließender Anionenaustausch-Chromatographie vom Großteil der noch kontaminierenden *E.coli*-Proteine getrennt (Abb. 4.2.). Nach SDS-PAGE-Analyse wurden die reinsten Peakfraktionen vereinigt, einkonzentriert und in einem abschließenden Gelfiltrationslauf in den Kristallisationspuffer (20 mM Tris/HCl pH 8) überführt (Abb. 4.3.).

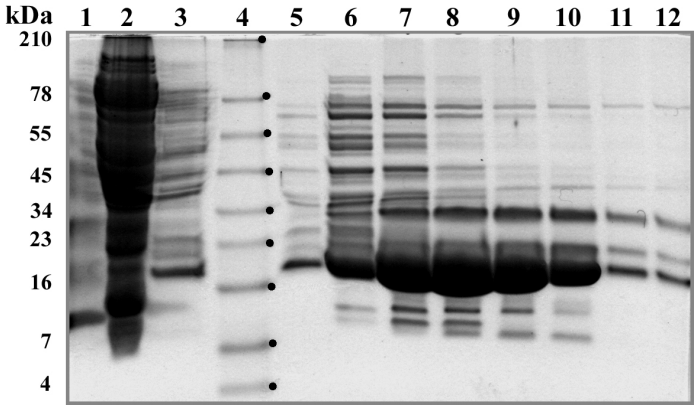


Abb. 4.1.:

12 % SDS-Gel zur βADT-Metallchelat-Affinitätschromatographie.

Spurenbelegung: **1**: Durchlauf; **2**: Proteinextrakt; **3**: Waschschritt;

4: Marker; **5-12**: Peakfraktionen.

[13] Gleichermaßen wurde auch mit dem entsprechenden Expressionskonstrukt für die α-apikale Domäne (αADT) verfahren (vgl. Punkt 3.2.2.).

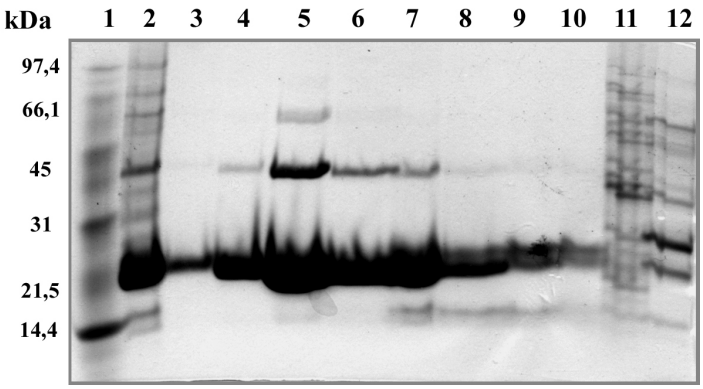


Abb. 4.2.:
12 % SDS-Gel zur βADT-Anionenaustausch-Chromatographie
Spurenbelegung: **1**: Marker; **2**: Pool der Sephadex G25-Säule; **3-10:** Hauptpeak mit βADT-Mono- und Oligomeren; **11-12:** Nebenpeak mit Verunreinigungen.

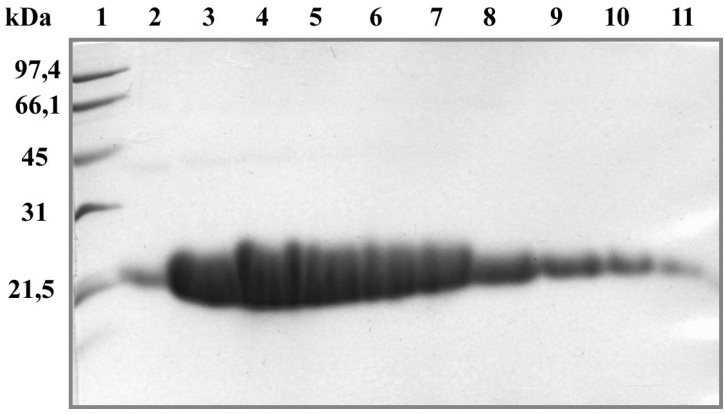


Abb. 4.3.:
12 % SDS-Gel zur βADT-Gelfiltration.
Spurenbelegung: **1:** Marker; **2-11:** βADT-Elutionspeak.

Trotz verbesserter Reinigungsstrategie traten in vielen SDS-Gelen der Domäne zwei weitere Banden von 7 und 10 kDa auf. Um zu klären, ob es sich hierbei um Abbauprodukte der apikalen Domänen oder um Kontaminanten handelte, wurden sie durch Western Blot mit einem affinitätsgereinigten anti-Thermosom-Antikörper und N-terminale Sequenzierung analysiert (siehe Punkt 3.3.3 und Abb. 4.4a). Beide Banden erwiesen sich als Bruchstücke der apikalen Domäne, wobei die Spaltstelle zwischen den Aminosäuren Glu B250 und Phe B251 der β-Untereinheit lag und die Domäne in die beiden Abschnitte mit oben genannter Größe teilte. Unter Bezug auf die bereits bekannte Kristallstruktur von

αADT konnte die Spaltstelle im Bereich der kurzen α-Helix, welche der langen Fortsatzhelix H10 [14] vorangeht, lokalisiert werden. Auch in späteren Präparationen von αADT zeigten sich derartige Banden, allerdings in geringerem Maße als bei βADT (Daten nicht gezeigt). Diese Erkenntnisse stehen in Übereinstimmung mit Szpikowska und Kollegen (1997), die eine erhöhte Proteolyse-Empfindlichkeit der apikalen Domänen des CCT-Komplexes in Abwesenheit von ATP feststellten. Auch hier waren die einzelnen paralogen Untereinheiten in unterschiedlichem Maße empfindlich. Auffällig war auch die Tendenz der apikalen Domäne zur Bildung von Assoziation. Sogar unter den Bedingungen des SDS-Gels sind bei α- und βADT Banden zwischen 30 und 60 kDa deutlich sichtbar (vgl. Abb. 4.2). Da diese – wie auch die Banden bei 7 und 10 kDa - durch den Anti-Thermosom-Antikörper erkannt werden, ist der Schluss zulässig, dass es sich hierbei um die apikalen Domänen bzw. deren Abbauprodukte handelt (Abb. 4.4a). Auch unter den Bedingungen der Blue-Native-PAGE (Abb. 4.4b) zeigt sich die Tendenz beider Domänen zur Assoziierung, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß.

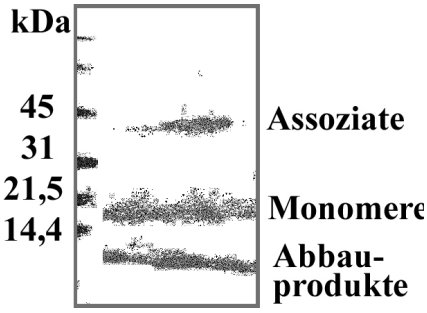


Abb. 4.4a:
Western Blot-Analyse der gereinigten αADT und βADT (Spuren verlaufen)

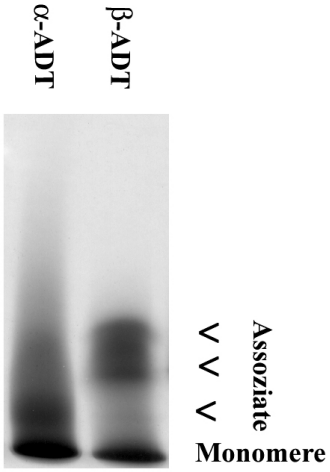


Abb. 4.4b:
3-17 % Blue-Native-PAGE der gereinigten αADT und βADT (Ausschnitt)

[14] Nomenklatur nach Ditzel et al., (1998).

4.1.2. Analyse des Oligomerisierungszustandes mittels analytischer Gelfiltration

Wie unter Punkt 4.1.1 gezeigt wurde bei beiden Domänen eine ausgeprägte Tendenz zur Bildung von Assoziaten beobachtet. Diese Eigenschaft kann starken Einfluss auf das Kristallisationsverhalten haben und wurde deshalb durch analytische Gelfiltration mit einer Superose 12 PC 3.2/20 – Säule (SMART-System) bei verschiedenen Pufferbedingungen untersucht. Anhand der Elutionsvolumina wurden für die Domänen Verteilungskoeffizienten (K_{av}-Werte) bestimmt, welche durch Vergleich mit den Werten der Eichkurve auf das entsprechende Molekulargewicht und somit den vorliegenden Oligomerenzustand schließen ließen (vgl. Punkt 3.3.3):

Laufpuffer	K_{av}-Wert und MGW αADT	K_{av}-Wert und MGW βADT
a) 20 mM Tris/HCl pH 8.0	0.31 / ~ 40-45 kDa → Dimer - Trimer	0.28 / ~ 50-60 kDa → Trimer
b) wie a) mit 5 % Glyzerin	0.30 / ~ 40-45 kDa → Dimer - Trimer	0.28 / ~ 50-60 kDa → Trimer
c) wie a) mit 0.1M NaCl	0.40 / < 20 kDa → Monomer	0.41 / < 20 kDa → Monomer

Die analytische Gelfiltration bestätigte die Assoziationstendenzen unter Bedingungen niedriger Ionenstärke, allerdings schienen diese bei α- und βADT unterschiedlich. Der Zusatz von 5 % Glyzerin hatte keine Auswirkungen auf das Laufverhalten. Jedoch bereits durch Zugabe von 0.1 M NaCl zum Laufpuffer wurde die Assoziierung offenbar behindert. Gemeinsam mit einem früheren Untersuchungsergebnis (vgl. Diplomarbeit G. Bosch, 1998) liefert das Verhalten der Domänen in der Gelfiltration einen Hinweis auf die Tendenz zur Bildung von schwachen Assoziaten.

4.1.3. Optimierung der Kristallisationsbedingungen und Datensammlung

Gereinigte βADT wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml zur Kristallisation eingesetzt (Punkt 3.4.1.). Bei Screening-Versuchen nach geeigneten Kristallisationsbedingungen stellte sich heraus, dass die Domäne bei einigen Bedingungen nadel- oder plättchenartige Kristallformen bildete, allerdings nur bei einer Bedingung wohlgeformte 3D-Kristalle. Diese wurden erstmals bei 30 °C, 2 % (v/v) Dioxan, 0.1 M Bicin pH 9, 10 % (w/v) PEG20000 nach einer Woche beobachtet. Die erhaltenen 3D-Kristalle wuchsen schnell zu einer Länge von 200 x 50 µm heran und zeigten häufig Verwachsungen sowie Kerben an der Oberfläche (Abb. 4.5a). Erste Beugungsbilder wiesen nur eine Auflösung von 5 Å auf, weshalb eine systematische Variation von Protein-, Additiv- und Präzipitanten-Konzentration sowie von pH-Werten, Wachstumstemperaturen und Reservoirvolumina durchgeführt wurde. Kristalle besserer Streuqualität entstanden schließlich im hängenden Tropfen bei 20 °C und 2 % (v/v) Dioxan, 8 % (w/v) PEG20000, 0.1 M Bicin pH 9.1 als Kristallisationspuffer. Die Tropfen setzten sich aus 1 µl Proteinlösung zu 10 mg/ml und 1 µl Kristallisationspuffer zusammen. Messbare, nur schwach dichroide Kristalle wuchsen innerhalb von 10 Tagen über einem Reservoir von 500 µl zu einer Größe von bis zu 400 x 100 µm heran (Abb. 4.5b).

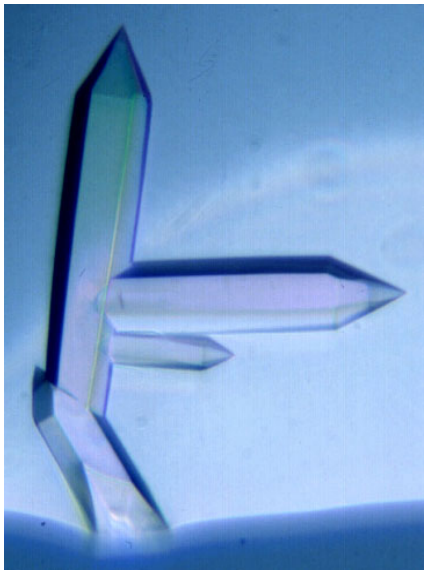


Abb. 4.5a:
verwachsene βADT-Kristalle in der ursprünglichen Kristallbedingung

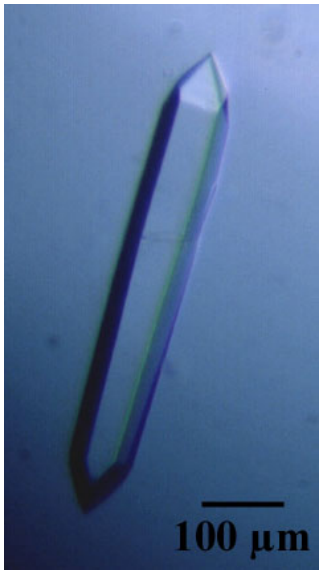


Abb. 4.5b:
βADT-Kristalle in der optimierten Kristallbedingung

Während des Kristallwachstums bildete sich anfänglich Phasentrennung im Tropfen aus, die aber allmählich verschwand. Auch die optimierten Kristalle zeigten teilweise Defekte im Längenwachstum, alterten nach etwa drei Wochen und erwiesen sich als anfällig gegenüber mechanischer Beanspruchung oder wechselnden Pufferbedingungen. Aus diesen Gründen konnte kein idealer Gefrierpuffer gefunden werden, da die Kristalle in keiner der getesteten Bedingungen unbeschädigt und unter Erhalt ihrer Streukraft eingefroren werden konnten. Da die Kristalle aber nur schwache Reflexe ergaben, mussten relativ lange Belichtungszeiten (1 min pro Aufnahme) gewählt werden. Um die damit verbundenen Strahlenschäden in Grenzen zu halten, wurde dennoch in 10 % (w/v) PEG20000, 20 % (v/v) Glyzerin und 0.1 M Bicin pH 9.1 als Gefrierpuffer bei 100 K an der Beamline BW7A (DESY, Hamburg, BRD) gemessen (Abb. 4.6 und Tab. 4.1.).

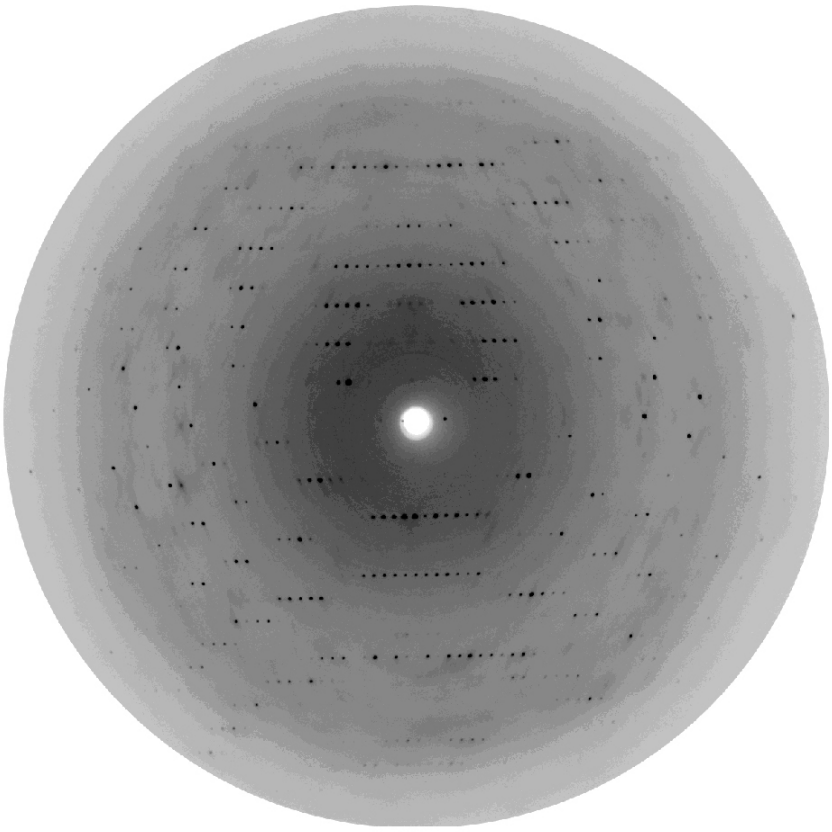


Abb. 4.6: Mit Synchrotronstrahlung an der Beamline BW7A (DESY) aufgenommenes Beugungsbild eines βADT-Kristalls. (Detektor-Durchmesser: 300 mm, Abstand zum Kristall: 240 mm, Oszillationswinkel: 1.5°, Belichtungszeit: 1 min, Temperatur: 100 K, Auflösung am Rand des Detektors: 2.7 Å).

Tab. 4.1.: Datensammlungsstatistik

Zellkonstanten	a = 57.32 Å, c = 106.14 Å
Raumgruppe	$P3_221$ (trigonal)
Auflösung	25 – 2.8 Å
Beobachtete Reflexe	19163
Einzigartige Reflexe	5170
Mosaizität	1.1 °
$I/\sigma(I)$ *	27.1 (3.3)
R_{merge} §	0.041 (0.393)
Vollständigkeit	97.8 (96.8) %

In Klammern sind jeweils die Werte für die höchste Auflösungsschale angegeben
* Berechnet mit dem Programm TRUNCATE (CCP4, 1994)
§ $R_{merge} = \Sigma_{hkl} \Sigma_i [I_i(hkl) - \langle I(hkl)\rangle] / \Sigma_{hkl} \Sigma_i I_i(hkl)$

4.1.4. Strukturauflösung durch Molekularen Ersatz (Molecular Replacement)

Die Lösung der Struktur erfolgte unter Mithilfe von Prof. Dr. L.-O. Essen durch Molekularen Ersatz mit dem Programm AMoRe (Navaza, 1994). Der globuläre Teil von αADT ohne den helikalen Fortsatz (Reste Ile A245 – Lys A274) wurde hierbei als Suchmodell verwendet (Punkt 3.4.3.). Die Berechnungen ergaben ein Molekül pro asymmetrischer Einheit und einen Solvensgehalt von 50 %. Die Verfeinerung erfolgte mittels CNS (Brünger et al., 1998) (Tab. 4.2.), wurde aber durch hohe Werte bei Mosaizität und B-Faktoren (teilweise auf Grund von Strahlungsschäden) erschwert. Das endgültige Modell von βADT umfasste die Reste Asn B215 – Asn B366 (ohne das N-terminale Methionin und eine Aminosäure des C-terminalen His_6-Tag). Für die Seitenketten des distalen Loop-Bereichs im helikalen Fortsatz (Asn B253 – Ile B256) sowie für die C-terminalen Reste Lys B365, Asn B366 und His B367 konnte keine Dichte definiert werden.

Tab. 4.2.: Verfeinerungsstatistik

Auflösungsbereich	15 – 2.8 Å
Reflexe (F>0)	5135
R_{cryst}; R_{free} #	0.261; 0.318
Atome (gesamt)	1160
Mittlerer B-Faktor	76 $Å^2$
r.m.s.d. Bindungslängen ¶	0.007 Å
r.m.s.d. Winkel ¶	1.33 °

¶ Mittlere Standardabweichungen von Bindungslängen und Winkeln in Bezug auf die Parameter von Engh und Huber (1991).

$R_{crys} = \Sigma_{hkl} |F_{obs, work} - k |F_{calc}| | / \Sigma_{hkl} |F_{obs, work}| \times 100.$
$R_{free} = \Sigma_{hkl} |F_{obs, test} - k |F_{calc}| | / \Sigma_{hkl} |F_{obs, test}| \times 100.$

4.1.5. Einfluss von Schwermetallverbindungen auf die βADT Kristalle

Um den Phasenfehler zu verringern und somit die Elektronendichte vor allem im Bereich des helikalen Fortsatzes exakter modellieren zu können, wurden zusätzlich Derivatisierungsversuche mit Schwermetallverbindungen unternommen. Wie aus Tab. 8.1. im Anhang ersichtlich ist, erwiesen sich die βADT Kristalle als sehr empfindlich gegenüber den Einflüssen der Schwermetalle während der Inkubationszeit. Nur in einer der getesteten Lösungen blieben die Kristalle intakt, jedoch konnte keine Derivatisierung festgestellt werden.

4.1.6. Kristallstruktur der β-apikalen Domäne des Thermosoms

Die Struktur des globulären Teils der βADT gleicht auffallend den entsprechenden Bereichen der αADT (Klumpp et al., 1997) und den apikalen Domänen im Gesamt-Thermosom (Ditzel et al., 1998). (Abb.4.7) Zwei fast orthogonal zueinander stehende β-Faltblätter bilden eine β-Sandwich-Anordnung, welche an jeder Seite von langen Loop-Regionen flankiert wird. Das untere β-Faltblatt würde im Gesamtkomplex den Übergang zur intermediären Domäne darstellen.

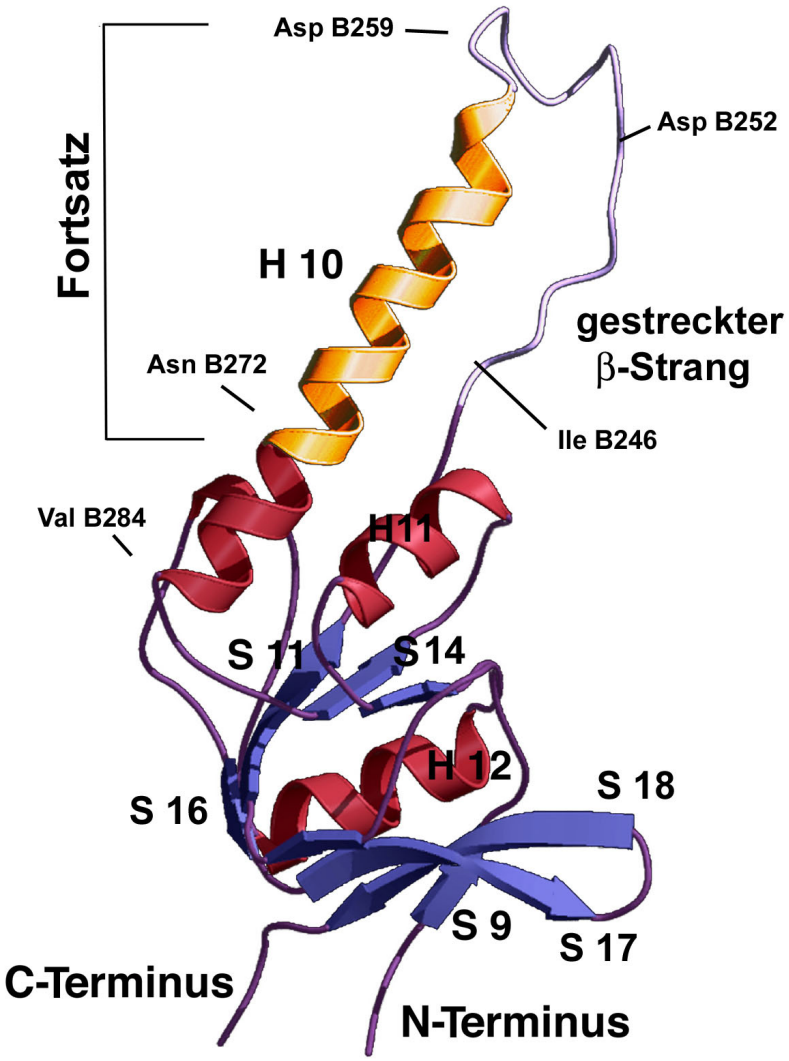


Abb. 4.7:
Kristallstruktur der β-apikalen Domäne des Thermosoms.
Nomenklatur nach Ditzel et al. (1998).

Eine Überlagerung der globulären Bereiche der verschiedenen Domänen (isolierte Konstrukte und Domänen im Gesamtkomplex) ergibt folgende r.m.s.-Abweichungen bei 114 äquivalenten C_α-Positionen:

r.m.s.-Abweichungen (in Å)	αADT (isolierte α-apikale Domäne)	β-apikale Domäne im Gesamt-Thermosom	α-apikale Domäne im Gesamt-Thermosom
βADT (isolierte β-apikale Domäne)	0.71	0.63	0.63
αADT (isolierte α-apikale Domäne)	-	0.68	0.49

Die Kernregionen stellen also relativ starre Strukturen dar. Abweichungen finden sich hauptsächlich an den N- und C-Termini sowie im Schleifensegment Lys B352 – Tyr B357, welches die β-Stränge S17 und S18 verbindet. In der Struktur des Gesamt-Thermosoms bildet diese Schleife Kontakte mit den intermediären und äquatorialen Domänen aus. Bei der βADT Struktur verursacht die Abwesenheit dieser Interaktionen eine leichte Verschiebung der Hauptkette um 1.1 Å.

Aus dem globulären Kernbereich der βADT tritt ein helikaler Fortsatz hervor, der bei Gruppe II Chaperoninen hochkonserviert ist. Seine C-terminale Hälfte, Helix H10, packt im unteren Teil (Reste Met B273 – Val B284) gegen das parallele β-Faltblatt aus S11, S14 und S15. Im oberen Teil (Reste Ser B261 – Asn B272) ragt das Fortsatzmotiv um mehr als 20 Å aus dem globulären Kernbereich hervor. Es bildet in seiner N-terminalen Hälfte einen gestreckten β-Strang, was aus der Torsionswinkelverteilung hervorgeht (Reste Ile B246 – Asp B252). Eine intramolekulare Salzbrücke am Fuß des Fortsatzes (Lys B247 und Glu B270) trägt zur Stabilität dieses Segments bei, aber hohe Temperaturfaktoren lassen vor allem im weiteren Verlauf des gestreckten β-Stranges sowie im anschließenden Loop an der Spitze des Fortsatzes (Reste Thr B253 – Asp B260) auf Flexibilität schließen.

4.1.7. Der Einfluss der Kristallpackung

Wie unter Punkt 4.1.6. gezeigt ähneln sich die globulären Teile der apikalen Domänen in den unterschiedlichen Kristallstrukturen weitestgehend. Die kristalline Umgebung hat in diesen Bereichen kaum Auswirkungen auf die Sekundärstruktur. Dagegen geht der Fortsatz intensive Wechselwirkungen mit symmetrieverwandten Molekülen im Kristallgitter ein. Insgesamt bedecken diese Kontakte etwa 24 % (472 $Å^2$) der Gesamtoberfläche von 1931 $Å^2$. Die Interaktionen bilden sich hauptsächlich in zwei verschiedenen Regionen heraus (Abb. 4.8):

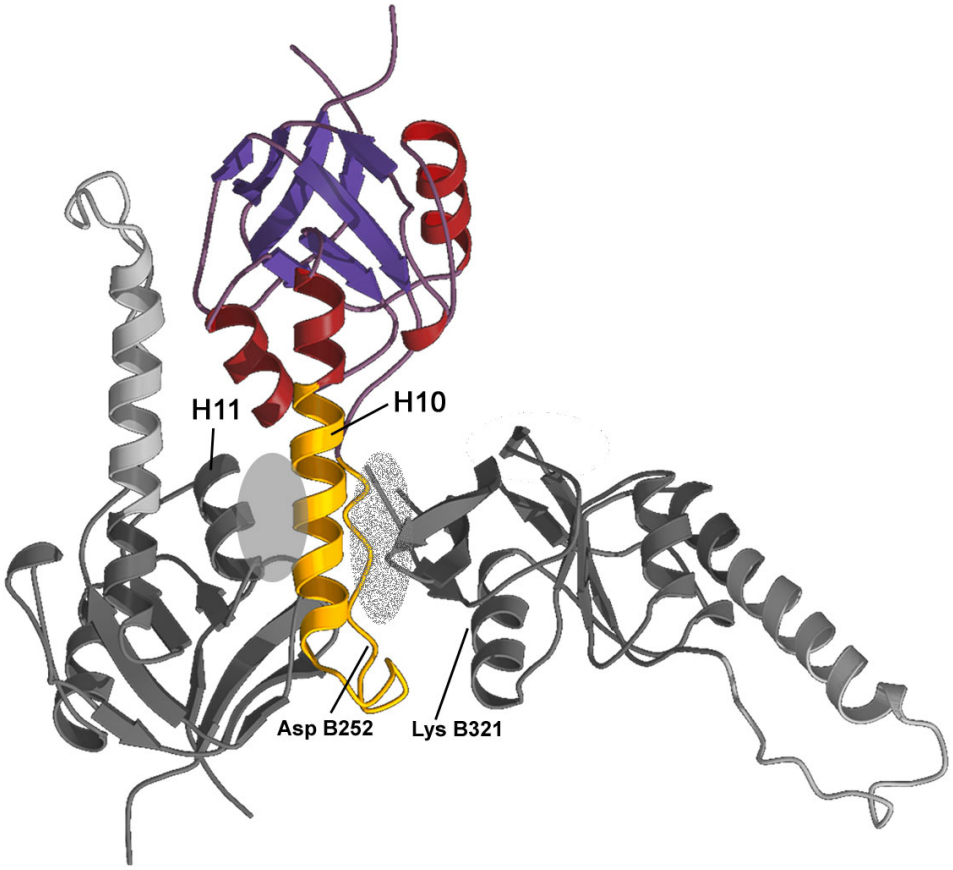


Abb. 4.8:
Kristallpackung in βADT – Kristallen. Die maßgeblichen Kontaktregionen zwischen symmetrieverwandten Molekülen sind grau unterlegt.

Die Wechselwirkungen schließen zum einen Teile der Helix H10 (Gln B264 – Glu B270) ein, die hauptsächlich mit einigen Resten der Helix H11 in einem symmetrieverwandten Molekül reagieren (graue Fläche). Zum anderen wird besonders das langgestreckte Segment im Bereich des Fortsatzes zwischen zwei weitere, symmetrieverwandte Moleküle eingebettet. Hierbei interagieren mehrere Reste des β-Stranges (Lys B247 - Asp B252) mit dem N-Terminus eines Nachbarmoleküls (grau-gesprenkelte Fläche). Auch mit einem Schleifenbereich, welcher die β-Stränge S9 und S10 eines anderen Nachbarmoleküls verbindet, kommen Wechselwirkungen zustande (nicht gezeigt). Asp B252 bildet zusätzlich eine intermolekulare Salzbrücke zu Lys B321 in der Nachbarhelix H12 aus. Die gestreckte Konformation des Fortsatz-Segments wird somit offenbar durch die Kristallpackung stabilisiert.

4.1.8. Hydrophobizität der βADT

Die hydrophoben Oberflächen der βADT ähneln in Ausmaß und Verteilung den Verhältnissen in der αADT-Kristallstruktur (Klumpp et al., 1997). Auch im Fall der βADT weist der Kernbereich eine relativ hohe Ladungsdichte auf. Im Bereich des Fortsatzes fallen dagegen die großen hydrophoben Flecken auf (Abb. 4.9). In der C-terminalen, durch die Helix H10 gebildeten Hälfte des Fortsatzes tragen dazu vor allem hydrophobe Reste bei, die aufgrund der Helix-Windung an der Innenseite des Fortsatzes zu liegen kommen. Die nach außen gewandte Seite dieser amphiphilen Helix ist dagegen durchgehend hydrophil besetzt und der Umgebung ausgesetzt. Auf der N-terminalen Seite des Fortsatzes tragen die Seitenketten von Ile B246, Pro B249 und Phe B251 im gestreckten β-Strang zu der hydrophoben Fläche bei. Die hydrophilen Seitenketten von Lys B248, Glu B250 und Asp B252 stehen im Bereich des β-Stranges von der Innenseite weg und tragen mit zu den Kristallkontakten bei, die den β-Strang stabilisieren (vgl. Punkt 4.1.7.).

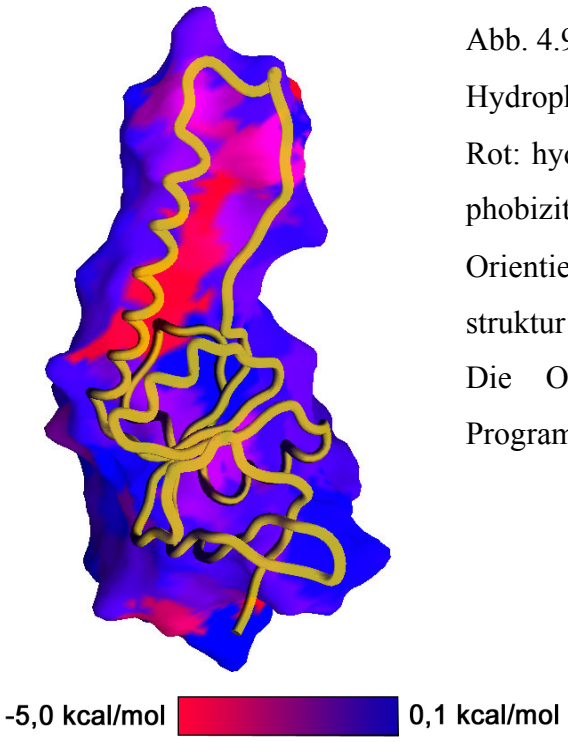


Abb. 4.9.:
Hydrophobizität der βADT-Oberflächenregionen. Rot: hydrophob, blau: hydrophil (nach der Hydrophobizitätsskala von Sharp et al., 1991). Zur Orientierung ist die C_α-Kette der βADT-Kristallstruktur über der Oberflächendarstellung gezeigt. Die Oberflächendarstellung wurde mit dem Programm GRASP (Nicholls et al., 1991) erstellt.

4.2. Analyse der apikalen Domänen in Lösung

Da die Strukturen der Fortsätze in allen verfügbaren Röntgenstrukturen der apikalen Domänen des Thermosoms in beträchtlichem Maße durch die kristalline Umgebung beeinflusst werden, war zusätzlich eine Strukturanalyse dieser möglicherweise zur Substratbindung beitragenden Regionen in Lösung notwendig.

4.2.1. Probenpräparation für die NMR-Spektroskopie

Die Expression markierten Proteins (^{15}N und $^{15}N^{13}C$) erfolgte nach der unter Punkt 3.3.1. geschilderten, optimierten Prozedur. Transformierte Zellen wurden demnach zunächst in einer LB-Vorkultur herangezogen und in einer mit Vitaminen angereicherten und pufferverstärkten Martek9-Vorkultur an die veränderten Bedingungen gewöhnt. Erst nachdem diese zweite Vorkultur die log-Phase erreicht hatte, wurde in die 4l - Martek9-

Hauptkultur überimpft, welche ebenfalls mit Vitaminen und zusätzlichem Puffer versetzt worden war. Nach der Induktionsphase wurde aus den geernteten Zellen ein Proteinextrakt hergestellt (Punkt 3.3.2.).

Die Präparation von markierten Proben für βADT verlief nach dem Verfahren zur Herstellung von Protein für die Kristallisation (Punkt 3.3.2. und 4.1.1.). Allerdings wurde das Protein bei der abschließenden Molekularsieb-Chromatographie in den Probenpuffer für die NMR-Spektroskopie umgepuffert (25 mM Natriumphosphat pH 7.8, 100 mM NaCl) und danach auf 22 mg/ml einkonzentriert.

Um markierte Proben von αADT zu erhalten, wurden die Proteinextrakte zunächst über eine Metallchelat-Affinitätssäule vorgereinigt (Abb. 4.10, linke Gelhälfte) (vgl. Punkt 3.2.2.). Nach SDS-PAGE-Analyse wurden die Fraktionen, die αADT enthielten, ermittelt und in den Startpuffer für die anschließende Anionenaustausch-Chromatographie [15] umgepuffert. Im Gegensatz zu den kontaminierenden Proteinen band die Domäne bei diesem Reinigungsschritt nicht an die Säule (Abb. 4.10, rechte Gelhälfte). Zur Abtrennung von Aggregaten und Oligomeren wurde der Durchfluss über eine Gelfiltrationssäule endgereinigt (Abb. 4.11) und dabei in den Puffer für die folgenden NMR-Experimente überführt (25 mM Natriumphosphat pH 5.5, 100 mM NaCl). Für die Messungen wurde eine Konzentration von 22 mg/ml eingestellt.

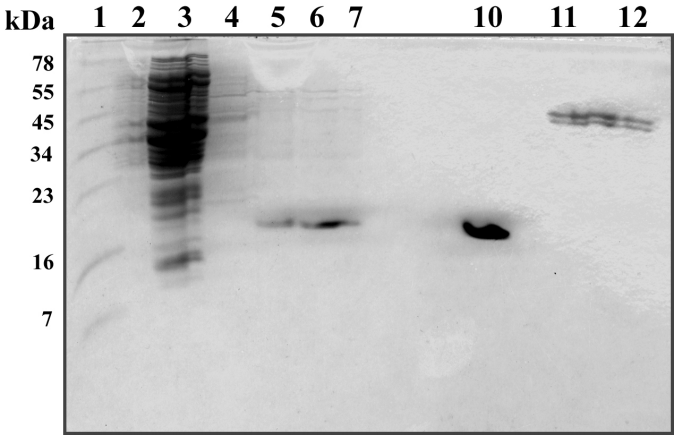


Abb. 4.10.: 12 % SDS-Gel zur αADT-Metallchelat- und Anionenaustausch-Chromatographie. (Die Proben in den Spuren 2-4 wurden verdünnt aufgetragen.).
Spurenbelegung: **1**: Marker; **2**: Durchlauf NiNTA-Säule; **3**: Proteinextrakt vor Metallchelat-Chromatographie; **4**: Wasch-Schritt NiNTA-Säule; **5-7**: Eluat NiNTA-Säule; **10**: Durchlauf HighQ-Säule; **11-12**: Eluat HighQ-Säule.

[15] Das Verfahren von Klumpp et al., 1997 wurde modifiziert.

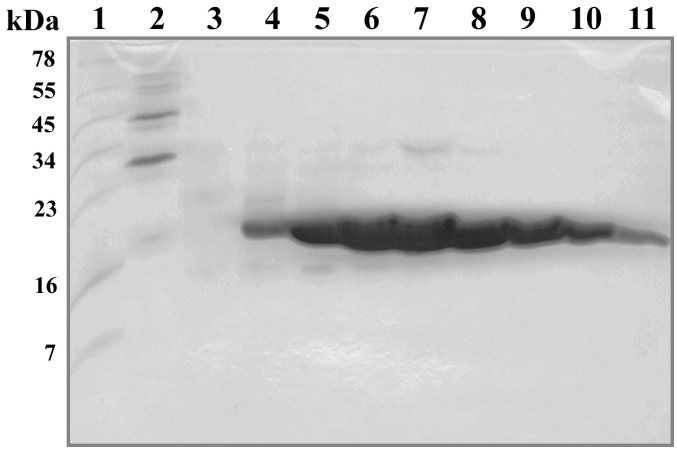


Abb. 4.11.: 12 % SDS-Gel zur αADT-Gelfiltration. Spurenbelegung: **1**: Marker; **2**: αADT nach HighQ-Säule (verdünnt); **3-11**: Eluat der Superdex-Säule.

4.2.2. Analyse der β-apikalen Domäne (βADT)

Die Aufnahme von NMR-Spektren der βADT sowie deren Interpretation erfolgten durch Dr. Tammo Diercks, Dr. Murray Coles (*Novaspin Biotech GmbH*, 85354 Freising-Weihenstephan, BRD) und Dipl. Chem. Michael John (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kessler, Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität München). Die Messungen mussten aus Gründen der Probenstabilität bei pH 7.8 durchgeführt werden. Bei derart hohen pH-Werten wird die Datenqualität jedoch durch schnellen NH-Austausch mit dem umgebenden Medium eingeschränkt. Zudem zeigte sich die Probe (wie auch später die Proben der αADT) nach 15-20 Tagen Messzeit zunehmend instabil, was die Signalqualität negativ beeinflusste.

^{1}H-1D-Protonenspektrum

In Abb. 4.12. ist ein eindimensionales Protonen-Spektrum der βADT gezeigt. Mit diesem Experiment wurde die Intaktheit der Probe überprüft. Obwohl die Dispersion der Signale generell für Proteine mit hohem Anteil an α-Helices geringer ist, erkennt man im Resonanzbereich zwischen 10 – 8.5 und < 0.5 ppm, der für gefaltete Polypeptide typisch ist, deutliche Signale.

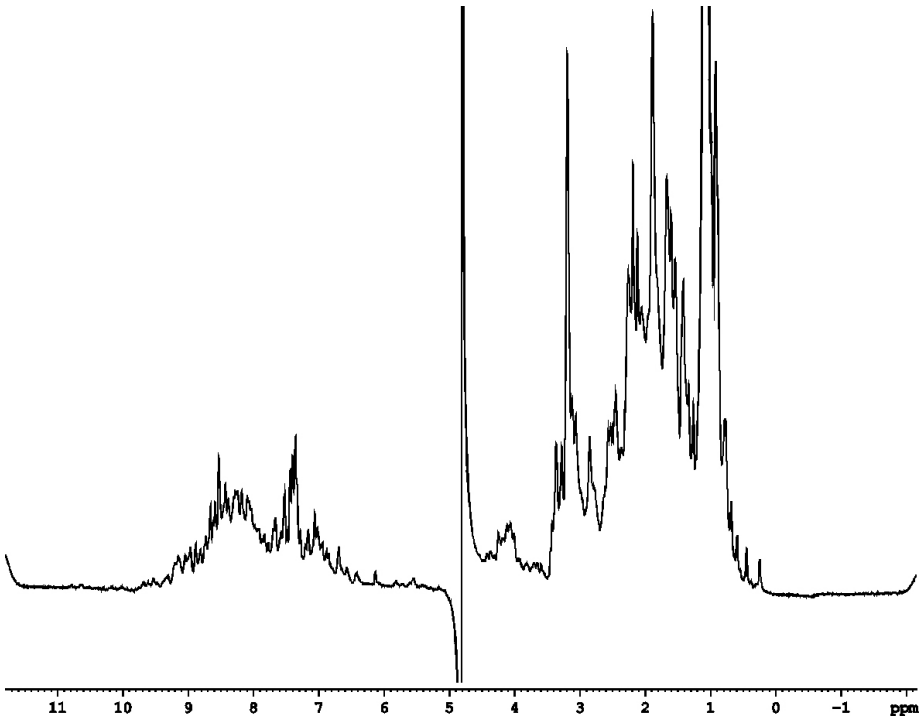


Abb. 4.12.:

1D- Protonen-Spektrum der βADT.

Auf der x-Achse ist die chemische Verschiebung, auf der y-Achse die Intensität aufgetragen.

2D – ^{1}H-^{15}N-HSQC – Spektrum der βADT

Das 2D – ^{1}H-^{15}N-HSQC – Spektrum besteht im wesentlichen aus den Signalen der H^N-Protonen des Proteinrückgrats und zusätzlich aus den Signalen der NH_2-Gruppen der Seitenketten von Asn und Gln bzw. der aromatischen H^N-Protonen von Trp und His. Aufgrund der schnellen Austauschraten der exponierten Amidprotonen mit dem Lösungsmittel konnten nur 110 der 148 H^N und ^{15}N Resonanz-Signale zugeordnet werden[16]. Eine zusätzliche Schwierigkeit stellte in diesem Zusammenhang der relativ große Anteil an helikalen Elementen dar, was zu einer engen Gruppierung und häufigen Überlappung der Signale beitrug (Abb. 4.13). Die sequenzielle Zuordnung erfolgte mit Hilfe einer Reihe von Triple-Resonanzexperimenten nach Sattler et al. (1999).

[16] Proline werden nicht mitgerechnet, da sie als Iminosäuren keine Signale abgeben.

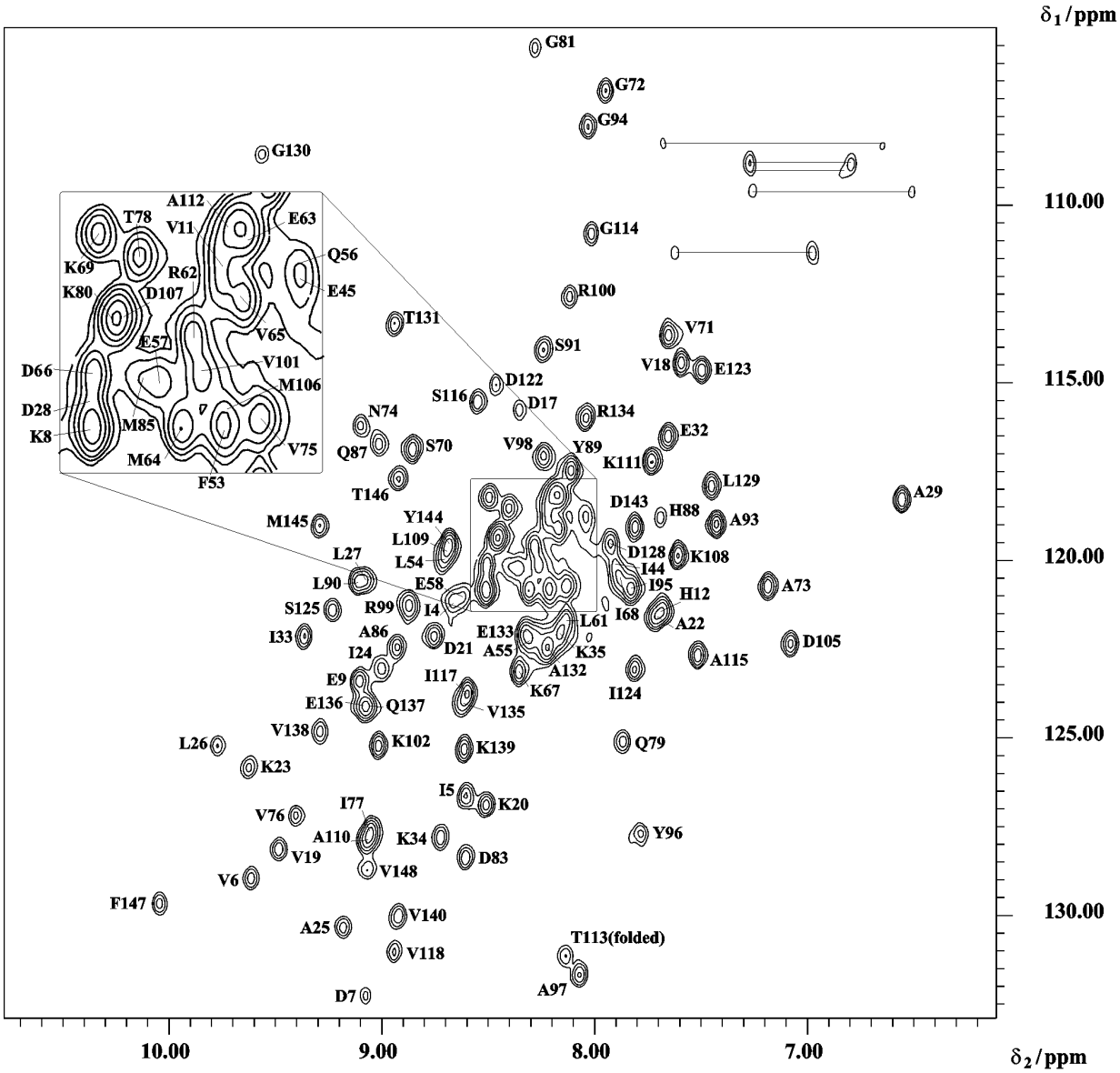


Abb. 4.13.:

Zugeordnetes 2D - ^{1}H-^{15}N-HSQC Spektrum der βADT, aufgenommen bei pH 7.8, 315 K und 600 MHz. Der Aminosäuretyp ist als Einbuchstabencode angegeben, die Nummer gibt die Position in der Aminosäuresequenz wieder (gezählt vom Beginn des 154 Aminosäuren langen βADT-Konstrukts an). Die Stickstoff-Frequenz ist auf der y-Achse, die Protonenfrequenz auf der x-Achse eingezeichnet. Die ^{15}N-^{1}H-Amid-Korrelationssignale der Asparagin- und Glutamin-Seitenketten sind mit Linien verbunden. Vergrößert dargestellt ist die Region mit geringer Signaldispersion.

Die relativ große Zahl nicht zuordnungsfähiger Reste stand in Korrelation mit der ausgeprägten Umgebungsexposition in diesen Abschnitten. Um die Lage dieser Bereiche zu verdeutlichen, wurden sie in Abb. 4.14 farblich auf die Kristallstruktur der βADT aufgetragen.

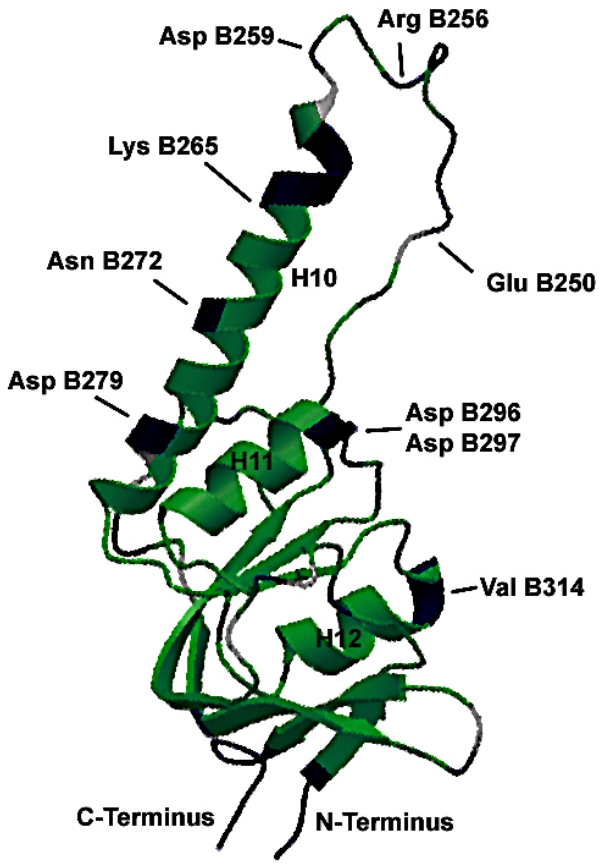


Abb. 4.14.:
Zugeordnete Reste für βADT (illustriert an der βADT-Kristallstruktur). Grün = zugeordnet, grau = Proline, schwarz = überlappend oder nicht zugeordnet.

Betroffen waren unter anderem beide Termini und für das Lösungsmittel gut zugängliche Loop- und Turn-Regionen. Insbesondere das Segment, welches dem gestreckten β-Strang mit anschließendem Loop in der Kristallstruktur entspricht, lieferte keine interpretierbaren Signale (Glu B250 – Asp B259). Außerdem fehlten Resonanzen für die N-terminalen Abschnitte der α-Helices, beispielsweise für Asp B297 in der ersten Windung von Helix H11 sowie für Val B314 in der Helix H12. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Zuordnung im N-terminalen Bereich der langen Fortsatz-Helix H10 (Ser B261 – Lys B265) könnte ebenfalls Wasser-Exposition sein.

Bestimmung der Sekundärstrukturelemente

Die Sekundärstrukturelemente wurden nach der *chemical shift index* (CSI) - Methode nach Wishart & Sykes (1994) ermittelt (Punkt 3.5.). Anhand von tabellierten Standards wurden den gemittelten Verschiebungswerten von H^{α}-, $^{13}C^{\alpha}$- und $^{13}C^{\beta}$- Kernen Tendenzen zu α-helikaler, β-Strang- oder ungeordneter (*random coil*) Konformation zugeordnet. Ergänzende Informationen zu strukturellen Präferenzen lieferten Protonenaustauschraten, Kopplungskonstanten sowie NOE-Konnektivitäten. Übertragen auf die Primärsequenz ergibt sich die Abfolge der Sekundärstrukturelemente (Abb. 4.15).

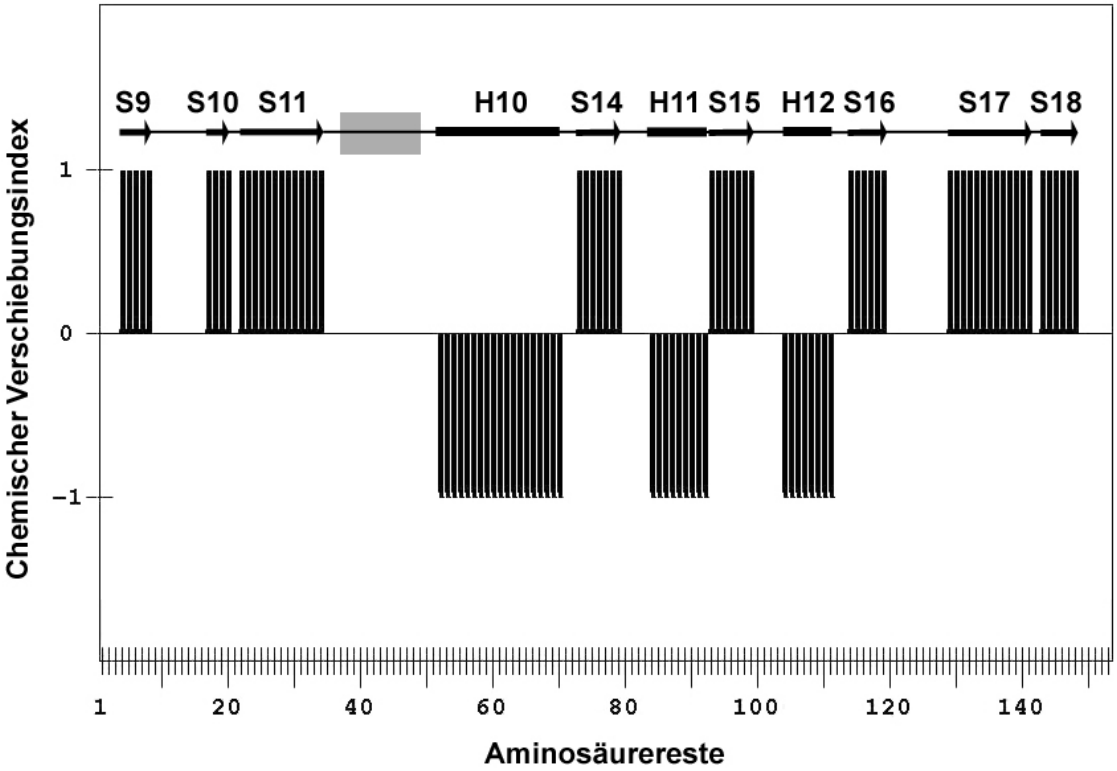


Abb. 4.15.:

Chemischer Verschiebungsindex (Konsensus) für βADT.

Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz (gezählt vom Beginn des βADT-Konstrukts an), auf der y-Achse der chemische Verschiebungsindex aufgetragen. Ein Wert von +1 entspricht dabei einem β-Strang, -1 einer α-Helix, 0 einer ungeordneten Konformation.

Die entsprechenden Sekundärstrukturelemente sind darüber mit Pfeilen für β-Stränge, Balken für α-Helices und Linien für unstrukturierte Regionen angegeben. Grau unterlegt ist der Bereich mit Unterschieden zur Kristallstruktur.

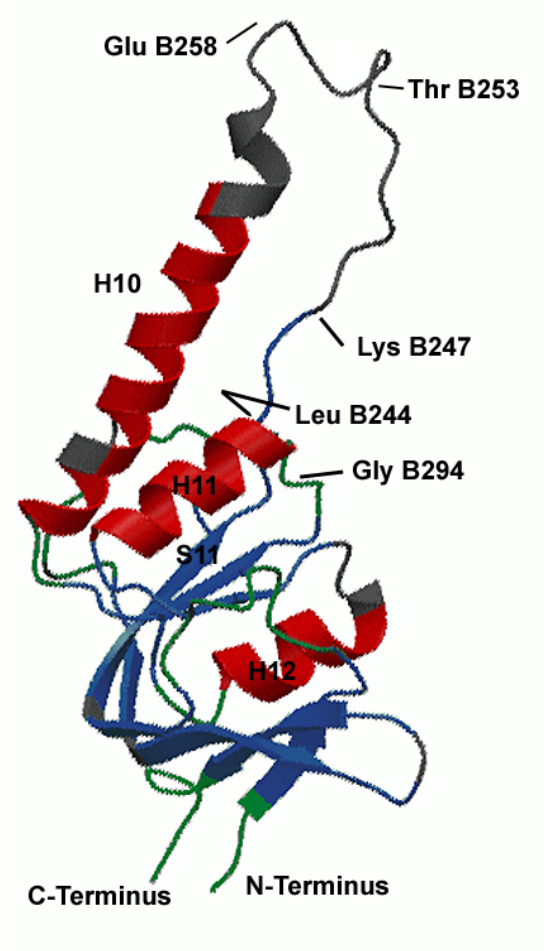


Abb. 4.16.:
Sekundärstrukturelemente der βADT in Lösung. Die Tendenzen der einzelnen Reste sind auf die Kristallstruktur der βADT aufgetragen.
Farbcodierung: rot = α-helikal, blau = β-Strang, grün = Loopregion, ungeordnetes Segment, grau = Proline, überlappende oder nicht zugeordnete Reste.

Die beobachteten Sekundärstruktur-Tendenzen für die einzelnen Aminosäuren wurden auf die Kristallstruktur der βADT aufgetragen (Abb. 4.16). Hieraus wird deutlich, dass das CSI-Muster (Abb. 4.15) in den zugeordneten Bereichen gut auf die Kristallstruktur passt. Allerdings zeigt die Peptidkette nach dem Faltblatt S11 (Leu B240 - Lys B247) in Lösung eindeutige β-Strang-Merkmale, in kristalliner Umgebung dagegen eine gestreckte Konformation. Stabilisierend wirkt hier eine Wasserstoff-Brückenbindung zwischen Leu B244 mit Gly B294 im Loopbereich vor Helix H11. Für den weiteren Verlauf der Peptidkette ab Lys B248 bis zum Beginn der Helix H10 können rigide Strukturelemente ausgeschlossen werden. Nur an der Spitze des Fortsatzes (Ile B257 – Asp B259) zeigen sich schwache Anzeichen kurzer, gestreckter Konformation.

Dynamik-Untersuchungen an der β-apikalen Domäne (βADT)

Um Aussagen zur lokalen Konformation des Proteinrückgrats treffen zu können, wurden $^{15}N\{^{1}H\}$-NOE Experimente durchgeführt (Punkt 3.5). Die zuordnungsfähigen Reste im globulären Teil von βADT zeigten positive Signale und erwiesen sich daher als wenig beweglich. Eine Ausnahme stellte lediglich Asp B356 dar, das in einer Loop-Region liegt. Im Segment von Glu B250 bis Gln B269 verschwanden die NOE-Signale, was hier hauptsächlich auf schnelle Wasseraustauschraten zurückzuführen sein dürfte. Außerdem war die Dichte der beobachteten NOEs an exponierten, eher ungeordneten Stellen eines Moleküls generell niedriger als in geschützten Kernbereichen, so dass sich diese Strukturen häufig als schlecht bestimmbar erweisen (Billeter, 1992). Allerdings können hohe Austauschraten bei Amidprotonen auch als Hinweis auf flexible Konformationen gewertet werden. Zur Verdeutlichung wurden auch hier die Werte der messbaren Reste auf die Kristallstruktur der βADT abgebildet (Abb. 4.17).

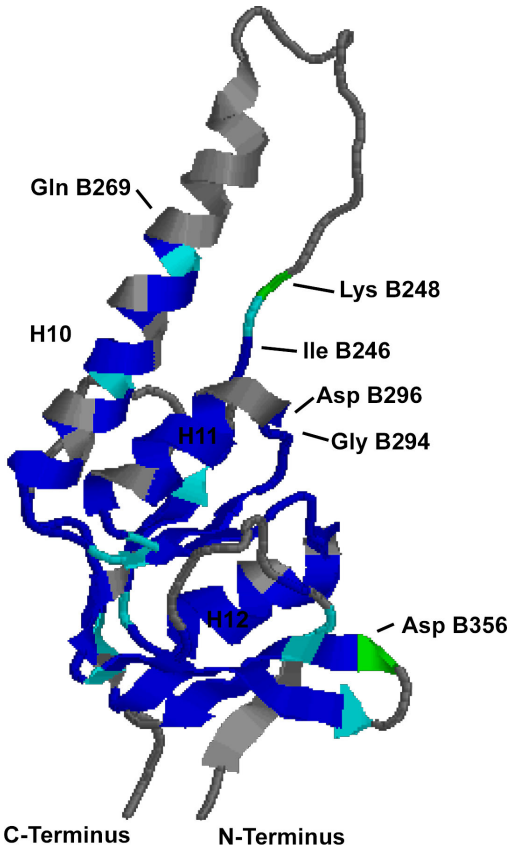


Abb. 4.17.:
$^{1}H^{15}N$ hetNOE-Werte der βADT (Projektion auf die βADT-Röntgenstruktur).
Farbcodierung: dunkel- bis hellblau = starr bis geringe Flexibilität; grün = mittlere Flexibilität; grau = Proline, überlappende oder nicht zugeordnete Reste; (rot entspräche ungeordneten Resten mit hoher Flexibilität).

Die Amidprotonen im Bereich des Fortsatzes kommen erst nach Pro B249 in signifikanter Weise mit dem Lösungsmittel in Kontakt. Von Ile B246 bis Lys B248 nimmt zwar die Flexibilität stetig zu, die Signale sind aber trotz dieser Mobilität und trotz des hohen

pH-Wertes noch erkennbar. Möglicherweise kann diese Beobachtung durch Wasserstoff-Brücken erklärt werden, die auch in der Kristallstruktur vorkommen. Insbesondere handelt es sich hier um Brückenbindungen zwischen den Resten Lys B247 und Glu B270 (Helix H10) sowie zwischen Ile B246 und Asp B296 (vor Helix H11). Dadurch scheinen die Protonen bis Lys B248 vom Lösungsmittel abgeschirmt, aber dennoch bis zu einem bestimmten Grad flexibel zu sein.

4.2.3. Analyse der α-apikalen Domäne (αADT)

NMR-Spektren der αADT wurden von Dipl. Chem. Michael John und Dipl. Chem. Markus Heller (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kessler, Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität München) aufgenommen und interpretiert.
Auch die Proben der αADT zeigten sich nach 15-20 Tagen Messzeit zunehmend instabil. Allerdings konnten die Messungen hier bei pH 5.5, also um mehr als zwei Einheiten niedriger als bei den βADT Proben durchgeführt werden. Dies bewirkt generell einen ca. 100fach langsameren NH-Austauschprozess, so dass eine größere Anzahl an Signalen verwertbar war und zugeordnet werden konnte.

2D –^{1}H-^{15}N-HSQC – Spektrum der αADT [17]

Auch bei αADT konnten nicht für alle Aminosäurereste passende Signale gefunden werden. Da wegen des isoelektrischen Punktes der αADT (pH 8.0) allerdings in einem erheblich günstigeren pH-Bereich gemessen werden konnte (pH 5.5 anstelle von pH 7.8 bei den βADT-Messungen), hatten die Zuordnungsprobleme keinen dissoziativen Grund. Vielmehr kam es wegen geringer Signalverteilung zu häufigen Überlappungseffekten, die durch den hohen Anteil an helikalen Strukturelementen noch verstärkt wurden. Außerdem wurde die Zuordnung durch Störsignale instabiler Proteinbereiche und Linienverbreiterung aufgrund von langsamem konformativem Austausch im µs- bis ms-Bereich erschwert (Abb. 4.18).

[17] Das αADT 1D-Protonen-Spektrum wird nicht separat gezeigt, da es dem der βADT sehr ähnlich ist (vgl. Punkt 4.2.2.).

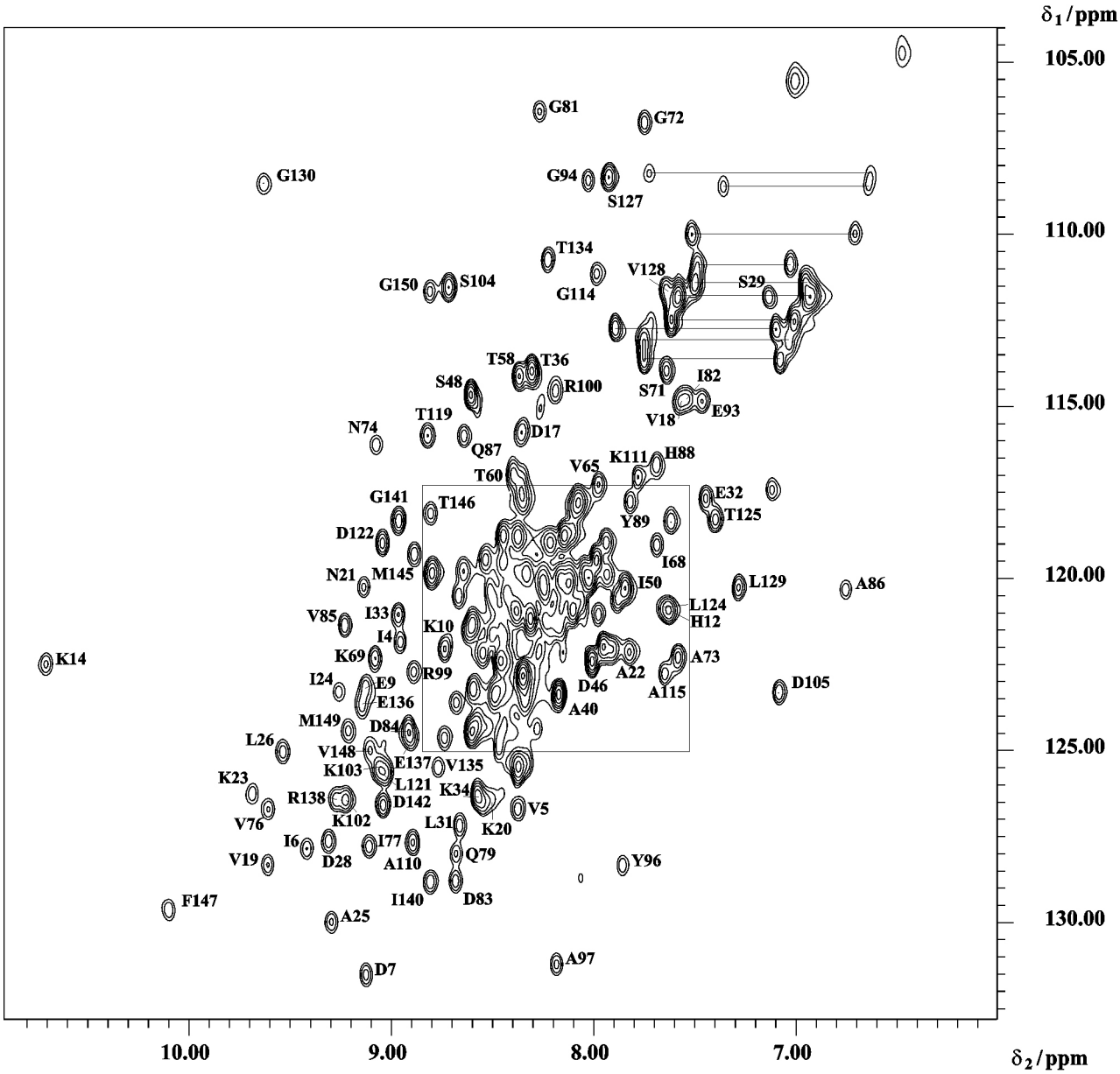


Abb. 4.18.:

Zugeordnetes 2D - ^{1}H-^{15}N- HSQC Spektrum der αADT bei pH 5.5, 315 K und 600 MHz. Der Aminosäuretyp ist als Einbuchstabencode angegeben, die Nummer gibt die Position in der Aminosäuresequenz wieder (gezählt vom Beginn des 153 Aminosäuren langen αADT-Konstrukts an). Die Stickstoff-Frequenz ist auf der y-Achse, die Protonenfrequenz auf der x-Achse eingezeichnet. Die ^{15}N-^{1}H-Amid-Korrelationssignale der Asparagin- und Glutamin-Seitenketten sind mit Linien verbunden. Die Region mit starker Signalüberlappung ist hervorgehoben.

Die Auswirkungen des niedrigeren pH-Wertes bei den αADT-Messungen verdeutlicht Abb. 4.19, in der die Signalzuordnung für 142 der 150 Aminosäuren (ohne Proline) des αADT-Konstrukts anhand der Kristallstruktur aufgezeigt wird.

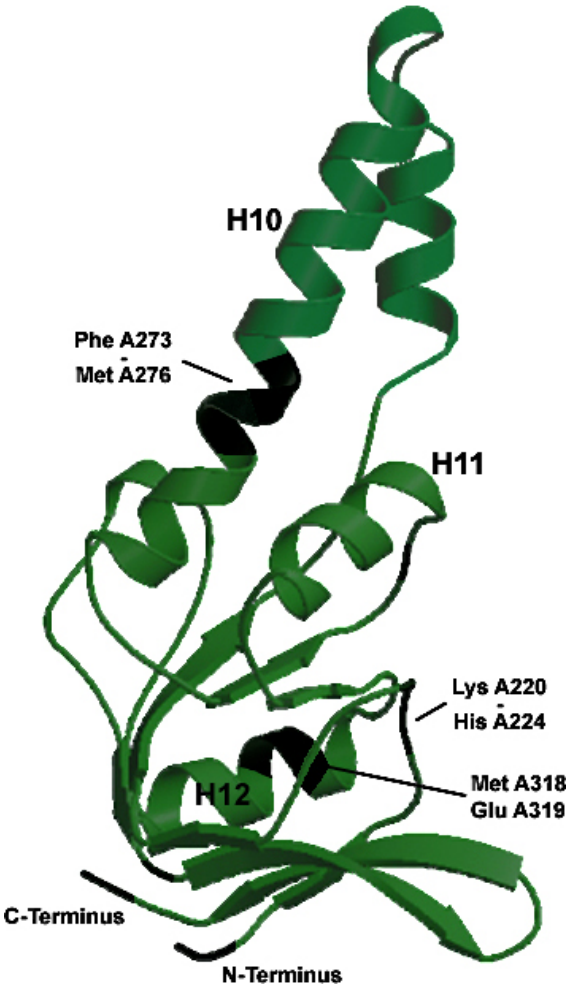


Abb. 4.19.:
Zugeordnete Reste für αADT (illustriert an der αADT-Kristallstruktur).
Grün = zugeordnet, schwarz = nicht zugeordnet oder Prolin.

Im Gegensatz zur βADT finden sich hier eindeutige Resonanzen für den helikalen Fortsatz, lediglich mit Ausnahme von vier Resten im C-terminalen Teil der Heilx H10 (Phe A273 – Met A276). Im Bereich der Helix H12 konnten zwei Reste nicht zugeordnet werden (Met A318 und Glu A319); des weiteren waren nur ein exponiertes Loop-Segment (Lys A220 – His A224) sowie die Termini betroffen.

Bestimmung der Sekundärstrukturelemente

Zur Identifizierung der Sekundärstrukturelemente wurden die gleiche Methoden angewendet wie zuvor für die βADT (Punkt 4.2.2). Die nachfolgenden Abbildungen 4.20 und 4.21 zeigen das ermittelte CSI-Muster sowie die Auftragung der Strukturinformationen auf die Röntgenstruktur der αADT.

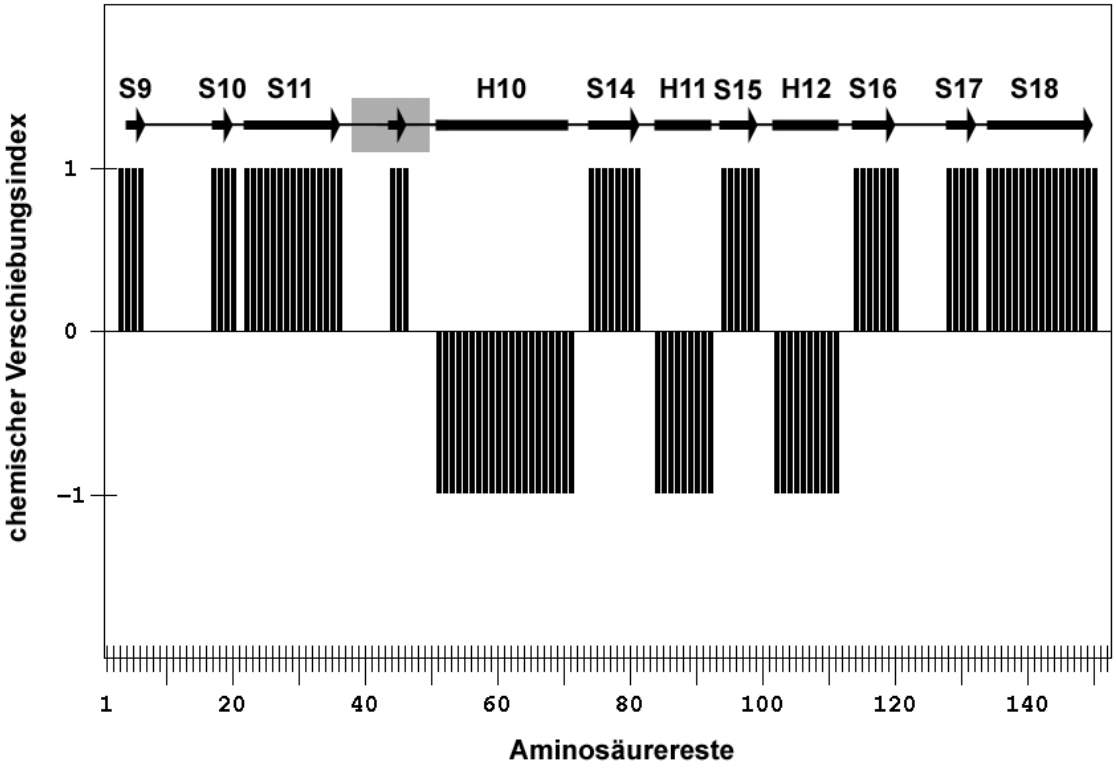


Abb. 4.20.: Chemischer Verschiebungsindex (Konsensus) für αADT.

Auf der x-Achse ist die Aminosäuresequenz (gezählt vom Beginn des αADT-Konstrukts an), auf der y-Achse ist der chemische Verschiebungsindex aufgetragen. Ein Wert von +1 entspricht dabei einem β-Strang, -1 einer α-Helix, 0 einer ungeordneten Konformation.

Die entsprechenden Sekundärstrukturelemente sind darüber mit Pfeilen für β-Stränge, Balken für α-Helices und Linien für unstrukturierte Regionen angegeben. Grau unterlegt ist der Bereich mit Unterschieden zur Kristallstruktur.

Die Sekundärstrukturinformationen aus den CSI-Werten stimmen bezüglich des globulären Kernbereichs wie schon bei βADT größtenteils mit der Kristallstruktur überein. Die Region ab Ala A324 im C-terminalen Teil der Helix H12 sowie das nachfolgende Loop-Segment bis Val A330 scheinen strukturell eher schwach definiert (Abb. 4.21).

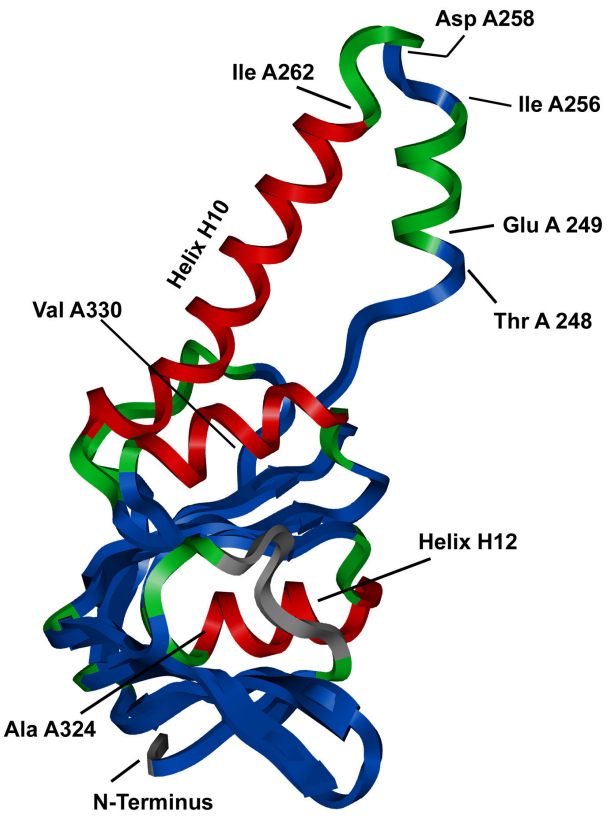


Abb. 4.21.:
Sekundärstrukturelemente der αADT in Lösung.
Die Tendenzen der einzelnen Reste sind auf die Kristallstruktur der αADT aufgetragen.
Farbcodierung:
rot = α-helikal, blau = β-Strang, grün = Schleifenregion, grau = Proline, überlappende oder nicht zugeordnete Reste.

Eine auffällige Diskrepanz zur Röntgenstruktur ist im N-terminalen Teil des Fortsatzes zu beobachten. Während die Peptidkette bis Thr A248 noch in linear-gestreckter Konformation vorliegt, sprechen die chemischen Verschiebungen im Folgesegment (Glu A249 bis Ile A256) für eine ungeordnete Region anstelle der kurzen Helix. *Random coil* - CSI-Werte können bereits ein erster Hinweis auf eine erhöhte Flexibilität sein (Wishart et al., 1991). An der Spitze des Fortsatzes (Ile A256 - Asp A258) tendieren die CSI-Werte wieder kurz zu einer gestreckten β-Konformation. Undeutliche Anzeichen hierfür waren auch in der CSI-Analyse für βADT erkennbar. Für die Reste Glu A263 – Thr A272 zeigen die Sekundärstruktur-Indikatoren übereinstimmend mit der Kristallstruktur α-helikale Tendenz, allerdings nicht in so ausgeprägtem Maße wie im weiteren Verlauf der Helix H10. Der N-Terminus dieser Helix könnte also einem schnellen Übergang zwischen einer aufgewundenen und einer gedeckelten Form unterworfen sein.

Dynamik-Untersuchungen an der α-apikalen Domäne (αADT)

Die deutlichen strukturellen Unterschiede, die sich aus der CSI-Bestimmung für den Fortsatz der αADT im Vergleich zur Kristallstruktur ergaben, legten die Vermutung nach erhöhter Plastizität in diesem Bereich nahe. Um dazu weitere Informationen zu erhalten, wurden auch für αADT $^{15}N\{^{1}H\}$-NOE-Werte gemessen und zur besseren Illustration auf die αADT-Röntgenstruktur abgebildet (Abb. 4.22).

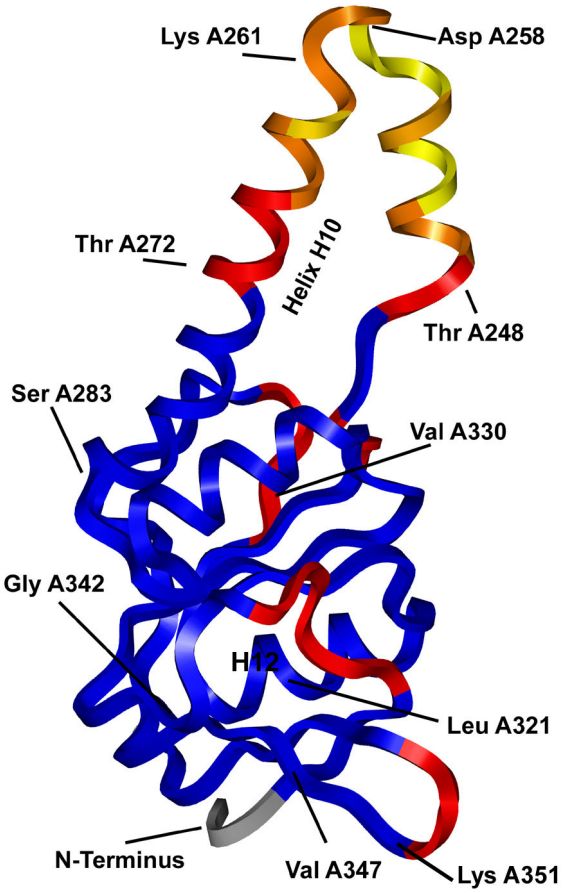
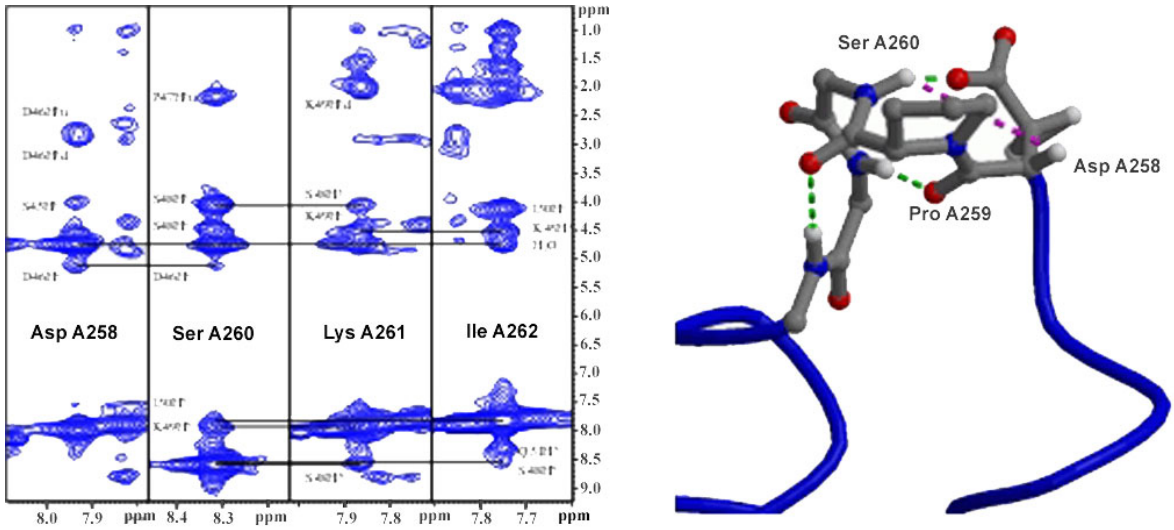


Abb. 4.22.:
Die Kristallstruktur der αADT mit abgebildeten $^{1}H^{15}N$ hetNOE-Werten; Farbcodierung: Dunkelblau = starr, kaum Flexibilität; rot = mäßige Flexibilität; orange bis gelb = hohe bis extreme Beweglichkeit; grau = Proline, überlappende oder nicht zugeordnete Signale.

Die meisten Reste im globulären Teil erwiesen sich auch bei αADT als relativ starre Strukturen. Sogar exponierte Schleifen-Segmente zeigten nur mäßige Mobilität, was auf Wechselwirkungen mit Resten im Kernbereich zurückzuführen ist. So wird zum einen der lange Loop folgend auf Helix H12, welcher im geschlossenen Komplex Kontakte mit der benachbarten apikalen Domäne ausprägen würde (Ditzel et al., 1998), in Lösung durch zwei Wasserstoffbrücken zum β-Faltblatt S11 (Val A330HN – Leu A238CO und Val A330CO – Asp A240HN) sowie durch hydrophobe Kontakte stabilisiert. Zum anderen erhält der Abschnitt zwischen den Faltblatt-Strängen S17 und S18 (Lys A351 – Arg A356)

unerwartete Rigidität durch die Ausbildung einer Haarnadelschleife. Im Gesamt-Thermosom würde dieser Bereich Teil der Schnittstelle zur intermediären Domäne sein.
Der Fortsatzbereich als Ganzes ist dagegen auf der Zeitskala unterhalb von 10 ns gegenüber der Gesamtmolekül-Rotation klar beweglich. Allerdings herrscht im N-terminalen Teil des Fortsatzes bis etwa Thr A248 nur vergleichsweise geringere Flexibilität. Dies spricht (wie schon bei βADT) für das Vorliegen einer linearen Peptidkette, die mit Wasserstoff-Brücken zur gegenüber liegenden Helix H10 hin stabilisiert ist. Der folgende Abschnitt bis hin zur Spitze des Fortsatzes (Glu A249 bis Asp A258) zeigt sich äußerst beweglich (hetNOE-Werte unterhalb 0.3). In Übereinstimmung mit den CSI-Werten sprechen diese Messungen gegen die Existenz einer kurzen Helix, wie sie in der Kristallstruktur der αADT zu sehen ist. Vielmehr scheinen sich hier mehrere kurzlebige Konformationen ständig ineinander umzuwandeln. Die Reste Pro A259 bis Lys A261 sind weniger dynamisch als ihre Umgebung. Analog zu den entsprechenden CSI-Werten für βADT scheint auch hier eine β-Schleife vorzuliegen (Abb. 4.23).



a) b)

Abb.4.23.:

a: Zusammenfassende Darstellung der NOE-Daten in der β-Schleifenregion Asp A258 – Lys A261

b: Vergrößerung des entsprechenden Fortsatzsegments mit Markierung der Wasserstoff-Brücken

Eine weitere Parallele zur den Befunden für βADT ergibt sich am N-Terminus der folgenden Helix H10. Verglichen mit für definierte Sekundärstrukturelemente üblichen Werten zeigten sich die Reste Gln A263 bis Thr A272 relativ bis stark beweglich. Die Aminprotonen tauschen in diesem Bereich auch in signifikanter Weise mit dem Umgebungswasser aus, könnten also zumindest temporär nicht durch Wasserstoffbrücken zum Helix-Rückgrat abgeschirmt sein. Diese Beobachtung dürfte die fehlende Zuordnung der beiden Reste im Bereich der Helix H10 erklären und – ebenso wie bei βADT – für ein Ausfransen dieses helikalen *N-Caps* sprechen. Die C-terminale Hälfte der H10 verläuft dagegen, gemessen an der Periodizität der φ-Winkel wieder amphiphil, so dass nur bei den exponierten Amidprotonen moderater Austausch stattfindet. Eine Ausnahme bildet lediglich Ser A283 am C-terminalen Ende der H10, dessen polare Seitenkette offenbar in Richtung des globulären Bereichs gedrängt und somit völlig vom Lösungsmittel abgeschirmt wird.

Artifiziellen Ursprungs dürften schließlich verbreiterte Signale an den Termini, im C-terminalen Teil der Helix H12 und im Beginn des folgenden Loops, sowie im β-Faltblatt S16 sein (Leu A321 – Val A330; Gly A342 – Val A347). Generell könnten derartige Signale zwar als Hinweise auf Protein-Protein-Interaktionen gedeutet werden, jedoch stellen die Lage dieser Reste im Gesamt-Thermosom (exponierte Kontaktflächen zu Nachbar-Untereinheiten bzw. hydrophobe Fläche in Übergang zur intermediären Domäne), vor allem aber die Aggregationsneigung der Probe die Signifikanz dieser Beobachtungen in Frage.

5. Diskussion

5. Strukturvergleich von substratbindenden Domänen archaealer und eukaryotischer Gruppe II Chaperonine

5.1. Kristall- und NMR- Strukturen unterscheiden sich häufig in kleinen, aber bedeutsamen Eigenschaften

Seit etwa 15 Jahren werden bereits Kristallstrukturen mit NMR-spektroskopischen Untersuchungen desselben Moleküls oder eines Homologen verglichen. Die Autoren Billeter (1992) und Wagner et al. (1992) kommen in Übersichtsartikeln zu diesem Thema zu dem Schluss, dass sich Röntgen- und NMR-Strukturen in der Regel nur in wenigen Aspekten voneinander unterscheiden, beispielsweise durch unterschiedliche Orientierungen einzelner Seitenketten, seltener auch des Proteinrückgrats. Trotz der oft unphysiologischen Umgebung im Kristall bilden Röntgenstrukturen meist den aktiven Zustand eines Proteins ab. Wegen der häufig dichten Packung im Kristallgitter können jedoch Modifikationen an der Oberfläche auftreten. Ein Problem stellen zudem die experimentellen Bedingungen bei der Kristallisation dar, z.B. pH-Wert oder Salzkonzentration. Zwar wirken diese Faktoren meist nur ionisierend auf Seitenketten und Termini, teilweise kann es aber durchaus zu Auswirkungen auf flexible, exponierte Reste kommen. Da gerade dort mögliche Interaktionen mit anderen Proteinen stattfinden, sind genaue Kenntnisse über die Oberflächen-Beschaffenheit von biologischen Makromolekülen für das Verständnis ihrer Funktionen entscheidend (Billeter, 1992; Wagner et al., 1992). Hierbei zeigt sich der Vorteil der NMR- gegenüber den röntgenkristallographischen Techniken: Die Experimente finden nicht in kristalliner Umgebung, sondern in Lösung statt, die Bedingungen nähern sich somit eher physiologischen Verhältnissen an. Bisher stellte die Beschränkung auf Proteine von kleiner bis mittlerer Größe den größten Nachteil der NMR-Technik dar. Allerdings wird die Auflösung ständig verbessert, so dass diese Methode in Zukunft immer häufiger zur Strukturaufklärung herangezogen werden kann.

5.2. Eine vergleichende Kristallstruktur-Analyse der apikalen Domänen des Thermosoms zeigt segmentale Plastizität

Alle bisher bekannten Kristallstrukturen von apikalen Domänen aus archaealen Chaperoninen stimmen in ihren globulären Teilen weitgehend überein (Klumpp, 1997; Ditzel, 1998; Bosch, 2000) (vgl. Abb. 5.1). Wie unter Punkt 4.1.6. bereits erwähnt weichen die r.m.s.d.-Werte der entsprechenden Kernbereich - C_α-Positionen nur zwischen 0.49 und 0.71 $Å^2$ voneinander ab. Die auffälligsten lokalen Unterschiede ergeben sich in den N-terminalen Abschnitten der Fortsätze, welche bei allen Gruppe II Chaperoninen ein hochkonserviertes Motiv darstellen. Bei einem Vergleich der entsprechenden Abschnitte der isolierten Domänen mit ihren Äquivalenten im Gesamtkomplex (Glu A244 – Gln A254 bzw. Glu B245 – Thr B253) fällt die strukturelle Diskrepanz besonders auf (Abb. 5.1). In der βADT-Kristallstruktur hat dieser Bereich die Gestalt eines gestreckten β-Stranges, wohingegen er bei der αADT eine kurze α-Helix bildet. Im Gesamtkomplex nehmen die entsprechenden Peptidstränge zwar auch eine β-artige Konformation an, allerdings weicht der Hauptkettenverlauf um mehr als 10 Å von dem der βADT ab. Diese beträchtliche Abweichung wird hauptsächlich durch zwei Faktoren hervorgerufen: Erstens rotiert die Region Glu B245 – Pro B249 um beinahe 43° um die Reste Pro B243 – Leu B244. Zweitens fehlt in der βADT-Struktur der scharfe Knick an der Position ProB249, welcher den Bereich Glu B245 – Glu B258 im geschlossenen Gesamtkomplex in zwei fast orthogonal zueinander angeordnete β-Stränge teilt (S12 und S13 im Gesamt-Thermosom). Außerdem fällt auf, dass die Reste Asn B254 – Ile B257 in der βADT-Struktur ein äußerst flexibles Loop-Segment mit außergewöhnlich hohen B-Faktoren bilden (53 $Å^2$ über dem mittleren B-Faktor). Im β-Strang S13 des geschlossenen Thermosoms hingegen sind sie Teil des kreisförmig geschlossenen, parallelen β-Faltblatts, welches den Zugang zur zentralen Kavität verschließt. Die Plastizität der beschriebenen Segmente weist daher möglicherweise auf eine bedeutsame Rolle für die Funktion im Gesamtkomplex hin.

Beachtlich ist auch die Beweglichkeit der Helix H10, welche durch die Rotationsfähigkeit um 27°, gemessen am Vergleich der Helixpositionen in βADT, αADT – bzw. im Gesamtkomplex, deutlich wird. Dabei bleibt aber die generelle Struktur und das Profil der Wasserstoffbrücken erhalten. Diese segmentale Bewegung der Helix H10 lässt sich durch eine Hebelbewegung um den Abschnitt Glu B276 – Val B278 erklären. Bereits bei einem früheren Vergleich der beiden Kristallformen der αADT wurde in diesem Bereich (Gln A275 – Val A277) eine Torsion um 12° beobachtet (Klumpp et al., 1997).

Die extremen strukturellen Veränderungen, welche die irisartige Schließung des Deckel-Faltblatts mit sich bringt, werden durch die große Plastizität der Fortsätze und durch diesen zusätzlichen Hebelpunkt innerhalb der Helix H10 erst möglich.

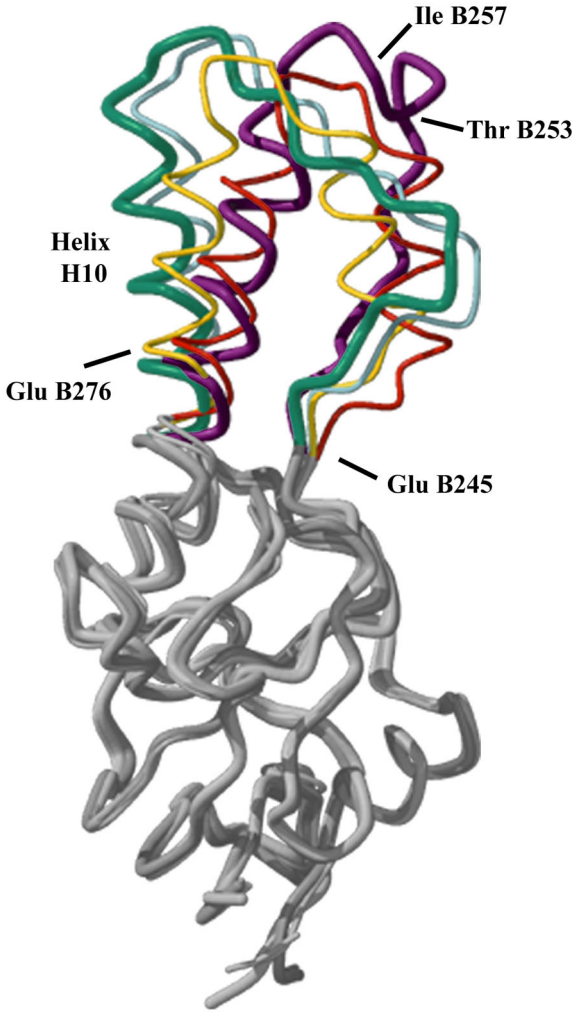


Abb. 5.1.:
Vergleichende Abbildung der Kristallstrukturen der apikalen Domänen des Thermosoms
Die Strukturen der isolierten αADT (Kristallform A = gelb; Kristallform B = rot), der isolierten βADT (violett) sowie der Domänen im geschlossenen Thermosom (grün und blau) wurden farblich kodiert übereinander gelegt, wodurch die strukturelle Diskrepanz im Bereich der jeweiligen Fortsätze besonders deutlich wird. Die globulären Anteile unterscheiden sich hingegen kaum voneinander und sind - für alle Strukturen gleich - in grau dargestellt.

Die N-terminalen Peptidsegmente der Fortsätze nehmen in jeder der vorliegenden Röntgenstrukturen eine andere Sekundärstruktur ein. Besonders ausgeprägt ist diese Plastizität allerdings im Fall der αADT, die zwischen Lys A247 und Gln A255 je nach Umgebung eine kurze α-Helix (isolierte αADT) oder zwei kurze β-Stränge (geschlossenes Thermosom) bildet. Hier kann man vom Vorliegen einer kontext-abhängigen Chamäleon-Sequenz sprechen, wie sie unter anderem schon für die Switch I Region des Elongationsfaktors EF-Tu (Abel et al., 1996; Polekhina et al., 1996) und den ternären Komplex von MATα2 mit dem Transkriptionsfaktor MCM1 und DNA (Tan & Richmond, 1998) beschrieben wurde. Wie stark der Einfluss der Tertiärinteraktionen auf derart variable Sequenzen sein kann, demonstrierten auch Minor & Kim (1996), indem sie ein

konstruiertes Peptid in verschiedene Domänen einpflanzten und die Struktur des Peptids (α-helikal oder β-Strang) in der jeweiligen Umgebung analysierten. Dass die Gestalt der Fortsätze aber nicht allein durch derartige Einflüsse, sondern natürlich auch durch die strukturellen Propensitäten der Sequenzreste bestimmt wird, verdeutlicht das Beispiel der βADT-Struktur. Hier zeigen sich zwar Unterschiede zwischen der isolierten (gestreckter β-Strang) und der geschlossenen Form (2 kürzere β-Stränge), jedoch wäre die Tendenz zu α-helikaler Konformation aufgrund des Prolin-Restes an Position B249 äußerst gering. Aus einer Sekundärstruktur-basierten Sequenz-Alignierung einiger eukaryotischer und archaealer Chaperonin-Untereinheiten (Klumpp et al., 1997, diese Arbeit Punkt 5.4, Abb. 5.5) geht hervor, dass in CCTδ- und CCTε- sowie in mehreren archaealen Untereinheiten Proline an einer äquivalenten Position vorkommen, was die Tendenz zur Bildung einer Helix auch hier unwahrscheinlich erscheinen lässt.

CCT konnte bisher (ohne Substrat) nur ATP-komplexiert in einer asymmetrischen Form mit einem geschlossenen und einem offenen Ring bei niedriger Auflösung abgebildet werden (Llorca et al., 1999a). Diese Rekonstruktionen stimmen aber in der geschlossenen Hälfte mit den Umrissen des Gesamt-Thermosoms so gut überein, so dass die Annahme zulässig ist, auch die Konformationen der CCT-Fortsätze könnten einander nach der Schließung der Kavität trotz einiger Unterschiede in der Primärsequenz ähnlich sein.

Der Einfluss der Kristallpackung und der Kristallisationsbedingungen

Die hohe konformationelle Varianz in den Strukturen der einzelnen Domänen-Fortsätze wird offenbar größtenteils durch die jeweilige Kristallpackung bestimmt. Im Fall von βADT sind etwa 24 % (472 $Å^2$) der Gesamtoberfläche von 1931 $Å^2$ in Kristallkontakte involviert. Ähnliches gilt für die beiden αADT Kristallstrukturen (32 bzw. 37 %) als auch für die Kontakte zwischen den Untereinheiten im Bereich der apikalen Domänen im Gesamt-Thermosom (42 %). Valdar & Thornton beobachteten in einer Arbeit über die Diskriminierung von biologischen und nicht-biologischen Kristallkontakten, dass relevante Packungsinteraktionen generell die größte Kontaktfläche eines Moleküls darstellen und konservierte Reste mit einbeziehen (Valdar & Thornton, 2001). Die bei weitem ausgeprägtesten Packungsinteraktionen befinden sich auch in den isolierten apikalen Domänen im Bereich der Fortsätze (12.8 bzw. 15.2 % der zugänglichen Oberfläche) und umfassen mehrere hochkonservierte Reste. Da die Kontaktflächen der isolierten apikalen Domänen jedoch in dieser Ausprägung *in vivo* nicht zustande kommen, können sie nur sehr

bedingt als Modelle für mögliche Interaktionen mit Sekundärstrukturelementen anderer Moleküle angesehen werden. Sie könnten jedoch eine Erklärung für die ausgeprägte Tendenz der Domänen zur Assoziat-Bildung liefern, welche bereits in durch die in dieser Arbeit gezeigten Gelfiltrations-Experimente (Punkt 4.1.2.) und Nativgele (Punkt 4.1.1. und Diplomarbeit G. Bosch, 1998) deutlich wurde. Für die genauen Kontakte in den βADT - Kristallen finden sich weder bei αADT noch im Gesamt-Thermosom Entsprechungen. Im geschlossenen Thermosom (Abb. 5.2c) wird der auffällige Knick in diesem Strang (nahe Pro B249) offenbar durch intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Lys B247NZ und Glu B250O mit dem hochkonservierten Glu A269 der benachbarten Untereinheit stabilisiert. In den βADT-Kristallen bilden die entsprechenden Reste Lys B247 und Glu B270 eine intramolekulare Salzbrücke aus. Die Reste Glu A269 bzw. B270 könnten im Funktionszyklus des Thermosoms eine wichtige Rolle spielen, da die Mutation eines entsprechenden Restes in CCT aus Hefe zu ausgeprägten funktionalen Defekten führt (Lin et al., 1997). In den Kristallen der α-apikalen Domäne (Abb. 5.2a) umfassen die Kristallkontakte hauptsächlich die kurzen helikalen Segmente der Fortsätze, was zur Ausbildung eines 4-Helix-Bündels führt (Klumpp et al., 1997). Den Extremfall stellt in dieser Hinsicht aber die Ausbildung des kreisförmigen β-Faltblatts (*β-barrel plug*) im geschlossenen Thermosom dar (Abb. 5.2c), welches durch die gegenseitigen Kontakte hauptsächlich hydrophober Reste aus äquivalenten β-Strang-Segmenten (S13) benachbarter Untereinheiten stabilisiert wird (Ditzel *et al*., 1998). Allerdings könnten sich in diesem Fall die Kristallisationsbedingungen (2 M Ammoniumsulfat, 0.1 M Natriumacetat, pH 5.6) zusätzlich Struktur-unterstützend auf die äußerst kompakte Anordnung vor allem der apikalen Domänen im Gesamtkomplex ausgewirkt haben, da Sulfationen hydrophobe Interaktionen fördern. Der Einfluss von hohen Ammoniumsulfat-Konzentrationen auf die Schließung des Thermosoms konnte kürzlich mittels Neutronen-Streuung gezeigt werden (Gutsche et al., 2000a). Auch die Verformbarkeit gerade von großen, oligomeren Molekülkomplexen durch Packungsinteraktionen bei der Kristallisierung ist an mehreren Beispielen dokumentiert (Svergun et al., 1997). Llorca und Kollegen konnten die Röntgenstruktur des geschlossenen Thermosoms zwar gut in die asymmetrische, halb-offene KryoEM-3D-Rekonstruktion eines ATP-komplexierten CCT-*cis*-Rings einpassen, allerdings waren die für die Deckelschließung verantwortlichen Fortsätze aufgrund der geringen Auflösung von 28 Å nicht sichtbar.

Außerdem gelang die Anpassung nur im ATP-bindenden CCT-Ring, nicht aber im ATP-freien und in CCT offenen *trans*-Ring, da das kristallisierte Thermosom (auch ohne Nukleotidbindung) in beiden Ringen in streng geschlossener, eher kugeliger Konformation vorliegt (Llorca et al., 1999a). An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass in neueren Kryo-EM-Rekonstruktionen von Chaperoninen-Präparationen aus *Thermoplasma acidophilum* (rekombinantes α-only-Thermosom) und *Sufolobus shibatae* (Wildtyp TF55) neben offenen und asymmetrischen auch ein komplett geschlossener Zustand beobachtet werden konnte (Schoehn et al., 2000a und 2000b). Dieser wirkte bei einem Anpassungsvergleich mit der Kristallstruktur des geschlossenen Thermosoms etwas weniger kompakt. Allerdings traten alle drei Zustände in Präparaten mit und ohne Nukleotide gleichzeitig auf, was Zweifel an der Intaktheit der Proben erlaubt.

Auch für αADT kann ein stabilisierender Einfluss des Ammoniumsulfats im Kristallisationspuffer (3.0 M Ammoniumsulfat, 0.1 M Natriumcitrat, pH 3.8); Klumpp et al., 1997) angenommen werden. Die α-helikale Anordnung im N-terminalen Abschnitt des αADT-Fortsatzes dürfte jedoch hauptsächlich durch die Ausbildung des 4-Helix-Bündels mit einem symmetrieverwandten Molekül im Kristallgitter zustande kommen. (Klumpp et al., 1997, Weber & Salemme,1980). In Abb. 5.2a wird deutlich, dass diese Anordnung die Verminderung der zugänglichen hydrophoben Gesamtoberfläche ermöglicht und das Dimer thermodynamisch stabilisiert ist. Durch diesen Abschirmungseffekt lässt sich auch erklären, warum die Seitenketten dieser kurzen Fortsatz-Helix nicht amphiphil angeordnet sind, sondern einige der hydrophoben Reste (z.B. Ile A256) zur Außenseite des Moleküls hin, aus der hydrophoben Fläche heraus orientiert sind. Da die Neigung zur Helix-Bildung sowohl von Sequenzvariationen als auch stark vom strukturellen Kontext abhängig ist (Serrano et al., 1992; Minor & Kim, 1996), liefern die Auswirkungen der stringenten Packungsinteraktionen in den αADT-Kristallen bereits Hinweise auf eine möglicherweise unterschiedliche, flexiblere Konformation dieses Abschnitts in Lösung. Auch in den Kristallen der βADT wird der gestreckte β-Strang des Fortsatzes durch intensive Packungsinteraktionen stabilisiert (Abb. 5.2b).

Abb. 5.2.:
Einfluss der Kristallpackung auf die Sekundärstrukturen der thermosomalen Fortsätze.
a) und b) Interaktionen zwischen symmetrieverwandten Molekülen in Kristallen der isolierten α- und β-apikalen Domäne. Nur jeweils ein Monomer ist farblich markiert. Die Kontaktregionen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. c) Aufsicht auf das geschlossene Thermosom; gelb gekennzeichnet ist die Hauptkontaktregion, das zirkulär geschlossene β-Faltblatt. Abb. 5.2a und 5.2c wurden aus den PDB-Einträgen 1ASS (Klumpp et al., 1997) bzw. 1A6D (Ditzel et al., 1998) erstellt. Die Nomenklatur folgt den Angaben bei Ditzel et al., (1998).

Erhöhte B-Faktoren in den βADT-Kristallen lieferten bereits Hinweise auf eine erhöhte Beweglichkeit im N-terminalen Fortsatzsegment, die sich schon aus der Aminosäuresequenz ergibt (vgl. Klumpp et al., 1997 und Punkt 5.4, Abb. 5.5). An der Basis aller Gruppe II Fortsatzsegmente fällt eine Ansammlung von Resten mit langen, polaren Seitenketten auf, welche die konformationelle Entropieneigung dieser Region erhöhen.

Bestätigt wurden diese Beobachtungen kürzlich durch die Kristallstruktur der γ-apikalen Domäne aus dem CCT-Komplex der Maus γCCT-AD (Pappenberger et al., 2002). Wie in Abb. 5.3 zu sehen ist, ähnelt sie in ihrer Gesamt-Topologie den archaealen Substratbindungsdomänen, die Kristallkontakte beschränken sich jedoch auf die Bodenflächen der globulären Teile (S9, S15, S16 und S17), welche im Gesamtkomplex die Schnittstelle zu den intermediären Domänen darstellen würden. Somit sind die

Fortsatzsegmente hier keinem formenden strukturellen Kontext unterworfen. Außerdem lagen physiologischere Kristallisationsbedingungen vor (100 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM Natriumchlorid, 10 mM Magnesiumacetat), demnach auch keine zusätzlichen Einflüsse durch hochkonzentrierte, kosmotrope Salze. Auffällig ist, dass das in thermosomalen Fortsätzen strukturell variable, N-terminale Fortsatz-Segment hier nicht aufgelöst werden konnte (Lys 248 – Asp 263), was die Autoren auf zu hohe Beweglichkeit zurückführten. Dies bestärkt die Vermutung, dass die ausgeprägten Kristallkontakte in den entsprechenden Fortsatz-Abschnitten der thermosomalen Domänen, vor allem aber bei αADT, eine ursprünglich stärkere Flexibilität kaschieren und die gezeigten Röntgenstrukturen als eine Art Schnappschuss unter mehreren möglichen Konformationen anzusehen sind. Die folgenden Analysen der isolierten Substratbindungsdomänen des Thermosoms in Lösung bestätigten diese Thesen.

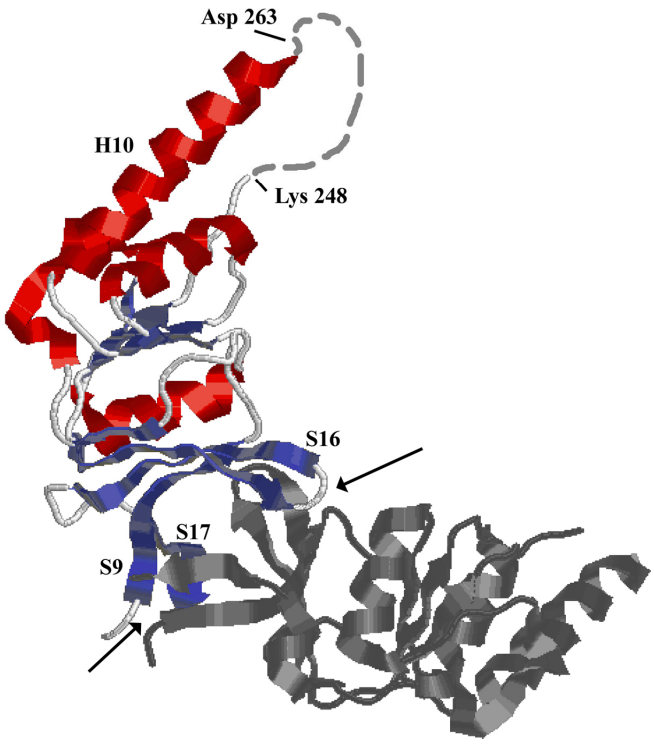


Abb. 5.3.:
γ-apikale Domäne des CCT-Komplexes (γCCT-AD) aus *Mus musculus*, erstellt aus dem PDB-Eintrag 1GML (Pappenberger et al., 2002).

Abb. 5.3 zeigt die Kristallstruktur der isolierten γCCT-AD und Packungsinteraktionen zwischen symmetrieverwandten Molekülen in den Kristallen der γCCT-AD. Nur ein Monomer ist farblich markiert. Die Kontaktregion ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Der Fortsatzabschnitt ohne auflösbare Elektronendichte (Lys 248 – Asp 263) wurde gestrichelt dargestellt. Die Nomenklatur folgt den Angaben bei Ditzel et al., (1998).

5.3. NMR-spektroskopische Untersuchungen an den thermosomalen Substrat-Bindungsdomänen beweisen die hohe Flexibilität der Fortsatz-Segmente

Wie erwartet entsprachen Lage und Vorkommen der Sekundärstrukturelemente in den globulären Kernbereichen bei αADT und βADT in Lösung im wesentlichen den Verhältnissen in den Röntgenstrukturen. Die auffälligsten Unterschiede zu den Kristallstrukturen waren in den Fortsätzen zu beobachten. Allgemein lässt sich sagen, dass die hetNOE-Messungen die bereits anhand der B-Faktoren in den βADT- und γCCT-AD-Kristallstrukturen vermutete Beweglichkeit der Fortsatz-Regionen bestätigten. Besonders die N-terminalen Abschnitte der Fortsätze von αADT und βADT zeigten sich in Lösung äußerst flexibel. In beiden Proteinen fehlten in diesen Bereichen die in den Kristallstrukturen vorhandenen Sekundärstrukturelemente. Tendenzen zu α-helikaler Konformation bei αADT bzw. gestreckter β-Strang-Konformation bei βADT wären allenfalls kurzlebiger Natur und gehörten keiner signifikanten Struktur-Population an. Beiden thermosomalen Domänen gemein ist auch die Bildung einer β-Schleife an der Spitze der Fortsätze. Interessanterweise neigen sowohl αADT und βADT in Lösung sowie auch die kristallisierte γCCT-AD zur partiellen Aufwindung am N-terminalen Ende der Helix H10. Diese Tatsache erhöht die Beweglichkeit des ungeordneten Fortsatzsegments zusätzlich. In den Kristallen der αADT und βADT dagegen werden die *N-Caps* dieser Helices durch Kristallkontakte stabilisiert und dadurch etwas elongiert. In der γCCT-AD-Struktur finden sich hier keine unterstützenden Kontakte, so dass es auch in kristalliner Umgebung zum Ausfransen der Helix kommt. Diese Übereinstimmung lässt die Vermutung zu, dass *Helix-Uncapping* eine für Gruppe II Chaperonine intrinsische Eigenschaft sein könnte. In Lösung scheinen destabilisierende Faktoren zum Tragen zu kommen, wie beispielsweise für das *N-Cap* einer Helix ungünstige hydrophobe oder langkettige Reste, welche die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zum Helix-Rückgrat behindern (Richardson & Richardson, 1988, Serrano & Fersht, 1989, Serrano et al., 1992). Sie fördern die Hydratisierung, wofür auch die bis Thr A272 reichenden, signifikanten Austauschraten der Amidprotonen sprechen.

Die außergewöhnliche Plastizität an der Spitze der Fortsätze und deren wahrscheinliche Exposition in einem offenen Zustand der Chaperonine dürfte diese Abschnitte für proteolytischen Abbau leicht zugänglich machen. Hierin liegt möglicherweise der Grund für die starke Protease-Anfälligkeit der Domänen (vgl. Punkt 4.1.1). Auch für mehrere

apikale Domänen von CCT konnte gezeigt werden, dass sie im apo-CCT-Zustand verstärkt proteolytisch abgebaut wurden. Erst nach Zugabe von MgATP (und somit der Schließung des Komplexes) wurden die flexiblen Segmente wohl durch Bildung der Deckelstruktur geschützt (Szpikowska et al, 1998).

Bereits in früheren Arbeiten konnten NMR-Analysen signifikante Unterschiede zwischen Kristall- und Lösungsstrukturen aufzeigen, welche für das funktionelle Verständnis des Moleküls wichtig waren. So fielen beispielsweise bei NMR-spektroskopischen Untersuchungen der Komplement-System Komponente C3a (Nettesheim et al., 1988; Chazin et al., 1988) Diskrepanzen in einigen Sekundärstrukturelementen im Vergleich mit der Röntgenstruktur (Huber et al., 1980) auf. Unter anderem wurde in der Kristallstruktur das *N-Cap* einer Helix im aktiven Zentrum von C3a künstlich durch intensive Packungskontakte stabilisiert und elongiert. In Lösung ging diese Helix einige Windungen weit auf, war somit verkürzt und beweglicher.

Eine Analogie zu den oben geschilderten Unterschieden im N-terminalen Fortsatzsegment der αADT-Struktur im Kristall und in Lösung liefert ein Vergleich der NMR- und Röntgenstrukturen des Cystein-Proteinase-Inhibitors Cystatin aus Hühnereiweiß (Bode et al., 1988; Dieckmann et al., 1993; Engh et al., 1993). Ein hochkonserviertes, 9 Aminosäuren langes, α-helikales Segment in kristalliner Umgebung stellt sich ohne den Struktur-induzierenden Einfluss von Packungsinteraktionen und Kristallisations-bedingungen als weitgehend ungeordnet dar. Die Autoren sehen in der Flexibilität dieses Abschnitts eine indirekte Unterstützung für die Substraterkennung, da so die Beweglichkeit der angrenzenden Bindungsregion erhöht wird.

5.4. Bewertung der vorliegenden Strukturinformationen und mögliche Implikationen für Substratinteraktionen bei Gruppe II Chaperoninen

Strukturelle Unordnung als intrinsische Eigenschaft in den Fortsätzen von Gruppe II – apikalen Domänen

Durch die vorliegenden Kristallstruktur-Varianten der verschiedenen apikalen Domänen wurde die außergewöhnliche Plastizität des Fortsatz-Segments deutlich. Allerdings sollten die Röntgenstrukturen, besonders unter dem Gesichtspunkt der teilweise recht unphysiologischen Kristallisationsbedingungen, vornehmlich als Momentaufnahmen angesehen werden. Sie stellen jeweils eine von mehreren möglichen Strukturvarianten dar,

welche die Fortsätze im Lauf des Funktionszyklus annehmen könnten, sobald die strukturelle Umgebung einen Übergang in eine stereochemisch passende Konformation induzierte. Die Erkenntnisse aus den NMR-Untersuchungen liefern dagegen Informationen über die Konformation der Domänen in Lösung, ohne Einflüsse der Kristallisationsbedingungen und störende Gitterkontakte. Sie könnten also als Hinweise auf die Struktur-Populationen gewertet werden, wie sie möglicherweise in einem offenen, substrat-ungebundenen Zustand des Thermosoms vorliegen.

Durch die Kernspinresonanz-Untersuchungen wurde besonders die intrinsische Unordnung im N-terminalen Abschnitt der Fortsätze deutlich. Die Tendenz der Fortsatz-Helix H10 zur partiellen Aufwindung, wie sie sowohl für die thermosomalen als auch für die γCCT-apikale Domäne gezeigt wurde (diese Arbeit bzw. Pappenberger et al., 2002), erhöht die Beweglichkeit dieses Segments weiter. Außerdem trägt ein zusätzlicher Hebelpunkt im C-terminalen Abschnitt der Helix H10 (Klumpp et al., 1997) zur Beweglichkeit des gesamten Fortsatz-Segments bei (vgl. Punkt 5.2). Ungeordnete Sequenzen sind für zahlreiche biologischen Funktionen von entscheidender Bedeutung, beispielsweise für molekulare Erkennungsprozesse, Regulationsmechanismen und Membrantransport (neuere Zusammenstellungen geben die Arbeiten von Wright & Dyson, 1999; Dunker et al., 2001, 2002). Der Vorteil hochflexibler Bereiche für solche Protein-Protein-Interaktionen liegt in ihrer Fähigkeit, sich mehreren verschiedenen Substraten anzupassen (*induced fit)*. Hierbei kommt es häufig zu Übergängen von der ungeordneten in eine geordnete Konformation (*disorder-to-order-transition*). Ausprägung, Spezifität und Affinität der Bindungsreaktion hängen dabei stark von der Komplementarität der jeweiligen Partner ab, somit von den beteiligten Resten, deren strukturellen Propensitäten, der Größe der Kontaktfläche und damit des hydrophoben Effekts sowie der Art der Interaktionen (hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen). Sowohl die Tendenz zur Bindung eines bestimmten Liganden als auch zur späteren Ablösung werden von der thermodynamischen Bilanz der Bindungsreaktion bestimmt, also von der Bindungsenthalpie ΔH sowie vom Entropieverlust ΔS für die ungeordnete Region bei einem Übergang in eine geordnete Konformation. So ist eine präzise thermodynamische Feinabstimmung je nach Beschaffenheit der beteiligten Liganden gegeben (Schulz, 1979; Wright & Dyson, 1999). Beachtenswert erscheinen in diesem Zusammenhang bereits im Jahr 1982 veröffentlichte Arbeiten am aktiven Zentrum der Triosephosphat-Isomerase (TIM): Alber und Kollegen schlugen vor, dass sich ein stark beweglicher Loop im aktiven Zentrum des Enzyms im Substrat-ungebundenen Zustand in einem ständigen Gleichgewicht zwischen mehreren

flexiblen Konformationen bewegt, also nicht etwa nur eine Art Umschalten zwischen bestimmten definierten Zuständen vollführt. Erst die Interaktion mit einem Bindungspartner würde im Zuge des Übergangs in einen geordneten Zustand (*disorder-to-order-transition*) eine passende Sekundärstruktur induzieren (Alber et al., 1983).

In einer neueren Veröffentlichung betonten Kriwacki et al. die Vorteile, die ein Wechsel von ungeordneter in eine definierte Sekundärstruktur in der Kinase-Inhibitordomäne von p21 nach Anlagerung von Cdk2 für die Spezifität der Partner-Erkennung bringt. Ein derartiger, bindungsinduzierter Faltungsvorgang könnte aufgrund des Entropieverlustes der vorher flexiblen Peptidkette thermodynamisch gesehen ungünstig ausfallen und somit die Affinität zum Substrat herabsetzen. Dies hätte dann aber zur Folge, dass sich ein ungeordneter Abschnitt bedeutend spezifischer an sein Substrat anpassen kann als ein bereits frei in geordneter Form vorliegendes Segment, das vielleicht geringere Komplementarität zeigt. Obwohl p21 mit mehreren Varianten von Cyclin-Cdk-Komplexen wechselwirken muss, kommt auf diese Weise mit jedem Partner eine spezifische Bindung zustande (Kriwacki et al., 1996).

Auffällige Übergänge zwischen unterschiedlichsten Konformationen sind auch für die in Lösung flexiblen Fortsatzsegmente der apikalen Domänen zu beobachten. Bei der Schließung des Thermosoms nehmen sie eine streng geordnete Struktur im Gesamtkomplex aufgrund der Interaktionen mit äquivalenten Strukturelementen im zirkulären β-Faltblatt ein. Hier wird der Verlust der Flexibilität wohl durch die kooperative Wirkung der aneinander bindenden β-Stränge im Deckelbereich wettgemacht. Auch die intensiven Kontakte mit Sekundärstrukturelementen symmetrieverwandter Moleküle im Kristallgitter der isolierten apikalen Domänen scheinen einen derartigen Übergang zu induzieren (kurze α-Helix bei der αADT, gestreckter β-Strang bei der βADT). Wie schon oben erwähnt kann ein möglicher Modellcharakter solcher Kristallkontakte für eventuelle *in vivo*-Interaktionen mit Substraten jedoch nur sehr bedingt abgeleitet werden, zumal die Rolle der Fortsatz-Segmente im Funktionszyklus der Gruppe II Chaperonine noch strittig ist. Außerdem konnte schon am Beispiel der GroEL-apikalen Domäne bei nachträglichen *in vitro*-Experimenten (Chen & Sigler, 1999) gezeigt werden, dass die Aussagekraft von zufälligen Nachbarschaftsinteraktionen, die durch die Kristallpackung begünstigt wurden (Buckle et al., 1997), begrenzt ist.

Für die Substraterkennung bei GroEL scheint Flexibilität in der Substratbindungsregion ebenfalls von Bedeutung zu sein. Die apikale Domäne von GroEL wurde bereits mehrfach mit und ohne Peptid-Liganden in hoher Auflösung gezeigt (Braig et al., 1994, 1995;

Boisvert et al., 1996; Zahn et al., 1996; Buckle et al., 1997; Xu et al., 1997; Chen & Sigler, 1999; Kobayashi et al., 1999; Ashcroft et al., 2002). Obwohl derartige Peptidmodelle nicht die gesamte Bandbreite an Substratinteraktionen widerspiegeln können (Feltham & Gierash, 2000; Hua et al., 2001), bestätigten und ergänzten sie doch vorige Erkenntnisse über die Identität der wechselwirkenden Reste und deren Interaktionsmodi mit den Modellpeptiden. In jeder dieser Studien nahm die Substratbindungstasche eine veränderte, je nach Beschaffenheit des Liganden sogar einmalige Konformation an. GroEL kann sich also elastisch an diverse unterschiedliche Substrate unter Beteiligung hauptsächlich hydrophober, aber auch hydrophiler Reste anpassen. Da GroEL viele verschiedene Substrate bindet, von denen jedes in einem anderen Faltungszustand ist, andere Oberflächen exponiert und somit unterschiedlichste Anforderungen an die Bindungsregion stellt (Houry, et al., 1999), kommen gerade hier die plastischen Eigenschaften der Bindungstasche zur Geltung. Ihre Flexibilität ermöglicht zudem eine thermodynamische Feinabstufung, je nachdem, wie gut die Partner zueinander passen. Chen & Sigler (1999) konnten mittels Fluoreszenz-Spektroskopie an der GroEL-apikalen Domäne bereits unterschiedliche Affinitäten zu einzelnen Modellpeptiden zeigen. Kooperative Effekte durch multivalente Bindung von Substratproteinen an mehrere Untereinheiten verstärken diese Interaktion in komplexen Moleküle wie GroEL (Chen & Sigler, 1999; Farr et al., 2000). Die Elastizität der GroEL-Bindungsregion, die schon im nicht-komplexierten Zustand wegen der teilweise hohen B-Faktoren vermutet wurde (Braig et al., 1994,1995; Boisvert et al., 1996), erhöht sich weiterhin durch eine gewisse Beweglichkeit der umliegenden Strukturelemente in der GroEL-apikalen Domäne.

Vergleichbare Verhältnisse liegen für die Fortsatzregionen von Gruppe II Chaperoninen vor, deren Flexibilität sich ebenfalls bereits durch die B-Faktoren in den Kristallstrukturen von βADT und γCCT-AD angedeutet hatte. Allerdings liegt hier in Lösung offenbar nicht, wie im Fall von GroEL, nur Plastizität, sondern inhärente, dynamische Beweglichkeit vor. Umso besser wären diese Segmente zur Anpassung an ein Substratspektrum von großer struktureller Diversität geeignet. Dabei würden eventuelle Interaktionen mit zunächst nur schwach affin bindenden Substraten durch die kooperative Wirkung der multiplen, flexiblen Bindungsstellen (je nach Spezies 8-9 Untereinheiten pro Ring) stabilisiert. Derartige Aviditätseffekte wurden schon für die Wechselwirkung von CCT mit naszierenden Polypeptidketten vorgeschlagen (McCallum et al., 2000).

Vermutlich haben alle Gruppe II Chaperonine die Tendenz zu einer eher wenig geordneten Konformation im N-terminalen Fortsatzabschnitt. Sekundärstrukturvorhersagen für αADT

und vergleichend dazu für mehrere archaeale und eukaryotische Substratbindungsdomänen, deren Strukturen noch nicht bekannt sind, bekräftigen diese Annahme [18]. In den meisten untersuchten Sequenzen zeigten sich übereinstimmende Propensitäten zu ungeordneter, manchmal etwas gestreckter Konformation im proximalen Fortsatzsegment. Zur Spitze des Fortsatzes hin waren kurze Ansätze von gestreckter Anordnung vor Beginn der langen Helix H10 zu verzeichnen, was schon in den NMR-Analysen der αADT und βADT beobachtet worden war (vgl. Punkte 4.2.2 und 4.2.3). Eine tabellarische Auflistung der einzelnen Vorhersage-Ergebnisse befindet sich im Anhang (Tab. 8.2.).
Die demnach scheinbar ausgeprägte Verbreitung hochflexibler Proteinregionen und ihre Bedeutung für viele biologische Prozesse legen die Vermutung nahe, dass den Fortsätzen der apikalen Domänen in Gruppe II Chaperoninen eine wichtige Rolle im Funktionszyklus zukommt, die auch über die alleinige Mitwirkung an der Schließung des Komplexes hinausgehen könnte.

β-Schleifen an der Spitze der Fortsätze

Auffällig ist das Vorkommen von β-Schleifen-Motiven an den Spitzen der Fortsätze, wobei allerdings nur für αADT (DPSK-Motiv) entsprechende NOE-Daten ermittelt werden konnten (vgl. Punkt 4.2.2). Bei der βADT-Lösungsanalyse konnte zwar der relevante Abschnitt nicht eindeutig genug zugeordnet werden, aber die Aminosäuresequenz weist ein eindeutiges *β-turn*–Motiv an homologer Position auf (DPSM-Motiv). Aus einer Alignierung mehrerer Substratbindungsdomänen von Gruppe II Chaperoninen geht hervor, dass β-Schleifen-Motive an äquivalenten Positionen bei allen getesteten archaealen, nicht aber bei eukaryotischen Fortsätzen vorkommen (siehe Abb. 5.5). Eine Ausnahme bildet hier lediglich die CCTα-Untereinheit, die ebenfalls eine derartige Sequenz trägt. Eine so auffällige Konservierung lässt die Vermutung zu, dass den β-Schleifen in derart exponierten Position eine funktionelle Bedeutung zukommen könnte.

[18] Vergleichend benutzt wurden die Methoden PROF (Ouali & King, 2000), PredictProtein-PHDsec (Rost & Sander, 1993) und PSIPred (Jones, 1999) für die Chaperonin-Sequenzen der Archaeen *Desulfurococcus mobilis, Haloferax volcanii, Sulfolobus solfataricus., Methanobacterium thermolithoautotrophicum* sowie der 8 CCT-Untereinheiten aus *Mus musculus*.

Konservierte Bereiche in den apikalen Domänen von Gruppe II Chaperoninen

Bereits bei der Lösung der αADT-Kristallstruktur durch Klumpp und Kollegen (1997) zeigte sich im Bereich des Fortsatzes eine auffällig große, hydrophobe Fläche (Abb. 5.4), welche in einem Vergleich mit der apikalen Domäne von GroEL die hydrophobe Oberfläche der Substratbindungstasche ersetzte. Sie wurde deswegen für eine Beteiligung an der Substraterkennung vorgeschlagen (Klumpp et al., 1997). Die später aufgeklärten Röntgenstrukturen der βADT (diese Arbeit) und der γCCT-AD (Pappenberger et al., 2000) zeigten im Oberflächenvergleich mit der αADT ähnliche elektrostatische Potentiale (Abb. 5.4a-c). Im Fall der γCCT-AD sind die Oberflächeneigenschaften dieser Fläche zwar aufgrund der fehlenden Elektronendichte im distalen Fortsatzsegment nur ansatzweise erkennbar, da aber die dazu beitragenden Reste oder zumindest ihre hydrophoben Eigenschaften hochkonserviert sind (Klumpp et al., 1997) (Abb.5.5), darf wohl bei allen Gruppe II Chaperoninen von einer ähnlich ausgeprägten hydrophoben Oberfläche ausgegangen werden. Besonders im distalen Fortsatzbereich scheinen die Gruppe II Fortsätze zu starker Flexibilität zu neigen, wie aus den $^{15}N\{^{1}H\}$-NOE- und CSI-Messungen für die thermosomalen apikalen Domänen (vgl. oben) und dem von Pappenberger vermuteten Grund für den Abbruch der Elektronendichte im entsprechenden Segment der γCCT-AD hervorgeht. Die Beweglichkeit wäre dort sogar noch ausgeprägter, wenn nicht ein in allen bekannten Gruppe II Chaperoninen völlig konservierter Glutamat-Rest an Position A269 bzw. B270 innerhalb der Helix H10 auf besondere Weise stabilisierend wirkte: Er bildet sowohl in Lösung als auch in der Kristallstruktur der βADT eine intramolekulare Brückenbindung zu einem ebenfalls konservierten Lysin-Rest (Lys B247) auf dem gegenüber liegenden, N-terminalen Ast des Fortsatzes und trägt so zur internen Stützung des β-Stranges bei (Abb. 5.6). Dieser Kontakt verleiht der ansonsten hochflexiblen Fortsatzregion im proximalen, dem globulären Kernbereich zugewandten Abschnitt durch seine sockelartige Wirkung eine gewisse Rigidität (vgl. Punkte 4.2.2 und 4.2.3). In der γCCT-AD-Struktur könnte eine Brückenbindung zwischen äquivalenten Resten der Grund dafür sein, dass die Elektronendichte bis Lys γ248 interpretierbar war, danach jedoch abbrach. Im geschlossenen Zustand des Thermosoms stellt der Glutamat-Rest eine Verbindung zur Nachbar-Untereinheit her.

Wenn man sich die Lösungsstrukturen der α- und βADT-Fortsätze spekulativ als Modellzustände in einer Substrat-akzeptierenden Konformation des Gesamtkomplexes – ähnlich der von Nitsch et al. (1998) beobachteten Form - vorstellte, wären die apikalen Domänen von offenen Gruppe II Chaperoninen mit ihren beweglichen, ungeordneten und zugleich hydrophoben Fortsätzen am Zylinderrand antennenartig der Umgebung ausgesetzt. Hierfür könnte die Stabilisierung durch die Glu–Lys-Brücke von Bedeutung sein. Derart exponiert wären sie für eine Erkennung von nicht nativen Polypeptiden gut positioniert. Der durch ATP-Bindung ausgelöste Übergang zur geschlossenen Form des Thermosoms (Gutsche et al., 2001) bewirkt dagegen eine Drehung der apikalen Domänen im Uhrzeigersinn, wobei sich die hydrophoben Flächen teilweise von der Kavität wegbewegen und sich schließlich durch die Bildung des zirkulären β-Faltblatts weitgehend gegenseitig verdecken (Abb. 5.4d; Ditzel et al., 1998). Sollten Substrate an Teile der Fortsätze binden, würden sie während dieser Domänen-Rotation mit gleichzeitigem Deckelschluss allmählich von ihren Bindungsstellen abgeschält (Klumpp et al., 1997; Steinbacher & Ditzel, 2001).

Für GroEL wurde bereits früher ein ähnlicher Mechanismus vorgeschlagen, der aber noch nicht vollständig geklärt ist. Hier werden die hydrophoben Substratbindungstaschen nach ATP-Bindung durch die Auswärtsbewegung der apikalen Domänen von der Zylinderinnenseite weggedreht, so dass sie nun zum oberen Rand hin orientiert sind und mit den GroES-Schleifenregionen interagieren können (Xu et al., 1997; Chen & Sigler, 1999).

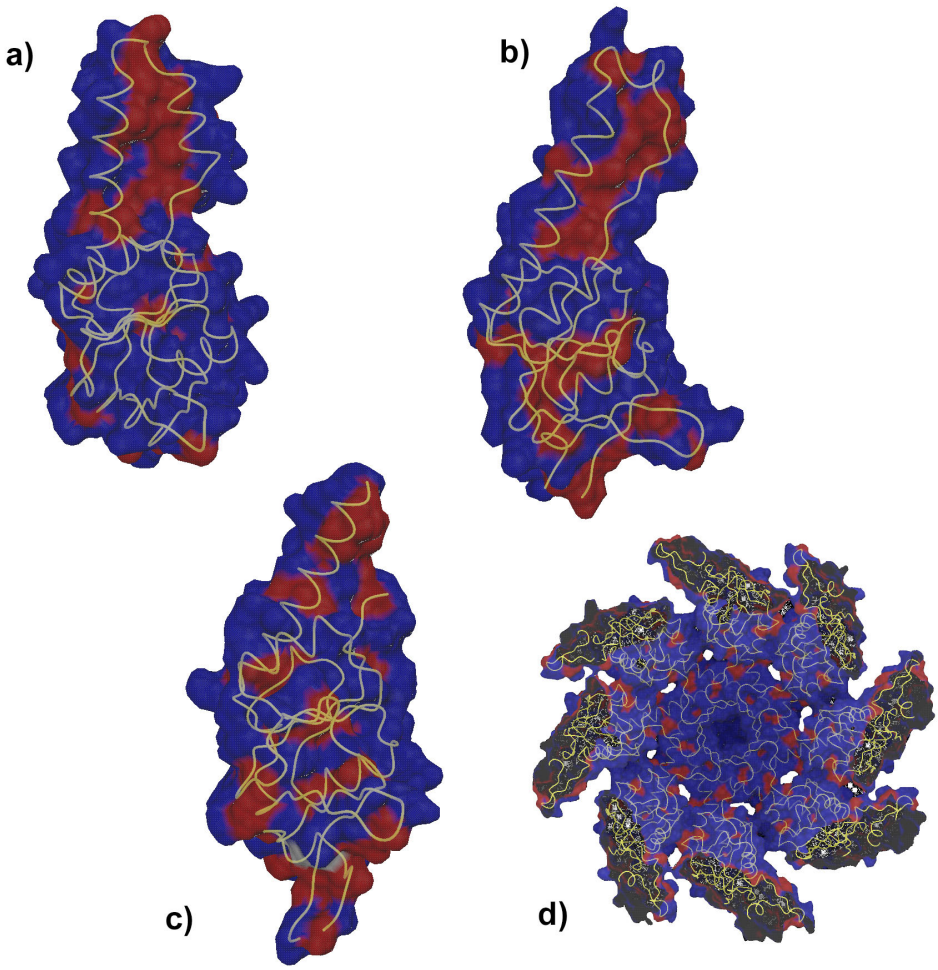
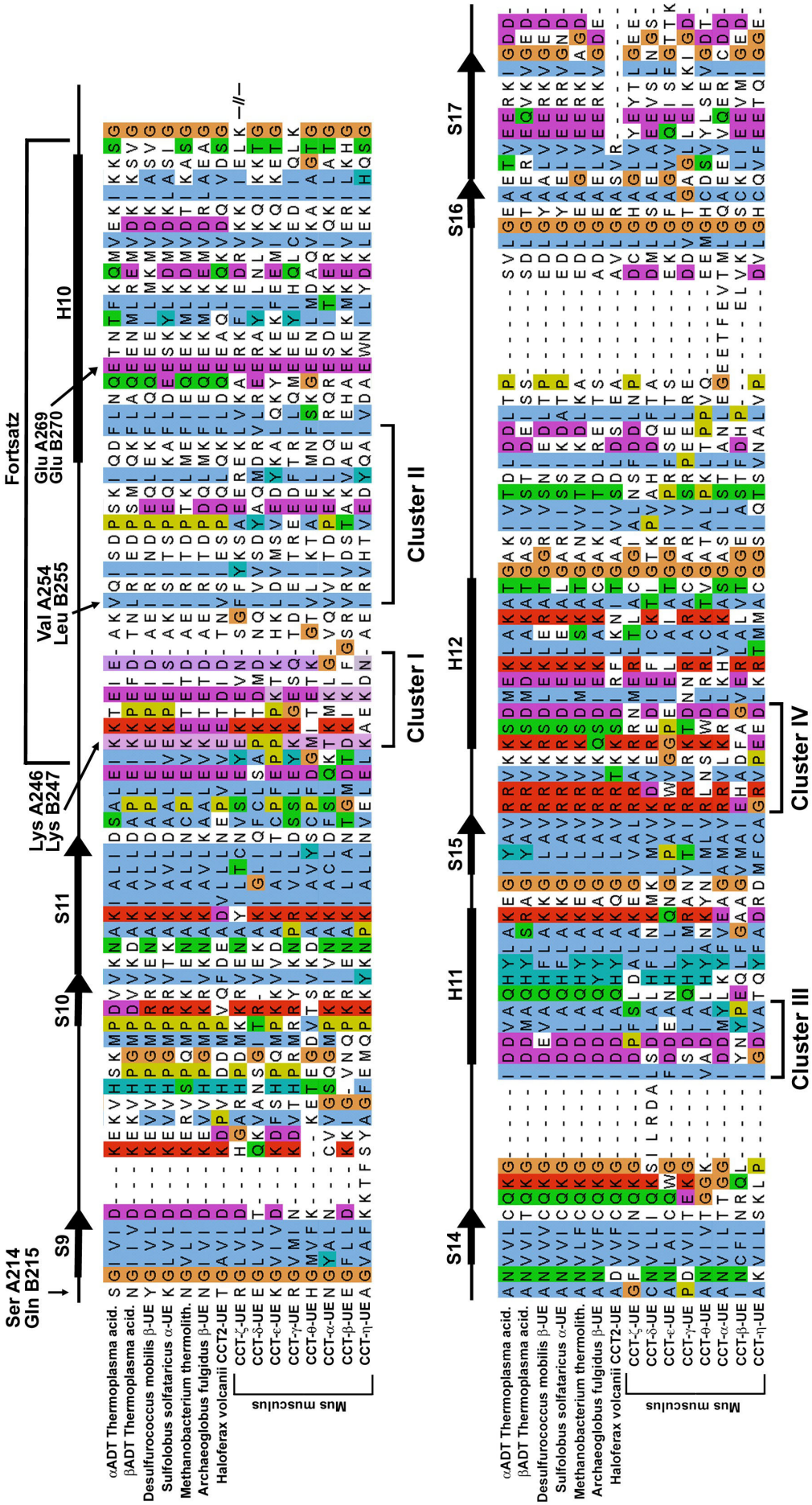


Abb. 5.4.: Verteilung der elektrostatischen Potentiale auf den Oberflächenregionen der Kristallstrukturen von a) αADT, b) βADT, c) γCCT-AD und d) den Deckelsegmenten des Thermosoms (von der Zylinder-Innenseite aus gesehen). Rot: hydrophob, blau: hydrophil. Zur Orientierung sind jeweils die C_α-Kette der Kristallstrukturen über den Oberflächendarstellungen gezeigt. Die Oberflächenpotentiale wurden aus den PDB-Einträgen 1ASS, 1E0R, 1GN1 und 1A6D mit Hilfe des Programms DINO (Philippsen, 2002) erstellt.

Hua et al. (2001) haben gezeigt, dass die Substratbindungstaschen der Gruppe I Chaperonine signifikante Sequenzhomologien aufweisen. In mehreren Arbeiten wurden bereits Teil-Alignierungen apikaler Domänen von Thermosomen und / oder CCT-Komplexen erstellt (Kim et al., 1994; Lin et al., 1997; Klumpp et al., 1997; Archibald et al., 1999; Pappenberger et al., 2002). Allerdings konzentrierten sich diese entweder auf nur

wenige eukaryotische bzw. archaeale apikale Domänen oder berücksichtigten nur hydrophile oder nur hydrophobe Eigenschaften. Um einen ganzheitlicheren Überblick über die Konservierungsgrade innerhalb der Gruppe II apikalen Domänen zu erhalten, wurde hier eine separate, Sekundärstruktur-basierte Alignierung mit einer größeren Anzahl archaealer und eukaryotischer Sequenzen durchgeführt (Abb. 5.5). Dabei wurden jene Reste besonders hervorgehoben, welche sowohl in allen untersuchten Organismen stark konserviert als auch von der Zylinderinnenseite einer hypothetischen, nicht-komplexierten Form des Thermosoms her gut zugänglich wären. Andere konservierte Reste und Gruppen wurden hier nicht berücksichtigt, da sie entweder nicht an der Innenseite des Thermosoms oder nur innerhalb der beiden β-Faltblätter im globulären Teil der apikalen Domäne bzw. an Kontaktstellen zu intermediären oder benachbarten Domänen liegen. Ihnen dürften daher hauptsächlich Struktur-erhaltende Aufgaben zukommen. Somit lassen sich diejenigen Reste, welche neben den oben gezeigten, zu den hydrophoben Flächen der Fortsätze beitragenden Aminosäuren, ebenfalls für eventuelle Substratinteraktionen geeignet wären, zu vier Clustern zusammenfassen, deren exponierte Lage in Abb. 5.6 verdeutlicht wird.

Folgeseite: Abb. 5.5.: Sequenzalignierung der apikalen Domänen repräsentativer Gruppe II Chaperonine. Ausgewählt wurden Vertreter der Crenarchaeota (*Desulfurococcus mobilis, Sulfolobus solfataricus*) und der Euryarchaeota (*Thermoplasma acidophilum, Archaeoglobus fulgidus, Haloferax volcanii, Methanobacterium thermolitho-autotrophicum*) sowie die CCT-Untereinheiten α, β, γ, δ, ε, η, θ und ζ der Maus. Konservierung ist bei geladenen Resten violett, pink oder rot, bei polaren, ungeladenen Resten grün und bei hydrophoben Resten blau gekennzeichnet. Die Sekundärstrukturelemente wurden über der Alignierung skizziert und orientieren sich an den Erkenntnissen der NMR-Analyse der αADT und βADT. Die Sequenz von CCTζ wurde an Position 281 aus Platzgründen um 5 Reste gekürzt (Insertion). Eine detailliertere Alignierung von archaealen Chaperonin-Sequenzen findet sich bei Archibald et al., 1999. Die Alignierung wurde mit dem Programm Clustal X (Thompson et al., 1997) erstellt.


Fortsatz
Ser A214
Gln B215
S9
S10
S11
Lys A246
Lys B247
Val A254
Leu B255
Glu A269
Glu B270
H10
Cluster I
Cluster II
αADT Thermoplasma acid.
βADT Thermoplasma acid.
Desulfurococcus mobilis β-UE
Sulfolobus solfataricus α-UE
Methanobacterium thermolith.
Archaeoglobus fulgidus β-UE
Haloferax volcanii CCT2-UE
CCT-ζ-UE
CCT-δ-UE
CCT-ε-UE
CCT-γ-UE
CCT-θ-UE
CCT-α-UE
CCT-β-UE
CCT-η-UE
Mus musculus
S14
H11
S15
H12
S16
S17
Cluster III
Cluster IV

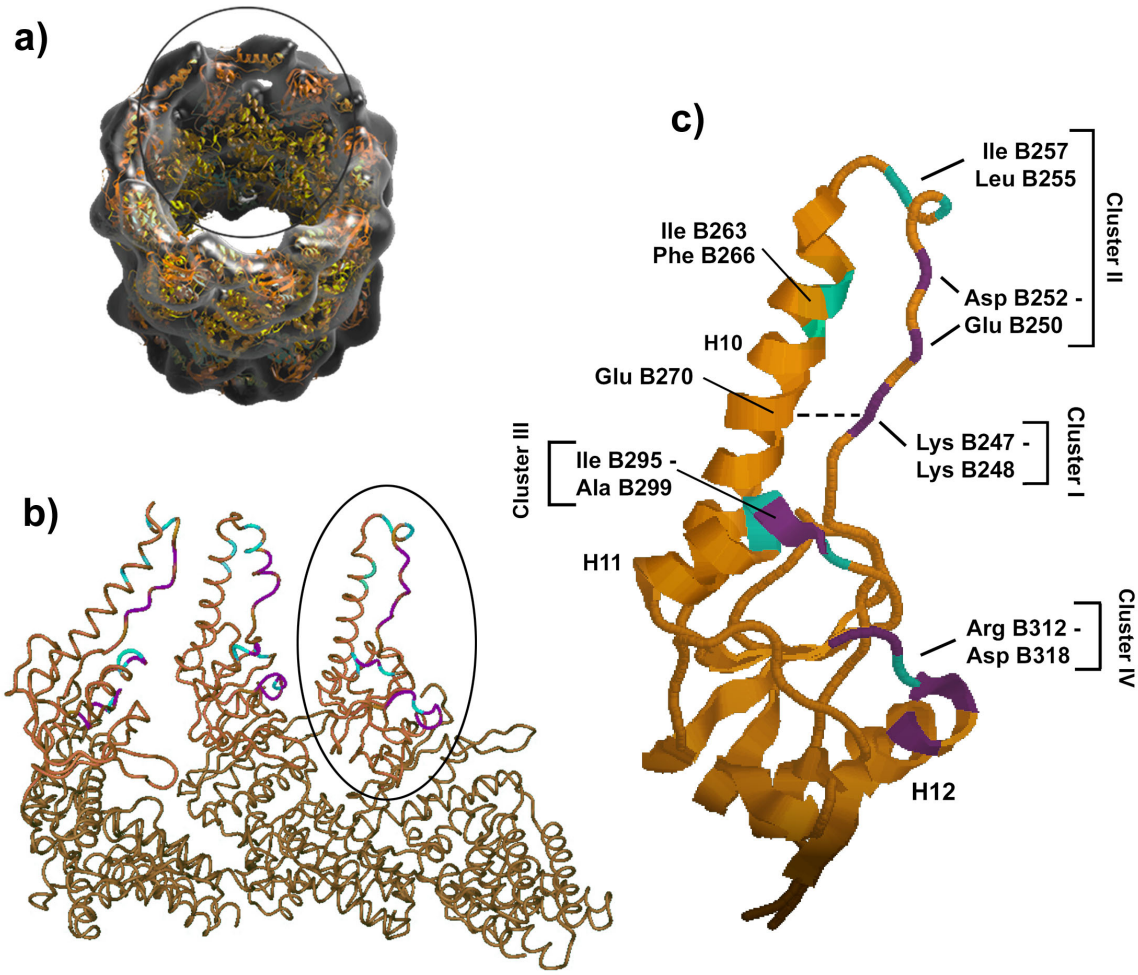


Abb. 5.6.: Konservierte Cluster in den apikalen Domänen der Gruppe II Chaperonine

a) Beobachtete kryo-elektronentomographische Rekonstruktion einer offenen Konformation des *α-only* Thermosoms mit eingepasstem *all-open-composite* Modell des Thermosoms (Nitsch et al., 1998). Schwarz umrandet ist ein Ausschnitt von drei benachbarten Untereinheiten, der in b) vergrößert dargestellt wird.

b) Hypothetisches Modell einer offenen Konformation des Thermosoms. Die Kristallstrukturen der isolierten apikalen Domänen wurden mit Hilfe des Programms TOP (Lu, 2000) mit der geschlossenen Form des Thermosoms (generiert aus den PDB-Eintrag 1A6D) superpositioniert und gemäß den Angaben bei Nitsch et al. (1998) anhand des Programms DINO (Philippsen, 2002) entgegen dem Uhrzeigersinn aufwärts und auswärts rotiert. Der Übersichtlichkeit halber sind hier nur drei benachbarte Untereinheiten (βADT-αADT-βADT) dargestellt. Der Standpunkt des Betrachters liegt inmitten der Kavität.

Konservierte hydrophobe (cyan) und hydrophile (violett) Reste sind hervorgehoben. Schwarz umrandet ist ein Ausschnitt einer β-Untereinheit, der in c) vergrößert dargestellt wird.
c) Die konservierten hydrophoben (cyan) und hydrophilen (violett) Reste aus Abb. 5.4 wurden auf die Kristallstruktur der βADT aufgetragen. Die Cluster-Unterteilung wurde übernommen. Gekennzeichnet ist außerdem mit einer gestrichelten Linie die intramolekulare Brückenbindung von Glu B270 zu Lys B247.

Cluster III (Ile B295 – Ala B299) und Cluster IV (Arg B312 – Asp B318) liegen im globulären Teil der apikalen Domäne. Obwohl sie jeweils Schleifensegmente vor den Helices H11 und H12 sowie deren erste Windungen umfassen, geht aus den Dynamik-Untersuchungen in dieser Arbeit hervor, dass sie höchstens mäßig beweglich sind. Aufgrund ihrer Lage, der vorherrschenden Beteiligung von geladenen Resten und eben jener Rigidität wurden diese beiden Gruppen von Pappenberger et al. (2002) grundsätzlich als geeignet für die Bindung der bereits weitgehend gefalteten CCT-Substrate Aktin und Tubulin vorgeschlagen.
Auch im Bereich des Fortsatzes fallen zwei stark konservierte Gruppen auf, die sich bezüglich ihrer Mobilität und ihrer Zugänglichkeit voneinander unterscheiden. Cluster I im proximalen Fortsatzabschnitt (Lys B247, Lys B248, Glu B250) ist durch die oben beschriebene intramolekulare Brückenbindung zur Helix H10 in seiner Beweglichkeit eingeschränkt. Dagegen nimmt die Flexibilität zum distalen Fortsatzsegment und bis in die ersten Windungen der Helix H10 hinein (Cluster II mit Asp B252, Leu B255, Ile B257, Ile B263, Phe B266, Leu B267) gemäß der $^{15}N\{^{1}H\}$-NOE – Werte für αADT und βADT (vgl. Punkte 4.2.2 und 4.2.3) deutlich zu. Im Gegensatz zu den Resten der Cluster I, III und IV, die sowohl in einem hypothetischen offenen als auch im geschlossenen Zustand des Thermosoms gut zugänglich sind, wird Cluster II an der Spitze des Fortsatzes ab Asp B252 in der geschlossenen Komplex-Konformation als Teil des zirkulären β-Faltblattes (S13) verdeckt oder kommt nach der Domänenrotation infolge der ATP-Bindung an der Außenseite des Zylinders zu liegen.

Für wichtige Funktionen besonders der Cluster I, II und IV sprechen auch Mutationsstudien am cct6-Gen der Hefe, welches dem cctζ-Gen der Maus entspricht (Lin et al., 1997). Bereits unter Punkt 5.2 wurden schwere funktionelle Defekte erwähnt, die bei Mutation des völlig konservierten Glu B270 in Helix H10 auftreten. In der Kristallstruktur der βADT sowie in der Lösungskonformation beider apikaler Domänen bildet dieser Glutamat-Rest eine Brückenbindung zum gegenüberliegenden Ast des Fortsatzes (Lys B247 im Cluster I) aus, welche (wie oben erwähnt) stabilisierende Wirkung haben könnte. Interessanterweise war eine Substitution polarer durch apolare Reste in Cluster I in Hefe lethal. Die Bedeutung dieses Segments für die Substraterkennung hatte sich allerdings schon früher angedeutet, als Miklos et al. (1994) Fehlbildungen bei Mikrotubuli, nicht aber bei Aktinpolymeren in cct1-245-Mutanten der Hefe (entspricht cctα der Maus) feststellten. Auch eine Mutation des Restes cct2-326, der in der ersten Hälfte der Helix H12 von Cct2p der Hefe positioniert und Teil des IV. Clusters ist, führte nur zu Defekten in der Tubulin-, nicht aber der Aktin-Assemblierung (Miklos et al., 1994). In der Arbeit von Lin et al. (1997) stellten sich Substitutionsmutanten in dieser konservierten Gruppe (entsprechend Arg B312 – Asp B318) als nicht lebensfähig heraus.
Nach Austausch einiger Reste in Cluster II, die an der ausgeprägten hydrophoben Fläche der Fortsätze beteiligt sind und Leu B255 sowie Ile B257 entsprechen, gegen geladene Aminosäuren trat bei Hefezellen Temperatursensitivität auf (Lin et al., 1997).

Sowohl die Studie von Miklos et al. (1994) als auch andere genetische sowie diverse biochemische Experimente deuten eine Spezialisierung der einzelnen CCT-Untereinheiten auf bestimmte Substratinteraktionen an (Vinh & Drubin, 1994; Ursic et al., 1994; Rommelaere et al., 1999; Dobrzynski et al., 1996; Kubota et al., 1994; Feldman et al., 1999; McCallum et al., 2000; Hynes & Willison, 2000; Ritco-Vonsovici & Willison, 2000). Erst kürzlich wurden KryoEM-3D-Rekonstruktionen von Nukleotid-freien CCT-Komplexen mit Aktin und Tubulin veröffentlicht, wobei die spezifische Bindung bestimmter Untereinheiten (CCTδ und β bzw. CCTδ und ε für Aktin; CCTβ, γ, θ, η, α bzw. CCTε, ζ, β, θ, δ für Tubulin) an die jeweiligen Substrate gezeigt werden konnte. Außerdem schienen Aktin und Tubulin über definierte Erkennungsbereiche an ihre spezialisierten Untereinheiten zu binden (Llorca et al., 1999b, 2000, 2001a, 2001b). Obwohl hierbei gesicherte Aussagen aufgrund niedriger Auflösung nicht möglich sind, scheint Aktin dennoch eher mit dem globulären Teil der apikalen Domänen zu interagieren, während die Tubulin-Kontaktfläche größere Bereiche einschließlich der

Fortsatzbasis umfassen könnte. Da diese beiden Substrate bereits weitgehend gefaltet sind, wenn sie mit CCT in Kontakt treten, könnten die rigideren Cluster im globulären Teil wie auch im proximalen Fortsatzbereich (I, III und IV) für eine Bindung in Frage kommen (vgl. Abb. 5.5. unf 5.6). Für eine Beteiligung dieser Gruppen, die sowohl im offenen als auch im geschlossenen Zustand von CCT zugänglich sind, spricht zudem, dass beide Substrate in 3D-Rekonstruktionen von AMP-PNP-CCT-Substrat-Komplexen noch an die apikalen Domänen zu binden scheinen (Llorca et al., 2001a). Entgegen einem Vorschlag von Pappenberger et al (2002), wonach CCT seine weitgehend gefalteten Substrate nur unter Beteiligung von hochkonservierten, geladenen und für jede Familie von CCT-Orthologen charakteristischen Signatur-Resten im globulären Kernbereich erkennen soll, sprechen frühere CCT-Bindungsstudien mit unterschiedlichen Fragmenten von Aktin und Tubulin für eine Beteiligung sowohl hydrophober als auch elektrostatischer Wechselwirkungen (Rommelaere et al., 1999; Dobrzynski et al., 1996; Hynes & Willison, 2000). Die in dieser Arbeit beschriebenen, konservierten Cluster stehen zu keiner der genannten Versionen in Widerspruch, da sie sowohl hydrophile als auch hydrophobe Reste umfassen.

Für andere, neuerdings bekannte CCT-Substrate außer den weit verbreiteten Zytoskelettproteinen liegen noch keine Informationen über Lokalisation und Art der Wechselwirkung mit den CCT-Untereinheiten vor, ebenso wenig für die genauen Regionen, über die Prefoldin mit den apikalen Domänen Kontakt aufnimmt, wenn es Aktin, Tubulin oder vielleicht auch andere, neu synthetisierte Proteine an CCT übergibt. Aus einer neueren KryoEM-3D-Rekonstruktion eines CCT-Prefoldin-Komplexes könnte zwar eine Kontaktfläche im Kernbereich der apikalen Domänen vermutet werden, jedoch sind verlässliche Aussagen aufgrund der geringen Auflösung von etwa 30 Å noch nicht möglich (Martin-Benito et al., 2002).

Weder Bakterien noch Archaeen besitzen die für Eukaryoten lebenswichtigen Zytoskelettproteine Aktin oder Tubulin. Auch die entfernt sequenzhomologen Zellteilungskomponenten FtsA und FtsZ als potentielle Vorläufer für Aktin und Tubulin sind offenbar nicht für alle Prokaryoten essentiell (Erikson et al., 2001). Somit kann man die bisherigen Erkenntnisse über die CCT-Aktin- und CCT-Tubulin-Interaktionen trotz der engen Verwandtschaft der Gruppe II Chaperonine nicht direkt auf die Thermosomen übertragen. Zudem geht aus Bioinformatik-Studien zur Evolution der Gruppe II Chaperonin-Untereinheiten hervor, dass sich die einzelnen CCT-Paralogen nach

Genduplikationen schon früh in der Evolution diversifiziert (*ancient paralogy*) und seither konvergent mit ihren jeweiligen Substraten, unter anderem Aktin und Tubulin, entwickelt haben (Archibald et al., 2000; Leroux & Hartl, 2000). Zumindest für die Gruppe der Crenarchaeoten, welche untereinander eng verwandte, extrem thermophile Archaeen umfasst, kann aber eine derartige Konvergenz offenbar ausgeschlossen werden (Archibald & Roger, 2002a). Für Euryarchaeoten, zu denen auch *Thermoplasma acidophilum* zählt, konnten noch keine gefestigten Erkenntnisse gewonnen werden, da noch zu wenige Genomsequenzen bekannt sind (Archibald & Roger, 2002b). Die Heterooligomerie scheint sich allerdings in allen bisher bekannten archaealen Chaperonin-Untereinheiten mehrfach unabhängig voneinander entwickelt oder auch wieder zurückgebildet zu haben (*recurrent paralogy*), so dass hier wohl keine Spezialisierung einzelner Typen von Untereinheiten auf bestimmte Substrate vorliegt (Archibald et al., 1999). Wie bereits aus den wenigen Sequenzen der oben gezeigten Alignierung (Abb. 5.5) hervorgeht, blieben hauptsächlich die polaren oder apolaren Eigenschaften einzelner Reste durch alle Gruppe II – apikalen Domänen erhalten, nicht so sehr die Aminosäure selbst. Während sich also in Eukaryoten die jeweiligen CCT-Orthologen auf ihre Bindungspartner zuentwickelt haben, könnten sich die einzelnen Archaeenstämme vielmehr individuell an ihre oft sehr extremen Umweltbedingungen und somit vielleicht unterschiedlichen Substratanforderungen angepasst haben. Trotz dieser gegensätzlichen Entwicklungen blieben die oben besprochenen Cluster in allen bekannten Gruppe II Chaperoninen konserviert, was dafür spricht, dass sie auch in jedem dieser Organismen eine individuell wichtige Rolle spielen.

Im Gegensatz zu früheren Vermutungen (Yaffe et al., 1992; Lewis et al., 1992; Gao et al., 1992; Frydman et al., 1992) geht man heute davon aus, dass CCT nicht nur auf Aktin und Tubulin spezialisiert ist. Es spielt offenbar eine wichtige Rolle bei der zellulären Proteinfaltung, indem es unmittelbar an 9-15 % der neu translatierten Polypeptidketten bindet oder diese von anderen molekularen Chaperonen (z.B. Prefoldin oder Hsc/Hsp70) übernimmt (neuere Übersichtsartikel finden sich bei Leroux & Hartl, 2000; Bukau et al., 2000; Feldman & Frydman, 2000; Dunn et al., 2001). Außerdem haben frühere Bindungsstudien die Fähigkeit von CCT zur Erkennung, teilweise auch zur ATP-abhängigen Rückfaltung mehrerer denaturierter Proteine bei unterschiedlichen Affinitäten und Reaktionsgeschwindigkeiten unter Beweis gestellt (Melki & Cowan (1994); Melki et al., 1997). Die Autoren vermuteten deswegen, CCT könne ein breiteres Substratspektrum besitzen als bis dato angenommen und exponierte, hydrophobe Flächen an

Faltungsintermediaten von Aktin und Tubulin erkennen, welche ohne Hilfe aggregieren würden. Zudem mehren sich entgegen früheren Informationen (Ursic & Culbertson, 1992; Lewis et al., 1992) in letzter Zeit Erkenntnisse, dass die Expression von CCT sowohl Hitze-induzierbar als auch sensitiv gegenüber chemischen Stressfaktoren und Kälteschock ist (Palmedo et al., 1997; Yokota et al., 2000; Somer et al., 2002). Somit dürfte CCT nicht nur bei der *de novo* Proteinfaltung, sondern durchaus auch bei der Stressbewältigung in der Zelle eine Rolle spielen, wenn auch vielleicht nicht auf so effiziente Weise wie beispielweise GroEL (Melki & Cowan, 1994).

Bisher ist noch nicht geklärt, auf welche Art CCT ein breiteres Spektrum an Substraten bewältigen würde. Hinweise auf unterschiedliche Ansprüche neu translatierter Polypeptidketten bezüglich der benötigten Zyklen zur Erlangung der korrekten Faltung zeichneten sich schon in einer Studie von Thulasiraman et al. (1999) ab, worin der Beitrag von CCT zur *de novo* Proteinfaltung abgeschätzt wurde. Angesichts so verschiedener Anforderungen, wie sie sowohl von naszierenden Polypeptidketten, als auch möglicherweise zur Aggregation neigenden Faltungsintermediaten und zudem einigen hochspezialisierten, schon fast nativen Substraten an CCT gestellt werden, erscheint die Entwicklung mehrerer unterschiedlicher Bindungsmodi plausibel. Für dieses breite Aufgabenspektrum wären Gruppe II Chaperonine mit ihren flexiblen Fortsätzen und den oben beschriebenen, konservierten Clustern gut ausgestattet.

Arbeiten zum *in vivo* Substratspektrum von GroEL, das etwa 10 - 15 % der neu synthetisierten Polypeptide umfasst (Ewalt et al., 1997; Houry et al., 1999), haben für Gruppe I Chaperonine bereits gezeigt, dass nicht alle bakteriellen Substrate auf dieselbe Weise und im gleichen Ausmaß mit GroEL wechselwirken, obwohl sich eine Präferenz für Proteine mit multiplen αβ-Faltungsmotiven abzuzeichnen scheint. Ein Teil der Proteine bindet nur transient an die apikalen Domänen, gelangt also nicht in die geschlossene Kammer. Ein weiterer Teil assoziiert mit GroEL, und eine dritte Fraktion (meist große Proteine, welche die Größenkapazität der Faltungskammer übersteigen) wird zwar gebunden, aber nur sehr ineffizient wieder entlassen (Houry et al., 1999). Diverse *in vitro* Bindungsstudien mit Modellsubstraten und *in vivo* – Experimente haben diese sehr individuellen Ansprüche, die unterschiedliche Substrate an GroEL stellen können, verdeutlicht. So scheint es bezüglich des Ausmaßes der beteiligten Komponenten und der Intensität der Wechselwirkung zwischen GroEL und seinen zahlreichen Substraten eine ganze Bandbreite an Möglichkeiten zu geben, die von der transienten Bindung an einzelne

apikalen Domänen bis hin zum kompletten Faltungszyklus unter Beteiligung von GroEL / GroES und ATP reicht (Peres Ben-Zvi et al., 1998).

Bisher sind noch keine Erkenntnisse über das natürliche Substratspektrum der archaealen Thermosomen vorhanden. Die evolutionsgeschichtliche Entwicklung der archaealen Chaperonin-Untereinheiten scheint jedoch nicht auf eine derartige Spezialisierung hinzudeuten, wie es bei den CCT-Familien der Fall ist. Geht man also von einem breiteren Substratspektrum aus und zieht man alle konservierten Reste der apikalen Domänen in Betracht, hätten Thermosomen – ebenso wie CCT - theoretisch die Möglichkeit, sowohl neu translatierte (mit oder ohne Übergabe durch einen Prefoldin-homologen Komplex) oder fehlgefaltete Polypeptide (*molten globules*) sowie bereits fortgeschrittene Faltungsintermediate zu erkennen. Dafür wäre es sicher von Vorteil, mehrere Bindungsstellen mit unterschiedlichen Eigenschaften, also sowohl hydrophobe als auch geladene Bereiche mit hoher oder geringer Flexibilität in exponierter Lage zu positionieren.
Für einige cren- und euryarchaeale Thermosomen konnte schon gezeigt werden, dass sie einige denaturierte *bona fide* Substrat-Proteine *in vitro* binden und teilweise auch deren Rückfaltung unterstützen können (vgl. Zusammenstellung bei Gutsche et al., 1999). Diese Versuche liefern aber noch keine ausreichenden Erkenntnisse über das Ausmaß des natürlichen Substratspektrums und die Substratspezifität.

Eine interessante Interpretation neuerer Ergebnisse zur Interaktion von GroEL mit diversen Modellpeptiden unterschiedlicher Konformation lieferten kürzlich Feltham und Gierash (2000) und folgten damit der zum Teil umstrittenen These von Shtilterman et al. (1999), wonach die GroEL-Kavität nicht nur ein passives Faltungskompartiment („Anfinsen-Käfig“) sei, sondern sich vielmehr aktiv an der Entfaltung von fehlgefalteten Proteinen beteiligt („*folding by forced unfolding*“). Exponierte Aminosäuren mehrerer Untereinheiten könnten demnach zunächst transient über multiple, vorwiegend hydrophobe Bindungsstellen mit einer großen Oberfläche eines nicht-nativen Substrats interagieren. Möglicherweise anfangs geringe Affinität zum Substrat würde durch eventuelle zusätzliche, elektrostatische Wechselwirkungen und durch den Aviditätseffekt ausgeglichen (siehe auch Farr et al., 2000; Chatellier et al., 2000). Im Zuge der Rotation der Untereinheiten könnte das Substrat ein wenig gestreckt werden und andere Sequenzabschnitte offen legen, welche dann von vorher vielleicht unbelegten Resten in

den Bindungstaschen mit höherer Spezifität und Affinität gebunden werden könnte (Feltham und Gierash, 2000).
Ein anderer Mechanismus für die GroEL-Substrat-Interaktion wird in der thermodynamischen Partitionierungs- oder Kopplungstheorie beschrieben, welche der Ringstruktur keine aktive Entfaltungsaktivität zuschreibt. Darin verhielte sich GroEL gegenüber den weniger gefalteten Zuständen innerhalb eines Gleichgewichts an Konformeren affiner und verschöbe so dieses Gleichgewicht hin zu den ungefalteteren Zuständen, ohne auf die Energiebarriere und somit die Konversionsrate zwischen den Faltungszuständen Einfluss zu nehmen (Walter et al., 1996).
Die multivalente Bindungsweise an Substrat-Polypeptide wäre allerdings in beiden Szenarien möglich (Farr et al., 2000, Chatellier et al., 2000a). Außerdem kann angesichts dieser Multifunktionalität nicht ausgeschlossen werden, dass GroEL im Laufe der Evolution mehrere Bindungs- und Faltungsmechanismen für eine Vielzahl an Substraten mit individuellen physikalisch-chemischen Eigenschaften und Größen entwickelt hat (Chatellier et al., 2000b).

Obwohl derartige Überlegungen hypothetisch sind, so bestehen doch zumindest ähnliche Möglichkeiten für Gruppe II Chaperonine. Auch hier könnten noch weitgehend ungefaltete Substrat-Kandidaten zunächst über die beweglichen und adaptationsfähigen Fortsätze mehrerer Untereinheiten quasi eingefangen werden. Auch hier könnte der Aviditätseffekt multivalenter Bindungsstellen eventuell geringere Affinitäten wettmachen. Im Zuge der ATP-induzierten Komplexschließung und der damit verbundenen Domänenrotation würden sie von diesen vorläufigen Bindungsstellen (ob mit oder ohne Streckung) abgeschält. Später könnten sie entweder in die hydrophile Faltungskammer entlassen werden oder über die dann noch zugänglichen Cluster während des Faltungszyklus gebunden bleiben. Solche Substrate aber, die (wie Aktin und Tubulin) schon weitgehend gefaltet wären, könnten dagegen sofort und präferenziell mit den für sie spezifischen, konservierten und weitgehend geladenen Gruppen interagieren.

Auch Leroux und Hartl spekulieren über die mögliche Existenz zweier verschiedener Substratbindungsmodi für CCT, um dessen duale Rolle als hochspezialisiertes Chaperonin für Substrate wie Aktin und Tubulin einerseits sowie als eher genereller Faltungshelfer für eine bestimmte Gruppe neu-synthetisierter Polypeptide andererseits zu gewährleisten (Leroux und Hartl, 2000). Überdies scheinen nicht alle neu-translatierten Polypeptide von

CCT gleich behandelt zu werden. So werden einige, wie z.B. Aktin, als Monomer entlassen, während andere Proteine, beispielsweise Tubulin oder der VHL Tumor Suppressor, erst nach Bindung von spezifischen Kofaktoren dissoziieren. (Dunn et al., 2001). Weil GroEL die Rückfaltung von denaturierter Aconitase (ein mitochondriales Enzym, das aufgrund seiner Größe nicht in der Faltungskammer eingeschlossen werden kann) unterstützt, aber auch native apo-Aconitase bis zur Clusterbildung mit Fe_4S_4 gebunden hält, spekulieren Chaudhuri et al. (2001), ob auch GroEL für diese beiden doch sehr unterschiedlichen Aufgaben eventuell verschiedene Reste mit jeweils passenden Eigenschaften in Anspruch nehmen könnte. Der Bereich der GroEL - apikalen Domänen, welcher in genetischen und strukturellen Untersuchungen als Substratbindungsregion identifiziert wurde, erwies sich zwar aufgrund seiner Fähigkeit zur Erkennung mehrerer Konformationen, sowohl sequenzieller als auch nicht-zusammenhängender Motive wie auch – neben hauptsächlich hydrophober – elektrostatischer Komponenten als gut ausgestattet für variable Bindungspartner (eine Zusammenstellung findet sich bei Wang et al., 2000). Dennoch zeigte sich schon früher in Mutationsstudien bei Fenton et al. (1994), welche kürzlich durch ein NMR-Footprinting einer GroEL-apikalen Domäne mit einem Modellprotein mittlerer Größe bestätigt wurden (Hua et al., 2001), dass außer den Aminosäuren, die in der „klassischen“ Bindungstasche von GroEL liegen, auch andere Reste an der Substraterkennung beteiligt sind.

5.5. Schlussbemerkung und Ausblick

An jedes Chaperonin werden in jedem Organismus gemäß den Bedingungen des Habitats sehr individuelle Ansprüche gestellt. Im Laufe der Evolution haben sich die einzelnen Spezies optimal an die Substratanforderungen und –Spektren ihrer Lebensräume angepasst, häufig auch spezialisiert.

Dass die entsprechenden Sequenzvariationen nicht unbedingt immer in der apikalen Domäne liegen müssen, zeigt ein genetisches Screening-Experiment, womit die gerichtete Entwicklung von GroEL/ES-Varianten hin zu einer affineren Interaktion mit einem Sensorprotein nachgestellt wurde. Die erfolgreichsten Adaptationen an die Eigenschaften des Sensorproteins betrafen dabei die äquatoriale Domäne nahe der ATP-Bindungsstelle, wodurch sich offenbar auch die Länge der Faltungsphase zugunsten des Substrats verändert hatte. Allerdings ging die verbesserte Anpassung an das Testsubstrat zu

Ungunsten der sonst so typischen Fähigkeit von GroEL, eine weite Bandbreite von Substraten mit hoher Affinität binden zu können (Wang et al., 2002).

Andererseits können sich natürlich auch divergente Entwicklungen beim Wegfall von funktionellen Zwängen einstellen. So analysierten Archibald et al. (2001b) in einer bioinformatischen Studie die Evolution der CCT-Untereinheiten im Nukleomorph der Cryptomonaden-Alge *Guillardia theta*. Im Gegensatz zur strikt konvergenten Entwicklung der für freilebende Eukaryoten so wichtigen Zytoskelettproteine mit ihren spezifischen CCT-Untereinheiten erwiesen sich die Tubuline hier als divergent. Wohl infolge dessen war der Evolutionsdruck auf die CCT-Untereinheiten weggefallen, so dass sie sich von ihren jeweiligen orthologen Familien ungewöhnlich stark unterschieden.

Diese Experimente verdeutlichen auf eindrucksvolle Weise, wie wichtig die Fähigkeit von GroEL zur Erkennung einer großen Substratvielfalt für Gruppe I Organismen sein muss, da offenbar nur vergleichsweise geringe Variationen nötig wären, um eine stärkere Spezialisierung zu erhalten. Verfolgt man diesen Gedanken weiter, so hätten Eukaryoten einen anderen Pfad eingeschlagen, indem CCT für die effiziente Bindung und Faltung einer bestimmten Gruppe von Substraten besonders optimiert worden ist. Für die Interaktion mit anderen, nicht derart adaptierten Substraten oder mit denaturierten Polypeptiden ist CCT zwar durchaus noch geeignet, bindet aber weniger affin (Melki & Cowan, 1994). Wie zum Ausgleich diese „Defizits“ an Generalisierung haben andere Stressproteine, wie beispielweise das HSP70-System, verglichen mit Prokaryoten eine Ausweitung ihres Aufgabenbereichs in Eukaryoten erfahren (Wang et al., 2002).

Aus dieser Sicht betrachtet spielen archaeale Gruppe II Chaperonine wieder einmal eine Zwischenrolle: Ihre Thermosomen weisen ebenfalls hoch konservierte, gut zugängliche Cluster auf (vgl. Punkt 5.4). Allerdings haben sich CCT- und thermosomale Substratbindungsdomänen offenbar auf verschiedene Weise evolutionär entwickelt (Archibald et al., 2000 und 2002a). In solchen Archaeen, in denen das HSP70-System nicht vorhanden ist, könnte wiederum den Chaperoninen ein größeres Aufgabenspektrum zukommen. Allerdings wurden bei diesem Szenario die Fähigkeiten eventuell kompensierender, anderer molekularer Chaperone oder Proteinkomplexe außer Acht gelassen. Außerdem ist über das Zusammenspiel weiterer an der Qualitätskontrolle der Zelle beteiligter Komponenten noch zu wenig bekannt, um bereits Festlegungen treffen zu können. Wertvolle Einblicke in derartige Netzwerke liefern Genom- und Proteomanalysen (z.B. in Ruepp et al., 2000, 2001).

Von diesem Standpunkt aus könnte man besonders bei archaealen Gruppe II Chaperoninen erst dann Aussagen zum Spezialisierungsgrad treffen, wenn für den untersuchten Organismus ein möglichst ganzheitliches, individuelles Bild des Substratspektrums vorläge, geprägt vom Selektionsdruck des jeweiligen Lebensraumes.

Anhand der vorliegenden Erkenntnisse ist zwar noch keine Antwort auf die eingangs gestellte Frage möglich, ob den Fortsatzsegmenten eine Rolle bei der Substratbindung zukommt. Dennoch erscheinen gerade ihre flexiblen Bereiche besonders geeignet, vielfältige Aufgaben zu erfüllen. Hätten die Fortsätze nur die Funktion der Zugangskontrolle zur Faltungskammer, stellte sich allerdings die Frage, welchen Vorteil es für Gruppe II Chaperonine brächte, in ihrer offenen Konformation acht oder neun große, hydrophobe Flächen derart stark zu exponieren.

Das von Klumpp et al. (1997) vorgeschlagene und von Nitsch et al. (1998) beobachtete Modell eines offenen Zustandes des Thermosms kann durch die Analysen dieser Arbeit ergänzt und präzisiert werden. Zwar sind inzwischen aus mehreren KryoEM-Rekonstruktionen und SANS-Studien eine Reihe von funktionalen Zuständen archaealer Chaperonine in niedriger Auflösung bekannt (Gutsche et al., 2000a, 2000b, 2001; Schoehn et al., 2000a und 2000b). Außerdem konnte mit Hilfe enzymologischer Tests ein Modell für den ATPase-Zyklus des Thermosoms entwickelt werden (Gutsche et al., 2000c). Jedoch fehlt immer noch eine hochaufgelöste Struktur eines Gruppe II Chaperonins in offener Konformation, um die Orientierung der Fortsätze zu klären.

Das vordringlichste Ziel für archaeale Chaperonine muss in Zukunft die Gewinnung natürlicher Substrate sein. Hierfür würden sich vergleichende Proteomanalysen anbieten, da auch eine Quantifizierung der Expression bestimmter Proteine unter wechselnden Bedingungen und so eine Abschätzung des Einflusses der individuellen Umgebung vorgenommen werden könnte. Hieraus sind entscheidende Erkenntnisse über Substraterkennung und Bindungsspezifitäten der Thermosomen sowie Rückschlüsse auf die *in vivo*-Funktionen der archaealen und ebenso der eukaryotischen Gruppe II Chaperonine zu erwarten.

Anhand von Liganden mit ausreichender Affinität könnten daraufhin biochemische Testverfahren wie Komigration mit Gelfiltrationssäulen durchgeführt werden, um die Natur der Substratinteraktion zu ergründen. Bei schwächerer Affinität, wie sie bei einer eventuell nur transienten Bindung an die ungeordneten Fortsatzregionen zu erwarten wäre, würden sich besonders die sensitiveren, spektroskopischen Bindungsstudien anbieten (beispielsweise mittels Fluoreszenz). Vor allem mit Hilfe der Elektronenmikroskopie sowie in atomarer Auflösung durch Röntgenstrukturanalyse (Kokristallisation) und NMR-Spektroskopie (NMR-Footprinting) könnten dann Chaperonin-Substrat-Komplexe dargestellt und die Peptid-bindenden Reste (gegebenenfalls auch gestützt durch Mutationen) genauer ermittelt werden. In diesem Zusammenhang wären auch Testversuche mit dem zum eukaryotischen Prefoldin homologen Gim1/5-Protein aus *Thermoplasma acidophilum* interessant.

Bis vor kurzem waren nur hochaufgelöste Strukturen von archaealen Gruppe II Chaperoninen bekannt. Die Kristallstruktur der CCT-γAD (Pappenberger et al., 2002) lieferte nun erste Einblicke in die strukturellen Besonderheiten dieser eukaryotischen Variante. Obwohl hier bald weitere Fortschritte zu erwarten sind, dürften in Zukunft besonders Chaperonin-Systeme aus mesophilen Archaeen das Modellsystem der Wahl sein, da zum einen Substrat-Bindungs- und Rückfaltungstests einfacher als an Molekülen aus thermophilen Archaeen durchgeführt werden können und zum anderen prokaryotische Domänen und Untereinheiten häufig einfacher rekombinant herstellbar sind.

6. Literatur

Abel, K., Yoder, M. D., Hilgenfeld, R., and Jurnak, F. (1996). An alpha to beta conformational switch in EF-Tu. Structure *4*, 1153-1159.

Alber, T., Gilbert, W. A., Ponzi, D. R., and Petsko, G. A. (1983). The role of mobility in the substrate binding and catalytic machinery of enzymes. Ciba Foundation Symposium *93*, 4-24.

Altamirano, M. M., Golbik, R., Zahn, R., Buckle, A. M., and Fersht, A. R. (1997). Refolding chromatography with immobilized mini-chaperones. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *94*, 3576-8.

Archibald, J. M., Blouin, C., and Doolittle, W. F. (2001a). Gene Duplication and the Evolution of Group II Chaperonins: Implications for Structure and Function. Journal of Structural Biology *135*, 157-169.

Archibald, J. M., Cavalier-Smith, T., Maier, U., and Douglas, S. (2001b). Molecular chaperones encoded by a reduced nucleus: the cryptomonad nucleomorph. Journal of Molecular Evolution *52*, 490-501.

Archibald, J. M., Logsdon, J. M., and Doolittle, W. F. (2000). Origin and evolution of eukaryotic chaperonins: Phylogenetic evidence for ancient duplications in CCT genes. Molecular Biology & Evolution *17*, 1456-1466.

Archibald, J. M., Logsdon, J. M., and Doolittle, W. F. (1999). Recurrent paralogy in the evolution of archaeal chaperonins. Current Biology *9*, 1053-6.

Archibald, J. M., and Roger, A. J. (2002b). Gene Conversion and the Evolution of Euryarchaeal Chaperonins: A Maximum Likelihood-Based Method for Detecting Conflicting Phylogenetic Signals. Journal of Molecular Evolution *55*, 232-245.

Archibald, J. M., and Roger, A. J. (2002a). Gene duplication and gene conversion shape the evolution of archaeal chaperonins. Journal of Molecular Biology *316*, 1041-1050.

Ashcroft, A. E., Brinker, A., Coyle, J. E., Weber, F., Kaiser, M., Moroder, L., Parsons, M. R., Jager, J., Hartl, U. F., Hayer-Hartl, M., and Radford, S. E. (2002). Structural plasticity and noncovalent substrate binding in the GroEL apical domain - A study using electrospray ionization mass spectrometry and fluorescence binding studies. Journal of Biological Chemistry *277*, 33115-33126.

Billeter, M. (1992). Comparison of protein structures determined by NMR in solution and by X-ray diffraction in single crystals. Quarterly Reviews of Biophysics *25*, 325-77.

Bode, W., Engh, R., Musil, D., Thiele, U., Huber, R., Karshikov, A., Brzin, J., Kos, J., and Turk, V. (1988). The 2.0 A X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. EMBO Journal *7*, 2593-9.

Boisvert, D. C., Wang, J., Otwinowski, Z., Horwich, A. L., and Sigler, P. B. (1996). The 2.4 A crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL complexed with ATP gamma S [see comments]. Nature Structural Biology *3*, 170-7.

Bosch, G., Baumeister, W., and Essen, L. O. (2000). Crystal structure of the beta-apical domain of the thermosome reveals structural plasticity in the protrusion region. Journal of Molecular Biology *301*, 19-25.

Bosch, G. g. I. (1998). Reinigung, Funktionscharakterisierung und Kristallisierung der Substratbindungsdomäne
der β-Untereinheit des Thermosoms aus *Thermoplasma acidophilum*. .

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. Anal. biochem. *72*, 249-254.

Bragg, L., and Perutz, M. F. (1954). The Structure of Haemoglobin .6. Fourier Projections On the 010-Plane. Proceedings of the Royal Society of London Series a- Mathematical and Physical Sciences *225*, 315-329.

Braig, K., Adams, P. D., and Brunger, A. T. (1995). Conformational variability in the refined structure of the chaperonin GroEL at 2.8 A resolution [see comments]. Nature Structural Biology *2*, 1083-94.

Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D. C., Joachimiak, A., Horwich, A. L., and Sigler, P. B. (1994). The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 A [see comments]. Nature *371*, 578-86.

Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., Delano, W. L., Gros, P., Grossekunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. (1998). Crystallography and NMR System - a New Software Suite For Macromolecular Structure Determination. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography *54*, 905-921.

Buchberger, A., Schroder, H., Hesterkamp, T., Schonfeld, H. J., and Bukau, B. (1996). Substrate shuttling between the DnaK and GroEL systems indicates a chaperone network promoting protein folding. Journal of Molecular Biology *261*, 328-33.

Buckle, A. M., Zahn, R., and Fersht, A. R. (1997). A Structural Model For Groel-Polypeptide Recognition. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *94*, 3571-3575.

Bukau, B., and al., e. (1999). Assisted Protein Folding, B. Bukau, ed. (Amsterdam: Harwood Academic Publishers).

Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C., and Craig, E. A. (2000). Getting newly synthesized proteins into shape. Cell *101*, 119-22.

Bukau, B., and Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. Cell *92*, 351-66.

CCP4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography *50*, 760-763.

Chatellier, J., Hill, F., and Fersht, A. R. (2000a). From minichaperone to GroEL 2: Importance of avidity of the multisite ring structure. Journal of Molecular Biology *304*, 883-896.

Chatellier, J., Hill, F., Foster, N. W., Goloubinoff, P., and Fersht, A. R. (2000b). From minichaperone to GroEL 3: Properties of an active single-ring mutant of GroEL. Journal of Molecular Biology *304*, 897-910.

Chatellier, J., Hill, F., Lund, P. A., and Fersht, A. R. (1998). In Vivo Activities of Groel Minichaperones. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *95*, 9861-9866.

Chaudhuri, T. K., Farr, G. W., Fenton, W. A., Rospert, S., and Horwich, A. L. (2001). GroEL/GroES-mediated folding of a protein too large to be encapsulated. Cell *107*, 235-246.

Chazin, W. J., Hugli, T. E., and Wright, P. E. (1988). 1H NMR studies of human C3a anaphylatoxin in solution: sequential resonance assignments, secondary structure, and global fold. Biochemistry *27*, 9139-48.

Chen, L. L., and Sigler, P. B. (1999). The crystal structure of a GroEL/peptide complex: Plasticity as a basis for substrate diversity. Cell *99*, 757-768.

Cudney, B., Patel, S., Weisgraber, K., Newhouse, Y., and McPherson, A. (1994). Screening and Optimization Strategies for Macromolecular Crystal Growth. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography *50*, 414-423.

Dieckmann, T., Mitschang, L., Hofmann, M., Kos, J., Turk, V., Auerswald, E. A., Jaenicke, R., and Oschkinat, H. (1993). The structures of native phosphorylated chicken cystatin and of a recombinant unphosphorylated variant in solution. Journal of Molecular Biology *234*, 1048-59.

Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Stetter, K. O., Huber, H., Huber, R., and Steinbacher, S. (1998). Crystal structure of the thermosome, the archaeal chaperonin and homolog of CCT. Cell *93*, 125-38.

Dobrzynski, J. K., Sternlicht, M. L., Farr, G. W., and Sternlicht, H. (1996). Newly-synthesized beta-tubulin demonstrates domain-specific interactions with the cytosolic chaperonin. Biochemistry *35*, 15870-15882.

Drenth, J. (1994). Principles of Protein X-Ray Crystallography (New York: Springer Verlag).

Dunker, A. K., Brown, C. J., Lawson, J. D., Iakoucheva, L. M., and Obradovic, Z. (2002). Intrinsic disorder and protein function. Biochemistry *41*, 6573-82.

Dunker, A. K., Lawson, J. D., Brown, C. J., Williams, R. M., Romero, P., Oh, J. S., Oldfield, C. J., Campen, A. M., Ratliff, C. M., Hipps, K. W., Ausio, J., Nissen, M. S., Reeves, R., Kang, C., Kissinger, C. R., Bailey, R. W., Griswold, M. D., Chiu, W., Garner, E. C., and Obradovic, Z. (2001). Intrinsically disordered protein. Journal of Molecular Graphics & Modelling *19*, 26-59.

Dunn, A. Y., Melville, M. W., and Frydman, J. (2001). Review: Cellular substrates of the eukaryotic chaperonin TRiC/CCT. Journal of Structural Biology *135*, 176-184.

Ellis, R. J. (1999). Molecular chaperones: pathways and networks. Current Biology *9*, R137-9.

Ellis, R. J. (1987). Proteins as molecular chaperones. Nature *328*, 378-379.

Engh, R. A., Dieckmann, T., Bode, W., Auerswald, E. A., Turk, V., Huber, R., and Oschkinat, H. (1993). Conformational variability of chicken cystatin. Comparison of structures determined by X-ray diffraction and NMR spectroscopy. Journal of Molecular Biology *234*, 1060-9.

Engh, R. A., and Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray protein-structure refinement. Acta Crystallographica Section A *47*, 392-400.

Erikson, H. P. (2001). Evolution in bacteria. Nature *413*, 30.

Ewalt, K. L., Hendrick, J. P., Houry, W. A., and Hartl, F. U. (1997). In vivo observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system. Cell *90*, 491-500.

Farr, G. W., Furtak, K., Rowland, M. B., Ranson, N. A., Saibil, H. R., Kirchhausen, T., and Horwich, A. L. (2000). Multivalent binding of nonnative substrate proteins by the chaperonin GroEL. Cell *100*, 561-573.

Farr, G. W., Scharl, E. C., Schumacher, R. J., Sondek, S., and Horwich, A. L. (1997). Chaperonin-mediated folding in the eukaryotic cytosol proceeds through rounds of release of native and nonnative forms. Cell *89*, 927-37.

Feldman, D. E., and Frydman, J. (2000). Protein folding in vivo: the importance of molecular chaperones. Current Opinion in Structural Biology *10*, 26-33.

Feldman, D. E., Thulasiraman, V., Ferreyra, R. G., and Frydman, J. (1999). Formation of the VHL-elongin BC tumor suppressor complex is mediated by the chaperonin TRiC. Molecular Cell *4*, 1051-61.

Feltham, J. L., and Gierasch, L. M. (2000). GroEL-substrate interactions: Molding the fold, or folding the mold? Cell *100*, 193-196.

Fenton, W. A., and Horwich, A. L. (1997). GroEL-mediated protein folding. Protein Science *6*, 743-60.

Fenton, W. A., Kashi, Y., Furtak, K., and Horwich, A. L. (1994). Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. Nature *371*, 614-9.

Frydman, J., Nimmesgern, E., Erdjument-Bromage, H., Wall, J. S., Tempst, P., and Hartl, F. U. (1992). Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and structurally related subunits. EMBO Journal *11*, 4767-78.

Gao, Y., Thomas, J. O., Chow, R. L., Lee, G. H., and Cowan, N. J. (1992). A cytoplasmic chaperonin that catalyzes beta-actin folding. Cell *69*, 1043-50.

Geissler, S., Siegers, K., and Schiebel, E. (1998). A novel protein complex promoting formation of functional alpha- and gamma-tubulin. EMBO Journal *17*, 952-66.

Guagliardi, A., Cerchia, L., Bartolucci, S., and Rossi, M. (1994). The chaperonin from the archaeon Sulfolobus solfataricus promotes correct refolding and prevents thermal denaturation in vitro. Protein Science *3*, 1436-1443.

Guagliardi, A., Cerchia, L., and Rossi, M. (1995). Sulfolobus-solfataricus chaperonin prevents lysozyme from aggregating during refolding and during heat denaturation. Protein and Peptide Letters *2*, 403-408.

Gutsche, I., Essen, L. O., and Baumeister, F. (1999). Group II chaperonins: New TRiC(k)s and turns of a protein folding machine. Journal of Molecular Biology *293*, 295-312.

Gutsche, I., Holzinger, J., Rauh, N., Baumeister, W., and May, R. P. (2001). ATP-induced structural change of the thermosome is temperature-dependent. Journal of Structural Biology *135*, 139-146.

Gutsche, I., Holzinger, J., Rossle, M., Heumann, H., Baumeister, W., and May, R. P. (2000a). Conformational rearrangements of an archaeal chaperonin upon ATPase cycling. Current Biology *10*, 405-408.

Gutsche, I., Mihalache, O., and Baumeister, W. (2000c). ATPase cycle of an archaeal chaperonin. Journal of Molecular Biology *300*, 187-196.

Gutsche, I., Mihalache, O., Hegerl, R., Typke, D., and Baumeister, W. (2000b). ATPase cycle controls the conformation of an archaeal chaperonin as visualized by cryo-electron microscopy. FEBS Letters *477*, 278-282.

Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature (London) *381*, 571-580.

Houry, W. A., Frishman, D., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., and Hartl, F. U. (1999). Identification of in vivo substrates of the chaperonin GroEL. Nature *402*, 147-154.

Hua, Q. X., Dementieva, I. S., Walsh, M. A., Hallenga, K., Weiss, M. A., and Joachimiak, A. (2001). A thermophilic mini-chaperonin contains a conserved polypeptide-binding surface: Combined crystallographic and NMR studies of the GroEL apical domain with implications for substrate interactions. Journal of Molecular Biology *306*, 513-525.

Huber, R., Scholze, H., Paques, E. P., and Deisenhofer, J. (1980). Crystal structure analysis and molecular model of human C3a anaphylatoxin. Hoppe Seylers Zeitschrift fur Physiologische Chemie *361*, 1389-99.

Hynes, G. M., and Willison, K. R. (2000). Individual subunits of the eukaryotic cytosolic chaperonin mediate interactions with binding sites located on subdomains of beta-actin. Journal of Biological Chemistry *275*, 18985-18994.

Jancarik, J., and Kim, S. K. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. Journal of Applied Crystallography *24*, 409-411.

John, M., Heller, M., Coles, M., Bosch, G., Baumeister, W., and Kessler, H. (2003). Backbone 1H, 15N and 13C resonance assignments of a-ADT and b-ADT. Journal of Biomolecular NMR *in Vorbereitung*.

John, M., Heller, M., Coles, M., Bosch, G., Baumeister, W., and Kessler, H. (2003). Structural disorder in the substrate binding domains of group II chaperonins. *in Vorbereitung*.

Jones, D. T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. J. Mol. Biol *292*, 195-202.

Kim, S., Willison, K. R., and Horwich, A. L. (1994). Cystosolic chaperonin subunits have a conserved ATPase domain but diverged polypeptide-binding domains. Trends in Biochemical Sciences *19*, 543-548.

Klumpp, M., Baumeister, W., and Essen, L. O. (1997). Structure of the substrate binding domain of the thermosome, an archaeal group II chaperonin. Cell *91*, 263-70.

Kobayashi, N., Freund, S. M. V., Chatellier, J., Zahn, R., and Fersht, A. R. (1999). NMR analysis of the binding of a rhodanese peptide to a minichaperone in solution. Journal of Molecular Biology *292*, 181-190.

Kraulis, P. J. (1991). MOLSCRIPT: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. J. Appl. Crystallogr. *24*, 946-950.

Kriwacki, R. W., Hengst, L., Tennant, L., Reed, S. I., and Wright, P. E. (1996). Structural studies of p21Waf1/Cip1/Sdi1 in the free and Cdk2-bound state: conformational disorder mediates binding diversity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *93*, 11504-9.

Kubota, H., Hynes, G., Carne, A., Ashworth, A., and Willison, K. (1994). Identification of six Tcp-1-related genes encoding divergent subunits of the TCP-1-containing chaperonin. Current Biology *4*, 89-99.

Leroux, M. R., and Hartl, F. U. (2000). Protein folding: Versatility of the cytosolic chaperonin TRIC/CCT. Current Biology *10*, R260-R264.

Lewis, V. A., Hynes, G. M., Zheng, D., Saibil, H., and Willison, K. (1992). T-complex polypeptide-1 is a subunit of a heteromeric particle in the eukaryotic cystosol. Nature (London) *358*, 249-252.

Lin, P., Cardillo, T. S., Richard, L. M., Segel, G. B., and Sherman, F. (1997). Analysis of mutationally altered forms of the Cct6 subunit of the chaperonin from Saccharomyces cerevisiae. Genetics *147*, 1609-33.

Liou, A. K., and Willison, K. R. (1997). Elucidation of the subunit orientation in CCT (chaperonin containing TCP1) from the subunit composition of CCT micro-complexes. EMBO Journal *16*, 4311-6.

Llorca, O., Martin-Benito, J., Gomez-Puertas, P., Ritco-Vonsovici, M., Willison, K. R., Carrascosa, J. L., and Valpuesta, J. M. (2001b). Analysis of the interaction between the eukaryotic chaperonin CCT and its substrates actin and tubulin. Journal of Structural Biology *135*, 205-218.

Llorca, O., Martin-Benito, J., Grantham, J., Ritco-Vonsovici, M., Willison, K. R., Carrascosa, J. L., and Valpuesta, J. M. (2001a). The 'sequential allosteric ring' mechanism in the eukaryotic chaperonin-assisted folding of actin and tubulin. EMBO Journal *20*, 4065-4075.

Llorca, O., Martin-Benito, J., Ritco-Vonsovici, M., Grantham, J., Hynes, G. M., Willison, K. R., Carrascosa, J. L., and Valpuesta, J. M. (2000). Eukaryotic chaperonin CCT stabilizes actin and tubulin folding intermediates in open quasi-native conformations. EMBO Journal *19*, 5971-5979.

Llorca, O., McCormack, E. A., Hynes, G., Grantham, J., Cordell, J., Carrascosa, J. L., Willison, K. R., Fernandez, J. J., and Valpuesta, J. M. (1999b). Eukaryotic type II chaperonin CCT interacts with actin through specific subunits. Nature *402*, 693-696.

Llorca, O., Smyth, M. G., Carrascosa, J. L., Willison, K. R., Radermacher, M., Steinbacher, S., and Valpuesta, J. M. (1999a). 3D reconstruction of the ATP-bound form of CCT reveals the asymmetric folding conformation of a type II chaperonin. Nature Structural Biology *6*, 639-642.

Lu, G. (2000). TOP: A new method for Protein Structure Comparisons and Similarity Searches. Journal of Applied Crystallography *33*, 176-183.

Martin-Benito, J., Boskovic, J., Gomez-Puertas, P., Carrascosa, J. L., Simons, C. T., Lewis, S. A., Bartolini, F., Cowan, N. J., and Valpuesta, J. M. (2002). Structure of eukaryotic prefoldin and of its complexes with unfolded actin and the cytosolic chaperonin CCT. EMBO Journal *21*, 6377-6386.

McCallum, C. D., Do, H., Johnson, A. E., and Frydman, J. (2000). The interaction of the chaperonin tailless complex polypeptide 1 (TCP1) ring complex (TRiC) with ribosome-bound nascent chains examined using photo-cross-linking. Journal of Cell Biology *149*, 591-601.

Melki, R., Batelier, G., Soulie, S., and Williams, R. C., Jr. (1997). Cytoplasmic chaperonin containing TCP-1: structural and functional characterization. Biochemistry *36*, 5817-26.

Melki, R., and Cowan, N. J. (1994). Facilitated folding of actins and tubulins occurs via a nucleotide-dependent interaction between cytoplasmic chaperonin and distinctive folding intermediates. Molecular & Cellular Biology *14*, 2895-904.

Merritt, E. A., and Murphy, M. E. P. (1994). Raster3D version 2.0. A program for photorealistic molecular graphics. Acta Crystallogr. D *50*, 869-873.

Miklos, D., Caplan, S., Mertens, D., Hynes, G., Pitluk, Z., Kashi, Y., Harrison-Lavoie, K., Stevenson, S., Brown, C., and Barrell, B. (1994). Primary structure and function of a second essential member of the heterooligomeric TCP1 chaperonin complex of yeast, TCP1 beta. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *91*, 2743-7.

Minor, D. L., Jr., and Kim, P. S. (1996). Context-dependent secondary structure formation of a designed protein sequence. Nature *380*, 730-4.

Navaza, J. (1994). AMoRe: an automated package for molecular replacement. Acta Crystallographica Section A *A50*, 157-163.

Nettesheim, D. G., Edalji, R. P., Mollison, K. W., Greer, J., and Zuiderweg, E. R. (1988). Secondary structure of complement component C3a anaphylatoxin in solution as determined by NMR spectroscopy: differences between crystal and solution conformations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *85*, 5036-40.

Netzer, W. J., and Hartl, F. U. (1998). Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. Trends in Biochemical Sciences *23*, 68-73.

Neuhoff, V., and Arnold, N. (1988). Improved staining of proteins in Polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogramm sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis *9*, 255-262.

Nicholls, A., Sharp, K., and Honig, B. (1991). GRASP: Graphical Representation and Analysis of Surface Properties. Proteins, Structure Function and Genetics *11*, 281.

Nitsch, M., Walz, J., Typke, D., Klumpp, M., Essen, L. O., and Baumeister, W. (1998). Group II chaperonin in an open conformation examined by electron tomography. Nature Structural Biology *5*, 855-857.

Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. Meth. Enzymol. *276*, 307-326.

Ouali, M., and King, R. D. (2000). Cascaded multiple classifiers for secondary structure prediction. Protein Science *9*, 1162-1176.

Palmedo, G., and Ammermann, D. (1997). Cloning and characterization of the Oxytricha granulifera chaperonin containing tailless complex polypeptide 1 gamma gene. European Journal of Biochemistry *247*, 877-83.

Pappenberger, G., Wilsher, J. A., Roe, S. M., Counsell, D. J., Willison, K. R., and Pearl, L. H. (2002). Crystal structure of the CCT gamma apical domain: Implications for substrate binding to the eukaryotic cytosolic chaperonin. Journal of Molecular Biology *318*, 1367-1379.

Peres Ben-Zvi, A., Chatellier, J., Fersht, A. R., and Goloubinoff, P. (1998). Minimal and optimal mechanisms for GroE-mediated protein folding. Proc. Natl. Acad. Sci. *95*, 15275-15280.

Philippsen, A. (2002). DINO: Visualizing Structural Biology. http://www.dino3d.org.

Polekhina, G., Thirup, S., Kjeldgaard, M., Nissen, P., Lippmann, C., and Nyborg, J. (1996). Helix unwinding in the effector region of elongation factor EF-Tu-GDP. Structure *4*, 1141-51.

Quaite-Randall, E., Trent, J. D., Josephs, R., and Joachimiak, A. (1995). Conformational cycle of the archaeosome, a tcp1-like
chaperonin from sulfolobus-shibatae. Journal of Biological Chemistry *270*, 28818-28823.

Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (1988). Amino acid preferences for specific locations at the ends of alpha helices. Science *240*, 1648-52.

Ritco-Vonsovici, M., and Willison, K. R. (2000). Defining the eukaryotic cytosolic chaperonin-binding sites in human tubulins. Journal of Molecular Biology *304*, 81-98.

Rommelaere, H., De Neve, M., Melki, R., Vandekerckhove, J., and Ampe, C. (1999). The cytosolic class II chaperonin CCT recognizes delineated hydrophobic sequences in its target proteins. Biochemistry *38*, 3246-57.

Rost, B., and Sander, C. (1993). Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. Journal of Molecular Biology *232*, 584-99.

Ruepp, A., Graml, W., Santos-Martinez, M. L., Koretle, K. K., Volker, C., Mewes, H. W., Frishman, D., Stocker, S., Lupas, A. N., and Baumeister, W. (2000). The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger Thermoplasma acidophilum. Nature *407*, 508-513.

Ruepp, A., Rockel, B., Gutsche, I., Baumeister, W., and Lupas, A. N. (2001). The chaperones of the archaeon Thermoplasma acidophilum. Journal of Structural Biology *135*, 126-138.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Sattler, M., Schleucher, J., and Griesinger, C. (1999). Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy *34*, 93-158.

Sayle, R. A., and Milnerwhite, E. J. (1995). Rasmol - Biomolecular Graphics For All. Trends in Biochemical Sciences *20*, 374-376.

Schagger, H., Cramer, W. A., and von Jagow, G. (1994). Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. Analytical Biochemistry *217*, 220-30.

Schagger, H., and von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. Analytical Biochemistry *199*, 223-31.

Schägger, H., and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Annal. Biochem. *166*, 368-379.

Schoehn, G., Hayes, M., Cliff, M., Clarke, A. R., and Saibil, H. R. (2000a). Domain rotations between open, closed and bullet-shaped forms of the thermosome, an archaeal chaperonin. Journal of Molecular Biology *301*, 323-332.

Schoehn, G., Quaite-Randall, E., Jimenez, J. L., Joachimiak, A., and Saibil, H. R. (2000b). Three conformations of an archaeal chaperonin, TF55 from Sulfolobus shibatae. Journal of Molecular Biology *296*, 813-819.

Schoepfer, R. (1993). The pRSET family of T7 promoter expression vectors for Escherichia coli. Gene *124*, 83-5.

Schulz, G. E. (1979). Nucleotide binding proteins. Molecular mechanisms of biological recognition, 79-94.

Serrano, L., and Fersht, A. R. (1989). Capping and alpha-helix stability. Nature *342*, 296-9.

Serrano, L., Sancho, J., Hirshberg, M., and Fersht, A. R. (1992). Alpha-helix stability in proteins. I. Empirical correlations concerning substitution of side-chains at the N and C-caps and the replacement of alanine by glycine or serine at solvent-exposed surfaces. Journal of Molecular Biology *227*, 544-59.

Sharp, K. A., Nicholls, A., Friedman, R., and Honig, B. (1991). Reconciling the magnitude of the microscopic and macroscopic hydrophobic effects. Science *252*, 106-109.

Shtilerman, M., Lorimer, G. H., and Englander, S. W. (1999). Chaperonin function: Folding by forced unfolding. Science *284*, 822-825.

Sigler, P. B., Xu, Z. H., Rye, H. S., Burston, S. G., Fenton, W. A., and Horwich, A. L. (1998). Structure and function in groel-mediated protein-folding. Annual Review of Biochemistry *67*, 581-608.

Somer, L., Shmulman, O., Dror, T., Hashmueli, S., and Kashi, Y. (2002). The eukaryote chaperonin CCT is a cold shock protein in Saccharomyces cerevisiae. Cell Stress & Chaperones *7*, 47-54.

Steinbacher, S., and Ditzel, L. (2001). Review: Nucleotide binding to the Thermoplasma thermosome: Implications for the functional cycle of group II chaperonins. Journal of Structural Biology *135*, 147-156.

Studier, F. W. (1973). Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. Journal of Molecular Biology *79*, 237-48.

Svergun, D. I., Barberato, C., Koch, M. H., Fetler, L., and Vachette, P. (1997). Large differences are observed between the crystal and solution quaternary structures of allosteric aspartate transcarbamylase in the R state. Proteins *27*, 110-7.

Szpikowska, B. K., Swiderek, K. M., Sherman, M. A., and Mas, M. T. (1998). MgATP binding to the nucleotide-binding domains of the eukaryotic cytoplasmic chaperonin induces conformational changes in the putative substrate-binding domains. Protein Science *7*, 1524-1530.

Tan, S., and Richmond, T. J. (1998). Crystal structure of the yeast MATalpha2/MCM1/DNA ternary complex. Nature *391*, 660-6.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G. (1997). The Clustal-X Windows Interface - Flexible Strategies For Multiple Sequence Alignment Aided By Quality Analysis Tools. Nucleic Acids Research *25*, 4876-4882.

Thulasiraman, V., Yang, C. F., and Frydman, J. (1999). In vivo newly translated polypeptides are sequestered in a protected folding environment. EMBO Journal *18*, 85-95.

Trent, J. D., Nimmesgern, E., Wall, J. S., Hartl, F. U., and Horwich, A. L. (1991). A molecular chaperone from a thermophilic archaebacterium is related to the eukaryotic protein t-complex polypeptide-1. Nature (London) *354*, 490-493.

Ursic, D., and Culbertson, M. R. (1992). Is yeast TCP1 a chaperonin? Nature *356*, 2.

Ursic, D., Sedbrook, J. C., Himmel, K. L., and Culbertson, M. R. (1994). The essential yeast Tcp1 protein affects actin and microtubules. Molecular Biology of the Cell *5*, 1065-80.

Vainberg, I. E., Lewis, S. A., Rommelaere, H., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Klein, H. L., and Cowan, N. J. (1998). Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin. Cell *93*, 863-73.

Valdar, W. S., and Thornton, J. M. (2001). Conservation helps to identify biologically relevant crystal contacts. Journal of Molecular Biology *313*, 399-416.

Vinh, D. B., and Drubin, D. G. (1994). A yeast TCP-1-like protein is required for actin function in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *91*, 9116-20.

Wagner, G., Hyberts, S. G., and Havel, T. F. (1992). NMR structure determination in solution: A critique and comparison with X-Ray crystallography. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure *21*, 167-198.

Waldmann, T., Lupas, A., Kellermann, J., Peters, J., and Baumeister, W. (1995a). Primary structure of the thermosome from Thermoplasma acidophilum. Biological Chemistry Hoppe-Seyler *376*, 119-26.

Waldmann, T., Nimmesgern, E., Nitsch, M., Peters, J., Pfeifer, G., Muller, S., Kellermann, J., Engel, A., Hartl, F. U., and Baumeister, W. (1995b). The thermosome of Thermoplasma acidophilum and its relationship to the eukaryotic chaperonin TRiC. European Journal of Biochemistry *227*, 848-56.

Walter, S., Lorimer, G. H., and Schmid, F. X. (1996). A thermodynamic coupling mechanism for GroEL-mediated unfolding. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *93*, 9425-30.

Wang, J. D., Herman, C., Tipton, K. A., Gross, C. A., and Weissman, J. S. (2002). Directed evolution of substrate-optimized GroEL/S chaperonins. Cell *111*, 1027-1039.

Wang, J. D., Michelitsch, M. D., and Weissman, J. S. (1998). Groel-groes-mediated protein-folding requires an intact central cavity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United *95*, 12163-12168.

Wang, Q. H., Buckle, A. M., and Fersht, A. R. (2000). Stabilization of GroEL minichaperones by core and surface mutations. Journal of Molecular Biology *298*, 917-926.

Weber, F., Keppel, F., Georgopoulos, C., Hayer-Hartl, M. K., and Hartl, F. U. (1998). The oligomeric structure of GroEL/GroES is required for biologically significant chaperonin function in protein folding. Nature Structural Biology *5*, 977-85.

Weber, P. C., and Salemme, F. R. (1980). Structural and functional diversity in 4-alpha-helical proteins. Nature *287*, 82-4.

Willison, K. R., and Horwich, A. L. (1996). Structure and Function of Chaperonins in Archaebacteria and Eukaryotic Cytosol. In The Chaperonins, R. J. Ellis, ed. (San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press), pp. 107-136.

Willison, K. R., and Kubota, H. (1994). The structure, function, and genetics of the chaperonin containing TCP-1 (CCT) in eukaryotic cytosol. In Morimoto, R. I., A. Tissieres and C. Georgopoulos (Ed.). Cold Spring Harbor Monograph Series, No, pp. 299-312.

Wishart, D. S., and Sykes, B. D. (1994). Chemical shifts as a tool for structure determination. Methods in Enzymology *239*, 363-92.

Wishart, D. S., Sykes, B. D., and Richards, F. M. (1991). Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. Journal of Molecular Biology *222*, 311-33.

Wright, P. E., and Dyson, H. J. (1999). Intrinsically Unstructured Proteins: Re-assessing the Protein Structure-Function Paradigm. Journal of Molecular Biology *293*, 321-331.

Xu, Z., Horwich, A. L., and Sigler, P. B. (1997). The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)7 chaperonin complex. Nature *388*, 741-50.

Yaffe, M. B., Farr, G. W., Miklos, D., Horwich, A. L., Sternlicht, M. L., and Sternlicht, H. (1992). Tcp1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis. Nature (London) *358*, 245-248.

Yokota, S. I., Yanagi, H., Yura, T., and Kubota, H. (2000). Upregulation of cytosolic chaperonin CCT subunits during recovery from chemical stress that causes accumulation of unfolded proteins. European Journal of Biochemistry *267*, 1658-64.

Zahn, R., Buckle, A. M., Perrett, S., Johnson, C. M., Corrales, F. J., Golbik, R., and Fersht, A. R. (1996). Chaperone activity and structure of monomeric polypeptide binding domains of GroEL. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *93*, 15024-9.

7. Abkürzungen

3D	Dreidimensional
Å	Angström (1 Å = 0.1 nm)
A	Ampere
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
αADT	α-apikale Domäne des Thermosoms
APS	Ammoniumperoxoiddisulfat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP-PNP	5'-Adenylylimidodiphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
βADT	β-apikale Domäne desThermosoms
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
Bis	Bisacrylamid
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
γCCT-AD	γ-apikale Domäne des CCT-Komplexes
ca.	circa
CCD	Charged Coupled Device
CCT	Chaperonin Containing TCP-1
CSI	Chemical Shift Index
DESY	Deutsches Elektronensynchrotron
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EtOH	Ethanol
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
FtsZ	Filamentous temperature sensitive protein Z

g	Gramm oder Erdbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
hetNOE	heteronuklearer Kern-Overhauser-Effekt (nuclear Overhauser Effect)
Histag	Histidine(6) Tag
HSP	Hitzeschockprotein (Heat Shock Protein)
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence (heteronukleare Einquanten-Kohärenz)
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β -D-thiogalaktopyranosid
IR	Isomorphous Replacement (Isomorpher Ersatz)
K	Kelvin
kDa	Kilodalton
kV	kilo Volt
l	Liter
LB	Luria-Bertani
µ	micro
M	molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MGW	Molekulargewicht
MilliQ	Wasser aus der MilliQ Reinstwasseranlage
min	Minute
ml	Milliliter
MPI	Max-Planck-Institut
MR	Molecular Replacement (Molekularer Ersatz)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure (nitrilotriacetic acid)
nm	Nanometer (=10^{-9} m)
NMR	Kernspinresonanz (Nuclear Magnetic Resonance)
NOE	Nuclear Overhauser Effect (Kern-Overhauser Effekt)
NTB	Nitrotetrazolium-Chloridblau
OD	optische Dichte
o.g.	oben genannt

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered Saline (Phosphat-gepufferte Saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglykol
ppm	parts per million
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
r.m.s.d.	root mean square deviation
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SANS	Small Angle Neutron Scattering (Neutronen-Kleinwinkelstreuung)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered Saline (Tris-gepufferte Saline)
TBST	Tris-gepufferte Saline mit Tween 20
TCA	Trichloressigsäure (Trichloracetic acid)
TE-Puffer	Tris EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TCP-1	T-Complex Polypeptide 1
TF55	Thermophilic factor 55
TriC	TCP-1 Ring Complex
Tricin	N-Tris-(hydroxymethyl)-methglycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
z.B.	zum Beispiel

Aminosäuren wurden nach dem Ein- oder Drei-Buchstaben-Code abgekürzt.

8. Anhang

Tab. 8.1.:
Einfluss der getesteten Schwermetallverbindungen auf die Kristalle der β-apikalen Domäne βADT

Alle Verbindungen wurden in Gefrierpuffer angesetzt (10 % PEG $_{20000}$, 20 % Glyzerin, 0,1 M Bicine pH 9,1).

Verbindung	*Konzen-tration*	*Inkubations-zeit*	**Effekt**
Trimethylbleiacetat	2 mM	3 h	Kristalle bekamen Risse
Blei(II)acetat-Trihydrat	2 mM	3h	Kristalle bekamen Risse
Gadolinium(III)acetat-Hydrat	5 mM	2,5 h	Kristalle bekamen Risse
Uranylacetat $UO_2^+(CH_3COO^-)_2$	5 mM	15 min	Kristalle zerbrachen
Dichlorodiamin-Platin $PtCl_2(NH_3)_2$	Gesättigte Lösung	8 h	keine sichtbaren Schäden; Auflösung bei 4 Å, aber keine Derivatisierung
Kalium-tetrachloro Platinat (K_2PtCl_4)	Gesättigte Lösung	8 h	Kristalle bekamen Haar-Risse; Auflösung sank auf 8 Å

Tab. 8.2.:
Auflistung der Sekundärstrukturergebnisse für die N-terminalen Fortsatz-abschnitte der apikalen Domänen einiger Gruppe II Chaperonine

Nur die Ergebnisse für die Fortsatzabschnitte zwischen β–Strang S11 und dem Beginn der Helix H10 sind für die jeweiligen Vorhersage-Methoden schematisch aufgeführt. Bis zur Spitze der Fortsätze hin waren Tendenzen zu geordneten Sekundärstruktur-Elementen – soweit vorhanden - generell schwach ausgeprägt. Häufig waren weder gesicherte Tendenzen zu α-helikaler noch zu gestreckter β-Anordnung erkennbar. Im distalen Fortsatzbereich scheinen fast alle Sequenzen übereinstimmend geeignet für einen kurzen Abschnitt gestreckter β-Anordnung.
kT = keine klare Tendenz zu α–Helix oder β–Faltblatt, C / c = ungeordnet, E / e = Tendenz zu (gestreckter) β-Konformation; H / h = Tendenz zu helikaler Konformation; n.g. = nicht getestet. Groß- und Kleinbuchstaben zeigen dabei starke bzw. schwache Tendenzen an. UE = Untereinheit.

Organismus und Untereinheit/Domäne	**PredictProtein (PHDsec)**	**PROF**	**PSIPred**
T. acidophilum αADT	C – E - C-	C – E - c	C – E - c-
D. mobilis β-UE	E – kT- -E	c – E - c	C-e-c-E
S. solfataricus α-UE	c – e -	c-C-e-E	c- -E - C
M. thermolitho-autotrophicum	E – c - E	c-C-E-E	c-e-C-E
H. volcanii cct2-UE	n.g.	n.g.	C – E - c
CCTα	C – E - c-	n.g.	n.g.
CCTβ	kT/c – e - c	C – E - c	c – h – c – e
CCTγ	C-e-E-c	n.g.	c – E - c
CCTδ	kT/c –E - c	c – E - C	c-E-c-e-c-E
CCTε	c-C-c-e-C	C – E - c	C – E - c
CCTη	n.g.	n.g.	C - E
CCTζ	n.g.	n.g.	C –c -E
CCTθ	kT – e - C	c – e - c	h-c-E-C

(Die Ausdrucke der Original-Vorhersage-Ergebnisse sind nicht gezeigt).

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von April 1998 bis März 2003 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Baumeister in der Abteilung für Molekulare Strukturbiologie am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Herrn Professor Baumeister danke ich herzlich für die Themenstellung, das Interesse am Fortgang der Arbeit, die großzügige Förderung, auch und besonders in Bezug auf Fortbildungsmaßnahmen, sowie für sein Verständnis trotz terminlicher Verzögerungen beim Abfassen der Promotionsschrift.

Die gute Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen bei der Aufklärung der Kristallstruktur war eine der wesentlichsten Voraussetzungen für das Gelingen dieser Arbeit. Ich möchte mich bei ihm ganz besonders für die intensive Einführung in die röntgenkristallographischen Techniken, sein Engagement während des gesamten Projekts und für die Betreuung während der Messungen am DESY Hamburg bedanken. Aus seinem reichen Erfahrungsschatz (nicht zuletzt, was die Verarztung verstauchter Zehen an Synchrotronen anbelangt) konnte ich für meine berufliche Zukunft sehr profitieren.

Auch die Kooperation mit der NMR-Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kessler an der TU München gestaltete sich äußerst interessant und erfolgreich. Deswegen möchte ich mich bei Herrn Prof. Kessler für sein andauerndes Interesse und seine Unterstützung für unsere gemeinsamen Projekte bedanken.
Wie sehr eine Kooperation von der guten, häufig sehr lustigen, immer engagierten und für beide Seiten lehrreichen Kommunikation lebt, durfte ich vor allem in der Zusammenarbeit mit Dr. Murray Coles und Dr. Tammo Diercks, Michael John und Markus Heller erfahren. Es hat mir während der Jahre große Freude gemacht, mit Euch zusammenzuarbeiten.

Ein großes Dankeschön gebührt allen ehemaligen Kollegen und jetzigen Mitgliedern der Abteilung, die mir immer mit Rat und Tat zu Seite standen und in zahllosen Diskussionen und nützlichen Ratschlägen ihr Wissen mit mir teilten, obwohl sie selbst oft schon genug zu tun hatten. Hierbei möchte ich besonders Dr. Jürgen und Marietta Peters, Werner Graml, Dr. Christiana Cicicopol und Marius Boicu, Oana Mihalache,

Dr. Susanne Witt, Dr. Noriko und Dr. Tomohiro Tamura, Dr. Irina Gutsche, Dr. Erika Seemüller, Dr. Harald Engelhardt und Dr. Peter Zwickl danken.

Vor allem im letzten Drittel meiner Arbeit haben mir viele liebe Arbeitskollegen und Freunde immer wieder durch schwierige Phasen geholfen, weshalb sich auch negative Erfahrungen auf die eine oder andere Weise bezahlt gemacht haben. Ohne ihre Hilfsbereitschaft und ihre Motivation hätte ich für viele Probleme nur schwer eine Lösung gefunden. Deswegen bedanke ich mich an dieser Stelle ganz besonders herzlich bei Dr. Daniela Nicastro (vor allem für lange, aufbauende Telefongespräche), Dr. Beate Rockel und Dr. Jürgen Peters.

Vielen anderen netten Kollegen, nicht zuletzt Ariane Briegel, Dr. Thomas Keil, Alexandra Gerega und Jens Schiener, Jan Lubieniecki, Herbert Breu, Toni Hillebrand, unserem Sekretariat und unserer Werkstatt, gilt mein persönlicher Dank für gründliche Textkorrekturen sowie zahllose kleinere und größere Hilfestellungen und Erklärungen, die für mich sehr nützlich waren und immer wieder für ein angenehmes Arbeiten sorgten.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinen Eltern, meiner Familie und unseren geduldigen Freunden, die mir immer die Stange gehalten und mich unterstützt haben, auch wenn wir uns nur selten sehen konnten. Ein besonderes Dankeschön möchte ich an dieser Stelle auch an meinen Onkel Manfred Schneider richten, der mir die Arbeit durch die Bereitstellung eines Laptops sehr erleichtert hat.

Um mich bei meinem Mann dafür zu bedanken, wie sehr er mich während der gesamten Arbeit unterstützt und mir zudem bei der Erstellung von Abbildungen geholfen sowie das Manuskript korrigiert hat, brauche ich eigentlich nur zu wiederholen, was ich schon in die Danksagung meiner Diplomarbeit geschrieben habe: Er war und ist einfach immer da, wenn man ihn braucht.