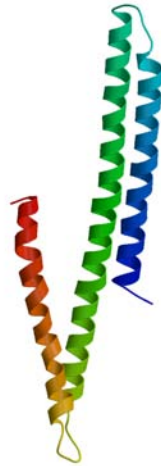
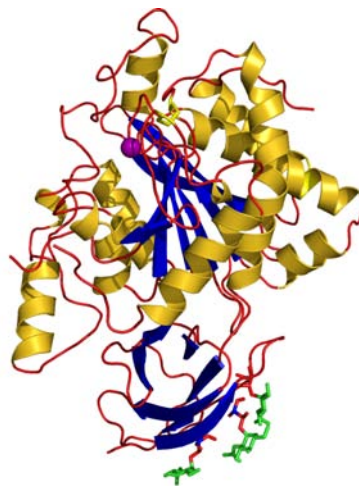


Röntgenkristallographische und biochemische Untersuchungen  
des  $\beta$ Amyloid-Precursorproteins (APP)  
aus der Alzheimer-Krankheit



und der Carboxypeptidase N (CPN)



Cora Keil



Technische Universität München  
Max-Planck-Institut für Biochemie  
Abteilung Strukturforschung

**Röntgenkristallographische und biochemische Untersuchungen  
des  $\beta$ Amyloid-Precursorproteins (APP)  
aus der Alzheimer-Krankheit  
und der Carboxypeptidase N (CPN)**

Cora Keil

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

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Steffen Johannes Glaser

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Dr. h.c. Robert Huber, i.R.  
2. Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner

Die Dissertation wurde am 24.10.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch  
die Fakultät für Chemie am 12.12.2006 angenommen.



„Per aspera ad astra“

*Seneca*



**Meiner Familie  
mit Lorenz**





# Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2003 bis Oktober 2006 in der Abteilung für Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Leitung von Professor Dr. Dr. Robert Huber angefertigt.

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Herrn Professor Dr. Dr. Robert Huber für das fortwährende Interesse an meiner Arbeit bedanken. Die große Freiheit bei der Bearbeitung der Themen und die Bereitstellung hervorragender, wissenschaftlicher Arbeitsbedingungen habe ich sehr genossen.

Ein ebenso großer Dank gilt Herrn Professor Dr. Wolfram Bode für seine stete Diskussionsbereitschaft, seine Unterstützung und die vielen anregenden Gespräche. Dies hat zu einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen.

Herrn Professor Dr. Reinhard Fässler sei für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis der molekularen Medizin ab Januar 2006 gedankt.

Bei Herrn Dr. Manuel Than bedanke ich mich für die Zusammenarbeit rund um die APPs und für seine Einführung in die Kristallographie.

Herrn Professor Dr. Ervin Erdos und Herrn Professor Dr. Randal Skidgel, Departments of Pharmacology and Anesthesiology, University of Illinois, College of Medicine at Chicago, USA danke ich für die Präparation der CPN1. Ein ganz besonderer Dank gilt Charlotte Ungewickell für die Kristallisation der CPN1 sowie Dr. Klaus Maskos für die Unterbreitung des Phasierungsproblems.

Meinen zahlreichen Laborkollegen danke ich für die vielen unterhaltsamen Stunden an der *bench* und teilweise außerhalb des Labors. Insbesondere nennen möchte ich Dr. Tobias Krojer, Dr. Dorota Ksiazek, Dr. Magda Wisniewska, Dr. Kerstin Rohr, Dr. Katja Wenig und Dr. Stefan Henrich. Ebenso sei meinen Bürokollegen gedankt, Dr. Rainer Friedrich, Dr. Michael Engel, Dr. Peter Göttig, Anna Tochowicz, Mekdes Debela und Dr. Susanne Stanitzek.

Renate Rüller, Monika Schneider und Sylvia Zehner waren mir stets eine große Hilfe bei der Bewältigung bürokratischer Probleme, Werner Dersch und Ottmar Paul haben mir bei technischen Problemen jedweder Art stets schnell und kompetent weiterhelfen können. Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Gleb Bourenkov für die Hilfe bei Arbeiten am Synchrotron und Herrn Dr. Hans Bartunik für die Bereitstellung der Infrastruktur an der Max-Planck-*Beamline* BW6 am deutschen Elektronen-Synchrotron. Herrn Dr. Karl-Heinz Mann und Reinhard Mentele möchte ich für die Edman-Sequenzierungen danken, Elisabeth Weyher für die Durchführung der Massenspektrometrie und die freundliche Einweisung in die Methode des Circular Dichroismus und Valerie Grimminger von der Technischen Universität München danke ich für die Durchführung der Experimente zur Ultrazentrifugation.

Außerhalb der Arbeit möchte ich mich bei meinen Freunden für ihre Geduld und das Verständnis bedanken, dass sie mir während meiner Doktorarbeit entgegengebracht haben. Dieser Dank gilt ganz besonders meinen „Unimädels“ Doris Hangel, Simone Hess und Sonja Meixlsperger, die alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit miterlebt haben.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meiner Mutter bedanken, die immer an mich geglaubt hat und mich zusammen mit meinem Großvater auf meinem Weg stets wohlwollend unterstützt und begleitet hat. Nicht zuletzt möchte ich Lorenz von Herzen danken für das große Verständnis, die Unterstützung und Aufmunterung auf dem Weg zu den Sternen.



## Publikationen

1. **Keil, C.**, Maskos, K., Than, M.E., Huber, R., Tan, F., Deddish, P.A., Skidgel, R.A., Erdos, E.G., Bode, W., (2006). Crystal structure of the human carboxypeptidase N (kininase I) catalytic domain. *J. Mol. Biol.* Submitted
2. **Keil, C.**, Huber, R., Bode, W., Than, M.E. (2004). Cloning, expression, crystallization and initial crystallographic analysis of the C-terminal domain of the amyloid precursor protein APP. *Acta Crystallogr. D* 60, 1614-1617.
3. **Keil, C.**, Huber, R., Bode, W., Than, M.E. (2004). Initial crystallographic analysis of the C-terminal domain of the Amyloid Precursor Protein Ectodomain. Jahresbericht HASYLAB 2004, Hamburg.

## Vorträge und Poster

1. 20<sup>th</sup> Winter School, Proteinases and their Inhibitors, recent developments. Tiers, Italien, 2003.
2. Sonderforschungsbereich 596. Progress Reports



# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
1.1 $\beta$ Amyloid-Vorläuferprotein (APP)	1
1.2 Carboxypeptidase N (CPN)	2
<b>2 Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1 Die Alzheimer-Krankheit	3
2.1.1 Die pathomorphologischen Veränderungen der AD	3
2.1.2 Das Amyloidvorläuferprotein (APP)	5
2.1.3 Die Rolle des $A\beta_{42}$ bei der Plaque-Bildung	8
2.1.4 Genetische Ursachen der Alzheimer-Krankheit	8
2.1.5 Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese	9
2.1.6 Dreidimensionale Strukturen von APP und mögliche Funktionen	10
2.1.7 Ziel der Arbeit	15
2.2 Carboxypeptidasen	17
2.2.1 Metallo-Carboxypeptidasen	17
2.2.2 Biochemische Charakterisierung von Metallo-Carboxypeptidasen	17
2.2.3 Allgemeine Struktur der Metallo-Carboxypeptidasen	20
2.2.4 Katalytischer Mechanismus der Metallo-Carboxypeptidasen	21
2.2.5 Katalytischer Mechanismus der N/E-Unterfamilie	23
2.2.6 Biochemische Charakterisierung von MCP Inhibitoren	23
2.2.7 Carboxypeptidase N (CPN)	26
2.2.8 CPN-Substrate	29
2.2.9 Ziel der Arbeit	30
<b>3 Material</b>	<b>31</b>
3.1 Laborgeräte	31
3.2 Kristallographie	32
3.3 Datenbanken	32
3.4 Proteine	32
3.4.1 Restriktionsendonukleasen	32
3.4.2 Antikörper	32
3.4.3 Sonstige Proteine	33
3.5 Standards	33
3.6 Kits	33
3.7 Chromatographiematerialien	33
3.8 Sonstige Materialien	33
3.9 Bakterienstämme und Plasmide	34
3.10 Medien und Medienzusätze	34
3.10.1 LB-Medium	34
3.10.2 LB-Agarplatten-Medium	34
3.10.3 SOB-Medium	34

3.10.4	Minimalmedium . . . . .	34
3.10.5	Antibiotika und andere Medienzusätze . . . . .	35
3.11	Allgemeine Puffer und Lösungen . . . . .	36
3.11.1	50x TAE-Puffer . . . . .	36
3.11.2	DNA-Probenpuffer . . . . .	36
3.11.3	SDS-PAGE . . . . .	36
3.11.4	Western-Blot . . . . .	38
3.11.5	Probenvorbereitung für Edman-Sequenzierung . . . . .	39
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>41</b>
4.1	Gentechnische Methoden . . . . .	41
4.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . . .	41
4.1.2	Herstellung von elektrokompenten Zellen . . . . .	42
4.1.3	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Zellen . . . . .	43
4.1.4	Plasmidpräparationen . . . . .	43
4.1.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren . . . . .	43
4.1.6	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen . . . . .	44
4.1.7	Dephosphorylierung linearer Doppelstrang-DNA . . . . .	45
4.1.8	Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	45
4.1.9	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase . . . . .	45
4.2	Proteinpräparation . . . . .	46
4.2.1	Kultivierung und Konservierung von <i>E.coli</i> Stämmen . . . . .	46
4.2.2	Konservieren von Bakterienstämmen mittels Glycerinkulturen . . . . .	46
4.2.3	Proteinexpression und Ernte . . . . .	46
4.2.4	Derivatisierung der Proteine mit Selenomethionin . . . . .	47
4.2.5	Aufkonzentrierung . . . . .	47
4.2.6	Chromatographische Methoden . . . . .	47
4.3	Proteinanalytik . . . . .	48
4.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	48
4.3.2	Färbemethoden . . . . .	48
4.3.3	Probenvorbereitung zur Edman-Sequenzierung . . . . .	49
4.3.4	N-terminale Sequenzierung nach EDMAN . . . . .	49
4.3.5	Massenspektrometrie . . . . .	49
4.3.6	Circular Dichroismus . . . . .	50
4.3.7	Analytische Ultrazentrifugation . . . . .	50
4.3.8	Antikörper-Färbung . . . . .	50
4.3.9	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Absorption . . . . .	51
4.4	Kristallisation . . . . .	51
4.4.1	Kristallisation mittels Dampfdiffusion . . . . .	52
4.4.2	Kristallmontage . . . . .	52
4.5	Röntgenkristallographische Methoden . . . . .	53
4.5.1	Kristallgitter und Kristallsymmetrie . . . . .	53
4.5.2	Bestimmung der Molekülanzahl in der asymmetrischen Einheit . . . . .	54
4.5.3	Röntgenstrahlung . . . . .	54
4.5.4	Theorie der Röntgenstreuung . . . . .	55
4.5.5	Reziprokes Gitter und Ewaldkonstruktion . . . . .	57
4.5.6	Temperaturfaktoren . . . . .	58
4.5.7	Fouriertransformation und Phasenproblem . . . . .	59
4.5.8	Datensammlung . . . . .	59
4.5.9	Prozessierung, Skalierung und Reduktion kristallographischer Daten . . . . .	60

4.5.10	Bestimmung nicht-kristallographischer Symmetrie . . . . .	62
4.5.11	Lösung des Phasenproblems . . . . .	63
4.5.12	Phasenbestimmung durch multiple anomale Dispersion (MAD) . . . . .	64
4.5.13	Phasenbestimmung durch molekularen Ersatz . . . . .	67
4.5.14	Modellbau und Elektronendichtekarten . . . . .	68
4.6	Verfeinerung . . . . .	68
4.6.1	Verfeinerung von Temperaturfaktoren . . . . .	69
4.6.2	<i>Rigid body</i> -Verfeinerung . . . . .	70
4.6.3	Molekulardynamik-Simulation ( <i>simulated annealing</i> ) . . . . .	70
4.6.4	Einbau von Wassermolekülen und Liganden . . . . .	70
4.7	Proteinstrukturen . . . . .	70
4.7.1	Homologiemodell . . . . .	70
4.7.2	Qualität von Proteinstrukturen . . . . .	70
4.7.3	Darstellung und Analyse von Proteinstrukturen . . . . .	71
4.7.4	Proteinstrukturvergleiche . . . . .	72
<b>5</b>	<b>Ergebnisse – <math>\beta</math>Amyloid-Precursorprotein (APP)</b>	<b>73</b>
5.1	C-terminale Hälfte der $\beta$ APP-Ektodomäne (bappS4) . . . . .	73
5.1.1	Klonierung und Expression . . . . .	73
5.1.2	Reinigung . . . . .	73
5.1.3	Expression und Reinigung von SeMet-bappS4 . . . . .	75
5.1.4	Biochemische Charakterisierung des reinen bappS4-Proteins und SeMet-bappS4-Proteins . . . . .	75
5.1.5	Kristallisation und Charakterisierung der Kristalle . . . . .	78
5.1.6	Kristallographische Datensammlung . . . . .	79
5.1.7	Strukturlösung . . . . .	80
5.2	N-terminale Hälfte der $\beta$ APP-Ektodomäne (bappS3) . . . . .	83
5.2.1	Klonierung und Expression . . . . .	83
5.2.2	Reinigung . . . . .	84
5.2.3	Biochemische Charakterisierung des bappS3-Proteins . . . . .	84
5.2.4	Heparinbindung . . . . .	84
5.2.5	Kristallisation . . . . .	85
5.3	gesamte $\beta$ APP-Ektodomäne (bappS1) . . . . .	85
5.3.1	Expression . . . . .	85
5.3.2	Reinigung . . . . .	86
5.3.3	Kristallisation und Charakterisierung der Kristalle . . . . .	86
5.3.4	Kristallographische Datensammlung . . . . .	87
5.3.5	Biochemische Charakterisierung der $\beta$ APP-Ektodomäne . . . . .	88
<b>6</b>	<b>Ergebnisse – Carboxypeptidase N (CPN)</b>	<b>91</b>
6.1	Klonierung, Expression und Reinigung . . . . .	91
6.2	Kristallisation . . . . .	91
6.3	Kristallographische Datensammlung . . . . .	91
6.4	Strukturlösung . . . . .	92
6.4.1	Molekularer Ersatz . . . . .	92
6.4.2	Modellbau . . . . .	92
6.4.3	Verfeinerung . . . . .	92
6.4.4	Qualität der CPN1-Struktur . . . . .	92
6.5	Strukturbeschreibung der CPN1 . . . . .	94
6.5.1	Beschreibung der Gesamtstruktur . . . . .	94

6.5.2	Strukturbeschreibung der Carboxypeptidase-Domäne . . . . .	96
6.5.3	Strukturbeschreibung der Trans-Thyretin(TT)-Domäne . . . . .	97
6.5.4	Das aktive Zentrum der CPN1 . . . . .	99
<b>7</b>	<b>Diskussion - <math>\beta</math>-Amyloid-Precursorprotein (APP)</b>	<b>101</b>
7.1	C-terminale Hälfte der $\beta$ APP-Ektodomäne (bappS4) . . . . .	101
7.1.1	Expression und Reinigung . . . . .	101
7.1.2	Phasierung mittels Selenomethionin . . . . .	101
7.1.3	Phasierung mittels $(\text{NH}_4)_2\text{OsCl}_6$ . . . . .	102
7.1.4	Beschreibung der Struktur der zentralen APP-Domäne (CAPPD/E2) . .	103
7.1.5	Vergleich des bappS4-Modells mit der veröffentlichten CAPPD-Struktur von Wang & Ha . . . . .	104
7.1.6	Heparinbindung . . . . .	105
7.2	N-terminale Hälfte der $\beta$ APP-Ektodomäne (bappS3) . . . . .	106
7.2.1	Expression und Reinigung . . . . .	106
7.2.2	Heparinbindung . . . . .	106
7.3	Vollängenkonstrukt der $\beta$ APP-Ektodomäne (bappS1) . . . . .	106
7.3.1	Expression und Reinigung . . . . .	106
7.3.2	Proteolytische Spaltung . . . . .	107
7.3.3	Strukturierung der $\beta$ APP-Ektodomäne . . . . .	108
<b>8</b>	<b>Diskussion - Carboxypeptidase N (CPN)</b>	<b>111</b>
8.1	Mögliche Substratinteraktion und Katalytischer Mechanismus . . . . .	111
8.2	Mögliche Tertiärstruktur der CPN . . . . .	113
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>115</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>118</b>



# Abbildungsverzeichnis

2.1	Gehirne eines gesunden und eines erkrankten Menschen . . . . .	4
2.2	Amyloide Plaques im Gehirn eines Alzheimer-Patienten . . . . .	4
2.3	Schematische Darstellung von humanem APP <sub>695</sub> . . . . .	6
2.4	Metabolismus des Amyloid Vorläuferproteins (APP) mit A $\beta$ -Generierung. . . . .	7
2.5	Mutationen des APP . . . . .	10
2.6	Struktur der Wachstumsfaktor-ähnlichen Domäne (GFLD) von APP . . . . .	13
2.7	Struktur der Kupfer-Bindedomäne (CuBD) von APP . . . . .	14
2.8	Lösliche Struktur des A $\beta$ -Peptids von APP . . . . .	15
2.9	Phylogenetischer Baum der Metallo-Carboxypeptidasen . . . . .	18
2.10	Vergleich von Aminosäuresequenzen verschiedener Carboxypeptidasen in Regionen mit hoher Homologie . . . . .	22
2.11	Vergleich von Carboxypeptidase Genstrukturen . . . . .	27
2.12	Schematische Zeichnung der Primärstruktur von CPN2 . . . . .	29
4.1	Phasendiagramm der Kristallisation . . . . .	51
4.2	Schematische Darstellung der Sitztropfenmethode-Methode . . . . .	52
4.3	Kristallmontage zur Messung bei Raumtemperatur . . . . .	53
4.4	Kristallmontage zur Messung bei 100K . . . . .	53
4.5	Schematische Darstellung der Röntgenstreuung an Materie . . . . .	56
4.6	Schematische Darstellung der Röntgenstreuung gemäß dem Bragg'schen Gesetz . . . . .	57
4.7	Darstellung der Ewald-Konstruktion zur Verbindung von realem und reziprokem Raum . . . . .	58
4.8	Messanordnung an der <i>image plate</i> . . . . .	61
4.9	Definition der Euler- und Polarwinkel . . . . .	63
4.10	Zusammensetzung des Strukturfaktors für einen Reflex hkl unter Berücksichtigung der anomalen Streuung . . . . .	65
4.11	Wellenlängenabhängiger Verlauf von $f'$ und $f''$ für Selen . . . . .	66
4.12	Harker-Konstruktion zur Phasenbestimmung unter Berücksichtigung des anomalen Signals . . . . .	67
5.1	Sekundärstrukturvorhersage der $\beta$ APP Ektodomäne . . . . .	74
5.2	Reinigungsüberblick und analytische Gelfiltration des bappS4-Proteins . . . . .	76
5.3	Heparinbindetest des bappS4-Proteins . . . . .	77
5.4	Circular Dichroismus des bappS4-Proteins mit und ohne gebundenem Heparin . . . . .	78
5.5	Kristalle des bappS4-Proteins . . . . .	79
5.6	Selbstrotation und Harker Plot der bappS4-Datensätze . . . . .	81
5.7	Initiale Dichte und initiales Modell des bappS4-Proteins . . . . .	82
5.8	Mithilfe des Programms SHARP gefundene Schwermetallpositionen . . . . .	83
5.9	Reinigungsüberblick und analytische Gelfiltration des bappS3-Proteins . . . . .	85
5.10	Heparinbindetest des bappS3-Proteins . . . . .	85
5.11	Reinigungsüberblick und analytische Gelfiltration des bappS1-Proteins. . . . .	86

5.12	Kristall des bappS1-Proteins . . . . .	87
5.13	Selbstrotation der bappS1-Datensätze . . . . .	88
5.14	Analytische Gelfiltration und SDS-PAGE zur Untersuchung der proteolytischen Segmentation von bappS1 . . . . .	89
6.1	Ramachandran-Diagramm der CPN-Struktur . . . . .	94
6.2	Topologie-Alignment der humanen CPN1 mit humaner CPM und CPD-2 der Ente . . . . .	95
6.3	Stereo-Abbildung der humanen CPN1-Struktur . . . . .	97
6.4	Stereo-Abbildung der humanen CPN1-Struktur, übereinandergelagert mit CPD-2 der Ente, humaner CPM sowie CPA . . . . .	98
6.5	Stereo-Abbildung der Glykosylierungsstellen der CPN1 . . . . .	99
6.6	Stereo-Abbildung des aktiven Zentrums der CPN1 mit gebundenem Sulfat . . . . .	100
7.1	Struktur der zentralen APP-Domäne (CAPPD bzw. E2) . . . . .	103
7.2	Übereinanderlagerung des bappS4-Modells mit der Struktur von Wang & Ha . . . . .	105
7.3	Modellvorstellung der APP-Ektodomänenstruktur . . . . .	109
8.1	Stereo-Abbildung des aktiven Zentrums der CPN1 mit gemodeltem Substrat . . . . .	112
8.2	Stereo-Abbildung der CPN1-Oberfläche . . . . .	114

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 $\beta$ Amyloid-Vorläuferprotein (APP)

Die Alzheimer Krankheit ist die häufigste aller Demenzerkrankungen, allein in Deutschland gibt es über 1 Million Betroffene. Die Ursache der Krankheit ist bisher noch nicht bekannt, es werden aber eine Reihe von Theorien diskutiert, die genetische, toxische, infektiöse und immunologische Faktoren berücksichtigen. Unbestritten ist, dass das  $\beta$ Amyloid-Vorläuferprotein (APP) und das durch Sekretasen abgespaltene Peptid A $\beta$  eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Alzheimer Krankheit spielen. Um die Ursachenkette weiter aufzulösen, wurden Fragmente des  $\beta$ APP zum Mittelpunkt dieser Arbeit gemacht.

Die C-terminale Hälfte der  $\beta$ APP-Ektodomäne, die in eigenen Vorarbeiten kloniert wurde (Keil, 2003), konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich überexprimiert werden, so dass große Mengen an löslichem und homogenem Material gewonnen werden konnten. Durch eine optimierte Reinigungsstrategie gelang es, das Protein hochrein zu erhalten und sowohl röntgenkristallographische Arbeiten als auch detaillierte biochemische Studien durchzuführen. Die Kristallisation des Proteinfragmentes und seine Röntgenstrukturanalyse erlaubten die Anfertigung eines initialen dreidimensionalen Modells der Struktur. Detaillierte, biochemische Untersuchungen zum Bindepartner Heparin brachten zusätzliche Informationen über die Bindefähigkeit des Proteins und die daran anschließenden Auswirkungen in Hinblick auf die Struktur und Stabilität.

Auch die in eigener Vorarbeit klonierte N-terminale Hälfte der  $\beta$ APP-Ektodomäne (Keil, 2003) konnte trotz Cysteinen in der Sequenz löslich in *E. coli*-Bakterien exprimiert werden und über eine optimierte Reinigungsstrategie hochrein gewonnen werden. Die Ausbeute war für initiale Kristallisationsansätze ausreichend, zusätzlich wurden auch für dieses Fragment Experimente bezüglich des Oligomerisierungsverhaltens durchgeführt. Die Daten konnten wichtige Informationen für ein Verständnis der Strukturierung der gesamten Ektodomäne beitragen.

Das Konstrukt, das die gesamte Ektodomäne umfasst, konnte ebenfalls löslich überexprimiert werden, und bei der Reinigung wurde Nutzen aus den verschiedenen Bindedomänen der  $\beta$ APP-Ektodomäne gezogen. Das hochreine Material war ausreichend, um Kristallisationsansätze anzusetzen. Allerdings zeigte sich, dass beim Kristallisieren ein proteolytischer Abbau in unterschiedliche Fragmente erfolgte. Die einzelnen Fragmente wurden intensiv biochemisch untersucht, so dass sich ein schematisches Gesamtbild der Struktur der  $\beta$ APP-Ektodomäne in Hinblick auf die unterschiedlichen Domänen und das Oligomerisierungsverhalten aufstellen ließ. Dies sind wichtige Schritte auf dem Weg, das Rätsel um das  $\beta$ APP und die Alzheimer Krankheit weiter zu lösen.

## 1.2 Carboxypeptidase N (CPN)

Die Carboxypeptidase N ist ein Mitglied der CPN/E-Unterfamilie der regulatorischen Metallo-Carboxypeptidasen und spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Peptidhormonen sowie zelloberflächen-basierter Aktivität von Wachstumsfaktoren. Dies geschieht über eine C-terminale Abspaltung speziell von Lysin- oder Argininresten von Peptiden und Proteinen. Einzigartig unter den Metallo-Carboxypeptidasen ist der Aufbau der CPN aus zwei unterschiedlichen Domänen, die im Blutplasma als Heterotetramere zirkulieren. Dabei werden je zwei sogenannte regulatorische 83 kDa-Untereinheiten (CPN2) von zwei katalytisch fungierenden 48 bis 55 kDa-Untereinheiten (CPN1) flankiert. Das Zusammenspiel der beiden Domänen untereinander ist bis heute noch relativ unklar, und auch über die Wechselwirkungen, die beide Domänen zusammenhalten, gibt es nur Spekulationen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die katalytische Untereinheit CPN1 der Carboxypeptidase N röntgenkristallographisch untersucht und die Struktur mittels der Methode des molekularen Ersatzes erfolgreich gelöst. Das Atommodell konnte bei einer Auflösung von 2,1 Å bis zu einem kristallographischen R-Faktor von 17,9 % verfeinert werden. Vergleiche der CPN1-Struktur mit den homologen Strukturen CPD-2 der Ente, humaner CPM (beide Mitglieder der CPN/E-Unterfamilie), sowie auch der CPA (CPA/B-Unterfamilie) machen die Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den Carboxypeptidasen deutlich und erklären verschiedene durch experimentelle Studien bekannte Substratpräferenzen und Inhibitorwirkungen.

Aufgrund biochemischer Daten und einer entsprechend dem elektrischen Potential erstellten Oberfläche der CPN1 konnte ein Vorschlag zur Tertiärstruktur gemacht werden sowie der Bereich der Interaktion zwischen den beiden Domänen deutlich eingegrenzt werden.

Zusätzlich angefertigte Modellierungsstudien mit einem den letzten Aminosäuren des natürlichen Substrats Bradykinin nachempfundenen Tripeptid ermöglichen Einblicke in den katalytischen Mechanismus der CPN. Eine Überlagerung der Struktur mit dem Enzym-Inhibitor-Komplex CPD-2 mit GEMSA läßt auch Rückschlüsse auf die Wirkungsweise mancher Inhibitoren zu. Ein Blick in das aktive Zentrum offenbart auch die Gründe für die präferentielle Spaltung von Lysin gegenüber Argininresten.

## 2 Einleitung

### 2.1 Die Alzheimer-Krankheit

Krankheiten, die allgemein als Demenz (De: ohne, mens: Geist, Verstand) bezeichnet werden – zu ihnen gehören die Alzheimer-Krankheit, die Parkinson Krankheit sowie Prionenerkrankungen – haben meist einen ähnlichen Verlauf. Es beginnt damit, dass Betroffene leicht vergesslich werden, Neuem nicht mehr so aufgeschlossen gegenüber treten und ihr Leben oft nur teilnahmslos führen. Im Laufe der Zeit nimmt die Vergesslichkeit immer mehr zu, Urteilsvermögen und klares Denken gehen verloren und es kommt zu Orientierungs-, Handlungs- und Bewegungsstörungen. Die Betroffenen sind zunehmend in der Bewältigung alltäglicher Anforderungen beeinträchtigt, was bis zur vollständigen Pflegebedürftigkeit führen kann (Bickel, 2000).

Allein in Deutschland leiden etwa 1 Million Menschen an der Alzheimer-Krankheit (Morbus Alzheimer, „alzheimer's disease“, AD), was etwa 75 % aller Demenzerkrankungen entspricht. Jährlich treten etwa 120.000 neue AD-Fälle auf, und 60 % der Neuerkrankungen sowie zwei Drittel aller Patienten sind über 80 Jahre alt, was auf die enge Korrelation der Erkrankung mit dem Alter zurückzuführen ist. Die Häufigkeit der Krankheit nimmt mit steigendem Lebensalter stetig zu. So leiden im Alter zwischen 65 und 74 Jahren 3 % an dieser Form der Demenz, bei über 85-jährigen sind bereits 12 % betroffen und bei über 95-jährigen steigt die Zahl der Patienten gar auf 24 %. In Anbetracht der steigenden Lebenserwartung stellt die Aufklärung der zur Demenz führenden pathogenetischen Mechanismen eine große Herausforderung dar. Für die klinische Diagnosestellung wurden verschiedene Kriterien festgelegt, um die AD von anderen Demenzen abzugrenzen (Mc Khann et al., 1984). Eine definitive AD-Diagnose kann jedoch bisher nur anhand einer postmortalen Untersuchung gestellt werden.

Auch Menschen, die am Down Syndrom (DS, Trisomie 21) leiden, entwickeln ohne Ausnahme im vierten Lebensjahrzehnt die klassischen Merkmale einer Neuropathologie, wie sie beim Morbus Alzheimer beobachtet wird (Wisniewski et al., 1985; Mann, 1989). Bei dieser „eigenartigen Erkrankung der Hirnrinde“, wie sie 1907 erstmalig von Alois Alzheimer beschrieben wurde, ist bei einer pathologischen Analyse schon rein äußerlich eine Degeneration des Hirngewebes erkennbar. Dieser Schwund an Gehirnmasse kann beträchtlich sein. Wie in Abbildung 2.1 sichtbar, schwindet bei Alzheimerpatienten sogar die Furchung der äußeren Hirnrinde.

Nähere Untersuchungen ergeben schließlich einen Verlust von Nervenzellen in ganz bestimmten Hirnregionen; zum Einen im Hippocampus, der vor allem für das Gedächtnis von großer Bedeutung ist und zum Anderen in der Großhirnrinde – der Hauptschaltstelle für Vernunft, Sprache, Lernen und anderen wichtigen Denkprozessen. Bei einer mikroskopischen Betrachtung fallen vor allem Aggregationen von Proteinen oder deren Fragmenten auf. Diese sogenannten amyloiden oder auch senilen Plaques (Selkoe et al., 1988) sind ein charakteristisches Merkmal der AD und treten schon relativ früh im Krankheitsverlauf auf (vgl. Abb. 2.2).

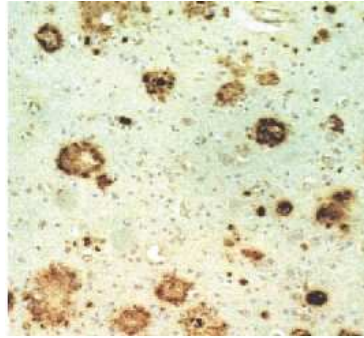
#### 2.1.1 Die pathomorphologischen Veränderungen der AD

Vorangestellt werden muß, dass auch im normal alternden Gehirn senile Plaques auftreten. Im Vergleich zu an AD-Erkrankten ist die Zahl der Plaques jedoch um den Faktor 10 geringer (Bles-

## 2 Einleitung



**Abbildung 2.1:** Das Gehirn eines an Alzheimer erkrankten Menschen (links) im Vergleich zu dem eines gleichaltrigen gesunden Menschen (rechts). Die Degeneration des Hirngewebes bei einem Alzheimer-Patienten ist beträchtlich. Schon bei einer rein äußerlichen Untersuchung kann man einen Schwund der Furchung der äußeren Hirnrinde erkennen.



**Abbildung 2.2:** Amyloide Plaques im Gehirn eines Alzheimer-Patienten. In diesem Schnitt durch das Gehirn eines Alzheimer-Patienten sind die klassischen neuropathologischen Veränderungen der Erkrankung dargestellt. Diese amyloiden Plaques bestehen aus kompakten extrazellulären Ablagerungen von  $\beta$ -Amyloid.

sed et al., 1968; Roth et al., 1966; Tomlinson et al., 1970). Neben der Zahl der Plaques ist auch ihre Lokalisation in bestimmten Regionen, insbesondere im entohirnalnalen Kortex, entscheidend für die Korrelation mit der Demenz (Cummings and Cotman, 1995; Cummings et al., 1996).

### Senile plaques - $\beta$ A4

Die schon von Alzheimer (Alzheimer, 1907) als „Drusen“ beschriebenen senilen Plaques sind extrazelluläre Ablagerungen, deren Hauptbestandteil sogenanntes  $\beta$ -Amyloid-Peptid ( $A\beta$ ,  $\beta$ A4) darstellt. Amyloid ist der Terminus für eine Gruppe sonst nicht verwandter Peptidkomplexe, die unter physiologischen Bedingungen zu unlöslichen Filamenten aggregieren können. Diese sind mit Farbstoffen wie Kongorot und Thioflavin S., die sich in  $\beta$ -Faltblattstrukturen einlagern (Glenner, 1981), anfärbbar. Ähnlich wie Stärke lassen sie sich auch mit Jod anfärben. Die Plaques weisen einen Durchmesser von 5–200  $\mu$ m auf und treten insbesondere in kortikalen und hippocampalen Regionen auf. Die Isolierung von Plaques aus dem Hirngewebe von AD-Patienten gelang erstmals im Jahre 1983 durch Allsop und Mitarbeiter (Allsop et al., 1983).

Das isolierte Material erwies sich als unlöslich und proteaseresistent. Erst durch Verwendung von Ameisensäure konnte die  $\beta$ -Faltblattstruktur zerstört werden, und aus perivaskulärem Amyloid und Plaque-Amyloid konnte ein 4,2 kDa großes Peptid isoliert und sequenziert werden (Glenner and Wong, 1984b; Masters et al., 1985). Es handelt sich um ein aus 39–43 Aminosäuren bestehendes Peptid, das durch proteolytische Spaltung des transmembranen Amyloid-Vorläuferproteins („amyloid precursor protein“, APP) entsteht (Kang et al., 1987). Damit rückte die Aufklärung der Rolle des APP bei der Ausprägung der bei AD auftretenden pathomorphologischen Veränderungen in den Mittelpunkt der Forschung.

Identisches  $\beta$ -Amyloid-Peptid wurde auch in Amyloidablagerungen von DS-Patienten identifiziert (Glenner and Wong, 1984a). Der Name  $\beta$ A4 bezeichnet die Größe von 4 kDa und die Fähigkeit der Peptide,  $\beta$ -Faltblattstrukturen zu bilden, die histologisch als Amyloid erscheinen. Da DS-Patienten eine Triplikation des C-Chromosoms 21 besitzen und damit ein zusätzliches Gen für das Amyloid-Vorläuferprotein, kommt es bei ihnen zur verstärkten Prozessierung und Ablagerung von A $\beta$ . Diese Ablagerungen gehen neurofibrillären Veränderungen und der Demenz voraus. Dies kann als erster Hinweis für die zentrale Rolle des A $\beta$  bei der Ausbildung der neurodegenerativen Veränderungen gesehen werden, die allgemein als Ursache der AD angenommen werden.

### 2.1.2 Das Amyloidvorläuferprotein (APP)

#### Lokalisation, genomische Organisation und alternatives Spleißen des APP-Genes

Das APP-Gen ist auf dem langen Arm (q) des Chromosoms 21 (Chromosom 21 von *Homo sapiens sapiens*, HSA 21q) lokalisiert (Goldgaber et al., 1987; Kang et al., 1987; Tanzi et al., 1987) und in 18 Exons organisiert, die sich beim Menschen über einen Bereich von 400 kb erstrecken. Das APP-Gen ist ein „housekeeping gene“, welches ubiquitär in allen Organen exprimiert wird (Tanzi et al., 1989). Der Promotorbereich weist einen hohen G/C-Gehalt auf und besitzt keine TATA-Box, was typisch für Promotoren derartiger Gene ist (Salbaum et al., 1988).

Alternatives Spleißen des Primärtranskripts an den Exons 7/8 und 15 führt zu 8 verschiedenen mRNA-Isoformen, die für Proteine mit Längen zwischen 677 und 770 Aminosäuren kodieren.

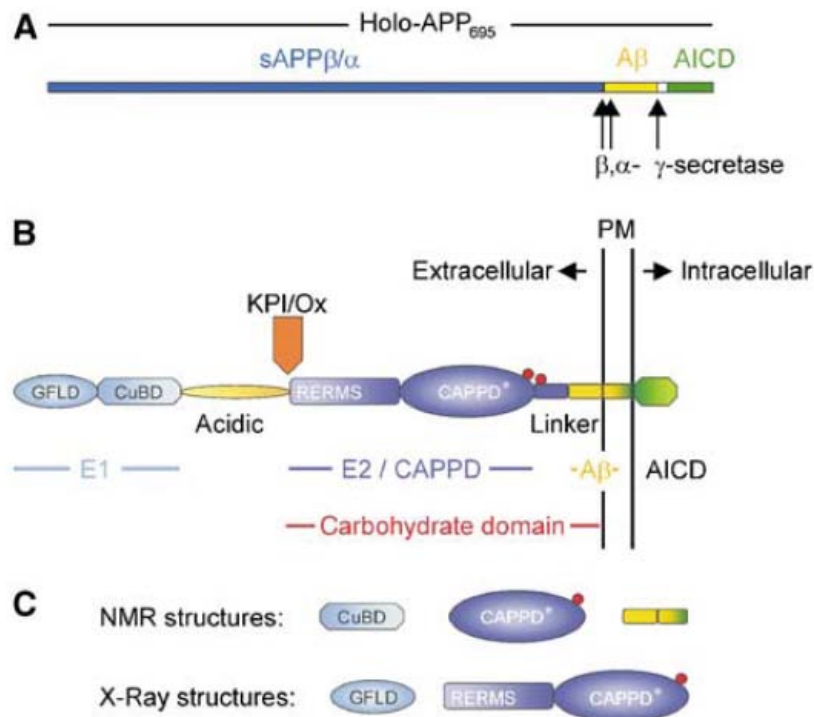
Die Expression erfolgt gewebespezifisch und entwicklungsabhängig. APP<sub>695</sub> ist die häufigste APP-mRNA-Form in Neuronen (Tanzi et al., 1988; Weidemann et al., 1989). In Gliazellen und in peripheren Geweben dominieren die längeren mRNA-Isoformen, die zusätzlich eine durch Exon 7 kodierte Proteinase-Inhibitor-domäne vom Kunitztyp (KPI) enthalten (Kitaguchi et al., 1988; Ponte et al., 1988; Tanzi et al., 1988). Für die KPI-Domäne wurde *in vitro* eine Funktion bei der Blutkoagulation gezeigt, wobei der Faktor XI inhibiert wird (Smith et al., 1990).

Die Isoform APP<sub>714</sub>, der nur Exon 7 fehlt, wurde auf RNA-Ebene ebenfalls nachgewiesen (Golde et al., 1990; Kang and Müller-Hill, 1990). Durch Spleißen von Exon 15 entsteht eine Anheftungsstelle für Chondroitin-Sulfat-Glykosaminoglykane (Pangalos et al., 1995), was auf eine Funktion bei der Zelladhäsion hindeutet. Die Isoformen ohne Exon 15 wurden zuerst in Leukozyten nachgewiesen und aus diesem Grund LAPP genannt (König et al., 1992). Sie werden in Rattengewebe ubiquitär, jedoch nicht in Neuronen exprimiert (Sandbrink et al., 1994).

#### Struktur und Funktion des APP

APP ist ein integrales Membranprotein und besteht aus einer transmembranen, einer großen extrazellulären N-terminalen und einer kurzen, intrazellulären C-terminalen Domäne (Kang et al., 1987). Das Protein hat ein relatives Molekulargewicht von ca. 120 kDa (Selkoe et al., 1988) und gelangt während der Translation in das endoplasmatische Retikulum und über die Golgivesikel zur Membran. Auf diesem konstitutiv sekretorischen Weg wird es durch N- und O-Glykosylierung (Dyrks et al., 1988; Weidemann et al., 1989), Phosphorylierung (Hung and Selkoe, 1994) und Sulfatierung (Weidemann et al., 1989) modifiziert.

Das APP-Molekül weist verschiedene funktionelle und strukturelle Domänen auf, die von unterschiedlichen Exons kodiert werden (vgl. Abbildung 2.3). Nachdem ein Signalpeptid während der Proteinreifung abgespalten wird, beginnt die APP-Struktur N-terminal mit einer Wachstumsfaktor ähnlichen Domäne (*growth factor like domain* - GFLD). Daran schließt sich eine Kupferbindedomäne (CuBD) an, gefolgt von einer sauren Domäne und den Insertionsstellen



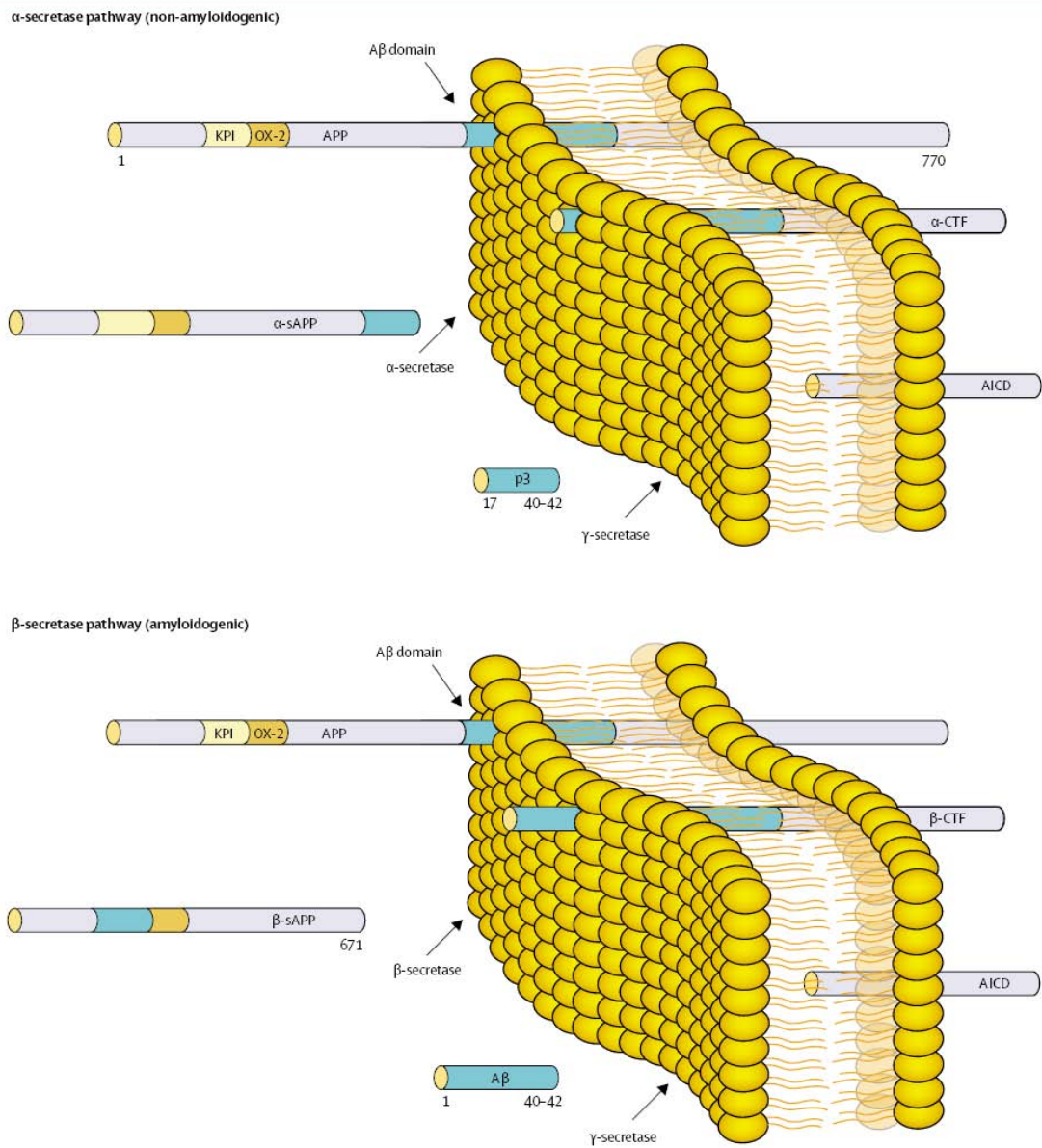
**Abbildung 2.3:** (A) Schematische Darstellung von humanem APP<sub>695</sub>, inklusive der Schnittstellen für  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase. (B) Überblick über die wichtigsten Domänen des APP: *growth factor like domain* (GFLD), Kupferbindedomäne (CuBD), E2-Domäne oder zentrale APP-Domäne (CAPPD), Transmembran-Domäne sowie die intrazelluläre Domäne (AICD). Die roten Punkte markieren die N-Glykosylierungsstellen. A $\beta$  bezeichnet die amyloide  $\beta$ -Peptid Sequenz. Zusätzlich sind die Insertionsstellen für die Protease-Inhibitor-Domäne vom Kunitz Typ (KPI), die nur in APP<sub>751</sub> und APP<sub>770</sub> existiert, sowie der Ox2-Sequenz, die nur in APP<sub>770</sub> vorkommt, eingezeichnet. (C) Bekannte stabile Strukturen von APP-Fragmenten. (Reinhard et al., 2005)

für die Protease-Inhibitor-domäne vom Kunitz-Typ (Hynes et al., 1990, KPI) sowie eine OX-2-Sequenz, die große Homologie zu dem Glykoprotein MRC OX-2 aufweist. Nach der sogenannten extrazellulären Glykosylierungsdomäne folgen die Transmembrandomäne und die cytosolische Domäne (Dyrks et al., 1988), die eine Konsensussequenz für Clathrin-vermittelte Endocytose enthält (Chen et al., 1990). Durch alternatives Spleißen des Exons 15 wird aus Exon 14 und 16 eine Konsensussequenz für Chondroitinsulfat zusammengesetzt (Pangalos et al., 1996). Die Sequenz des APP weist Bindungsstellen für Komponenten der extrazellulären Matrix wie Kollagen, Laminin und Heparin (Schubert et al., 1989; Breen, 1992; Narindrasorasak et al., 1992; Multhaup et al., 1995) und für Metalle wie Zink (Bush et al., 1993) und Kupfer (Hesse et al., 1994) auf. Die Funktion des APP ist nicht eindeutig geklärt. Die ubiquitäre Expression und die evolutionäre Konservierung deuten allerdings auf eine essentielle physiologische Rolle des Proteins hin.

### Proteolytische Prozessierung des $\beta$ APP

Das reife APP wird auf zwei Wegen proteolytisch prozessiert. An diesem Prozess sind drei verschiedene Proteasen, sog. Sekretase, beteiligt (Steiner and Haass, 2000). Dabei erfolgt zunächst eine Spaltung durch die  $\beta$ -Sekretase (Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Hussain et al., 1999; Yan et al., 1999, „beta-site APP-cleaving enzyme“, BACE, auch als „Asp2“ bezeichnet), die APP innerhalb der extrazellulären Domäne am N-Terminus der A $\beta$ -Region, 12 Aminosäuren vor der Transmembranregion, schneidet. Dabei wird lösliches sAPP $\beta$  sezerniert. Nachfolgend generiert die  $\gamma$ -Sekretase-Spaltung den C-Terminus des  $\beta$ -Amyloid-Peptids. Vergleiche hierzu auch Abb. 2.4.





**Abbildung 2.4:** Metabolismus des Amyloid Vorläuferproteins (APP) mit Aβ-Generierung. Dargestellt ist die proteolytische Spaltung über den α- (oben) bzw. β- (unten) sekretorischen Weg des APP<sub>770</sub> (Reinhard et al., 2005).

## 2 Einleitung

Sowohl das  $A\beta_{40}$  als auch das längere Peptid  $A\beta_{42}$  werden von der  $\gamma$ -Sekretase produziert. Die für die Alzheimer-Krankheit charakteristischen Plaques entstehen, wenn die  $\gamma$ -Sekretase durch Mutationen falsch schneidet und damit eine erhöhte Konzentration der toxischen Form  $A\beta_{42}$  freigesetzt wird oder wenn eine erhöhte Sekretase-Konzentration bzw. Aktivität besteht und so generell vermehrt  $A\beta$  gebildet wird.

Die dritte Sekretase ist die  $\alpha$ -Sekretase (Lammich et al., 1999), die durch ADAM10 als auch ADAM17/TACE repräsentiert wird. Sie spaltet APP innerhalb der  $\beta$ -Amyloid-Region, wobei es wie schon bei der Spaltung durch die  $\beta$ -Sekretase zur Sekretion der löslichen Ektodomäne ( $sAPP_{\alpha}$ ) in das Vesikellumen oder in den extrazellulären Raum kommt. Durch die Aktivität der  $\alpha$ -Sekretase wird die Entstehung des  $A\beta$ -Peptids inhibiert. Durch die anschließende Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase kommt es zur Freisetzung eines kleinen, harmlosen und nicht-toxischen Peptids, des sog. p3.

Damit die  $\gamma$ -Sekretase aktiv werden kann, muß das Vorläuferprotein in jedem Fall zuerst mit einer anderen Sekretase geschnitten werden. Welche Sekretase die erste endoproteolytische Spaltung durchführt –  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Sekretase – bestimmt, welches Peptid freigesetzt wird – p3 oder  $A\beta$  (vgl. Abbildung 2.4).

### 2.1.3 Die Rolle des $A\beta_{42}$ bei der Plaque-Bildung

Für die Bildung der Plaques aus den  $A\beta$ -Peptiden wird der längeren Form  $A\beta_{42}$  eine entscheidende Rolle zugeschrieben. In den Gehirnen von AD/DS-Patienten konnte gezeigt werden, dass die Ablagerung von  $A\beta_{42}$  der Ablagerung von  $A\beta_{40}$  vorausgeht (Iwatsubo et al., 1994; Iwatsubo et al., 1995; Lemere et al., 1996). Diese Beobachtung wird mit der stärkeren Aggregationstendenz der längeren Peptide in Verbindung gebracht, welche durch die beiden zusätzlichen C-terminalen Aminosäuren Isoleucin und Alanin hervorgerufen wird (Dyrks et al., 1992; Jarrett et al., 1993). So erfolgt die Bildung der Plaques wahrscheinlich in zwei Stufen. In der initialen Phase kommt es zur Bildung von Aggregationskernen, für die verschiedene Kofaktoren und  $A\beta_{42}$  notwendig sind (Jarrett and Lansbury, 1992). In der zweiten Phase erfolgt eine konzentrationsabhängige Anlagerung der  $A\beta$ -Peptide.

Gestützt wird diese Theorie durch die Beobachtung, dass bei allen bekannten Formen der familiären AD Mutationen auftreten, die entweder zu einer Erhöhung des Anteils der längeren Peptide oder zur Verstärkung der Aggregationstendenz der kürzeren Form führen. Neben  $A\beta$ -Peptiden wurden in den Plaques auch  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin (Abraham et al., 1988), Apolipoprotein E (Namba et al., 1991), Komplementfaktoren (Eikelenboom et al., 1989), Zytokine (Bauer et al., 1991) und Serumamyloid P (Kalaria et al., 1991) nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass das Immunsystem bei der Ausbildung der neurodegenerativen Veränderungen beteiligt ist. Diese Annahme wird gestützt durch das Auftreten reaktiver Mikroglia/Makrophagen und Astrozyten im Bereich der Plaques (Alzheimer, 1911; Wisniewski and Terry, 1973; Wisniewski and Weigel, 1993; Meda et al., 1995).

### 2.1.4 Genetische Ursachen der Alzheimer-Krankheit

Neben der Triplikation einer Reihe von Genen auf HSA 21 können weitere genetische Veränderungen zu einer frühzeitigen Erkrankung an AD führen. Diese Formen, die nur etwa 10% der AD-Fälle betreffen, weisen eine familiäre Häufung auf. Bei der nicht familiär bedingten Form spricht man von der sporadischen AD. Mit Ausnahme des früheren Erkrankungsbeginnes unterscheiden sich die familiär gehäuften klinisch nicht von den sporadischen AD-Fällen. Abhängig davon, ob die Krankheit vor oder nach dem 65. Lebensjahr eintritt, werden eine früh einsetzende

(„early onset“, EOAD) und eine spät einsetzende („late onset“, LOAD) Form der familiären AD unterschieden. Bis heute sind Veränderungen in drei verschiedenen Genorten, auf HSA 21, HSA 14 und HSA 1 beschrieben, die zu einer familiär bedingten AD (FAD) führen können (Schellenberg et al., 1993; Levy-Lahad et al., 1995). Für diese Genorte ist die Vererbbarkeit entsprechend eines autosomal-dominanten Erbganges gesichert (Duara et al., 1993). In den zugeordneten Genen wurden verschiedene Mutationen beschrieben, die in Tabelle 2.1 als Überblick zusammengefasst sind und in Abbildung 2.5 grafisch dargestellt sind.

Die Mutationen im APP-Gen treten in den Exons 16 und 17 auf, führen zu Veränderungen der Aminosäuresequenz im Bereich der Sekretaseschnittstellen und beeinflussen damit die proteolytische Prozessierung des APP. Das hat eine insgesamt vermehrte Bildung von  $A\beta$  oder eine vermehrte Prozessierung der stärker amyloiden Form  $A\beta_{42}$  zur Folge (Haass et al., 1994; Suzuki et al., 1994; Tamaoka et al., 1994).

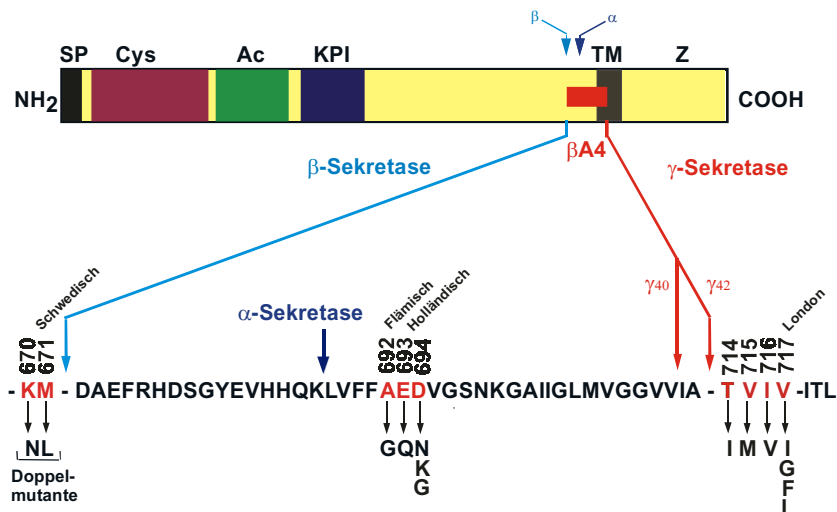
Die Präseniline PS1 und PS2 sind zwei Polypeptide, die vorwiegend im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind (Kovacs et al., 1996). Hier kommt es wahrscheinlich zu Interaktionen mit APP (Weidemann et al., 1997). Die Mutationen im PS1- und PS2-Gen führen ebenfalls zu einer Erhöhung der stärker amyloiden Form  $A\beta_{42}$ , wie Befunde in PS-FAD-Patienten gezeigt haben (Scheuner et al., 1996). Experimente mit kultivierten Zellen und transgenen Mäusen haben diese Beobachtung bestätigt (Borchelt et al., 1996; Citron et al., 1997).

**Tabelle 2.1:** Eine Auswahl der bekanntesten Genorte mit Assoziation zur FAD

HSA	Gen	Mutationen	Anteil FAD	Genorte mit Assoziation zur FAD Erkrankungsbeginn	Quelle
21	APP	KM → NL <sub>670/671</sub> (schwedisch)	< 5 %	50-60 Jahre	(Mullan, 1992)
21	APP	A → G <sub>692</sub> (flämisch)			(Hendriks et al., 1992)
21	APP	E → Q <sub>693</sub> (holländisch)			(Van Broeckhoven et al., 1990)
21	APP	V → I,F,G <sub>717</sub> (London)			(Goate et al., 1991)
14	PS1	>35 <i>missense</i> Mutationen	<50 %	40-50 Jahre	(Sherrington et al., 1995)
1	PS2	2 <i>missense</i> Mutationen	ca. 5 %	55-65 Jahre	(Levy-Lahad et al., 1995; Rogaev et al., 1995)

### 2.1.5 Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Anormale Prozessierung von APP und erhöhte Produktion von  $\beta$ -Amyloid spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese vererbbarer AD-Formen, denen Mutationen im APP-Gen oder in den beiden Präsenilinen zugrunde liegen. Sporadisch auftretende AD und vererbbare AD zeigen die gleichen pathologischen Merkmale und den gleichen klinischen Phänotyp. Daraus lässt sich ableiten, dass eine veränderte APP-Prozessierung in beiden Fällen eine zentrale Rolle spielt. Als Modell für die Entstehung von Alzheimer wird derzeit die Amyloid-Kaskaden-Hypothese angenommen. Diese Hypothese basiert auf der Vermutung, dass die Ablagerung von  $\beta$ -Amyloid die Ursache für die Neurodegeneration bei AD ist. Wahrscheinlich wird die Entstehung der charakteristischen Plaques durch eine erhöhte Konzentration von fibrillärem  $A\beta_{42}$  im Vergleich zu löslichem  $A\beta_{40}$  gefördert. Im Gegensatz zu  $A\beta_{40}$  zeigt das hydrophobere  $A\beta_{42}$  *in vitro* eine verstärkte



**Abbildung 2.5:** Die Abbildung zeigt die Mutationen von APP, die mit familiären Formen von AD gekoppelt sind. Markiert sind der N-(NH<sub>2</sub>) und C-Terminus (COOH) sowie die Protease-Inhibitor-Domäne vom Kunitz-Typ (KPI), saure Domäne (Ac), cysteinreiche Region (Cys), Signalpeptid (SP), Transmembranregion (TM) und der zytoplasmatische Abschnitt (Z). Die Spaltstellen der Sekretasen sind durch Pfeile markiert. Im unteren Bildbereich ist die Aminosäuresequenz des  $\beta$ -Amyloid-Peptids dargestellt. Rot markiert sind die AS, für die „missense“-Mutationen gefunden wurden, welche zu vererbaren familiären Formen von AD führen.

Tendenz zur Präzipitatbildung (Jarrett et al., 1993). Dies wird auch dadurch bestätigt, dass die längere Form ( $A\beta_{42}$ ) bereits in früheren Stadien von AD in sogenannten „diffusen Plaques“ gefunden wurde (Yamaguchi et al., 1998). Derzeit wird angenommen, dass zunächst diffuse Plaques durch die Aggregation der verlängerten Amyloidform entstehen und diese sich durch weitere Anlagerung von sowohl  $A\beta_{40}$  als auch  $A\beta_{42}$  zu reifen, neuropathogenen neuritischen Plaques weiterentwickeln (Selkoe, 1999).

Bisher ist allerdings noch nicht nachgewiesen, ob die pathologischen Veränderungen im Gehirn von Alzheimer-Patienten primär auf die Amyloid-Plaques zurückzuführen sind. Dagegen würde eine nur teilweise bestehende Korrelation zwischen der Anzahl neuritischer Plaques und dem Ausmaß der Demenz sprechen, desweiteren sind die nachgewiesenen Amyloidablagerungen nicht in dem Bereich des Neuronenverlustes lokalisiert. Es ist anzumerken, dass auch bei älteren, gesunden Menschen diffuse Plaques auftreten.

### 2.1.6 Dreidimensionale Strukturen von APP und mögliche Funktionen

Forschungsarbeiten in Zellkultur rund um das Amyloid-Vorläuferprotein konzentrieren sich oft auf spezielle Segmente oder Subdomänen (vgl. Abbildung 2.3), und jedem dieser Segmente wurde eine Vielzahl an Funktionen zugeschrieben (vgl. Tabelle 2.2). Viele dieser Studien basieren auf überexprimiertem APP und/oder gereinigtem APP in hoher Konzentration, was Rückschlüsse auf physiologische Vorgänge schwierig macht. Eine Möglichkeit, die funktionelle Rolle von APP besser zu verstehen, ist die Identifikation von Bindungspartnern. APP ist in der Lage, viele unterschiedliche Proteine zu binden (vgl. Tabelle 2.2), und viele der vorgeschlagenen Funktionen betreffen allgemeine biologische Vorgänge.

Eine andere Möglichkeit, die physiologischen Funktionen von APP zu untersuchen, beruht auf strukturellen Analysen des Proteins und der Identifizierung bestimmter Regionen für entsprechende Funktionen. Diese Subdomänen können eine Hilfe darstellen, um die Rezeptoren und Bindungspartner, die mit APP interagieren, zu erkennen. Die Ektodomäne des Transmembranproteins besteht höchstwahrscheinlich aus einer Anordnung verschiedener unabhängiger Domä-

**Tabelle 2.2:** Protein-Interaktionen und Funktionen von APP (Reinhard et al., 2005)

Funktion	APP-Domäne	Bindungspartner	Quelle
Oberflächenrezeptor	CAPPD A $\beta$ , undefiniert undefiniert	F-Spondin ApoE A $\beta$	(Ho and Sudhof, 2004) (Strittmatter et al., 1993) (Turner et al., 2003, Review) (Lorenzo et al., 2000)
Adhäsionsmolekül			
Zelle/Substrat	Undefiniert, A $\beta$	ECM (Laminin, Kollagen, Perlecan, etc.)	(Kibbey et al., 1993) (Small et al., 1999; Turner et al., 2003, Reviews) (Ohsawa et al., 2001)
Zelle/Zelle	E1 (GFLD) E1, E2 (HBD 1&2) AICD CAPPD E1	Fibulin-1 HSPG Fe65, Mena <sup>a</sup> CAPPD ( <i>cis/trans</i> ?) E1 ( <i>cis/trans</i> ?)	(Small et al., 1999, Review) (Sabo et al., 2001) (Wang and Ha, 2004) (Soba et al., 2005)
Regulator neuronaler Prozesse			
Neuronales Wachstum	sAPP A $\beta$ CAPPD	undefiniert undefiniert undefiniert	(Mattison et al., 1997; Small et al., 1999, Review) (Mattison et al., 1997; Small et al., 1999, Review) (Mattison et al., 1997; De Strooper and Annaert, 2000, Review)
Dendritische Verzweigung	AICD (C99)	Abl, profilin, JIP	(Leyssen et al., 2005)
Synapsen-Entstehung	sAPP undefiniert, AICD	undefiniert Fasiclin II, X11/Mint	(Mattison et al., 1997; Small et al., 1999, Review) (Ashley et al., 2005)
Synapsen Plastizität	sAPP	undefiniert	(Mattison et al., 1997; Turner et al., 2003, Review)
Neuronale Reizbarkeit	sAPP	undefiniert	(Mattison et al., 1997; Turner et al., 2003, Review)
Axonaler Transport Rezeptor	AICD	JIP, kinesin <sup>a</sup>	(Kamal et al., 2000; Kamal et al., 2001; Taru et al., 2002; Matsuda et al., 2003; Lazarov et al., 2005)
Regulator neuronaler Stammzellen-Teilung	sAPP	undefiniert	(Caillé et al., 2004)
Signalmolekül			
G-Protein gekoppelter Rezeptor Protein Signalweg	AICD	G(o)	(Nishimoto et al., 1993)
Kinase-vermittelter Signalweg	AICD	Abl, Shc/Grb2, JIP, Dab	(Russo et al., 2002; Tarr et al., 2002) (Koo, 2002; Schubert et al., 2004, Reviews)
Gentranskription	sAPP AICD (C59, C57, C49)	undefiniert Fe65, Fe65L, JIP, Mint/X11, Numb	(Mattison et al., 1997, Review) (Roncarati et al., 2002; Scheinfeld et al., 2003; Merdes et al., 2004) (Mattison et al., 1997; Koo, 2002; Turner et al., 2003; Beglopoulos et al., 2004, Reviews)
Regulator von Calciumhomeostase	A $\beta$ , undefiniert AICD (C99, C57) CuBD	undefiniert undefiniert (via Phosphoinositid) Ca <sup>2+</sup>	(La Ferla, 2002; Abramov et al., 2004, Reviews) (Leissring et al., 2002) (Maynard et al., 2005, Review)
Regulator von Zellüberleben bzw. -tod			
Neurotrophisch	sAPP	undefiniert	(Mattison et al., 1997, Review)
Neurotoxisch	A $\beta$ <sup>b</sup> AICD casp (C31) AICD (C59, C57) AICD (aa 649-664)	undefiniert, APP Caspasen, APP-BP1 undefiniert (Signale über GSK3 $\beta$ , Tip60) undefiniert	(Lu et al., 2003) (Mattison et al., 1997; ? , Review) (Chow et al., 1996) (Milligan, 2000, Review) (Kinoshita et al., 2002a; Kim et al., 2003) (Bertrand et al., 2001)

ECM: Extrazelluläre Matrix; HBD: Heparinbinde-Domäne; HSPG: Heparansulfatproteoglykane; <sup>a</sup>Indirekte Interaktion; <sup>b</sup>Oligomer versus Monomer?

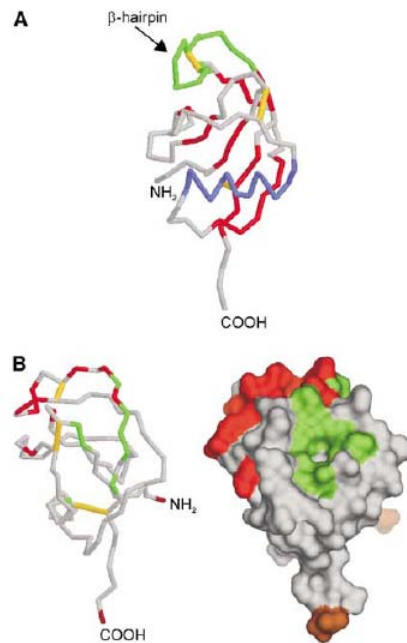
nen, wobei die meisten davon wohl auch unabhängige Faltungseinheiten darstellen (vgl. Abbildung 2.3 B & C). Einige dieser APP-Einheiten wurden bereits strukturell beschrieben und geben wichtige Informationen, um die Funktionen des APP zu entschlüsseln.

### Die Ektodomäne des APP

Die extrazelluläre Domäne von APP hat eine komplexe Struktur, und mehr als 70 % der Aminosäuren sind an der Bildung von Sekundärstrukturelementen beteiligt (Gralle et al., 2002). Diejenigen Aminosäurereste, die nicht in eine Sekundärstruktur-Faltung involviert sind, konzentrieren sich auf zwei definierte Bereiche von Aminosäurerest 190-264 und etwa 507-589. Die erstgenannte Region ist stark negativ geladen und der sauren Domäne zuzuordnen. Mehr als 56 % der Reste sind Glutamate oder Aspartate, manchmal acht in aufeinanderfolgender Sequenz. Dies läßt es unmöglich erscheinen, den Bereich in eine geordnete Struktur zu falten. Die zweite Region liegt aminoterminal zur A $\beta$ -Sequenz und ist der sogenannten „Linker-Region“ zuzuordnen (Dulubova et al., 2004; Wang and Ha, 2004). Mehrere unterschiedliche Algorithmen zur Sekundärstruktur-Vorhersage zeigen diesen Bereich frei von jeglichen Sekundärstruktur-Elementen an, und beide unstrukturierte Bereiche weisen auch keinerlei Homologie zu den APP-ähnlichen Proteinen auf, die sich in anderen Bereichen sehr stark mit APP gleichen. Daher könnten diese Domänen für APP-spezifische Funktionen verantwortlich sein. Wahrscheinlicher ist aber, dass sie flexible Linker darstellen, die die unabhängigen Faltungseinheiten miteinander verbinden und so die entsprechende Distanz der Domänen zueinander sowie die Beweglichkeit in allen drei Dimensionen sicherstellen. Ein genaues Verständnis wird erst die Strukturlösung der vollständigen Ektodomäne ermöglichen.

**N-terminale Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne (GFLD)** Die N-terminale Domäne von APP (Rest 23-128) wurde bereits im Jahr 1999 strukturell beschrieben (Rossjohn et al., 1999) und wurde im Folgenden als Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne (*growth factor like domain* - GFLD) bezeichnet. Die GFLD besteht aus neun  $\beta$ -Strängen und einer  $\alpha$ -Helix (vgl. Abbildung 2.6). Diese Domäne ist reich an Cysteinen und enthält drei Disulfidbrücken, die zusammen mit dem hydrophoben Kern der Struktur innerhalb der gesamten APP-Familie hoch konserviert sind. Die Disulfidbrücke zwischen Cys98 und Cys105 stabilisiert die Haarnadel-Kehre, der entscheidende Bedeutung für axonales Wachstum (Small et al., 1999) und Aktivierung von MAP-Kinase (Greenberg et al., 1995) beigemessen wird (vgl. Abbildung 2.6 A, markiert in grün). Außerdem besteht die Kehre aus mehreren basischen Resten, was in einer stark positiv geladenen Oberfläche resultiert. Diese Oberfläche könnte eine der Heparin-Bindedomänen des APP darstellen (vgl. Abbildung 2.6 B, markiert in rot). Allerdings stellt die Haarnadelkehre auch eine der beweglichsten Regionen dieser Struktur dar, und nur einige wenige der basischen Reste sind innerhalb der APP-Familie konserviert. Direkt angrenzend an diese vermeintliche Heparin-Bindedomäne ist ein hydrophober Oberflächenbereich (vgl. Abbildung 2.6 B, markiert in grün). Derartige Regionen spielen oft Schlüsselrollen bei Interaktionen zwischen Proteinen. Dieser Bereich ist innerhalb der gesamten APP-Familie konserviert und könnte ein Kernmolekül von Proteoglykanen binden. Ebenso denkbar wäre, dass dieser Bereich Dimerisierungen zwischen einzelnen APP-Molekülen vermittelt, ähnlich wie auch andere Wachstumsfaktoren in Anwesenheit von Heparin dimerisieren (Mohammadi et al., 2005). Auch die Möglichkeit einer Bindestelle für einen anderen Liganden darf nicht außer Acht gelassen werden, bevor nicht experimentelle Daten die Funktion dieser Oberflächenregion eingrenzen.

Zwar zeigt die Struktur der N-terminalen Domäne von APP keinerlei Ähnlichkeit mit anderen bekannten Strukturen und erschwert somit eine funktionelle Zuordnung, aber es wurden ähnliche disulfidverbrückte Haarnadelkehren in mehreren Wachstumsfaktoren beschrieben (Chirgadze

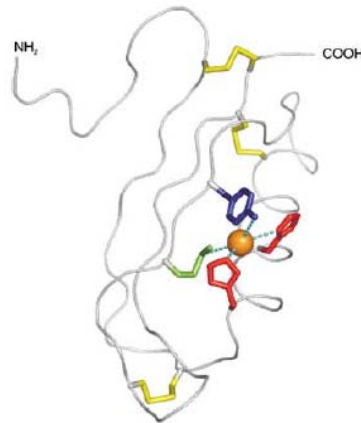


**Abbildung 2.6:** Struktur der Wachstumfaktor-ähnlichen Domäne (*growth factor like domain* - GFLD) von APP (PBD:1MWP). (A) Rückgrat-Diagramm, Disulfidbrücken sind in gelb dargestellt,  $\beta$ -Faltblätter in rot, die  $\alpha$ -Helix in blau und die Haarnadel-Kehre in grün. (B) Rückgrat-Diagramm und Oberflächenansicht um  $90^\circ$  gedreht, verglichen mit Bild (A). N- und C-Termini sind braun dargestellt, die hydrophobe Oberflächenregion grün und die HSPG-Bindestelle rot. (Reinhard et al., 2005).

et al., 1998; Kadomatsu and Muramatsu, 2004, Reviews). Experimentelle Daten zeigen, dass die N-terminale Domäne (E1 mit saurer Domäne, vgl. Abbildung 2.3 B) in der Lage ist, axonales Wachstum zu fördern (Ohsawa et al., 1997; Ohsawa et al., 1999).

**Kupferbinde-Domäne (CuBD)** An die GFLD schließt sich C-terminal die gut untersuchte Kupfer-Bindedomäne (CuBD) an, und beide Domänen lassen sich zur E1-Domäne von APP zusammenfassen (Daigle and Li, 1993). Die Kupfer-Bindedomäne umfasst die Aminosäurereste 124-189 von APP, und die Struktur besteht aus einer  $\alpha$ -Helix und einem dreisträngigen  $\beta$ -Faltblatt (Barnham et al., 2003). Drei Disulfidbrücken und ein hydrophober Kern stabilisieren die Struktur. Die Reste His147, His151, Tyr168 und Met170 sind tetraedrisch angeordnet und bilden die so die in Abbildung 2.7 dargestellte Kupfer-Bindestelle.

Eine tetraedrische Anordnung von Cu(II) kann die Redoxchemie erklären, die mit Kupferbindung von APP verbunden ist. Üblicherweise bevorzugen Cu(II)-Ionen eine planare Koordination, Cu(I) dagegen präferiert die tetraedrische Anordnung. Außerdem sind Histidinreste eher dafür bekannt, Cu(I) zu binden, während für die Bindung von Cu(II)-Komplexen eher Sauerstoff-Liganden beobachtet wurden (Casella and Gullotti, 1993). Daher ist wahrscheinlich das unübliche Tyrosin innerhalb des Kupfer-Koordinationsbereiches verantwortlich dafür, die Cu(II)-Bindung zu erleichtern, an die sich direkt die Redoxreaktion anschließt. Da die relativ starre Kupferbindestelle eine Cu(I)-Bindung bevorzugen würde, wird die Reduktion von Cu(II) ermöglicht (Multhaup et al., 1996). Interessanterweise ist die Kupferbindestelle an der Oberfläche exponiert und zeigt starke strukturelle Ähnlichkeiten mit Kupfer-Chaperonen. Auch wenn diese Kupfer-Chaperone eine andere Koordinationsebene mit Thiolresten (CXXC-Motiv) aufweisen, bestehen sie ebenfalls aus einer  $\alpha$ -Helix und einem dreisträngigen  $\beta$ -Faltblatt (Huffman and O'Halloran, 2001; Markosian and Kurganov, 2003, Reviews). Bei einem Vergleich der Lokalisation zeigen sich allerdings



**Abbildung 2.7:** Rückgratdarstellung der Struktur der Kupfer-Bindedomäne (CuBD) von APP (PBD:1OWT). Disulfidbrücken sind gelb markiert, eine orange Kugel deutet die ungefähre Lage des Cu(I)-Ions an, das derart modelliert wurde, dass sich eine tetraedrische Konformation zwischen His147 (rot), His151 (rot), Tyr168 (blau) und Met170 (grün) ergibt (Reinhard et al., 2005).

Unterschiede, da die Chaperone hauptsächlich im Cytosol zu finden sind, während APP extrazellulär vorkommt und daher keine Cysteine für die Metallkoordination einsetzen kann. Ähnlich anderen Membranproteinen wie zum Beispiel der CopB copper ATPase aus *Enterococcus hirae* bildet auch APP sein Metall-Bindemotiv aus Histidinresten (Cobine et al., 2002).

Die E1-Domäne (GFLD und CuBD) ist über einen wahrscheinlich unstrukturierten und flexiblen Bereich mit der Kohlenhydrat-Domäne verbunden, die sich wiederum in die E2-Domäne, auch zentrale APP-Domäne (CAPPD) und eine Linker-Region unterteilen lässt. Innerhalb der E2-Domäne finden sich viele Subdomänen, die unterschiedliche Bindestellen enthalten.

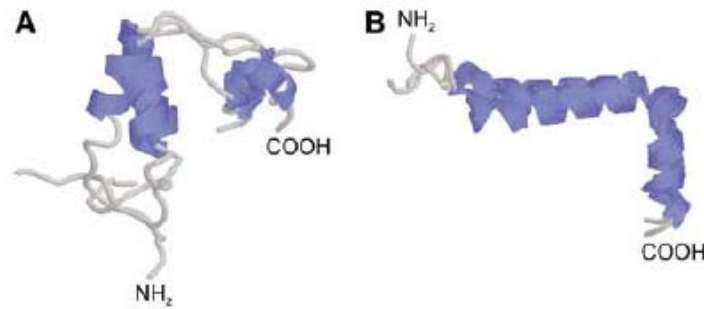
### A $\beta$ -Region

Da das A $\beta$ -Peptid eine wichtige Rolle innerhalb der Alzheimer-Krankheit spielt und Bestandteil der senilen Plaques darstellt, haben sich viele Forschungsarbeiten auf dieses Peptid konzentriert. So konnten mit verschiedenen Methoden lösliches A $\beta$ , Aggregations-Intermediate, sowie A $\beta$ -Fibrillen charakterisiert werden. Mittlerweile sind 40 Strukturen des Peptids unterschiedlicher Länge veröffentlicht (Serpell, 2000; Morgan et al., 2004, Reviews). A $\beta$ 40/42 Peptide sind aufgebaut aus zwei  $\alpha$ -Helices, die über einen Knick oder eine Kehre miteinander verbunden sind (vgl. Abbildung 2.8). Im Gegensatz zu dieser Struktur in Lösung von A $\beta$ , liegt das Molekül in amyloiden Fibrillen mit einem hohen Anteil an  $\beta$ -Faltblättern vor. Der konformationelle Wechsel zwischen  $\alpha$ -helikaler und  $\beta$ -strängiger Faltung könnte maßgebend für die amyloiden Eigenschaften des Peptids sein. Der Auslöser dieses konformationellen Wandels ist bis jetzt noch nicht ganz verstanden, aber krankheitsverursachende Mutationen befinden sich in der ersten  $\alpha$ -Helix (10-24) und verursachen die Destabilisierung der Helix und eine bevorzugte  $\beta$ -Faltblatt-Strukturierung (Levy et al., 1990; Wisniewski et al., 1991).

### Intrazelluläre Domäne (AICD)

Die cytoplasmatische oder auch intrazelluläre Domäne von APP (AICD) wird durch proteolytischen Abbau des APP freigesetzt und umfasst 49-50 Aminosäurereste (Gu et al., 2001; Sastre et al., 2001; Yu et al., 2001; Weidemann et al., 2002). Die meisten der identifizierten Bindepartner





**Abbildung 2.8:** Lösliche Struktur des A $\beta$ -Peptids von APP. (A) in 40 % Trifluorethanol (PDB:1AML) und (B) in 80 % Hexafluoroisopropanol (PDB:1IYT) (Reinhard et al., 2005).

von APP interagieren mit der intrazellulären Domäne (vgl. Tabelle 2.2). Dabei spielt das von *C.elegans* bis zum Menschen komplett konservierte YENPTY-Motiv (Aminosäurereste 682-687) innerhalb von AICD eine besonders wichtige Rolle bei Clathrin-vermittelter Endocytose, sowie bei der Bindung zu diversen Interaktionspartnern, wie Fe65, JIP und X11/Mint (De Strooper and Annaert, 2000; King and Scott Turner, 2004, Reviews). Strukturelle Analysen haben allerdings gezeigt, dass diese APP-Domäne in Lösung keine stabile Konformation annimmt (Keil, 2003). Jedoch konnten einige kurzlebige Strukturen über einen weiten pH-Bereich erhalten werden, die eine hydrophobe Gruppe, eine TypI  $\beta$ -Windung und eine eventuell entstehende Helix in der C-terminalen Hälfte des Peptids zeigen (Ramelot et al., 2000). Allerdings zeigen diese strukturellen Analysen keinerlei Tertiärkontakte, weshalb nicht auszuschließen ist, dass es sich nur um ein frühes Stadium der Proteinfaltung handelt. Interaktionen mit Bindepartnern könnten weitere Proteinfaltung induzieren und die resultierende Struktur stabilisieren. Ein derartiges Verhalten konnte bei Kokristallen von AICD mit der PDI-Domäne von X11 beobachtet werden (Zhang et al., 1997). Die Stabilität eines AICD-Ligandenkomplexes hängt stellenweise zusätzlich von einer Phosphorylierung der AICD ab. Wie Tabelle 2.2 zeigt, scheint AICD in verschiedenen Signalwegen zu wirken, von einem Phosphoinositid-vermittelten Calcium Signalweg (Leisring et al., 2002) über Apoptose (Passer et al., 2000; Kinoshita et al., 2002a; Kim et al., 2003) bis zu Gentranskription (Cao and Sudhof, 2001; Cupers et al., 2001; Kimberly et al., 2001; Kimberly et al., 2005; Kinoshita et al., 2002b; Walsh et al., 2003; von Rotz et al., 2004; Pardossi-Piquard et al., 2005).

### 2.1.7 Ziel der Arbeit

Nach heutigem Stand der Forschung ist klar, dass eine gestörte Prozessierung des Proteins  $\beta$ APP und seines Peptidfragmentes  $\beta$ -Amyloid eine Ereigniskette auslöst, die letztendlich zur Schädigung und Zerstörung von Nervenzellen führt und schließlich den Beginn der Alzheimer-Krankheit einleitet. Auf dem Weg, Arzneistoffe gegen diese Erkrankung zu entwickeln, gibt es Ansätze, bei denen die  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Sekretase daran gehindert werden sollen,  $\beta$ APP zu spalten. So würde das toxische A $\beta$ 42-Fragment erst gar nicht entstehen. Andere Überlegungen gehen dahin, das bereits entstandene Peptid in seiner toxischen Wirkung abzuschwächen, den Prozess der Plaque-Bildung zu stören oder auch bereits existierende Plaques aufzulösen. Viele Fragen sind allerdings trotz aller Forschungsergebnisse immer noch offen; so ist auch sehr wenig über die Zusammenhänge der Proteine und der Krankheits-Entstehung bekannt.

In jedem Fall steht am Anfang der Ursachenkette das Vorläuferprotein  $\beta$ APP, und ein erweitertes Verständnis dieser Krankheit setzt Kenntnisse über die Struktur, Funktion und Bedeutung des

## 2 Einleitung

$\beta$ APP voraus. Ziel der Arbeit war es daher, möglichst große Mengen homogener Präparate von löslichen Fragmenten des  $\beta$ APP zu erhalten und diese sowohl biochemisch als auch strukturell zu charakterisieren. Dreidimensionale Strukturen erlauben Einblicke in mögliche Funktionen und geben wichtige Hinweise für weitere biochemische Experimente, wie zum Beispiel Mutationsstellen, um bestimmte Aspekte genauer zu untersuchen. So sollten biochemische Untersuchungen und die Lösung der Strukturen der N- und C-terminalen Hälften der APP-Ektodomäne zu einem besseren Verständnis über die Funktionen und Bindeeigenschaften des Proteins beitragen. Auch wenn bereits einzelne, dreidimensionale Strukturen von Teilstücken des  $\beta$ APP bekannt waren, war nach wie vor unklar, wie diese Fragmente ein Ganzes bilden und eventuell miteinander und mit anderen Proteinen interagieren. Die dreidimensionale Struktur der gesamten Ektodomäne könnte Informationen über Lage und Zusammenspiel der einzelnen Domänen liefern. Dies stellen wichtige Schritte dar, auf dem Weg eine Vorstellung der räumlichen Struktur von APP zu erhalten und somit die Ursachenkette der Alzheimer-Krankheit um einen weiteren Schritt aufzuklären.

## 2.2 Carboxypeptidasen

Carboxypeptidasen sind Exopeptidasen, die Proteine und Peptide vom C-terminalen Kettenende her durch sukzessive Abspaltung jeweils eines Aminosäurerests verkürzen. Für diesen enzymatischen Vorgang gibt es mindestens zwei verschiedene Enzyme mit unterschiedlichen katalytischen Mechanismen. Zum Einen sind die Serin-Carboxypeptidasen zu nennen, deren katalytische Aktivität durch einen reaktiven Serin-Rest innerhalb der Ser/His/Asp-Triade gesteuert wird, zum Anderen gibt es die Metallo-carboxypeptidasen (MCP), die ein Zinkion im katalytischen Zentrum gebunden haben.

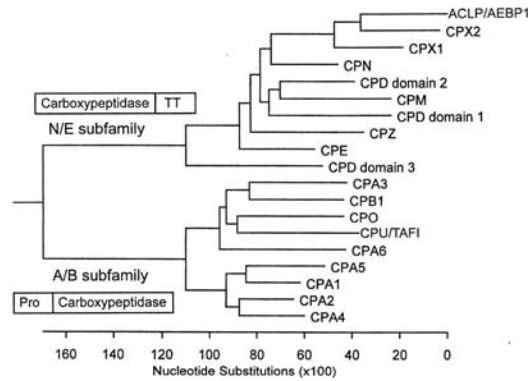
### 2.2.1 Metallo-Carboxypeptidasen

MCPs können wiederum in die zwei Subfamilien A/B und N/E untergliedert werden, abhängig von ihrer Sequenz- und Strukturhomologie. Innerhalb jeder dieser Subfamilien besteht eine Identität der Aminosäuresequenz zwischen 25-63 %, vergleicht man aber die zwei Familien miteinander, so sind es nur noch 15-25 % Identität. Ein phylogenetischer Baum in Abbildung 2.9 veranschaulicht die Unterschiedlichkeit dieser Enzyme. Diese Untergliederung ist aber erst möglich seit es Sequenzdaten zu allen Carboxypeptidasen gibt. Vorher wurden diese aufgrund ihrer Substratspezifität unterteilt, was auch heute noch parallel zu der oben genannten Unterteilung basierend auf Sequenz- und Strukturhomologie nach wie vor üblich ist. Nach ihrer Substratspezifität unterscheidet man zwischen Carboxypeptidasen der Gruppe A und Carboxypeptidasen der Gruppe B. Carboxypeptidasen A spalten bevorzugt Aminosäuren mit aromatischer und verzweigter aliphatischer Seitenkette, während Carboxypeptidasen B ausschließlich Peptidbindungen angreifen, deren NH-Gruppe von Lysin oder Arginin gebildet wird. Eine weitere Gliederung lässt sich auch noch aufgrund unterschiedlicher physiologischer Rollen der Enzyme aufstellen. Einige MCPs spielen ausschließlich in der Lebensmittel-Verdauung eine Rolle und werden daher teilweise pankreatische Carboxypeptidasen genannt, während andere in gezielteren Reaktionen eine Rolle spielen, was ihnen den Namen der regulatorischen MCPs eingebracht hat. Letztere übernehmen eine Vielzahl an wichtigen biologischen Funktionen in nicht der Verdauung zugehörigen Geweben und Flüssigkeiten, sie agieren bei der Blutgerinnung, bei Entzündungsreaktionen, spielen eine Rolle bei Prohormon- und Neuropeptid-Synthese, bei der zellulären Kommunikation sowie vielen weiteren physiologischen Vorgängen.

### 2.2.2 Biochemische Charakterisierung von Metallo-Carboxypeptidasen

#### Vorkommen und biologische Funktionen der A/B Metallo-Carboxypeptidasen

Insgesamt existieren neun Mitglieder der A/B-Unterfamilie von MCPs in Säugetieren: CPA1, CPA2, CPA3, CPA4, CPA5, CPA6, CPB, CPU und CPO. Alle scheinen lösliche Proteine zu sein, die normalerweise als inaktive Vorgängerstufen mit einem vorausgehenden Signalpeptid von 15-22 Resten synthetisiert werden. Diese Proenzyme der A/B-Unterfamilie werden Procarboxypeptidasen (PCP) genannt und enthalten eine 90-95 Reste lange N-terminale Pro-Region, die sich als globuläre und unabhängige Einheit faltet. Diese sogenannte Aktivierungsdomäne ist mittels eines Verbindungssegments an das eigentliche Enzym angehängt (Coll et al., 1991; Guasch et al., 1992). In Säugetieren werden die PCA1, PCA2, und PCB im endokrinen Pankreas erzeugt und als stabile Zymogene innerhalb der pankreatischen Granula gespeichert, bis es zur Sekretion in den Verdauungstrakt kommt. Die proteolytische Spaltung durch Trypsin im Zwölffingerdarm generiert schließlich das aktive Enzym mit 305-309 Resten. Mastzell-CPA (auch bezeichnet als CPA3) befindet sich hauptsächlich in ihrer aktiven Form mit gebundenen Pro-



**Abbildung 2.9:** Phylogenetischer Baum der Metallo-Carboxypeptidasen. Für diese Analyse wurden die in jeder Unterfamilie konservierten Regionen der unterschiedlichen Proteine miteinander verglichen. Zusätzlich zu der etwa 300 Aminosäuren umfassenden Carboxypeptidase-Domäne (CP), die sowohl Mitglieder der Unterfamilie A/B gemein haben, als auch Mitglieder der Unterfamilie N/E, beinhaltet die Darstellung auch die ca. 90-95 Reste umfassende Prodomäne der A/B-Unterfamilie und die ca. 80-90 Reste umfassende Transthyretin-Domäne (TT) der N/E-Unterfamilie. Die drei verschiedenen CP/TT-Domänen der CPD wurden getrennt analysiert. Die Länge jedes Astpaars steht für die Ferne zwischen Aminosäurepaaren. Die x-Achse steht für die Anzahl an Nukleotid-Ersetzungen, die die Aminosäure-Unterschiede zwischen den einzelnen Sequenzen auslösen würde.

teoglykanen innerhalb der sekretorischen Granula von Mastzellen (Springman et al., 1995). Die genaue Funktion dieser Carboxypeptidase ist bisher noch unbekannt, aber es wurde beschrieben, dass sie wahrscheinlich bei anaphylaktischen und inflammatorischen Prozessen nach einer Aktion von Chymase beteiligt ist (Springman et al., 1995). CPU, auch bekannt unter den Namen CPB2, CPR und Plasma-CPB, wird als inaktives Vorläuferprotein PCPU in der Leber produziert und sezerniert (Bajzar et al., 1995). Diese zirkulierende Vorläuferform wird auch oft beschrieben als durch Thrombin aktivierbarer Fibrinolyse Inhibitor (TAFI). Die aktive Form (TAFIa) kontrolliert die Rate der Fibrinolyse, indem es C-terminale Lysinreste abspaltet, die als Bindestelle für Plasminogen benötigt werden. CPA4, ursprünglich bezeichnet als CPA3, ist bisher noch kaum erforscht. Biochemisch ist sie bisher noch nicht charakterisiert, aber basierend auf dem aktiven Zentrum und den Resten, die für die Substratbindung verantwortlich sind, ist davon auszugehen, dass dieses Enzym ähnlich der CPA-Spezifität reagiert. Interessanterweise wird CPA4 in einigen Krebsgeschwülsten exprimiert, und es wird vermutet, dass sie bei Prostatakrebs involviert ist (Kayashima et al., 2003). CPA5 schneidet C-terminale aliphatische Aminosäuren und kommt vereinzelt in Regionen der Hypophyse von Nagetieren und anderen Geweben vor (Wei et al., 2002; Wei et al., 2003). Sie spielt eventuell eine Rolle bei der Prozessierung von Peptiden, die dem Pro-Opiomelanocortin entstammen, und bei anderen Peptiden, die einer C-terminalen Abspaltung von aliphatischen Resten unterliegen (Wei et al., 2003). CPA6 ist enzymatisch bisher kaum erforscht, aber auch hier ist basierend auf der Homologie des aktiven Zentrums und den Resten, die für die Substratbindung verantwortlich sind, davon auszugehen, dass dieses Enzym ähnlich der CPA-Spezifität reagiert (Wei et al., 2003). CPA6 findet sich angereichert im olfaktorischen Kolben, aber auch in diversen anderen Gehirnregionen sowie auch in einer Vielzahl von Geweben während der Embryogenese (Fontenele-Neto et al., 2005). Modellierungsstudien anhand der humanen CPO lassen mutmaßen, dass dieses Enzym spezifisch für saure Aminosäuren ist statt für aliphatische oder aromatische Reste wie bei der CPA-Untergruppe, oder basische Reste wie bei der CPB-Untergruppe (Wei et al., 2002). Studien über die Expression von CPO und einer Funktion als MCP stehen noch aus.

### Vorkommen und biologische Funktionen der N/E Metallo-Carboxypeptidasen

Es existieren acht Mitglieder der N/E-Unterfamilie, von denen fünf (CPN, CPE, CPM, CPD und CPZ) als Carboxypeptidasen enzymatisch aktiv sind. Die anderen Mitglieder sind die CP-ähnlichen Proteine X1 (CPX1) und X2 (CPX2) sowie ein Protein, das in seiner Vollängenform als Carboxypeptidase-ähnliches Protein der Aorta (ACLP) bezeichnet wird, und dessen verkürzte Form, die wahrscheinlich durch alternatives Schneiden des Genoms entsteht, als Adipocyte-enhancer-Bindeprotein1 (AEBP1) bezeichnet wird. Alle diese drei Enzyme weisen kritische Mängel im aktiven Zentrum und in den Resten auf, die für die Substratbindung verantwortlich sind. Diese wären unerlässlich für eine Carboxypeptidase-Aktivität. Von den fünf aktiven Familienmitgliedern der N/E-Untergruppe wurden die CPE und CPN als erste entdeckt, sie sind daher auch die am besten erforschten Carboxypeptidasen dieser Familie (Fricker, 2004; Skidgel and Erdos, 2004). CPE spaltet innerhalb der Biosynthese zahlreicher Peptidhormone und Neurotransmitter C-terminale basische Reste von Peptidintermediaten ab, die durch die Aktivität von Prohormon-Konvertasen bei Peptidvorgängerstufen entstehen (Fricker, 2004). CPN dagegen zirkuliert im Plasma als ein Komplex aus mehreren Protein-Untereinheiten. CPN ist vor allem bekannt geworden durch seine Funktion der Bradykinin-Inaktivierung, indem es den C-terminalen Argininrest abspaltet und damit die Affinität des Peptids für seine Rezeptoren verändert (Skidgel and Erdos, 2004). Auch die Rolle, die CPN im Komplementsystem bei der Inaktivierung der Anaphylatoxine C3a, C4a und C5a spielt, ist bereits seit einiger Zeit bekannt (Skidgel and Erdos, 2004). Auch die CPM ist in der Lage, C-terminale Arginin- und Lysinreste von Proteinen und Peptiden abzuspalten (Skidgel, 2004). Die Hauptform der CPM liegt allerdings membrangebunden mit einem Glycosyl-Phosphotidyl-Inositol-Anker vor, der sich am C-Terminus des Proteins befindet. Die CPM spielt wahrscheinlich bei der extrazellulären Synthese von Peptiden eine Rolle (Skidgel, 2004). Die CPZ ist ebenfalls außerhalb von Zellen zu finden, aber diese Carboxypeptidase scheint eher ein Teil der extrazellulären Matrix zu sein als durch eine posttranslationale Modifikation an die Membran gebunden zu sein (Novikova et al., 2000). Es konnte bereits eine Interaktion zwischen CPZ und Wnt4 nachgewiesen werden, was für eine Funktion der CPZ innerhalb der embryogenen Entwicklung sprechen würde (Moeller et al., 2003). CPD ist von allen Metallo-Carboxypeptidasen diejenige, die am meisten über verschiedene Gewebe verstreut zu finden ist. Sie wurde in allen überprüften Geweben nachgewiesen (Dong et al., 1999; Song and Fricker, 1996). Innerhalb von Zellen befindet sich die CPD im *trans*-Golgi-Netzwerk und in unreifen, sekretorischen Vesikeln, allerdings nicht mehr in den ausgereiften sekretorischen Vesikeln (Varlamov et al., 1999). Im Gegensatz zu allen anderen Metallo-Carboxypeptidasen besitzt die CPD mehrere Carboxypeptidase-ähnliche Domänen. Alle CPDs der verschiedenen Spezies Mensch, Ratte, Maus, Rind, Ente, Huhn und Drosophila enthalten drei Carboxypeptidase-ähnliche Domänen (Tan et al., 1997; Xin et al., 1997; Kuroki et al., 1995; Sidyelyeva and Fricker, 2002). Bemerkenswert dabei ist, dass ausschließlich die ersten beiden Domänen alle Informationen für das aktive Zentrum und die Aminosäurereste enthalten, die verantwortlich für die Substratbindung sind. Die dritte Domäne ähnelt eher den Mitgliedern der CPX1/2-Familie insofern, dass sie kritische Mängel bei Resten aufweist, die für die enzymatische Aktivität entscheidend sind und somit auch keinerlei Aktivität gegenüber Standardsubstraten von Carboxypeptidasen zeigt (Novikova et al., 1999). Der CPD wird eine Funktion in der Bearbeitung von Proteinen zugeschrieben, denen zunächst eine Aktivität von Furin oder anderen Endopeptidasen im *trans*-Golgi-Netzwerk, wie Wachstumsfaktoren und Rezeptoren, vorausgeht.

Alle Mitglieder der N/E-Familie der Carboxypeptidasen differieren in diversen Aspekten von denen der A/B-Familie. Ein wichtiger Unterschied stellt der Aktivierungsmechanismus dar. Wie bereits beschrieben, werden Metallo-Carboxypeptidasen der A/B-Untergruppe zunächst als inaktive Proenzyme exprimiert, während Mitglieder der N/E-Untergruppe keine proteolytische

Spaltung benötigen, um die aktive Form zu generieren, sondern auf eine subzelluläre Lokalisation angewiesen sind, um unsachgemäße Spaltereignisse zu verhindern, die zu einer Schädigung der Zelle führen würden. Auch wenn zumindest ein Mitglied der N/E-Familie (CPE) eine kurze Prodomäne besitzt, die enzymatisch abgespalten wird, ist bereits diese Vorläuferform vollständig enzymatisch aktiv (Parkinson, 1990). Ein weiterer wichtiger Unterschied der Unterfamilien ist eine 80-90 Aminosäuren lange Domäne unmittelbar C-terminal hinter der Carboxypeptidase-Domäne, die bei allen Mitgliedern der N/E-Untergruppe zu finden ist, und zwar nur bei diesen. Diese Domäne ist strukturell homolog zu Transthyretin und anderen Proteinen und fungiert eventuell als Faltungsdomäne (Gomis-Ruth et al., 1999). Zusammenfassend zeigt Tabelle 2.3 einen Vergleich der Eigenschaften von Zink-Carboxypeptidasen aus Säugetieren.

**Tabelle 2.3:** Vergleich der Eigenschaften von Zink-Carboxypeptidasen aus Säugetieren

	Anzahl Aminosäuren <sup>a</sup>	Familie	Proenzym	Form	Substrat	Lokalisierung	Chr (human)
CPU/R	309	A	Ja	S	Arg/Lys	Blut	13
CPB	306	A	Ja	S	Arg/Lys	Pankreas	3 <sup>b</sup>
mc-CPA	308	A	Ja	S	Hydrophob	Mastzellen	3
CPA	307	A	Ja	S	Hydrophob	Pankreas	7
CPN1	457	N	Nein	S	Arg/Lys	Blut	10
CPM	426	N	Nein	M	Arg/Lys	viele Gewebe <sup>c</sup>	12
CPH/E	434	N	Nein	S/M	Arg/Lys	(Neuro-) endokrin	4 <sup>d</sup>
CPD	1378	N	Nein	S/M	Arg/Lys	Golgi/Trans-Golgi	17
CPZ	515/641	N	Nein	S	Arg/Lys	Extrazell. Matrix	4

S: löslich; M: Membranegebunden; <sup>a</sup>reifes Protein; <sup>b</sup>in der Nähe von mc-CPA auf Chromosom 3; <sup>c</sup>inklusive Plazenta, Niere und Lunge; <sup>d</sup>nicht in der Nähe der CPZ auf Chromosom 4

### 2.2.3 Allgemeine Struktur der Metallo-Carboxypeptidasen

Mittlerweile existieren schon einige dreidimensionale Strukturen diverser MCPs von Säugetieren der Unterfamilien A/B und PCP in der Protein-Datenbank. Analysen dieser Strukturen zeigen, dass die Enzyme eine ähnliche konformationelle Faltung haben und eine ähnliche Architektur des aktiven Zentrums aufweisen, identische katalytische Aminosäuren konserviert haben und nur erwartete Variationen in den entsprechenden – die Substratspezifität bestimmenden Resten – aufweisen (Rees et al., 1983; Faming et al., 1991; Garcia-Saez et al., 1997; Barbosa Pereira et al., 2002). Die Konformation der strukturell bestimmten Proregionen ist sehr ähnlich, obwohl in einigen Fällen, wie zum Beispiel zwischen der PCPA und PCPB vom Schwein, die sequentielle Homologie sehr niedrig ist (27%). Die Topologie dieser Proregionen besteht aus einer offenen Schichtbauweise mit einem vierfachen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt auf der einen Seite und zwei antiparallelen  $\alpha$ -Helices als Aufsatz, mit zusätzlich einer verlängerten  $\alpha$ -Helix am C-Terminus, die die globuläre Domäne mit dem Rest des Enzyms verbindet. Die Interaktion mit dem Enzym geschieht über das  $\beta$ -Faltblatt, zwischen  $\beta 2$  und  $\beta 3$  (Guasch et al., 1992). Disulfidbrücken gibt es keine innerhalb der Aktivierungsdomäne von PCPs, abgesehen von einer einzelnen (Cys138-Cys161), die in allen aktiven Formen der meisten A/B-Gruppen-Mitglieder konserviert ist. Die A2-Formen

offenbaren noch eine zweite Disulfidbrücke zwischen Cys210-Cys244, während die B-Formen zwei zusätzliche zwischen Cys66-Cys79 und Cys152-Cys166 aufweisen. Die Carboxypeptidasen-Domänen der N/E-Familie der MCPs scheinen hinsichtlich ihrer Gesamtstrukturen denen der A/B-Familie zu ähneln, basierend auf der zweiten Domäne von CPD der Ente (CPD-2), humaner CPM und Modellierungsstudien mit anderen Mitgliedern dieser Unterfamilie (Aloy et al., 2001; Gomis-Ruth et al., 1999; Reverter et al., 2004). Die einzigen großen Unterschiede bestehen in der Länge der Kehren zwischen den  $\beta$ -Faltblättern und  $\alpha$ -Helices. Diese Unterschiede generieren bei den Mitgliedern der N/E-Familie eine eingeschränktere Substratbindetasche verglichen mit Mitgliedern der A/B-Familie. Die etwas längeren Kehren um die Region der Substratbindetasche erklären auch die Wirkungslosigkeit von Protein-Inhibitoren bei Metallo-Carboxypeptidasen der Unterfamilie A/B. Wie bereits erwähnt, besitzen alle N/E Enzyme eine zusätzliche Domäne, die sich C-terminal zur Carboxypeptidase-Domäne befindet. Diese Transthyretin-ähnliche Region (TT) faltet sich in eine  $\beta$ -Faltblattstruktur, bestehend aus 7  $\beta$ -Strängen, die durch kurze Kehren miteinander verbunden sind. Die am meisten konservierte Region bei den Proteinen der Carboxypeptidasen stellt der Bereich des aktiven Zentrums dar (vgl. Abbildung 2.10). Alle Carboxypeptidasen von Säugetieren enthalten eine Zinkbindestelle, eine Substratbindestelle, eine spezielle Aminosäure, die für die Peptidspezifität mitverantwortlich ist und eine Aminosäure, die in die katalytische Aktivität des Proteins involviert ist. (Aloy et al., 2001; Gomis-Ruth et al., 1999). Die Zinkbindestelle besteht dabei aus einem Histidinrest und einer Glutaminsäure, die durch zwei Aminosäurereste voneinander getrennt sind, sowie einem weiteren Histidinrest, der 100-130 Aminosäuren davon entfernt liegt (Aloy et al., 2001; Gomis-Ruth et al., 1999). Das Zink-Molekül wird dabei durch die beschriebenen Aminosäuren und einem zusätzlichen Wassermolekül gebunden. In allen Mitgliedern der Zink-Carboxypeptidasen-Familie gleich sind auch die Positionen der Aminosäuren, die verantwortlich für die Substratbindung sind. Diese Bindestelle wird geformt durch ein Asparagin, ein daran angrenzendes Arginin und ein weiter vorwärts in der Polypeptidkette gelegenes Tyrosin. Der Aminosäurerest, der mit für die Peptidspezifität verantwortlich ist, unterscheidet sich allerdings, abhängig von dem Typ Aminosäure, der vom Substrat abgespalten wird. Die funktionelle Untergruppe der Carboxypeptidasen A haben an dieser Stelle ein Isoleucin oder Leucin, das an den hydrophoben Rest, der durch das Enzym abgespalten wird, bindet. Die funktionelle Untergruppe der Carboxypeptidasen B dagegen haben an dieser Stelle einen Asparaginsäurerest, der an Lysin bzw. Arginin bindet, wenngleich dieser Rest bei CPU/R und CPB sehr viel weiter hinten in der Polypeptidkette liegt, verglichen mit den anderen Carboxypeptidasen dieser Untergruppe (CPN1, CPM, CPH/E, CPD1, CPD2 und CPZ) (vgl. Abbildung 2.10). Außerdem ist ein Glutaminsäurerest, der in die katalytische Aktivität des Enzyms involviert ist in allen bekannten Carboxypeptidasen positionell konserviert.

#### 2.2.4 Katalytischer Mechanismus der Metallo-Carboxypeptidasen

Rinder-CPA(1) ist eine der biochemisch am gründlichsten erforschten Enzyme überhaupt und wird daher auch oft in Lehrbüchern als Beispiel für seinen katalytischen Mechanismus aufgeführt. Dabei gab es über diesen Mechanismus lange Zeit Kontroversen. Durch die meisten kristallographischen und kinetischen Studien wird das Modell unterstützt, bei dem das Zinkion der CPA1 ein klassischer elektrophiler Katalysator ist. Es vermittelt elektrostatische Stabilität für die negativ geladenen Intermediate, die während der Hydrolyse entstehen (Vendrell et al., 2004; Vendrell and Aviles, 1999). Kristallographische Analysen von Metallo-Carboxypeptidasen der Unterfamilie A/B konnten nachweisen, dass bestimmte Reste eine besonders wichtige Rolle innerhalb der Substratbindung und Katalyse einnehmen. Diese Reste können in fünf verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Aviles et al., 1993; Vendrell and Aviles, 1999). Die S1'-Tasche wird gebildet durch Asn144, Arg145, Tyr248 und Xaa255, für die S1-Tasche dagegen spielen Arg127, Leu/Ile247 und





lässt sich dabei bei der phenolischen Hydroxylgruppe von Tyr248 beobachten, was einem Viertel des gesamten Proteindurchmessers entspricht. Eine derartige Verschiebung wird vor allem durch eine leichtgängige Rotation um die  $C\alpha$ - $C\beta$ -Bindung ermöglicht. Die Hydroxylgruppe von Tyr248 schwingt dabei von der Oberfläche des Moleküls in die Nachbarschaft des terminalen Carboxylats des Substrats. Dadurch wird der Hohlraum im aktiven Zentrum verschlossen und somit jegliches Wasser ausgesperrt.

### Spaltung der Peptidbindung

Eine wichtige katalytische Aufgabe der Carboxypeptidase A bei der Hydrolyse von Peptidbindungen besteht darin, Wasser zu aktivieren. Dies wird durch das gebundene Zinkion ermöglicht und zusätzlich durch die dem Zink benachbarte Carboxylatgruppe des Glu270 unterstützt. Dadurch verhält sich das zinkgebundene Wassermolekül nahezu identisch einem Hydroxylion. Darauf folgt der erste Katalyseschritt der Carboxypeptidase, indem das aktivierte Wassermolekül die Carbonylgruppe der zu spaltenden Peptidbindung angreift und gleichzeitig das Glu270 ein Proton des Wassermoleküls aufnimmt. Dadurch entsteht ein negativ geladenes tetraedrisches Zwischenprodukt, das durch elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Zinkion und der positiv geladenen Seitenkette des Arg127 stabilisiert wird. Anschließend wird ein Proton von der Carboxylgruppe des Glu270 auf die Peptid-NH-Gruppe übertragen, worin die Spaltung der Peptidkette resultiert.

#### 2.2.5 Katalytischer Mechanismus der N/E-Unterfamilie

Die aktiven Familienmitglieder der N/E-Untergruppe haben aller Voraussicht nach den gleichen katalytischen Mechanismus wie die A/B-Unterfamilie der MCPs, basierend auf den konservierten Resten des aktiven Zentrums, kristallographischen Analysen von zwei Mitgliedern der N/E-Familie und Mutagenese-Studien (Aloy et al., 2001; Gomis-Ruth et al., 1999; Reverter et al., 2004; Qian et al., 1999). Allerdings sind einige wichtige Reste innerhalb der Substratbindetasche bei der A/B-Familie unterschiedlich im Vergleich zu denen der N/E-Familie der MCPs. Der wichtigste Unterschied besteht im Rest am unteren Ende der S1'-Bindetasche, die die positive Ladung des Substrates aufnimmt. Während sowohl die CPB als auch TAFIa ein Asp auf Position 255 enthalten, haben aktive Mitglieder der N/E-Unterfamilie in der vergleichbaren Position entweder ein Gln (CPE, D-I, D-II, N, M) oder ein Ser (CPZ). Dabei ist zu beachten, dass die Nummerierung aufgrund unterschiedlich langer N-terminaler Anhänge vor der Carboxypeptidasedomäne bei jedem Enzym variieren kann. Hier wird nach der Konvention die Nummerierung der CPA verwendet. Anstatt des Asp255-Restes scheint ein Glu - bei der CPB an vergleichbarer Position 207 - für die Spezifität gegenüber C-terminal basischen Resten bei CPE, D, M, N und Z verantwortlich zu sein (Aloy et al., 2001; Gomis-Ruth et al., 1999). Dieses Glu ist über alle Spezies dieser fünf Metallo-Carboxypeptidasen konserviert und ist auch in den inaktiven Mitgliedern der N/E MCPs vorhanden. Dagegen spielt das Ser oder Gly auf Position 207 bei CPB und anverwandten Mitgliedern der A/B-Familie eine untergeordnete Rolle innerhalb der S1'-Tasche.

#### 2.2.6 Biochemische Charakterisierung von MCP Inhibitoren

##### Selbständige Inhibition der A/B MCPs

Anders als die N/E-MCPs werden die Mitglieder der A/B-Unterfamilie zunächst als inaktive Vorgänger oder Zymogene synthetisiert, wobei ein in der Sequenz enthaltenes Aktivierungssegment (auch Pro-Region genannt) als autologer Inhibitor fungiert und die Enzyme derart bis zu ihrem Bedarf inaktiv hält (Vendrell et al., 2000). Das globuläre Zentrum dieser Pro-Region von ca.

80 Aminosäureresten bedeckt das aktive Zentrum des Enzyms und somit auch die S2-, S3- und S4-Taschen. Keine der Reste, die S1 oder S1' bilden, sind direkt durch die Abdeckung betroffen. Die einzige Ausnahme ist das zu S1' gehörige Arg145, das direkt an das Asp41 des PCPB Pro-Segmentes bindet. Hierin liegt wohl auch der Grund für das wesentliche Fehlen an Aktivität dieser Formen gegenüber peptidischen Substraten. Im Gegensatz dazu weist PCPA einige strukturelle Differenzen an der  $\beta$ 2- $\beta$ 3 Kehre auf, bei der eine *cis*-Pro-Bindung und eine  $3_{10}$ -Helix-Wendung fehlen, die als Gründe für die verbleibende Aktivität gegenüber kleinen synthetischen Substraten angeführt werden. Der Aktivierungsvorgang, der vor allem durch Trypsin vonstatten geht (Gomis-Ruth et al., 1995), läuft für PCPBs schneller ab als für PCPAs, was wohl an der stärker ionischen Umgebung liegt. Proteinchemische und enzymatische Experimente haben gezeigt, dass die erste Spaltung durch Trypsin an einer Arginin-Peptidbindung zwischen dem Aktivierungssegment und der restlichen Carboxypeptidase-Domäne passiert. Anschließend wird das Aktivierungssegment dem proteolytischen Abbau überlassen. Kürzliche Studien haben allerdings auch gezeigt, dass diese Pro-Regionen nicht ausschließlich als Modulatoren der Enzym-Aktivierung wirken, sondern auch als wichtige Elemente bei der Faltung. Man hat herausgefunden, dass die Anwesenheit dieser Segmente die heterologe Expression von PCPs besonders fördert, was annehmen läßt, dass der globuläre Teil der Pro-Region als unabhängige Faltungseinheit fungiert (Phillips and Rutter, 1996; Ventura et al., 1999).

### Heterologe Inhibitoren von MCPs

Sowohl kinetische als auch spektroskopische Experimente haben gezeigt, dass alle MCPs durch chelatierende Reagentien wie zum Beispiel 1,10-Phenanthrolin inhibiert werden können, aber auch durch diverse kleine Carbonsäure-Anionen wie aliphatische Carboxylate, D-Aminosäuren oder bestimmte Dipeptide, die in der Lage sind, an die S1'- und S1-Tasche zu binden (Vendrell and Aviles, 1999). Diese Moleküle folgen verschiedenen vorgeschlagenen Mechanismen der Inhibition. Um die Möglichkeit zu reduzieren, auf eine unproduktive Art zu binden, wird normalerweise ein unpolarer „Deckel“-Ersatz (Benzyl, Carbobenzoxy-, *tert*-butyl, etc.) am N-Terminus dieser synthetischen Pseudosubstrat-Inhibitoren platziert, um so die S2- und weitere Taschen zu besetzen und derart die eigenen inhibitorischen Fähigkeiten zu erhöhen. Detaillierte Studien wurden mittels Übergangszustand-Analoga mit einer tetraedrischen Struktur durchgeführt. Phosphonat Analoga von Tripeptid- und Tetrapeptid-Substraten (z.B. N-Sulfamoylphenylalanine und seine Derivate) mit vorgeformten tetraedrischen Zentren zählen zu den Molekülen mit der besten Wirkung. Diese erreichen einen  $K_i$ -Wert im pM oder fM Bereich (Park et al., 2001). Zusätzlich zu den Phosphatestern und -amiden wurden auch Sulfoximine, Sulfodiimine und Teile von Sulfonimidamiden in Substrat-Analoga von CPA aufgenommen, um starke Inhibitoren zu erhalten. Neue Inhibitoren mit mM-nM Affinität wurden kürzlich gegen CPA und TA-FIa getestet, z.B. 2-Benzyl-3,4-Iminobutan-Säure, N-(Hydroxyaminocarbonyl)Phenylalanin, 2-Benzyl-2Methyl-3,4-Epoxybutan-Säure, Alpha-Benzyl-2-Oxo-1,3-Oxazolidine-5-Essigsäure, 2-(4-Imidazolyl)Hydrocinnamic Säure, N-(2-Chloroethyl)-N-Methylphenylalanin, 2-Ethyl- bzw. Benzyl-2-Methyl-3-Mercaptopropansäure und eine Serie von Cysteinderivaten (Cho et al., 2002; Do et al., 2005). Die bekanntesten Inhibitoren allerdings sind Ethyl- und Benzylbernsteinsäure für Enzyme der Untergruppe A und Guanidinoethylmercaptobernsteinsäure (GEMSA) für Enzyme der Untergruppe B, mit einem  $K_i$  im mM-nM Bereich (Lee et al., 1999). Der letztgenannte Inhibitor wurde bereits gebunden in der Spezifitätstasche von der zweiten Domäne der CPD von Ente kristallisiert (Aloy et al., 2001). Dieser peptidimitierende Inhibitor zeigt die größte Wirksamkeit gegenüber dieser Carboxypeptidase-Domäne und CPE mit  $K_i$  Werten im niederen nM Bereich (Novikova et al., 1999; Fricker et al., 1983).

### Protein-Inhibitoren: Endogene und Exogene

Im Gegensatz zu der großen Vielfalt strukturell und funktionell unterschiedlicher Inhibitoren von Endoproteinasen, sind bisher nur einige wenige Protein-Inhibitoren bekannt, die spezifisch MCPs der Gruppe A/B inhibieren (Vendrell et al., 2004; Vendrell et al., 2000). Diese wurden aus Ratten und menschlichem Gewebe sowie aus *Solanacea*-Pflanzen (Tomaten und Kartoffeln) und aus den Parasiten *Ascaris suum* (parasitärer Nematode), *Hirudo medicinalis* (Egel) und *Rhipicephalus bursa* (Zecke) gewonnen. Diese Carboxypeptidase-Inhibitoren unterscheiden sich in ihren Ziel-Proteasen. Während Inhibitoren aus Säugetier-Gewebe anscheinend an endogene Carboxypeptidasen binden, interagieren die anderen Inhibitoren mit exogenen Enzymen, so zum Beispiel mit den Carboxypeptidasen eines bestimmten Organismus. Für Metallo-Carboxypeptidasen der Unterfamilie N/E wurden bisher noch keine Protein-Inhibitoren identifiziert.

Latexin, auch bekannt als Gewebe- oder endogener Carboxypeptidase-Inhibitor (ECI), ist der größte beschriebene MCP-Inhibitor. Er wurde zunächst als Neuronen-Marker im lateralen Neocortex von Säugetiergehirnen im Entwicklungsstadium entdeckt und agiert vor allem bei Entzündungsreaktionen (Normant et al., 1995; Liu et al., 2000). Obwohl Latexin ein sehr wirksamer Inhibitor gegenüber CPA1 und CPB ist, spricht die weitreichende Verbreitung in Geweben von Latexin dagegen, dass die einzige Funktion dieses Inhibitors die Hemmung der pankreatischen Verdauungsenzyme ist. Die nativen Zielobjekte von Latexin könnten alle anderen MCPs einschließen, vor allem CPA6, das im Gehirn und anderen Geweben exprimiert wird. Dabei wirkt Latexin bei A/B MCPs, indem es die autologe Inhibition durch die Aktivierungssegmente von PCPs imitiert. Dieser Inhibitor interagiert mit dem Oberteil des Enzyms bis zur Berührungsfläche der beiden Domänen (Strang  $\beta 7$ - $\beta 8$ ) und spannt dabei eine Kehre ein, die die Reste Asp273-Pro282 des menschlichen CPA4-Teils umgibt (Pallares et al., 2005). Der Kontaktbereich dieses Komplexes ist größer als die typische Protease-Inhibitor-Berührungsfläche. Es gibt aber nur sehr wenige Interaktionen mit Resten des aktiven Zentrums (mit den S1'- und S2-Taschen), was die Flexibilität von Latexin erklärt, das fähig ist, alle bisher getesteten A/B MCPs von Vertebraten zu inhibieren.

Der Kartoffel-Carboxypeptidase-Inhibitor (PCI oder CPI), der sehr homolog zum Inhibitor aus Tomaten ist, stellt ein kleines Protein mit 39 Resten dar und inhibiert kompetitiv MCPs der Gruppe A/B mit einem  $K_i$  im nM-Bereich (Hass et al., 1975; Hass and Hermodson, 1981). Der PCI-Inhibitor hemmt Carboxypeptidasen nach dem gleichen Prinzip wie der MCP-Inhibitor LCI, der im medizinischen Blutegel *Hirudo medicinalis* gefunden wurde. Hierbei handelt es sich um ein Protein von 66 Resten, das als kompetitiver Inhibitor von A/B MCPs wirkt und einen  $K_i$  im nM-Bereich vorweisen kann. Der LCI hat in der C-terminalen Region eine gewisse Sequenzidentität zu den Inhibitoren aus dem Parasiten *Ascaris suum* - ein 66 Reste langes Protein - und zu dem Inhibitor aus *Solanacea*. Diese beiden teilen zusätzlich zu dem C-terminalen Bereich auch eine über 9 Reste reichende Sequenzidentität im Inneren. Im Gegensatz zum Inhibitionsmechanismus von Latexin beruht die Hemmung von MCPs durch PCI und LCI auf der Interaktion des C-terminalen Schwanzes mit dem aktiven Zentrum des Enzyms. Hierbei wird eine Substratbindung imitiert und somit jegliche Bindung von realen Substraten verhindert (Rees and Lipscomb, 1982a; Reverter et al., 2000). Dabei wird der C-terminale Schwanz des Inhibitors in die Furche des aktiven Zentrums eingeführt und formiert so eine erste Kontaktregion. Der carboxyterminale Rest (Gly39 im Fall von PCI und Glu66 im Fall von LCI) wird dabei vom Inhibitor abgespalten, bleibt jedoch innerhalb der S1'-Tasche des Enzyms weiterhin gebunden und wird von dem verbliebenen Inhibitor abgedeckt. Der so neu generierte C-terminale Rest (Val38/65) ordnet sich schließlich im aktiven Zentrum des Enzyms an und bildet Wasserstoffbrücken und van-der-Waals-Bindungen aus zu Resten der S1'- und S1-Tasche. Die folgenden 2 Reste (Tyr37/64 und Pro36/63) interagieren mit der S2- und S3-Tasche. Daher sind die meisten Reste der Carboxypeptidase, die essentiell für eine Substratbindung und die nachfolgende Katalyse sind, von diesen Inhibitoren betroffen.

Als letztes sei noch ein in der Zecke (*Rhipicephalus bursa*) gefundener Inhibitor zu nennen, der auch unter dem Namen TCI bekannt ist und A/B Carboxypeptidasen ebenfalls mit nM-Affinität hemmt. Dabei verankert sich TCI bivalent an der Oberfläche von A/B MCPs, wie es bei keinem anderen Inhibitor beobachtet wurde (Arolas et al., 2005). Wie auch bei PCI und LCI interagiert der C-terminale Schwanz von TCI mit dem aktiven Zentrum des Enzyms und imitiert derart eine Substratbindung. Auch bei diesem Mechanismus wird der letzte Rest (His75) durch die Carboxypeptidase abgespalten, aber anders als bei PCI und LCI verbleibt der Rest nicht in der S1'-Tasche gebunden. Der folgende Rest Leu74 ordnet sich am katalytischen Zinkion an und schirmt die S1-Tasche ab, während Trp73 mit der S2-Tasche interagiert. Im Gegensatz zu diversen sekundären Kontakten, wie sie bei der Hemmung durch PCI und LCI zu beobachten sind, macht die N-terminale Domäne des TCI-Inhibitors Interaktionen mit der Enzym-Oberfläche. Diese doppelte Bindung führt zu einer höheren Kontaktfläche, als bei der einfachen Bindung von PCI zu CPA.

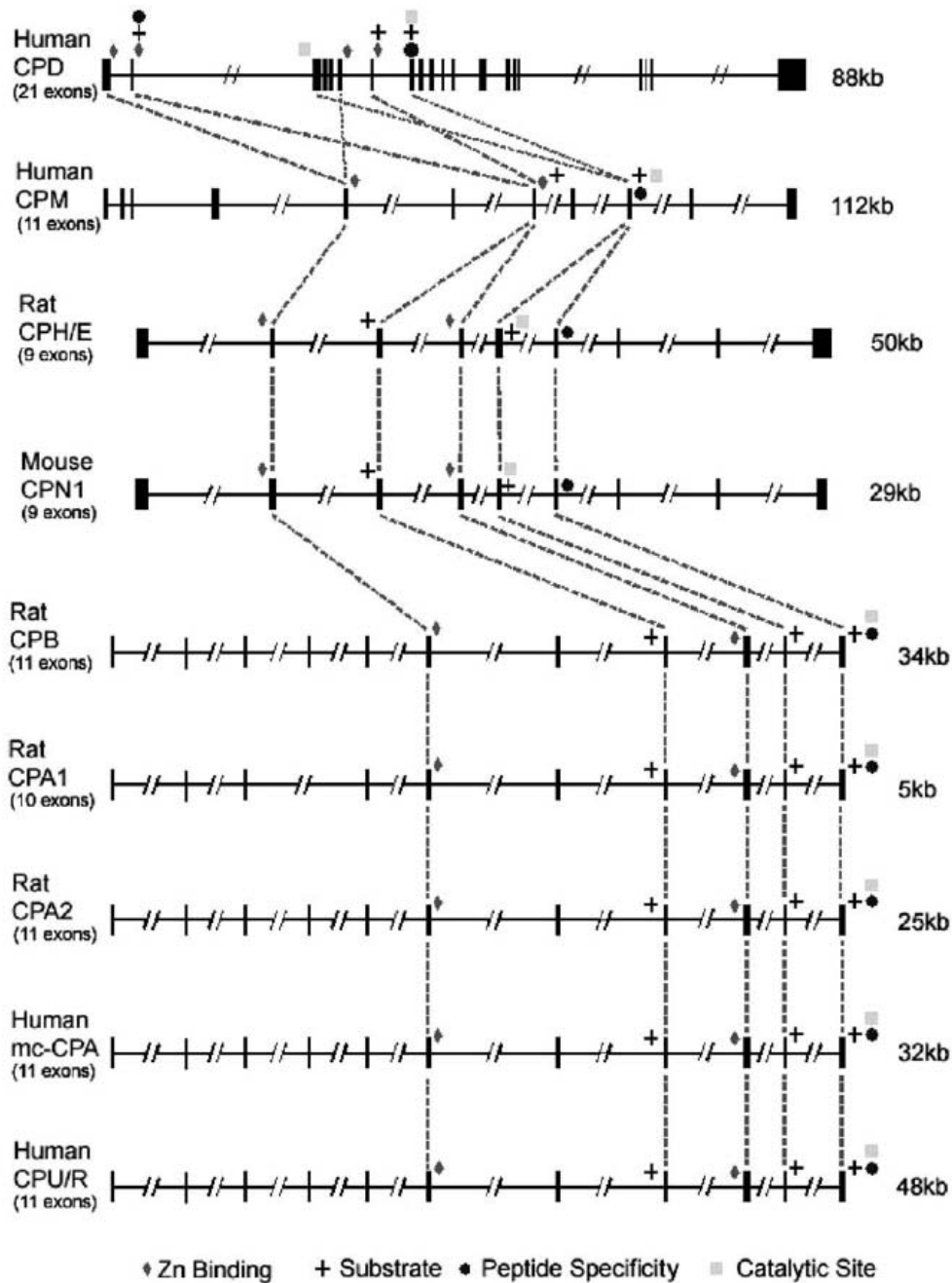
### 2.2.7 Carboxypeptidase N (CPN)

Carboxypeptidase N (CPN) ist eine Zink-Metalloprotease, die die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin vom C-Terminus biologisch aktiver Proteine und Peptide spaltet (Skidgel, 1996). Das Enzym wird konstitutiv in der Leber exprimiert und in den Blutstrom abgegeben. Strukturell besteht die CPN aus zwei identischen großen Untereinheiten (CPN2) mit einer Größe von jeweils 83 kDa und zwei identischen kleinen Untereinheiten (CPN1) mit einer Größe von jeweils 52 kDa. Zusammen bilden diese ein heterogenes Tetramer von 280 kDa. Dabei ist das enzymatisch aktive Zentrum der CPN in der kleineren Untereinheit zu finden, während die großen Untereinheiten hauptsächlich dazu dienen, das Protein vor Abbau oder Filtration aus dem Blutstrom zu schützen. Humane CPN wurde erstmals 1962 durch Ervin Erdös und Eleanor Sloane entdeckt, die es als Enzym beschrieben, das Bradykinin inaktiviert, indem es das carboxyterminale Arginin abspaltet. Es wurde daher auch als Kininase I bezeichnet (Erdos and Sloane, 1962). Eine weitere Entdeckung folgte 1970, als Viktor Bokisch und Hans Müller-Eberhard zeigen konnten, dass die CPN die Komplement Anaphylatoxine C3a, C4a und C5a durch Entfernung des carboxyterminalen Arginins inaktiviert (Bokisch and Müller-Eberhardt, 1970). Seitdem wurden immer wieder neue Substrate für die CPN beschrieben, dazu gehört unter anderem die Kreatinkinase MM (CK-MM) (Michelutti et al., 1987).

#### Die kleine CPN-Untereinheit

Das CPN1-Gen ist auf dem menschlichen Chromosom 10q24 (Riley et al., 1998) und auf dem Mauschromosom 19D2 (Matthews and Wetsel, 2001) lokalisiert. Wenn man die Positionierung auf dem Genom mit der anderer Carboxypeptidasen vergleicht, fällt auf, dass keine auf dem gleichen Chromosom wie die CPN1 zu finden ist (vgl. Tabelle 2.3). Das CPN1-Gen der Maus ist etwa 29 kb groß und umfasst 9 Exons (Matthews and Wetsel, 2001) (vgl. Abbildung 2.11). Vergleicht man die strukturellen Gene der Carboxypeptidasen, so offenbart sich eine unterschiedliche organisatorische Homologität zwischen den beiden strukturellen Unterfamilien. Die strukturelle Organisation von Genen innerhalb der strukturellen Untergruppe CPA ist hoch konserviert und enthält nahezu identische Exon-Nummern und ähnliche Spleißstellen (Boffa et al., 1999; Clauser et al., 1988; Reynolds et al., 1989). Die CPN-Genfamilie dagegen ist weit weniger homolog in ihrer gesamten Gen-Organisation (vgl. Abbildung 2.11).

CPN1 und CPH/E sind sich insofern noch am ähnlichsten, als sie 9 Exons und mehrere ähnliche Spleißstellen an derselben Position besitzen (Jung et al., 1991; Matthews and Wetsel, 2001). Das CPM-Genom unterscheidet sich mit 11 Exons und nur einem hochkonservierten Exon (Exon6 der CPM und Exon5 der CPN1) (Bektas et al., 2001; Li et al., 2002).



**Abbildung 2.11:** Vergleich von Carboxypeptidase Genstrukturen. Die Genstrukturen der CPN1 aus Maus wurde übereinandergelagert mit humaner CPD, humaner CPM, CPH/E aus Ratte, CPB aus Ratte, CPA1 aus Ratte, CPA2 aus Ratte, humane mc-CPA und humane CPU/R. Es wurden die Exons markiert, die Aminosäuren enthalten, die für die Zink-Bindung verantwortlich sind (Raute), für Substratbindung (Kreuz), Peptidspezifität (Kreis) und katalytische Aktivität (Quadrat). (Matthews et al., 2003).

## 2 Einleitung

Die CPD ist absolut einzigartig, da sie drei Carboxypeptidase-Domänen besitzt, von denen allerdings nur zwei aktiv sind. Daher hat das 21 Exons umfassende CPD-Genom auch zwei konservierte Exons gemein mit CPN1 (Exons 3 und 10 und Exon 5 der CPN1) (Timblin et al., 2002).

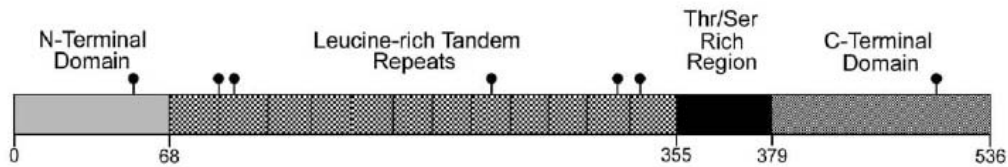
### Große CPN-Untereinheit

Das heterogene CPN-Tetramer ist zusammengesetzt aus jeweils zwei kleineren (CPN1) und zwei größeren (CPN2) Untereinheiten. Die zwei großen Untereinheiten haben ein Molekulargewicht von jeweils 83 kDa, und ihre Hauptaufgabe ist es, die kleineren Untereinheiten zu schützen. Ohne die CPN2-Untereinheit würde die katalytische Einheit sehr schnell durch Filtration in der Niere aus dem Blutstrom entfernt werden (Tan et al., 1990). Auch eine Degradierung oder enzymatische Inaktivierung der CPN1 bei 37 °C wird durch die große Untereinheit verhindert (Levin et al., 1982; Oshima et al., 1975).

Die menschliche cDNA der großen CPN-Untereinheit CPN2 ist 2870 bp lang und kodiert eine 536 lange Aminosäure-Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 59 kDa (Tan et al., 1990) (vgl. Abbildung 2.12). Zusätzlich besitzt die CPN2 sowohl N- als auch O-glycosylierte Zucker, die etwa 27 % des gesamten Molekulargewichts von 83 kDa der großen Untereinheit ausmachen (Grimwood et al., 1988; Levin et al., 1982; Plummer, 1978). Die CPN2 cDNA enthält sieben potentielle N-Glycosylierungsstellen sowie eine Serin/Threonin-reiche Region, die eine potentielle Glycosylierungsstelle für O-verknüpfte Zucker darstellt (Tan et al., 1990). Dazu kommen noch diverse andere interessante Bereiche innerhalb der cDNA, wie sich wiederholende leucinreiche Regionen und ein hydrophiler Carboxy-Terminus (Tan et al., 1990). Mehr als die Hälfte der Polypeptidkette wird von sich wiederholenden leucinreichen Tandems bestimmt, wobei jedes dieser Tandems 24 Aminosäuren lang ist und diese Bereiche sowohl in die Untergruppen-Interaktion involviert sein könnten wie auch für die strukturelle Integrität des gesamten Tetramers eine große Rolle spielen könnten. Innerhalb dieser leucinreichen Wiederholungen finden sich wiederum fünf sogenannte Leucin-Zipper als strukturelle Motive (Tan et al., 1990). Diese könnten zum Einen bei der Tertiärstruktur der CPN2 von Bedeutung sein, zum Anderen aber auch für die Ausbildung des Tetramers (Landschulz et al., 1988; Tan et al., 1990).

### Interaktionen zwischen den beiden CPN-Untereinheiten

Die CPN ist ein Tetramer, bestehend aus zwei Heterodimeren aus je einer CPN1- und einer CPN2-Untereinheit. Diese Untereinheiten sind innerhalb des Heterodimers sehr fest miteinander verbunden, da nur stark denaturierende Bedingungen von 3 M Guanidinium es ermöglichen, die beiden Untereinheiten voneinander zu trennen (Levin et al., 1982; Plummer, 1978). Zwar sind die Interaktionen, die zu dieser festen Bindung führen, bisher noch nicht genau aufgeklärt, aber verschiedene Arbeitsgruppen postulierten, dass die leucinreiche Wiederholungsregion der CPN2 an die hydrophobe CPN1 bindet (Gebhard et al., 1989; Tan et al., 1990). Da festgestellt wurde, dass eine Trennung der Untereinheiten auch durch nichtionische Detergenzien nicht möglich ist (Levin et al., 1982), ist davon auszugehen, dass auch geladene Reste bei der Interaktion zwischen der CPN1 und CPN2 eine Rolle spielen. Hierbei könnte es sich um geladene Reste handeln, die an die leucinreiche Wiederholungsregion der CPN2 angehängt sind, sofern diese an der Oberfläche der Untereinheit positioniert sind (Tan et al., 1990). Die Interaktionen zwischen den einzelnen Heterodimeren dagegen sind sehr viel schwächer als jene innerhalb der Heterodimere selbst. Bereits eine einfache Proteolyse mit Plasmin oder Trypsin vermag das Tetramer in die zwei Heterodimere zu trennen (Levin et al., 1982; Plummer, 1978). Es ist denkbar, dass die leucinreichen Regionen für die Interaktion zwischen den beiden Untereinheiten verantwortlich sind. In



**Abbildung 2.12:** Schematische Zeichnung der Primärstruktur von CPN2. Vier Domänen sind dargestellt, die N-terminale Domäne, die leucinreiche Wiederholungs-Domäne, die Threonin/Serin-reiche Domäne und die C-terminale Domäne. Eingezeichnet sind ebenfalls die sieben potentiellen Glykosylierungsstellen. (Matthews et al., 2003).

diesem Fall würden wahrscheinlich die carboxy- und aminoterminalen Enden der CPN2 an der Bildung des Tetramers beteiligt sein (Tan et al., 1990). Der Aminoterminal der CPN2 enthält zahlreiche saure Reste, die an die zahlreichen basischen Reste am Carboxyterminus der zweiten CPN2-Untereinheit innerhalb des Tetramers binden könnten (Tan et al., 1990). Diese Interaktionen zusammengenommen bilden ein recht fest verbundenes Tetramer, das sich im Blutstrom als extrem stabil erwiesen hat.

### 2.2.8 CPN-Substrate

#### Kinine

Bradykinin ist ein Protein, das zur Gruppe der Kinine gehört. Es handelt sich um ein blutgefäßveränderndes Oligopeptid, das aus neun Aminosäuren besteht und ähnlich wie Histamin wirkt. Bei Entzündungen oder Verletzungen ist es an der Schmerzempfindlichkeitssteigerung an der betroffenen Körperstelle beteiligt. Es verursacht eine Tonusänderung der glatten Muskulatur (abhängig vom Wirkort), erhöht die Permeabilität des Gefäßes und verursacht Schmerz. CPN entfernt das carboxyterminale Arginin von Bradykinin und ist dadurch in der Lage, dieses zu inaktivieren (Erdos and Sloane, 1962). Auch andere Kinine wie zum Beispiel Kallidin (auch bekannt als Lys-Bradykinin) oder Met-Lys-Bradykinin können von der CPN reguliert werden (Erdos, 1979). Im Jahr 1970 wurde auch der Anaphylatoxin-Inaktivator des Komplementsystems als CPN identifiziert (Bokisch and Müller-Eberhardt, 1970). Anaphylatoxine bezeichnen aktivierte Teilkomplexe des Komplementsystems, die bei akuten allergischen Reaktionen durch Auslösung des Mastzellen-Zerfalls Histamin freisetzen. Diese können Spasmen glatter Muskelfasern, z. B. Bronchialspasmen bewirken, eine Steigerung der Durchlässigkeit der Blutkapillaren sowie zunehmende Chemotaxis, also biochemisch ausgelöste Bewegungsreaktionen z. B. weißer Blutkörperchen. Auch in diesem Fall reguliert die CPN die Anaphylatoxine durch enzymatische Abspaltung ihrer carboxyterminalen Argininreste, wodurch sich die biologische Aktivität der Anaphylatoxine um das 10-100-fache verringert (Ember et al., 1998).

#### Creatin-Kinase

Ein weiteres Substrat der CPN ist die Creatin-Kinase MM (Abendschein et al., 1987; Hendriks et al., 1988; Michelutti et al., 1987). Creatin-Kinase (CK) wird auch als Creatin-Phosphokinase (CPK) oder als Kreatinkinase bezeichnet und ist ein Enzym, das eine energiereiche Phosphatgruppe von ATP auf Kreatin überträgt. Das Enzym findet man in allen Muskelzellen und im Gehirn. Es werden vier Isoenzyme, CK-MM (Skelettmuskeltyp), CK-MB (Myokardtyp), CK-BB (Gehirntyp) und CK-MiMi (Mitochondrientyp), unterschieden. Die CPN spaltet die zwei carboxyterminalen Lysinreste der CK-MM ab und erzeugt somit die zwei Produkte CK-MM2 und CK-MM1 (Abendschein et al., 1987).

### CPN und NO-Produktion

Die Aminosäure L-Arginin wird von der Stickoxid-Synthase (NOS) zur Produktion des biologisch aktiven Gases Stickoxid (NO) verwendet, das eine wichtige Rolle bei der Entspannung von glatten Muskelfasern spielt und u.a. eine Aggregation von Blutplättchen verhindert. Da die Konzentration von Arginin, die man üblicherweise in Zellen und Plasma findet (100-800  $\mu\text{M}$ ), über dem  $K_m$ -Wert (1-20  $\mu\text{M}$ ) der NOS (endothele oder neuronale NOS) liegt, wurde zunächst angenommen, dass die Bereitstellung von Arginin keinen limitierenden Faktor für die NO-Produktion darstellt. Mittlerweile haben allerdings eine Reihe unterschiedlicher Modellsysteme nachweisen können, dass eine Erhöhung der extrazellulären Arginin-Konzentration auch eine Erhöhung der NO-Produktion zur Folge hat (Moncada and Higgs, 1995). Dieses sogenannte „Arginin-Paradoxon“ ist zwar bisher nur wenig verstanden, aber es könnte zumindest teilweise durch die erhöhte Expression der induzierbaren NOS (iNOS) während Entzündungen erklärt werden. Ebenso ist noch wenig darüber bekannt, welche Rolle Arginin, das von Peptiden und Proteinen stammt, für die NO-Synthese spielt. Wenn iNOS während einer Entzündung induziert wird und die Generierung von freiem Arginin durch Carboxypeptidasen erhöht wird, erscheint es nur plausibel, dass sich auch die NO-Konzentration erhöht. Diese Theorie konnte 2001 auch durch *in vitro* Daten unterstützt werden ((Hadgar and Skidgel, 2001).

#### 2.2.9 Ziel der Arbeit

Die Metallo-Carboxypeptidase N (CPN) spielt bei vielen Vorgängen im menschlichen Körper eine wichtige Rolle. Sie ist ein Mitglied der „regulatorischen“ Carboxypeptidasen, wird als extrazelluläres Glycoprotein in der Leber synthetisiert und von dort ins Blut ausgeschüttet. Dort kontrolliert sie die Aktivität vasoaktiver Peptidhormone, Wachstumsfaktoren und Cytokine, indem sie spezifisch C-terminal basische Aminosäuren abspaltet. Als erstes Substrat der CPN wurde das in Entzündungsprozessen involvierte Bradykinin entdeckt. Die Abspaltung des C-terminalen Arginin-Restes von Bradykinin stellt wohl bis heute auch eine der wichtigsten bekannten Funktionen der CPN dar. Ziel war es daher, die dreidimensionale Struktur der Carboxypeptidase N zu lösen, um Einblicke in den Katalysemechanismus der CPN zu bekommen und ein tieferes Verständnis für bisher nur experimentelle Daten zu ermöglichen. Ein Vergleich der CPN-Struktur mit anderen Carboxypeptidase-Strukturen sollte zudem plausible Erklärungen für unterschiedliche Substratvorlieben und Inhibitor-Wirkungen liefern. So ist zum Beispiel die Bevorzugung von Lysin- gegenüber Argininresten als C-terminal abzuspaltenden Rest bekannt, ebenso gibt es Studien über Inhibitorwirkungen, aber bisher konnte die Ursache dafür nicht geklärt werden. Ebenso sollte eine Strukturlösung der CPN1 Hinweise auf Interaktionsflächen mit der CPN2 liefern, um so ein tieferes Verständnis für die unter den Carboxypeptidasen einzigartige Tetramerbildung zu erhalten.



# 3 Material

Der Begriff „bidest Wasser“ wird im Folgenden für deionisiertes Wasser verwendet, das zusätzlich über eine Milli-Q-Plus Filtrieranlage (Millipore) gereinigt wurde. Als „steril“ oder „autoklaviert“ bezeichnete Lösungen und Materialien wurden für 20 min bei 120 °C und 2 bar Überdruck autoklaviert. Als „sterilfiltriert“ bezeichnete Lösungen wurden durch einen 0,2 µm Filter filtriert.

## 3.1 Laborgeräte

Äkta Explorer	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Autoklav	Tuttnauer Systec (Wettenberg), 5075 ELV Tuttnauer Systec (Wettenberg), 2540 EL
Blot-Apparatur	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Brutschrank	Heraeus (Hanau), B5042
Elektroporator	Stratagene (Heidelberg), Elektroporator 1000
Feinwaage	Satorius (Göttingen), BP 211D
Fluorometer	Tecan (Crailsheim), Safire <sup>2TM</sup>
FPLC-Systeme basic	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Magnetrührer	IKA-Werke (Staufen), RET
pH-Meter	Mettler-Toledo (Giessen), MP220 mit Elektrode InLab 410
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Schlauchpumpe	Amersham Pharmacia (Freiburg), LKB T-1
Schüttelinkubator	Braun (Melsungen), HAT
SMART-System	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Sonifier	Branson Ultrasonics (Danbury, USA), W250
Thermomixer	Eppendorf (Hamburg), compact Eppendorf (Hamburg), comfort
UV/VIS-Spektrometer	Beckmann (München), DU-7500 Perkin Elmer (Wellesley, USA), PE Lambda 17
Waage	Mettler Toledo (Giessen), PE3600
Zentrifugen	Eppendorf (Hamburg), 5804R Eppendorf (Hamburg), 5415R Beckmann (München), J-6M/E Beckmann (München), Avanti <sup>TM</sup>

## 3.2 Kristallographie

Drehanodengenerator	Rigaku (Kemsing Sevenoaks, Großbritannien), RU200
Detektor	Mar Research (Hamburg), Mar345mm Mar Research (Hamburg), MarCCD
Kristallisationsplatten	Charles Supper Company (Natick, MA USA), CrysChem Greiner Bioone (Frickenhausen), 96-Well
Cryoanlage	Oxford Cryosystems Ltd. (Oxford, Großbritannien)
Kristallisationsroboter	Beckmann (München), Biomek 1000 Zinsser Analytic GmbH (Frankfurt), Cartesian
Lichtmikroskop	Leica (Wetzlar), MZ12 <sub>5</sub> Leica (Wetzlar), MZ12
Goniometerkopf	Huber Diffraktionstechnik (Rimsting)

Kommerzielle Kristallisations-Screens stammten von den Firmen Hampton Research (Laguna Hills, USA), Emerald BioStructures (Bainbridge Island, USA), Jena Biosciences (Jena), Nextal (Montreal, Kanada) und Sigma-Aldrich (München).

Zur Datenverarbeitung aller Art wurden Server und *workstations* der Firma DIGITAL alphastations (OSF), SILICON GRAPHICS und Computerserver (IRIX) oder IBM-kompatible Personal Computer verwendet.

## 3.3 Datenbanken

Für die Literaturrecherche sowie zur Analyse der DNA- und Proteinsequenzen wurden folgende Internetadressen und deren Linksammlungen verwendet:

NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
PDB	<a href="http://pdbeta.rcsb.org/pdb/Welcome.do">http://pdbeta.rcsb.org/pdb/Welcome.do</a>
SWISSPROT	<a href="http://www.expasy.org">http://www.expasy.org</a>

## 3.4 Proteine

### 3.4.1 Restriktionsendonukleasen

HindIII	New England BioLabs (Beverly, USA)
NdeI	New England BioLabs (Beverly, USA)

### 3.4.2 Antikörper

Anti-His-Antikörper	Amersham Bioscience (Uppsala, Schweden)
Anti-Mausi-IgG/Alkaline Phosphatase aus der Ziege	Sigma (St. Louis, USA)

### 3.4.3 Sonstige Proteine

Herculase-DNA-Polymerase	Stratagene (La Jolla, USA)
Alkalische Phosphatase (CIP)	New England BioLabs (Beverly, USA)
T4-DNA-Ligase	New England BioLabs (Beverly, USA)
FPLC-Eichproteine	BioRad (Hercules, Canada)
NBT/BCIP	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Protease-Inhibitor Cocktail EDTA-frei	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Heparin derived tetrasaccharide (dp4)	Dextra Laboratories (Reading, UK)
Heparin derived hexasaccharide (dp6)	Dextra Laboratories (Reading, UK)
Heparin derived dp16 saccharide	Dextra Laboratories (Reading, UK)

### 3.5 Standards

High-Range-Molekulargewichtsstandard (HR) für SDS-PAGE	Sigma (St. Louis, USA)
Low-Range-Molekulargewichtsstandard (LR) für SDS-PAGE	Sigma (St. Louis, USA)
Broad-Range-Molekulargewichtsstandard (BR) für SDS-PAGE	Sigma (St. Louis, USA)
Broad-Range-Molekulargewichtsstandard (BR) „prestained“ für SDS-PAGE und Western Blot	Sigma (St. Louis, USA)
1 kb DNA-Längenstandard	New England BioLabs (Beverly, USA)

### 3.6 Kits

Qiagen Plasmid Mini Kit	QIAGEN (Hilden)
Qiagen Plasmid Maxi Kit	QIAGEN (Hilden)
Qiaquick PCR Purification Kit	QIAGEN (Hilden)
Qiaquick Gel Extraction Kit	QIAGEN (Hilden)

### 3.7 Chromatographiematerialien

Superdex 200	Amersham Biosciences (Little Chalford, USA)
HiTrap Chelating HP (1 ml)	Amersham Biosciences (Little Chalford, USA)
Superdex 75	Amersham Biosciences (Little Chalford, USA)
NiNTA Säulenmaterial	Amersham Biosciences (Little Chalford, USA)
Ni Sepharose 6 Fast Flow Säulenmaterial	Amersham Biosciences (Little Chalford, USA)

### 3.8 Sonstige Materialien

Centricon Mikrokonzentratoren	Millipore (Bedford, USA)
Filterpapier	Whatmann (Maidstone, UK)
Biosupport Membran	Pall (Portsmouth, England)
PE-Röhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner & Söhne (Nürtingen)
Petrischalen aus Polystyrol	Greiner & Söhne (Nürtingen)
Sterilfilter 0,2 µm	membraPure (Bodenheim)

## 3.9 Bakterienstämme und Plasmide

Plasmid <i>pET22b</i>	Novagen (Madison, USA)
Plasmid <i>pMT9</i>	Laborsammlung Manuel Than
Plasmid <i>pMT10</i>	Laborsammlung Manuel Than
<i>E. coli</i> Klonierungsstamm <i>DH5<math>\alpha</math></i>	Stratagene (La Jolla, USA)
<i>E. coli</i> Expressionsstamm <i>BL21(DE3)pRIL</i>	Stratagene (La Jolla, USA)
<i>E. coli</i> Expressionsstamm <i>Rosetta(DE3)</i>	Novagen (Madison, USA)
<i>E. coli</i> Expressionsstamm <i>Origami(DE3)pRIL</i>	Novagen (Madison, USA)
<i>E. coli</i> Expressionsstamm <i>B834(DE3)</i>	Novagen (Madison, USA)

## 3.10 Medien und Medienzusätze

### 3.10.1 LB-Medium

10 g/l	Bacto Trypton
5 g/l	Yeast Extract
10 g/l	NaCl

Die Substanzen wurden eingewogen und in einem Liter destilliertem Wasser unter Rühren gelöst. Anschließend wurde das Medium durch Autoklavieren sterilisiert und nach dem Abkühlen entsprechend weiterverarbeitet oder bei Raumtemperatur gelagert.

### 3.10.2 LB-Agarplatten-Medium

Das Medium wurde wie flüssiges LB-Medium unter Zusatz von 15 g/l Bacto AgarAgar hergestellt. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium auf ca. 50 °C abgekühlt und mit entsprechenden Antibiotika versetzt. Das Medium wurde durch vorsichtiges Schwenken gemischt und möglichst zügig in sterile Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren wurden die Platten bei 4 °C gelagert. Vor dem Animpfen wurden die Platten einige Stunden bei RT stehen gelassen oder eine Stunde bei 37 °C inkubiert, um kondensiertes Wasser vom Plattendeckel zu entfernen.

### 3.10.3 SOB-Medium

20 g/l	Bacto Trypton
5 g/l	Hefe-Extrakt
0,584 g/l	NaCl
0,186 g/l	KCl

Die Substanzen wurden eingewogen und in einem Liter destilliertem Wasser unter Rühren gelöst. Anschließend wurde das Medium durch Autoklavieren sterilisiert und nach dem Abkühlen entsprechend weiterverarbeitet oder bei Raumtemperatur gelagert.

### 3.10.4 Minimalmedium

740 ml	H <sub>2</sub> O (autoklaviert in 2l Schüttelkolben)
100 ml	10fach Stocklösung Salze
100 ml	10fach Stocklösung Aminosäuren
60 ml	Seleno-DL-Methionin (1 mg/ml Endkonzentration)

Die Zutaten wurden unter sterilen Bedingungen in den Schüttelkolben vermischt und anschließend mit den entsprechenden Antibiotika versetzt.

### 3.10.5 Antibiotika und andere Medienzusätze

#### 10fache Stocklösung Salze

75 ml	1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
17 ml	5 M NaCl
10 ml	1 M $\text{MgSO}_4$
200 ml	1 M Glucose
10 ml	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 mg/ml)
10 ml	<i>Trace elements</i> (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
10 ml	Thiamin (10 mg/ml)
10 ml	Biotin (10 mg/ml)
10 ml	$\text{FeH}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 mg/ml - erst kurz vor Gebrauch zugeben!)
648 ml	$\text{H}_2\text{O}$

Die Zutaten wurden unter sterilen Bedingungen vermengt und in eine autoklavierte Flasche sterilfiltriert. Die fertige Stocklösung wurde bei 4 °C gelagert, die Einzelzutat Ammoniumeisen(II)-sulfathexahydrat wurde bei -20 °C gelagert.

#### 10fache Stocklösung Aminosäuren

274 ml	$\text{H}_2\text{O}$
476 ml	1 M $\text{K}_2\text{HPO}_4$
220 ml	1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$
je 0,5 mg	aller Aminosäuren außer Met, Phe, Trp, Tyr
je 0,5 mg	Phe, Trp, Tyr (bereits gelöst in 28,5 ml $\text{H}_2\text{O}$ und 1,5 ml 32 % HCl)
970 ml	$\text{H}_2\text{O}$

Die Zutaten wurden unter sterilen Bedingungen vermengt und in eine autoklavierte Flasche sterilfiltriert. Die fertige Stocklösung wurde bei 4 °C gelagert.

#### Trace elements 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$

5 $\mu\text{l}$	$\text{MnCl}_2$ (10 mg/ml)
5 $\mu\text{l}$	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (10 mg/ml)
5 $\mu\text{l}$	$\text{Na}_2\text{MoO}_4$ (10 mg/ml)
5 $\mu\text{l}$	$\text{ZnSO}_4$ (10 mg/ml)

Die Zutaten wurden unter sterilen Bedingungen zusammenpipettiert und mit autoklaviertem  $\text{H}_2\text{O}$  auf ein Endvolumen von 50 ml gebracht.

#### Ampicillin

Es wurde eine Ampicillin-Stammlösung von 100 mg/ml in Wasser hergestellt. Diese wurde dem Medium im Verhältnis 1:1000 zugesetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

#### Chloramphenicol

Eine Chloramphenicol-Stammlösung von 34 mg/ml in EtOH wurde hergestellt und den Medien im Verhältnis von 1:1000 zugesetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### 3 Material

#### **Tetracyclin**

Eine Tetracyclin-Stammlösung von 12 mg/ml in EtOH wurde hergestellt und den Medien im Verhältnis von 1:1000 zugesetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

#### **IPTG**

Zum Induzieren der Bakterien wurde eine 1 M IPTG-Stammlösung vorbereitet und sterilfiltriert. Nach dem Erreichen einer OD<sub>595</sub> von 0,8 wurden die Bakterien mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG induziert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

## **3.11 Allgemeine Puffer und Lösungen**

### **3.11.1 50x TAE-Puffer**

242 g Tris  
57,1 ml Essigsäure  
100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

Die Substanzen wurden in einen Meßkolben eingewogen bzw. abgefüllt und mit destilliertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Anschließend wurde der Puffer sterilfiltriert und bei RT gelagert. Zum Gießen von Agarosegelen wurden 5 ml des 50x TAE-Puffers mit 245 ml destilliertem Wasser verdünnt.

### **3.11.2 DNA-Probenpuffer**

250 mg Bromphenolblau  
150 mM Tris, pH 7,6  
60 ml Glycerin  
7 ml H<sub>2</sub>O

Die Substanzen wurden eingewogen bzw. abgemessen und bei RT gelagert. Der Probenpuffer besteht zum Einen aus Glycerin, um die Proben in die Taschen sinken zu lassen und zum Anderen aus Bromphenolblau, um die Sichtbarkeit der Proben beim Auftragen zu verbessern.

### **3.11.3 SDS-PAGE**

#### **10% Ammoniumpersulfat (APS)**

1 g APS wurde in 10 ml H<sub>2</sub>O gelöst und bei -20 °C gelagert.

#### **10% Natriumdodecylsulfat (SDS)**

5 g SDS wurden in 40 ml H<sub>2</sub>O gelöst, dabei war es teilweise nötig den Reaktionsansatz etwas anzuwärmen, um Kristalle zu lösen. Dann wurde der pH-Wert mittels HCl auf 7,2 eingestellt und das Volumen anschließend auf 50 ml aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei RT.

**SDS-PAGE Trenngel (für 8 Gele)**

	24,4 ml	Wasser
	32 ml	Acrylamidlösung, 30 %
12%iges Trenngel:	20 ml	Tris/HCl; 1,5 M; pH 8,8
	800 $\mu$ l	SDS, 10 %
	800 $\mu$ l	APS, 10 %
	32 $\mu$ l	TEMED
	18,4 ml	Wasser
	40 ml	Acrylamidlösung, 30 %
15%iges Trenngel:	20 ml	Tris/HCl; 1,5 M; pH 8,8
	800 $\mu$ l	SDS, 10 %
	800 $\mu$ l	APS, 10 %
	32 $\mu$ l	TEMED

Die Substanzen wurden alle bis auf TEMED abgemessen bzw. zusammenpipettiert und durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Nach der Zugabe von TEMED wurde die Lösung erneut durch vorsichtiges Schwenken gemischt und anschließend zügig in die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Die Oberfläche wurde mit Isopropanol überschichtet und das Auspolymerisieren abgewartet.

**SDS-PAGE Sammelgel (für 8 Gele)**

20,4 ml	Wasser
5,1 ml	Acrylamidlösung, 30 %
3,75 ml	Tris/HCl; 1 M; pH 6,8
300 $\mu$ l	SDS, 10 %
300 $\mu$ l	APS, 10 %
30 $\mu$ l	TEMED

Entsprechend dem Trenngel wurde auch das Sammelgel hergestellt, indem alle Substanzen bis auf das TEMED abgemessen bzw. zusammenpipettiert wurden. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen, mehrfach gespült, dem Sammelgel TEMED zugegeben und nach einer Durchmischung über das Sammelgel pipettiert. Anschließend wurden Plastikämme mit 10–12 Taschen zwischen die Platten eingeführt und die Gele nach Erstarren luftdicht mit etwas Wasser oder in feuchte Tücher eingeschlagen verpackt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

**SDS-PAGE-Probenpuffer**

10 ml	1,5 M Tris (pH 6,8)
12 ml	10 % SDS
30 ml	Glycerin
15 ml	$\beta$ -Mercaptoethanol
1,8 mg	Bromphenolblau

Die Substanzen wurden abgemessen bzw. eingewogen und mit H<sub>2</sub>O auf 50 ml aufgefüllt. Für nicht-reduzierenden Probenpuffer wurde kein  $\beta$ -Mercaptoethanol zugegeben. Die Lagerung erfolgte bei RT. Der Puffer wurde bei SDS-PAGE den Proben zugegeben, um nicht-kovalente Wechselwirkungen aufzuheben, dem Protein eine negative Ladung zu verleihen und dadurch eine Auftrennung nach Größe unabhängig von der Eigenladung zu erzielen. Zusätzlich vereinfacht der enthaltene Farbstoff und das Glycerin den Probenauftrag durch Anfärben der Proben und Absinken in die Geltaschen.

### 3 Material

#### **10× SDS-PAGE-Laufpuffer**

10 g SDS  
30,3 g Tris  
144,1 g Glycin

Die Substanzen wurden eingewogen und in 900 ml H<sub>2</sub>O gelöst. Das Volumen wurde mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und bei RT gelagert. Für einen SDS-PAGE-Lauf wurde der Puffer 10fach verdünnt.

#### **Coomassie-Blue-Färbelösung**

2,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250  
450 ml Ethanol  
100 ml Essigsäure  
450 ml H<sub>2</sub>O

Das Coomassie Brilliant Blue wurde eingewogen und in den angegebenen Lösungen unter Rühren gelöst. Anschließend wurde die Färbelösung bei Raumtemperatur gelagert.

#### **Coomassie-Blue-Entfärbelösung**

450 ml Ethanol  
100 ml Essigsäure  
450 ml H<sub>2</sub>O

Die einzelnen Lösungen wurden gemischt und bei RT gelagert.

### **3.11.4 Western-Blot**

#### **Transfer-Puffer**

200 ml Methanol wurden mit einfachem SDS-PAGE-Laufpuffer auf ein Gesamtvolumen von 1 l aufgefüllt.

#### **TBS-Puffer**

20 mM Tris, pH 7,5  
150 mM NaCl  
0,05 % Tween

Die Substanzen wurden zusammenpipettiert und bei RT gelagert. Für das Blocken der Membran wurde zusätzlich noch 5 % Magermilchpulver zugegeben, für die nachfolgende Antikörperbindung die entsprechende Konzentration an primärem bzw. sekundärem Antikörper.

#### **AP-Puffer**

100 mM Tris, pH 9,5  
100 mM NaCl  
50 mM MgCl<sub>2</sub>

Die Substanzen wurden zusammenpipettiert und bei RT gelagert. Zum Färben des Western-Blots wurden 10 ml des Puffers frisch mit 200 µl INT/BCIP (Roche) angesetzt.



### 3.11.5 Probenvorbereitung für Edman-Sequenzierung

#### Färbelösung

2,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250  
450 ml Methanol  
100 ml Essigsäure  
450 ml H<sub>2</sub>O

Das Coomassie Brilliant Blue wurde eingewogen und in den angegebenen Lösungen unter Rühren gelöst. Anschließend wurde die Färbelösung bei Raumtemperatur gelagert.

#### Entfärbelösung

500 ml Methanol  
100 ml Essigsäure  
400 ml H<sub>2</sub>O

Die einzelnen Lösungen wurden gemischt und bei RT gelagert.



# 4 Methoden

## 4.1 Gentechnische Methoden

Grundlagen für die folgenden Arbeitsvorschriften stellen die entsprechenden Abschnitte aus Sambrook et al. (1989) bzw. Ausubel et al. (1987) dar, gegebenenfalls modifiziert durch Hersteller-spezifische Empfehlungen. Für die Anzucht von Bakterien bei molekularbiologischen Arbeiten wurden sterile Gefäße und Lösungen verwendet. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Arbeiten bei Raumtemperatur ausgeführt.

### 4.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wird zur starken Amplifikation von definierten DNA-Bereichen benutzt. Das Grundprinzip der PCR ist die enzymatische Duplikation einer DNA-Sequenz. Hierzu benötigt werden zwei Oligonukleotide – die Primer – die jeweils komplementär homolog zu dem (+)-Strang des einen Endes und zu dem (–)-Strang des anderen Endes der zu amplifizierenden DNA-Region sind. Nach Hitze-Denaturierung der DNA können sich die Primer bei der anschließenden Abkühlung des Reaktionsansatzes an die DNA-Matrize anlagern. Die hitzestabile Polymerase erstellt – ausgehend vom 3'-OH-Ende des Primers – durch Primer-Extension eine Kopie der DNA-Matrize. Die Primer müssen so orientiert sein, dass die Synthesen der DNA-Moleküle aufeinander zulaufen. Nachdem die gewünschte Sequenz synthetisiert ist, werden die Stränge durch Hitze einwirkung voneinander getrennt. Durch erneute schnelle Senkung der Temperatur wird eine spezifische Bindung der Primer an die entstandenen DNA-Stücke ermöglicht. Durch Primerverlängerung wird dann wieder eine neue Kopie der Template-DNA erstellt. Durch dreißig- bis vierzigfaches Wiederholen dieses Zyklus erreicht man eine vieltausendfache Vermehrung des definierten DNA-Bereiches zwischen den Primern.

#### PCR-Reaktion

Der Reaktionsansatz wurde nach folgendem Rezept zusammenpipettiert:

2 $\mu$ l	forward primer der Konzentration 10 pmol/ $\mu$ l
2 $\mu$ l	reverse primer der Konzentration 10 pmol/ $\mu$ l
4 $\mu$ l	dNTP-Mix der Konzentration 2,5 nmol/ $\mu$ l
0,1 $\mu$ l	Template
0,5 $\mu$ l	Herculase
36,4 $\mu$ l	autoklaviertes bidest Wasser

Die Herculase wurde dabei als letzter Schritt zupipettiert und das Programm wie in Tabelle 4.1 angegeben laufen gelassen.

Anschließend wurde die Reaktion mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese überprüft (vergleiche Abschnitt 4.1.8).

Tabelle 4.1: PCR-Reaktion

Programmschritt		Dauer	Temperatur
Denaturieren der DNA-Matrize zu Beginn:		5 min	96 °C
3-Schritt-PCR: (25–30 Zyklen)	Denaturieren	1,10 min	96 °C
	Annealing:	1 min	47–58 °C
	Extension:	1,45 bzw. 4 min	72 °C
Verlängerung der entstandenen PCR-Produkte am Ende:		10 min	72 °C

### Reinigung der PCR-Produkte

Die Proben der Polymerase-Kettenreaktion wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach dem Herstellerprotokoll gereinigt.

### 4.1.2 Herstellung von elektrokompenten Zellen

Im Gegensatz zu anderen Bakterien (z.B. *Bacillus subtilis*) nimmt *E.coli* spontan keine Fremd-DNA auf. Es existieren jedoch verschiedene Methoden, um *E.coli*-Zellen für die Aufnahme von DNA kompetent zu machen. Im Folgenden soll die Herstellung elektrokompenter Zellen beschrieben werden.

Dazu wurden zunächst *E.coli*-Kulturen auf LB-Medium (sofern nötig, war dieses mit entsprechenden Antibiotikazusätzen versetzt) ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit über Nacht bei 37 °C wurden je 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft, diese Vorkultur am Abend desselben Tages in 100 ml SOB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Jeweils 5 ml wurden aus dieser Übernacht-Kultur entnommen, um damit 4 frische Erlenmeyerkolben mit je 1 l SOB-Medium anzuimpfen. Die Kulturen wurden bei 37 °C bis zu einer OD<sub>595</sub> von 0,8 herangezogen. Dann wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4000 upm für 25 Minuten bei 4 °C geerntet und der Überstand abgegossen. Die Zellen wurden in je einem halben Liter autoklaviertem 10 %igem Glycerin resuspendiert und erneut bei 4000 upm 25 min lang zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt, der Überstand wieder abgegossen und die Zellen kurz abzentrifugiert, um den restlichen Waschpuffer von den Becherwänden zu spülen. In der verbliebenen Flüssigkeit wurden die Zellen auf Eis durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert und in 15 ml Falcon Röhrchen gesammelt. Schließlich wurden 50 µl Aliquots hergestellt, diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

### Test auf Sauberkeit

Um die Zellen auf Sauberkeit zu testen, wurden 50 µl reine Zellen auf einer LB<sub>AB</sub>-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Zellen enthalten ohne ein integriertes Plasmid keine Antibiotika-Resistenz und sollten daher nicht auf dem Selektionsmedium wachsen.

### Test auf Transformationseffizienz

Die Zellen wurden mit 10 ng DNA in verschiedenen Verdünnungen transformiert, auf LB<sub>Amp</sub> ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden gezählt, mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und die Transformationseffizienz (XFE) nach folgender Formel berechnet:

$$\text{XFE} = \frac{\text{transformierte Klone}}{1 \mu\text{g, DNA}}$$

Bei einer Transformationseffizienz von  $10^8$  und höher wurden die Zellen für weitere Experimente verwendet.

#### 4.1.3 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Zellen

Zur Transformation von Plasmid-DNA in elektrokompente *E.coli*-Zellen wurden  $50 \mu\text{l}$  Zellen und  $1 \mu\text{l}$  des Plasmids eingesetzt. Der DNA-Transfer wurde durch Elektroporation mittels des Elektroporators 1000 von Stratagene vermittelt. Dabei wurde durch Stromschläge von 1650 V die Membran der elektrokompenten Zellen für kurze Zeit für Fremd-DNA durchgängig gemacht. Eine erfolgreiche Transformation war an einer Zeitkonstante zwischen 4,6 und 5,8 zu erkennen. Nach erfolgter Transformation wurden die Zellen schnellstmöglich in  $950 \mu\text{l}$  frischem LB-Medium aufgenommen und nach einer einstündigen Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  auf Selektionsmedium ausplattiert.

#### 4.1.4 Plasmidpräparationen

Nach Anzucht im entsprechenden Selektionsmedium wurden die Bakterien, die das gewünschte Plasmid replizierten, durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt und einer alkalischen Lyse mit NaOH/SDS unterworfen. Dies führte zum Platzen der Zellen und zur Denaturierung der bakteriellen Proteine. Sowohl die chromosomale als auch die Plasmid-DNA wurden dabei freigesetzt und ebenfalls denaturiert. Anschließend erfolgte eine Neutralisierung des alkalischen Lysats unter Hochsalzbedingungen. Hierbei renaturierte die Plasmid-DNA, während alle anderen makromolekularen Komponenten als Präzipitat ausfielen. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe einer Anionenaustauschersäule (Qiagen). Aufgrund der hohen Ladungsdichte des Säulenmaterials konnte doppelsträngige Plasmid-DNA unter Hochsalzbedingungen bei neutralem bis schwach alkalischem pH-Wert selektiv eluiert werden.

#### Mini-Präparationen zur Charakterisierung transformierter Bakterien

Zur Gewinnung von Plasmiden aus *E.coli*-Kulturen, wurde zunächst eine 5 ml Vorkultur aus LB mit den entsprechenden Antibiotika mit einer auf Platte gewachsener Einzelkolonie angeimpft und diese über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Das weitere Vorgehen erfolgte laut Anleitung im QIAGEN Plasmid-Mini-Kit.

#### Maxi-Präparationen zur Plasmidgewinnung

Zunächst wurde eine 5 ml Vorkultur aus LB mit den entsprechenden Antibiotika mit einer auf Platte gewachsener Einzelkolonie angeimpft und diese nach einer Inkubation von ca 12 h bei  $37^\circ\text{C}$  in eine 100 ml-Übernacht-Kultur überführt. Das weitere Vorgehen erfolgte laut Anleitung im QIAGEN Plasmid-Maxi-Kit.

#### 4.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren wurde photometrisch mit einer 1:20 Verdünnung in autoklaviertem bidest Wasser durchgeführt. Dabei wurde die Absorption der Purin- und

Pyrimidin-Basen im Bereich von 260 nm ausgenutzt. Hierbei war zu beachten, dass Doppelstrang-DNA, Einzelstrang-DNA und Einzelstrang-Oligonukleotide infolge des unterschiedlichen Ausmaßes der Basenkoppelung verschiedene Extinktionskoeffizienten besitzen. Eine Extinktion von 1 entspricht

bei Doppelstrang-DNA einer Konzentration von ca.	50 $\mu\text{l}/\text{ml}$ ,
bei Einzelstrang-DNA einer Konzentration von ca.	40 $\mu\text{l}/\text{ml}$ ,
bei Einzelstrang-Oligonucleotiden einer Konzentration von ca.	20 $\mu\text{l}/\text{ml}$ .

Dazu wurde ein UV-VIS-Spektrum von 220 nm bis 300 nm aufgenommen und aus dem erhaltenen Absorptionswert bei 260 nm wurde die Konzentration der Nukleinsäure berechnet und eventuell durch eine zweite Messung bei 280 nm - dem Absorptionsmaximum aromatischer Reste von Proteinen - ihre Reinheit abgeschätzt. Bei einem Quotienten  $E_{260}/E_{280}$  von 1,8 – 2,0 betrug die Reinheit der DNA 70–95 %.

### 4.1.6 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom TypII schneiden doppelsträngige DNA spezifisch an palindromischen Sequenzen, die für das jeweilige Restriktionsenzym charakteristisch sind. Je nach Enzym variiert die Pufferzusammensetzung, bei der die Reaktion optimal (bezüglich Spezifität und Geschwindigkeit) abläuft.

#### Qualitativer Verdau

Ein qualitativer Verdau, der zum Test von Mini- bzw. Maxi-Preps angewendet wurde, wurde wie folgt angesetzt:

2/10 $\mu\text{l}$	DNA (2 $\mu\text{l}$ für Maxi, 10 $\mu\text{l}$ für Mini)
2,5 $\mu\text{l}$	Puffer (ausgewählt nach der Tabelle des New England Biolabs Katalogs)
1 $\mu\text{l}$	von jedem Restriktionsenzym a 20 U
ad 25 $\mu\text{l}$	autoklaviertes bidest Wasser

Um Kontaminationen auszuschließen, wurden zusätzlich jeweils Kontrollen angesetzt, die nur das erste Enzym, nur das zweite Enzym oder nur den Puffer enthielten. Die Proben wurden 2–3 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und anschließend wurde der gesamte Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen (vgl. Abschnitt 4.1.8)

#### Quantitativer Verdau

Der quantitative Verdau wurde nach folgendem Schema angesetzt:

5 $\mu\text{g}$	Plasmid/Insert
10 $\mu\text{l}$	Puffer (ausgewählt nach der Tabelle des New England Biolabs Katalogs)
2,5 $\mu\text{l}$	von jedem Restriktionsenzym
ad 40 $\mu\text{l}$	autoklaviertes bidest Wasser

Dazu wurden zusätzlich jeweils Kontrollen angesetzt, die nur das erste Enzym, nur das zweite Enzym und nur den Puffer enthielten. Diese Kontrollen wurden wie folgt angesetzt:

2 $\mu\text{g}$	Plasmid
4 $\mu\text{l}$	Puffer (ausgewählt nach der Tabelle des New England Biolabs Katalogs)
1 $\mu\text{l}$	von jedem Restriktionsenzym
ad 100 $\mu\text{l}$	autoklaviertes bidest Wasser

Der Verdau wurde 2–3 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, dann wurden je 15  $\mu\text{l}$  abgenommen und auf ein Agarosegel aufgetragen (vgl. Abschnitt 4.1.8). Erwies sich der Verdau als vollstän-

dig, wurden die Proben weiterverarbeitet. Andernfalls wurde noch einmal die gleiche Menge an Restriktionsenzym zugegeben und über Nacht weiter bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

### 4.1.7 Dephosphorylierung linearer Doppelstrang-DNA

Zur Entfernung der 5'-Phosphatgruppen linearer DNA wurde Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*, CIP) verwendet. Dazu wurde 1 µl der CIP in den Plasmiddoppelverdauer gegeben und der Ansatz eine weitere Stunde bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert.

### 4.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse oder Präparation von DNA-Fragmenten wurden diese in Agarosegelen im elektrischen Feld aufgetrennt. Da Nukleinsäuren bei neutralem pH-Wert polyanionisch sind, wandern sie im elektrischen Feld auf die positive Elektrode zu. Bei der Wanderung durch die Gelmatrix werden sie der Größe nach aufgetrennt. Durch die Zugabe von SYBR Green zu den Proben, welches in GC-Paare der DNA interkaliert, können DNA-Fragmente unter UV-Licht aufgrund der Abgabe von Fluoreszenzlicht sichtbar gemacht werden.

Zur Herstellung von 1%igen Gelen wurde 0,50 g Agarose mit 1x TAE-Puffer auf 50 g aufgefüllt und anschließend in der Mikrowelle aufgeschmolzen und wieder abgekühlt. Nach Erreichen der Gießtemperatur von 55 °C wurde das Gel blasenfrei in die mit den entsprechenden Kämmen versehene Gießkammer gegossen. Nach etwa einer Stunde wurden die Kämmen aus dem erstarrten Gel entfernt. Die DNA-Proben wurden mit 1/4 Vol. Probenpuffer versetzt und zur Elektrophorese in die geformten Geltaschen gegeben. Zusätzlich wurden die Proben zur späteren Analyse mit 1/10 Vol. SYBR Green versehen. Zum Größenvergleich wurde ein Nukleinsäuren-Standard eingesetzt. Die angelegte Spannung während der Elektrophorese betrug durchgehend 50 V und das Gel wurde nach einer Stunde Laufzeit unter UV-Licht fotografiert. Bei präparativen Gelen wurde die interessierende Bande mit einem Skalpell herausgeschnitten. Die Extraktion von DNA-Fragmenten erfolgte mittels des Gel Extraction Kits der Firma Qiagen (Abschnitt 4.1.8).

### Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolation der DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des Gel extraction Kits der Firma Qiagen. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der selektiven und quantitativen Adsorption von DNA an Silicagel-Partikel unter Hochsalzbedingungen. Die DNA bleibt während des Waschvorgangs an die Silica-Partikel gebunden und kann am Ende der Aufreinigung spezifisch abgelöst werden. Das gewünschte DNA-Fragment wurde unter UV-Licht (312 nm) mit Hilfe eines sterilen Skalpells aus einem Agarosegel herausgeschnitten. Das weitere Vorgehen erfolgte laut Anleitung im QIAGEN Gel-extraction-Kit.

### 4.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNA-Fragmente, wobei sowohl kohäsive als auch glatte Enden miteinander verknüpft werden. Ebenso werden offene Phosphodiesterbindungen in einem Strang der Doppelhelix geschlossen.

## 4 Methoden

100 ng	geschnittener Vektor
7 fach molare Menge	des geschnittenen Inserts
2,5 $\mu$ l	Ligase-Puffer
1 $\mu$ l	Ligase
ad 25 $\mu$ l	autoklaviertes bidest Wasser

Der Ligationsansatz wurde ca. 2 h bei RT inkubiert und anschließend wurde mit einem Teil eine Transformation durchgeführt. Der Rest wurde über Nacht bei 16 °C weiter inkubiert und am nächsten Tag sofern nötig eine weitere Transformation durchgeführt.

## 4.2 Proteinpräparation

### 4.2.1 Kultivierung und Konservierung von E.coli Stämmen

Zur Anzucht der *E.coli*-Stämme wurden LB<sub>AB</sub>-Platten mit transformierten Zellen angeimpft und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Für Flüssigkulturen wurde LB<sub>0</sub>- Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und mit einer Einzelkolonie von einer Platte oder aus einer Glycerinkultur angeimpft und im Erlenmeyerkolben bei 37 °C in einem Kulturschüttler bis zur gewünschten Zelldichte inkubiert. Die Zelldichte wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Zur Konservierung von *E.coli*-Kulturen wurden diese auf Agarplatten bei 4 °C aufbewahrt.

### 4.2.2 Konservieren von Bakterienstämmen mittels Glycerinkulturen

Zur Aufbewahrung von Bakterienkulturen über längere Zeiträume müssen Dauerkulturen angelegt werden. In glycerinhaltigem Medium lassen sich Bakterien bei tiefen Temperaturen praktisch unbegrenzt lange lagern, ohne an Vitalität zu verlieren.

Dazu wurden je 500  $\mu$ l der aufzubewahrenden Bakterienkultur mit je 500  $\mu$ l sterilem Glycerin in einem sterilen 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Zum Animpfen wurde mit einer Impföse ein kleiner Teil der gefrorenen Glycerinkultur abgenommen und in das entsprechende Medium überführt oder auf einer Agarplatte ausgestrichen.

### 4.2.3 Proteinexpression und Ernte

Zur Expression der Proteinfragmente wurde das entsprechende Plasmid in den gewünschten *E.coli*-Expressionsstamm transformiert und Übernacht-Kulturen mit 100 ml Medium (versetzt mit entsprechenden Antibiotika) angesetzt. Daraus wurden je 5 ml in frische Erlenmeyerkolben mit 1 l LB-Medium überführt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 herangezogen. Dann wurde die Proteinexpression durch die Zugabe von 1 mM Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und die Kulturen bei Raumtemperatur bis zum optimierten Zeitpunkt geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4.000 upm für 25 Minuten bei 4 °C geerntet.

### Löslichkeitstest

Bevor ein kloniertes Konstrukt im großen Maßstab exprimiert wurde, wurde jeweils ein Expressionstest mit verschiedenen Expressionsstämmen und bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Im Anschluß daran zeigte ein Löslichkeitstest, ob das Protein in löslicher Form oder als Einschlusskörper (*inclusion bodies*) exprimiert wurde.



Dazu wurde das Pellet von 1 ml der nach der Anleitung in Abschnitt 4.2.3 gewonnenen *E. coli*-Zellen in 400  $\mu$ l Lysispuffer (100 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8) resuspendiert und die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen und anschließend abzentrifugiert. 20  $\mu$ l des Überstandes wurden mit 5  $\mu$ l 4x SDS-Auftragspuffer versehen und das Pellet wurde in 500  $\mu$ l 2x SDS-Auftragspuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Proben bei 95 °C 5 min lang aufgeköcht und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Je nach Ergebnis wurde mit dem Überstand oder dem Pellet weitergearbeitet.

### Abbau- und Aggregationstest

Um einen Überblick über einen eventuellen Proteinabbau durch Proteasen und eine Aggregation des Proteins zu erhalten wurde ein Abbau- und Aggregationstest angesetzt. Dazu wurde eine Probe sofort mit Auftragspuffer versetzt und aufgeköcht, weitere Proben wurden vorher über Nacht bei Raumtemperatur und bei 37 °C und eine Probe 2 Tage lang bei 37 °C stehen gelassen. Anschließend wurden die Proben jeweils einmal mit reinem, nicht reduzierendem SDS-PAGE-Probenpuffer und mit reduzierendem  $\beta$ -Mercaptoethanol-Probenpuffer versetzt, aufgeköcht und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Analyse der SDS-PAGE erlaubte Aufschluß über das Aggregationsverhalten und die Tendenz zu proteolytischem Abbau des Proteins.

### 4.2.4 Derivatisierung der Proteine mit Selenomethionin

Für die Phasierung bei der Strukturlösung des bappS4-Konstruktes wurden Schweratomderivate des Proteins benötigt. Dies konnte durch den Einbau von Selenomethionin anstelle von Methionin in das Zielprotein erreicht werden. Hierzu wurde das Protein in dem Methionin-auxotrophen Stamm *B834(DE3)* überexprimiert, der eine Defizienz der Cystathionin-Synthase aufweist und dadurch eine Inkorporation von SeMet in das Protein ermöglichte. Die Bakterienkultivierung erfolgte in einem aufwendig herzustellenden Minimalmedium, wodurch die Wachstumszeit deutlich verlangsamt wurde und auch die Expressionsrate sank. Die Vorkulturen wurden noch mit LB-Medium angezogen, anschließend allerdings zur Entfernung von Methionin abzentrifugiert (4000 \*g, 10 min, 4 °C), das Pellet mit 20 ml bidestilliertem und autoklaviertem H<sub>2</sub>O gewaschen, erneut abzentrifugiert und das Pellet abschließend in 20 ml Minimalmedium resuspendiert. Die Bakterienkultivierung und der Zellaufschluß erfolgten wie beschrieben.

### 4.2.5 Aufkonzentrierung

Zur Aufkonzentrierung der gereinigten Proteine wurde die Ultrazentrifugation verwendet. Dabei wurde die Lösung durch Zentrifugation gegen eine Membran gedrückt, welche ein bestimmtes Ausschlußvolumen besaß. Proteine oberhalb des Ausschlußvolumens konnten die Membran nicht passieren und somit aufkonzentriert werden.

### 4.2.6 Chromatographische Methoden

Für die Reinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli* wurden alle verwendeten Puffer sterilfiltriert und entgast.

### Affinitätschromatographie

Bei der Affinitätschromatographie beruht der Trennungseffekt auf der Affinität des Zielproteins bestimmte Interaktionspartner zu binden, während der Großteil der im Zellaufschluß enthaltenen Proteine diese Affinität nicht besitzt. Im Rahmen dieser Arbeit kamen verschiedene Säulen

## 4 Methoden

zum Einsatz, die nach diesem Prinzip funktionieren. Für die C-terminale und N-terminale Hälfte der APP-Ektodomäne wurde eine NiNTA-Säule für die Reinigung verwendet. Der bei der Klonierung angehängt Histidin-*tag* konnte an das Säulenmaterial der NiNTA-Säule binden und mittels eines Stufengradienten mit Imidazol wieder eluiert werden. Bei der Reinigung des Vollängenkonstruktes über eine Heparin-Bindesäule wurde ein NaCl-Gradient von 1,5 % pro Säulenvolumen angesetzt und die Elution des bappS1-Konstruktes von der mit Kupfer immobilisierten Säule erfolgte ebenfalls mittels eines Imidazol-Stufengradienten.

### Größenausschluß-Chromatographie (Gelfiltration)

Als abschließender Reinigungsschritt wurde stets eine Größenausschlußchromatographie durchgeführt. Die Matrix der verwendeten Säulen bestand aus einem dreidimensionalen Netzwerk mit definierter Porengröße, wodurch kleine Moleküle in die Poren der Matrixkügelchen eindringen und auf der Säule zurückgehalten werden konnten, während die großen Moleküle nicht möglich war. Dadurch konnte eine Trennung aufgrund der Größe der Proteine erfolgen. Für die Ausschlußchromatographie, wurden je nach den zu trennenden Größenbereichen eine Superdex 200 oder eine Superdex 75 26/60, verwendet. Die Säule wurde in mindestens 1,5 SV des jeweiligen Laufpuffers äquilibriert. Das maximale Probenauftragsvolumen betrug 5 ml. Die Elution erfolgte mit 360 ml Laufpuffer und einer Flußrate von 1- 2 ml/min. Es wurden Fraktionen von 1 ml ab einem Elutionsvolumen von 100 ml gesammelt.

## 4.3 Proteinanalytik

### 4.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der SDS-PAGE wandern Proteine entsprechend des Logarithmus ihres Molekulargewichts unterschiedlich schnell. Das den SDS-PAGE-Proben zugegebene SDS, das im Verhältnis 1:1,4 (SDS:Aminosäure) gebunden wird, verleiht dem Protein eine negative Überschlußladung. Wird ein elektrisches Feld angelegt, wandern die Proteine in Richtung Anode. Sie können dann mittels verschiedener Färbemethoden sichtbar gemacht werden. In der vorliegenden Arbeit wurden 12 und 15 %ige Polyacrylamidgele mit Trenngel und Sammelgel verwendet. Zur Auftrennung wurde ein elektrisches Feld mit einer Stromstärke von 30 mA pro Gel angelegt. Anwendung fanden die SDS-Gele vor allem zur Kontrolle des Reinigungserfolges. Die Lösung der Proteine erfolgte, falls nicht anders angegeben in 4× SDS-PAGE-Probenpuffer. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Ansätze 5 Minuten bei 95 °C aufgekocht, um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu erreichen.

### 4.3.2 Färbemethoden

#### Coomassie

Polyacrylamidgele wurden mit Coomassie-Färbelösung übergossen, einige Sekunden in der Mikrowelle aufgekocht und für 15–45 Minuten gefärbt. Anschließend wurde die Färbelösung abgossen, das Gel kurz mit dest. Wasser gewaschen und zusammen mit der Entfärbelösung kurz in der Mikrowelle aufgekocht. Es wurde 2–24 Stunden im Entfärbelösungsmittel entfärbt.

## Silberfärbung

Ein SDS-Polyacrylamidgel wurde für 4–12 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler in einem Ethanol-Essigsäure-Wasser-Gemisch (30:10:60) inkubiert und anschließend gut mit destilliertem Wasser abgespült. Es folgte zweimal eine halbstündige Inkubation in 30 %igem Ethanol und dreimal ein 10 minütiger Waschschriff mit destilliertem Wasser. Eine frisch angesetzte 0,1 %ige Silbernitrat-Lösung wurde zugegeben, nach einer halben Stunde abgegossen und das Gel unter fließendem, destilliertem Wasser mindestens 20 Sekunden lang gespült. Schließlich wurde das Gel mit einer frisch angesetzten 2,5 %igen Natriumcarbonat-Lösung mit 0,02 % Formaldehyd (pH über 4) entwickelt und mit 5 %iger Essigsäure abgestoppt.

### 4.3.3 Probenvorbereitung zur Edman-Sequenzierung

Das vorgereinigte Protein wurde auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und geblottet. Der Reaktionsaufbau entsprach dabei den Angaben in der Tabelle 4.2.

**Tabelle 4.2:** Aufbau eines Blots

Schicht	Inhalt & Puffer
4 (oben)	9× Whatman-Filterpapier (in Transferpuffer getränkt)
3	Gel
2	Membran (in 60%igem Methanol getränkt)
1(unten)	6× Whatman-Filterpapier (in Transferpuffer getränkt)

Die negativ geladenen Proteine wurden dabei auf eine PVDF-Membran übertragen. Das Blotting erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 100 mA für 90 Minuten. Die geblottete Membran wurde etwa 10 Minuten in der Färbelösung geschwenkt und danach entfärbt. Dann wurde der Blot getrocknet, die interessierende Proteinbande ausgeschnitten und zur Sequenzierung mittels Edman-Abbau geschickt.

### 4.3.4 N-terminale Sequenzierung nach EDMAN

Nach der Methode des EDMAN-Abbaus (Edman and Henschen, 1975) wurde die N-terminale Aminosäure mit Phenylisothiocyanat umgesetzt. Durch schwach saure Bedingungen wurde die N-terminale Aminosäure abgespalten, die sich schließlich in eine Phenylthiohydantoin-Aminosäure umlagerte. Nach einer HPLC-Auftrennung wurde die Aminosäure durch Vergleich mit einem getrennten Standard-Aminosäuregemisch identifiziert. Die Sequenzierung wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Mann und Reinhard Mentele am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

### 4.3.5 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) erlaubt mit einer sehr hohen Genauigkeit die Bestimmung von Proteinmassen. Ermittelt wird die Ionenmasse in der Gasphase, eigentlich das Verhältnis von Masse zu Ladung. Analytische Ionen können aus der Lösung oder als Feststoff in die Gasphase überführt werden, wie zum Beispiel bei der Elektrospray-MALDI (*matrix assisted laser desorption ionisation*). Dabei werden die Moleküle, die ionisiert werden, nicht zerstört. Die Ermittlung des Molekulargewichts von gereinigtem Protein wurde freundlicherweise von Frau Elisabeth Weyher am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

### 4.3.6 Circular Dichroismus

Eine der wichtigsten Methoden zur Konformationsanalyse von Polypeptiden ist der Circular Dichroismus (CD). Sofern sich in der Nachbarschaft eines Chromophors Asymmetriezentren befinden, wird links- und rechts circular polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbiert. Der Carbonyl-Chromophor der Peptidbindung befindet sich in asymmetrischer Umgebung. Daher werden im UV zwei CD-aktive Elektronenübergänge, ein schwacher  $n\pi^*$ -Übergang und ein starker  $\pi\pi^*$ -Übergang beobachtet. Die Wechselwirkung des eingestrahnten circular polarisierten Lichts mit den Elektronen der Peptidcarbonyl-Gruppe hängt von der Lage der Carbonyl-Gruppe und damit der Konformation ab. Rechtsgängig  $\alpha$ -helikale Polyaminosäuren liefern CD-Spektren mit negativen Banden bei  $\lambda = 223$  nm ( $n\pi^*$ -Übergang) und  $\lambda = 207$  nm und einer positiven Bande bei  $\lambda = 193$  nm. Die beiden kürzerwelligen CD-Banden gehören zum Carbonyl- $\pi\pi^*$ -Übergang, welcher infolge der Helix in zwei Komponenten aufspaltet. Polypeptide, die bei  $\lambda = 215 - 220$  nm ein Minimum ( $n\pi^*$ -Übergang) und bei  $\lambda = 195$  nm ein Maximum besitzen ( $\pi\pi^*$ -Übergang), haben dagegen eine antiparallele  $\beta$ -Faltblatt-Konformation. Auch die ungeordnete Konformation eines Peptids spiegelt sich in einem charakteristischen CD-Spektrum wider. Die Auswertung des CD-Spektrums eines Proteins erfolgt durch Vergleich mit Standards bekannter Strukturen. Die Konformationsanteile können prozentual berechnet werden. Für eine CD-Messung wurden  $200 \mu\text{l}$  Protein mit einer Konzentration von  $150 \mu\text{g}/\text{ml}$  eingesetzt.

### 4.3.7 Analytische Ultrazentrifugation

Zur Bestimmung der Masse und des Oligomerisierungsverhaltens der  $\beta$ -APP-Konstrukte wurde die Methode der Ultrazentrifugation angewendet. Dabei kann unterschieden werden zwischen dem Sedimentationslauf, der eine apparente Masse in Abhängigkeit vom hydrodynamischen Radius bestimmt, und dem Gleichgewichtslauf, der eine Massenbestimmung absolut unabhängig vom hydrodynamischen Radius möglich macht. Die Zentrifugationen wurden bei  $4^\circ\text{C}$  über etwa 72 h (bis zur Einstellung des Gleichgewichts) bei einer Geschwindigkeit von 13000 rpm durchgeführt. Für die Auswertung wurde das Programm Origin single (Origin v 3.78) der Software XLA-Data Analysis (Beckman) verwendet. Diese Arbeiten wurden freundlicherweise von Frau Valerie Grimminger von der Technischen Universität München durchgeführt.

### 4.3.8 Antikörper-Färbung

Die Proteinproben wurden auf einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und nach den Angaben in Abschnitt 4.3.3 geblottet, jedoch nicht gefärbt. Vor der Reaktion mit Antikörpern mussten unspezifische Proteinbindungsstellen der Blotmembran mit einem Blocker abgesättigt werden. Dies wurde durch eine 1-16 stündige Inkubation in TBS-Puffer mit 5 % Magermilchpulver erreicht.

Anschließend wurde die Magermilchlösung verworfen und die Membran dreimal je 5 min mit 20 ml reinem TBS-Puffer gewaschen. Es folgte eine Inkubation über 1 h in einer frisch angesetzten Lösung aus 20 ml TBS-Puffer +  $7 \mu\text{l}$  des primären Antikörpers (Anti-His). Dabei kam es zur Bindung des Anti-His-Antikörpers an den His-tag des klonierten Proteinfragments. Um nicht oder nur unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen folgten wieder drei Waschschriffe von je 5 min mit 20 ml reinem TBS-Puffer. Nachfolgend wurde die Membran eine Stunde in 20 ml TBS-Puffer +  $2 \mu\text{l}$  des sekundären Antikörpers (Anti-Maus) inkubiert. Dabei kam es zur Bindung des Anti-Maus-Antikörpers an den schon an das Protein gebundenen Anti-His-Antikörper. Nicht oder nur unspezifisch gebundene Antikörper wurden wiederum mit drei Waschschriffen entfernt.

Da der zweite Antikörper eine kovalent gebundene Alkaline Phosphatase trägt, die die Färbung von INT/BCIP katalysiert, ließ sich somit die Existenz bzw. Lage des Proteinfragments mit

His-tag sichtbar machen. Dazu wurde die Membran in eine frisch angesetzte Lösung aus 10 ml AP-Puffer + 200  $\mu$ l INT/BCIP überführt und gewartet, bis die entsprechenden Banden angefärbt wurden. Eine Abstopfung der Reaktion erfolgte durch Abkippen der Färbelösung und Waschen der Membran in Wasser.

### 4.3.9 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Absorption

Sowohl die Peptidbindungen als auch die Seitenketten von Aminosäuren sind für die Absorption eines Proteins verantwortlich. Dabei absorbieren die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin vor allem im Bereich zwischen 230 und 300 nm. Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurden UV-VIS-Spektren im Wellenlängenbereich von 240 bis 320 nm aufgenommen. Die Proteinkonzentration konnte dann mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt werden.

Lambert-Beer'sches Gesetz:  $A = \varepsilon \cdot c \cdot d = \varepsilon/M \cdot c_M \cdot d$

- A: Absorption bei 280 nm
- $\varepsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient  $\varepsilon_{280 \text{ nm}} [\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}]$
- c: Proteinkonzentration [M]
- d: Schichtdicke der Küvette [cm]
- M: Molekulargewicht [g/mol]
- $c_M$ : Proteinkonzentration [g/l]
- $\varepsilon/M$ :  $A_{280 \text{ nm}; 0,1 \% ; 1 \text{ cm}}$

Die Extinktionskoeffizienten für die in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden mittels des „Expassy Tools“ (<http://www.expassy.ch/tools>) bestimmt.

## 4.4 Kristallisation

Voraussetzung für die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen mittels Röntgenstrukturanalyse sind hochgeordnete Einkristalle ausreichender Größe. Bis heute ist es allerdings nicht möglich, geeignete Bedingungen für die Kristallisation eines Proteins vorherzusagen. Die Züchtung von Proteinkristallen ist daher ein empirischer und extrem zeitintensiver Vorgang. Die am häufigsten verwendeten Methoden zur Kristallisation beruhen auf dem langsamen Entzug von Lösungsmittel aus einer Proteinlösung, wodurch sich die Konzentration des zugesetzten Fällungsmittels erhöht (vgl. Abb. 4.1). Wird die Löslichkeitsgrenze überschritten, können sich in der übersättigten Lösung Kristallkeime bilden. Durch das Wachsen der Kristalle sinkt die Proteinkonzentration, und das System geht im Idealfall in die metastabile Phase über.

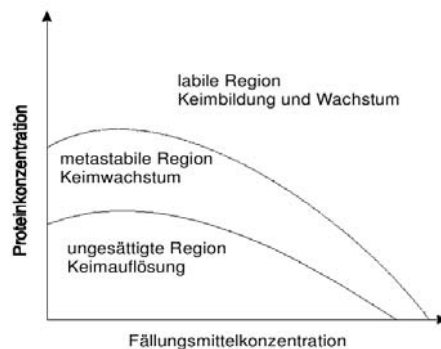


Abbildung 4.1: Phasendiagramm der Kristallisation (McPherson, 1990)

In dieser Phase werden keine weiteren Kristallisationskeime gebildet, das Kristallwachstum schreitet jedoch fort. Die Bildung von Kristallen wird durch eine Vielzahl von Parametern beeinflusst wie der Protein-, Fällungsmittel- und Salzkonzentration, den verwendeten Puffersubstanzen, dem pH-Wert und der Temperatur (Gilliland and Ladner, 1996). Eine systematische Variation aller Parameter ist aufgrund des dazu notwendigen Zeit- und Materialaufwandes kaum möglich. Daher wird bei der Suche nach initialen Kristallisationsbedingungen in Reihenexperimenten (sog. *screenings*) der vieldimensionale Parameterraum punktuell abgetastet (Carter and Carter, 1979; Cudney et al., 1994). Häufig wird dabei ein *screening* verwendet, das auf der statistischen Analyse erfolgreicher Kristallisationsbedingungen basiert (Jancarik and Kim, 1991). In der Zwischenzeit sind von zahlreichen Herstellern eine ganze Reihe solcher *screenings* kommerziell erhältlich. Als Fällungsmittel dienen dabei Salze, organische Lösungsmittel oder auch lösliche Polymere wie Polyethylenglycol (PEG). Proteinkristalle aus den initial erhaltenen Bedingungen können durch eine feinere Variation der Parameter optimiert werden. Zusätzlich kann die Kristallisation durch Einführung gezielter Mutationen an der Proteinoberfläche beeinflusst werden.

### 4.4.1 Kristallisation mittels Dampfdiffusion

In dieser Arbeit wurde für die Proteinkristallisation die Sitztropfenmethode (*sitting drop*) verwendet, dabei handelt es sich um eine Variante der Gasphasenmethode (McPherson, 1990). Die Proteinlösung wird in diesem Fall mit Kristallisationspuffer in einem Tropfen gemischt und über der Reservoirlösung auf ein Plateau gesetzt (vgl. Abb. 4.2). Durch Abkleben mit transparentem Klebeband entsteht ein geschlossenes System, wobei die Konzentration an Fällungsmittel und Salzen im Tropfen geringer ist als im Reservoir. Über Dampf-Diffusion wird dem Tropfen Wasser entzogen und so die Konzentration von Fällungsmittel, Salzen und Protein langsam, bis zur Übersättigung erhöht. Ist die übersättigte Phase erreicht, können sich Kristalle bilden. Bei der Suche von initialen Kristallisationsbedingungen wurden zum Teil per Hand 24-*well*-Platten oder mit einem Cartesian-Roboter 96-*well*-Platten pipettiert. Dazu wurden 300 bzw. 100  $\mu\text{l}$  (24-*well* bzw. 96-*well* Platten) Reservoirpuffer vorgegeben und ein Tropfen mit je 1 bzw. 0.2  $\mu\text{l}$  Proteinlösung auf das Plateau gesetzt und mit der gleichen Menge Reservoirpuffer vermischt. Die fertigen Kristallisationsansätze wurden bei konstant 20 °C bzw. 4 °C aufbewahrt und in regelmäßigen Abständen mit einem Lichtmikroskop auf Kristalle untersucht.

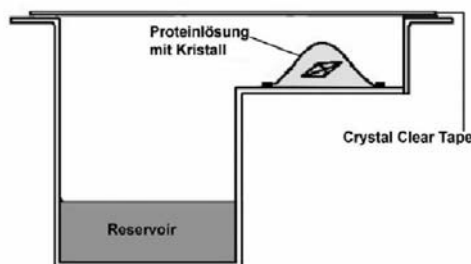


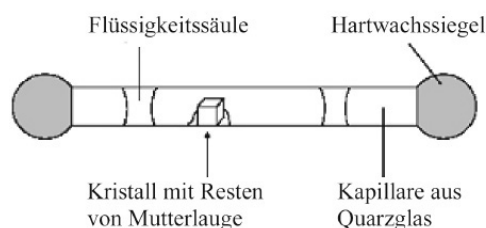
Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Sitztropfen-Methode

### 4.4.2 Kristallmontage

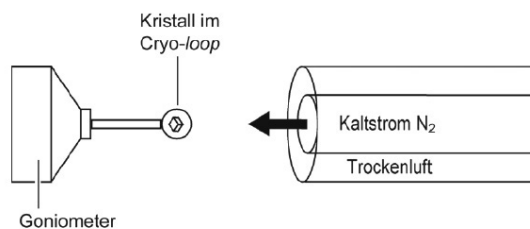
Für röntgenkristallographische Untersuchungen müssen die Proteinkristalle aus der Mutterlauge entfernt werden. Da die Kristalle aber einen hohen Solvensgehalt besitzen, müssen sie während der Messung vor dem Austrocknen geschützt werden. Für Messungen bei Raumtemperatur geschieht das durch Montage in einer silikonisierten Kapillare aus Quarzglas (Durchmesser 0.5 - 0.7 mm).

Dafür wurde der Kristall in die Kapillare gesaugt, zusätzlich etwas Mutterlauge eingefüllt, der Kristall mittels Filterpapier oder einer dünneren Kapillare trocken gelegt und die Kapillare mit Hartwachs verschlossen (vgl. Abb. 4.3).

Für lange Messreihen bzw. Messreihen mit hoher Intensität des Röntgenstrahls (z.B. am Synchrotron) war diese Methode nicht geeignet, da sie keinen Schutz vor Strahlenschäden bietet. Durch Absenkung der Temperatur auf 100 K konnten die Strahlenschäden minimiert werden (Rodgers, 1994). Dafür wurden die Kristalle in einer vorgefertigten Nylonschleife (*cryo-loop*) montiert und im kalten Stickstoffgasstrom gefroren (vgl. Abb. 4.4). Der Durchmesser der verwendeten Nylonschleifen (Durchmesser 0.1 - 1.0 mm) wurde dabei etwas größer als die größte Kristalldimension gewählt. Zur Vermeidung von Eiskristallen, die störende Reflexe hervorrufen und den Proteinkristall beschädigen können, wurden dem Puffer Kryoprotektanzien zugesetzt.



**Abbildung 4.3:** Kristallmontage in Kapillare, zur Messung bei Raumtemperatur.



**Abbildung 4.4:** Kristallmontage in einer Nylonschleife zur Messung bei 100K. Zur Vermeidung von Eisbildung ist der Stickstoffstrom von einem Trockenluftstrom umgeben.

## 4.5 Röntgenkristallographische Methoden

### 4.5.1 Kristallgitter und Kristallsymmetrie

Ein Kristall ist ein regelmäßiger, sich aus periodisch wiederholenden Einheiten (Elementarzellen) aufbauender dreidimensionaler Körper. Die Elementarzelle wird durch die drei sie aufspannenden Einheitsvektoren  $a$ ,  $b$ ,  $c$  mit den Achsenlängen  $a$ ,  $b$ ,  $c$  sowie deren eingeschlossene Winkel  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  beschrieben. Anhand der Beziehungen zwischen Achsenlängen und Winkeln der Elementarzelle sowie der Symmetrien lassen sich sieben Kristallsysteme unterscheiden: triklin, monoklin, orthorhombisch, tetragonal, trigonal, hexagonal und kubisch. Durch Kombination der Kristallsysteme mit den drei möglichen Kristallpackungen (primitiv, innen- und flächenzentriert) erhält man die 14 Bravaisgitter. Die Moleküle stehen durch Symmetrie-Elemente wie Inversionszentren, Drehachsen, Spiegelebenen, Schraubenachsen und Gleitspiegelebenen zueinander in Beziehung. Die Symmetrie-Elemente werden durch Symmetrie-Operationen beschrieben und deren Anwendung auf eine asymmetrische Einheit erzeugt die Elementarzelle. Für die Röntgenstrukturanalyse

ergibt sich daraus, dass es ausreichend ist, die atomare Anordnung in der asymmetrischen Einheit zu bestimmen. Die drei Symmetrieoperationen Inversion, Drehung und Spiegelung enthalten im Gegensatz zur Schraubenachse und Gleitspiegelung keine Translationskomponente. Durch Kombination dieser sogenannten Punktsymmetrien werden die 32 Punktgruppen gebildet, die mögliche Symmetrien von Molekülen beschreiben. Aus der Kombination der Punktgruppen und der Translationssymmetrie eines Kristalls ergeben sich die 230 kristallographischen Raumgruppen (International Tables for Crystallography, 1996). Aufgrund der Chiralität der Aminosäuren treten bei Proteinkristallen jedoch keine Inversionszentren und Spiegelebenen auf. Daher gibt es für Biomakromoleküle lediglich elf Punktgruppen und 65 kristallographische Raumgruppen (Drenth, 1999), die sogenannten Bio-Raumgruppen.

#### 4.5.2 Bestimmung der Molekülanzahl in der asymmetrischen Einheit

Die Packungsdichte von Proteinkristallen bewegt sich innerhalb eines begrenzten Bereichs. Daher kann in vielen Fällen die Anzahl  $z$  der Proteinmoleküle in der asymmetrischen Einheit ohne Kenntnis der Kristallstruktur bestimmt werden. Aus den Parametern der Elementarzelle wird dazu der von Matthews (1968) eingeführte Packungsparameter  $V_M$  für verschiedene Werte  $z$  berechnet (vgl. Gleichung 4.5.1). Durch Vergleich mit einer Statistik bekannter Proteinkristallstrukturen kann  $z$  relativ gut bestimmt werden. Im allgemeinen wird für cytosolische Proteine ein Packungsparameter von 1.7 bis  $3.5 \text{ \AA}^3/\text{Da}$  erwartet, meist liegt er um  $2.4 \text{ \AA}^3/\text{Da}$  (Kantardjieff and Rupp, 2003) mit einem Solvensgehalt von ca. 50 %.

$$V_M = \frac{V_{EZ}}{M_r \cdot z \cdot n} \quad (4.5.1)$$

- $V_M$ : Packungsparameter
- $V_{EZ}$ : Volumen der Elementarzelle
- $M_r$ : Molekulargewicht [Da]
- $n$ : Zahl der asymmetrischen Einheiten pro Elementarzelle
- $z$ : Zahl der Moleküle pro asymmetrische Einheit

#### 4.5.3 Röntgenstrahlung

Als Röntgenstrahlung werden elektromagnetische Wellen der Wellenlänge 10 bis  $0.1 \text{ \AA}$  (1-120 keV) bezeichnet. Für die Röntgenstrukturanalyse von Proteinen wird eine geeignete monochromatische Röntgenstrahlung von etwa  $1 \text{ \AA}$  Wellenlänge benötigt. Diese Strahlung läßt sich auf verschiedene Arten erzeugen. Im Labor werden Drehanoden-Röntgeneratoren verwendet. Hierbei werden Elektronen aus einem Glühdraht (Filament) emittiert und treffen, nachdem sie durch ein elektrisches Feld von 45 kV beschleunigt wurden, auf eine Kupferanode. Die Anode muß ausreichend gekühlt werden, da der überwiegende Anteil der Strahlung durch strahlungslose Absorption verloren geht. Mit Hilfe von Nickel-Filtern oder Graphitkristallen wird aus der emittierten Röntgenstrahlung monochromatische  $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung mit einer Wellenlänge von  $1.5418 \text{ \AA}$  erhalten. Diese Strahlung wird über einen Kollimator direkt auf den zu untersuchenden Proteinkristall gelenkt.

In dieser Arbeit wurde eine Kupfer-Drehanode der Firma Rigaku verwendet. Bei dieser Anode wird die  $\text{CuK}\alpha$ -Linie mit einem Graphit-Monochromator selektiert. Der Röntgengenerator wurde mit einer Spannung von 50 kV und einer Stromstärke von 100 mA betrieben. Da diese Röntgenstrahlung jedoch nicht ausreicht, um qualitativ hochwertige und hochaufgelöste Datensätze zu erzeugen, wird zunehmend Synchrotronstrahlung, die in Teilchenbeschleunigern zur Verfügung steht, verwendet. Dort werden Elektronen oder Positronen im Hochvakuum auf einer Kreisbahn



auf relativistische Geschwindigkeiten (1-6 GeV) beschleunigt, wobei tangential Synchrotronstrahlung freigesetzt wird. Die Ablenkung der Elektronen erfolgt dabei durch starke Magneten. Bei jeder Richtungsänderung im Magnetfeld entsteht Strahlung im Wellenlängenbereich von harter Röntgenstrahlung (0.01 nm) bis zu sichtbarem Licht (600 nm). Die gewünschte Wellenlänge kann durch Einkristallreflektion sehr genau eingestellt werden. Diese Variabilität der Wellenlänge ist eine Voraussetzung für die hier angewendete Phasenbestimmung nach der Methode der multiplen anomalen Dispersion (MAD). Die Synchrotron-Messungen wurden an den Meßstationen (*beamlines*) BW6 am DESY in Hamburg und Id14 am ESRF in Grenoble durchgeführt.

#### 4.5.4 Theorie der Röntgenstreuung

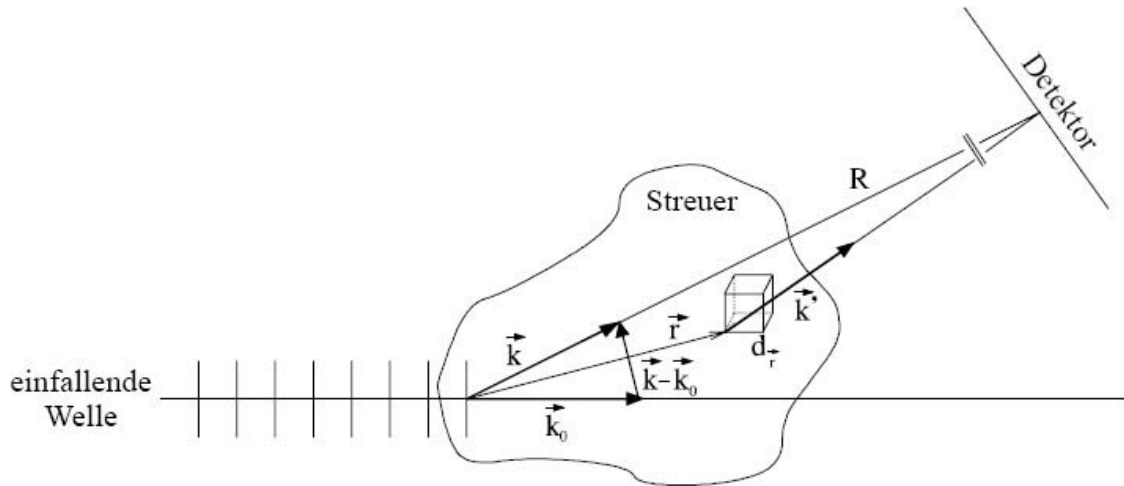
Die Röntgenstrukturanalyse beruht auf der Streuung von Röntgenstrahlung an Materie. Die Elektronen des Streuers werden dabei durch die elektrische Komponente des elektromagnetischen Wechselfeldes der Welle in Schwingung versetzt. Die angeregten Elektronen stellen selbst oszillierende Dipole dar, die ihrerseits eine Sekundärstrahlung emittieren, welche die gleiche Wellenlänge und eine definierte Phasenbeziehung zu der Primärstrahlung besitzt. Diese elastische Streuung wird als kohärente oder Thomsonstreuung bezeichnet. Das Auftreten von inkohärenter Streustrahlung mit verminderter Frequenz (Compton Streuung) wird bei der Röntgenstrukturanalyse vernachlässigt. Bei der Röntgenstrukturanalyse liegt die Wellenlänge der verwendeten Strahlung in der Größenordnung der Bindungsabstände der Atome im Protein und die Streuer sind periodisch angeordnet, daher kommt es zu Interferenzerscheinungen der kohärenten Sekundärstrahlung. Das Interferenzbild (Reflexmuster) hängt dabei von der Elektronendichteverteilung der streuenden Materie im Kristall ab. Die Symmetrie des Reflexmusters wird durch die Symmetrie des Kristallgitters bestimmt, während die Intensität der Reflexe von der Elektronendichteverteilung innerhalb der asymmetrischen Einheit abhängt. Ein Modell zur Veranschaulichung des Streuvorgangs, bei dem die Röntgenstrahlung als ebene Welle betrachtet wird, ist in Abbildung 4.5 dargestellt. Besitzt die einfallende Primärstrahlung den Richtungsvektor  $k_0$  und die gestreute Welle den Richtungsvektor  $\vec{k}$  mit dem gleichen Betrag  $2\frac{\pi}{\lambda}$ , so ergibt sich die Streuamplitude  $E$  am Ort  $\vec{R}$ , nach Gleichung 4.5.2, durch Integration über alle Volumenelemente im streuenden Materiepartikel mit der Elektronendichte  $\rho_{el}(\vec{r})$ .

$$E = const \cdot e^{i(\omega \cdot t - \vec{k} \cdot \vec{R})} \int_{Vol} \rho_{el}(\vec{r}) \cdot e^{i(k - k_0)r} dr \quad (4.5.2)$$

$\omega = 2\frac{\pi c}{\lambda}$  : Kreisfrequenz  $\omega$  und Wellenlänge  $\lambda$  der Röntgenstrahlung  
 t: Zeit  
 $\vec{k}_0$ : Wellenvektor des einfallenden Strahls mit  $|k_0| = 2\frac{\pi}{\lambda}$   
 $\vec{k}$ : Wellenvektor des gestreuten Strahls mit  $|k| = 2\frac{\pi}{\lambda}$   
 $\rho_{el}(\vec{r})$ : Elektronendichte am Ort  $r$

Die Terme vor dem Integral enthalten physikalische Informationen über die Ausbreitung der ebenen Welle. Das Integral enthält Informationen über die Verteilung der Elektronendichte im streuenden Volumenelement und wird daher als Strukturfaktor  $F$  bezeichnet. Durch die Einführung des Streuvektors  $s$  mit  $2\pi$  ergibt sich  $s = k - k_0$ . Dadurch kann der Strukturfaktor zu folgender Form vereinfacht werden:

$$F(\vec{s}) = \int_{Vol} \rho_{el}(\vec{r}) \cdot e^{2\pi i s r} dr \quad (4.5.3)$$



**Abbildung 4.5:** Schematische Darstellung der Röntgenstreuung an Materie. Der einfallende Strahl wird dabei als ebene Welle betrachtet, die in Richtung des Detektors gestreut wird.

In Gleichung 4.5.3 wird die ortsabhängige Elektronendichte  $\rho_{el}(r)$  aus dem realen Raum in den reziproken Raum, der vom Streuvektor  $s$  abhängigen komplexen Strukturformfaktoren  $F(\vec{s})$ , überführt. Mathematisch gesehen stellt dieses Integral eine Fourieranalyse dar. Bei der Röntgenstreuung an Kristallen kommt es nur dann zu positiven Interferenzen, wenn die Phasenverschiebung zwischen gestreuten Sekundärwellen ein Vielfaches von  $2\pi$  ist. Daraus resultieren die Laue-Bedingungen:

$$\vec{a} \cdot s = h\vec{b} \cdot s = kh, k, l = \dots, -2, -1, 0, 1, 2, \dots \vec{c} \cdot s = l \quad (4.5.4)$$

Die ganzen Zahlen  $h$ ,  $k$  und  $l$  werden als Millersche Indizes bezeichnet. Anschaulich betrachtet beschreiben sie Netzebenen im realen Raum (siehe unten). Durch die Darstellung des Ortsvektors  $r$  in fraktionellen Koordinaten des realen Raums und Berücksichtigung der Laue-Bedingungen wird Gleichung 4.5.3 in folgende Form überführt:

$$F(hkl) = V_{EZ} \int_{x=0}^1 \int_{y=0}^1 \int_{z=0}^1 \rho_{el}(x, y, z) \cdot e^{2\pi i(hx+ky+lz)} dx dy dz \quad (4.5.5)$$

Eine anschauliche, wenn auch physikalisch stark vereinfachende Erklärung der Streuung von Röntgenstrahlen an einem Kristall liefert das Braggsche Gesetz (Bragg and Bragg, 1913).

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin\Theta_{hkl} \quad (4.5.6)$$

- $n$ : 1,2,3,...
- $\lambda$ : Wellenlänge [ $\text{\AA}$ ]
- $d_{hkl}$ : Netzebenenabstand
- $\Theta_{hkl}$ : Glanzwinkel des Reflexes  $hkl$  [ $^\circ$ ]

Das Braggsche Gesetz behandelt den Streuvorgang als Reflexion der unter dem Glanzwinkel  $\Theta_{hkl}$  einfallenden monochromatischen Röntgenstrahlen an den sogenannten parallelen Netzebenen. Diese verlaufen durch die Gitterpunkte des Kristallgitters und werden durch die Millerschen Indices  $hkl$  beschrieben. Eine positive Interferenz der an unterschiedlichen Ebenen mit Abstand  $d_{hkl}$  gestreuten Röntgenstrahlung tritt dann auf, wenn der Gangunterschied ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ist. In Abbildung 4.6 wird das Braggsche Gesetz graphisch veranschaulicht.

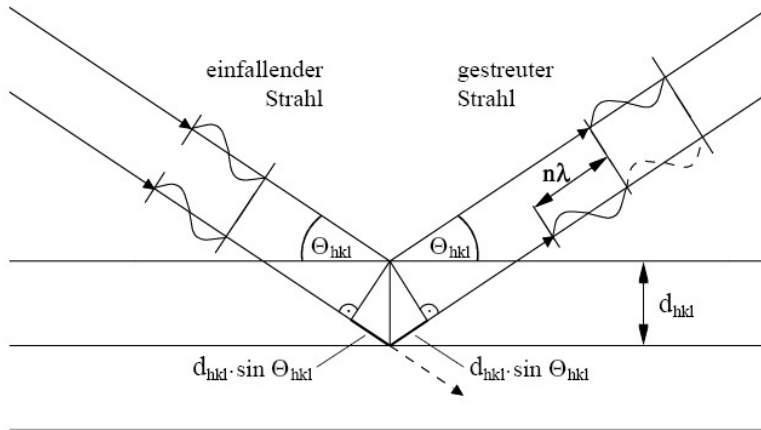


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung der Röntgenstreuung gemäß dem Bragg'schen Gesetz.

#### 4.5.5 Reziprokes Gitter und Ewaldkonstruktion

Die Millerschen Indizes  $hkl$  beschreiben Scharen von parallelen Netzebenen im realen Raum. Durch die Streuung von Röntgenstrahlen an einer Netzebenenschar entsteht im Fall positiver Interferenz ein Reflex mit dem Streuvektor  $s$ , dessen Länge dem reziproken Ebenenabstand  $\frac{1}{d_{hkl}}$  entspricht und der senkrecht zu den streuenden Ebenen steht. Jeder Streuvektor  $s$  erzeugt einen Punkt  $P(hkl)$  im sogenannten reziproken Raum. Die für  $\vec{s}$  erlaubten diskreten Werte definieren dabei das reziproke Gitter mit den Basisvektoren  $\vec{a}$ ,  $\vec{b}$  und  $\vec{c}$ :

$$s = h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^* \quad (4.5.7)$$

Unter Berücksichtigung der Laue-Bedingungen (vgl. Gleichung 4.5.4) ergibt sich nach Gleichung 4.5.8 eine definierte räumliche Beziehung zwischen realem und reziprokem Raum. Dabei sind die Dimensionen des reziproken Raums umgekehrt proportional zu den Dimensionen des realen Raums. Die Basisvektoren des reziproken Gitters  $\vec{a}^*$ ,  $\vec{b}^*$  und  $\vec{c}^*$  stehen senkrecht zu den Basisvektoren  $\vec{a}$ ,  $\vec{b}$  und  $\vec{c}$  des realen Raums, wobei im Fall rechtwinkliger Elementarzellen die Vektoren beider Systeme kollinear sind.

$$\vec{a} = \frac{(\vec{b}^* \times \vec{c}^*)}{V_{EZ}} \quad \vec{b} = \frac{(\vec{c}^* \times \vec{a}^*)}{V_{EZ}} \quad \vec{c} = \frac{(\vec{a}^* \times \vec{b}^*)}{V_{EZ}} \quad (4.5.8)$$

Die Ewaldkonstruktion (Ewald, 1921) stellt eine graphische Darstellung der Bragg'schen Gleichung im dreidimensionalen Raum dar und verdeutlicht den Zusammenhang zwischen realem Gitter, reziprokem Gitter und dem Auftreten von Röntgenreflexen (vgl. Abbildung 4.7). In der Ewald-Konstruktion wird der streuende Kristall in den Mittelpunkt der sogenannten Ewaldkugel mit dem Radius  $\frac{1}{\lambda}$  gelegt. Der Ursprung 0 des reziproken Gitters liegt im Austrittspunkt des Primärstrahls aus der Ewaldkugel. Ein Reflex wird nur dann beobachtet, wenn der Streuvektor  $s$  des reziproken Gitterpunktes  $P(hkl)$  mit der Ewaldkugel zusammenfällt und  $F(hkl) \neq 0$  ist. Eine Drehung des Kristalls im Röntgenstrahl bedingt auch eine Drehung des reziproken Gitters, wodurch nach und nach alle reziproken Gitterpunkte  $P(hkl)$  in den Schnittpunkt mit der Ewaldkugel gebracht werden. Unter Vernachlässigung der anomalen Röntgenstreuung besitzt das reziproke Gitter in Bezug auf die Reflexintensitäten im Gegensatz zum realen Kristallgitter ein zusätzliches Inversionszentrum. Diese Eigenschaft wird durch das Friedelsche Gesetz beschrieben:

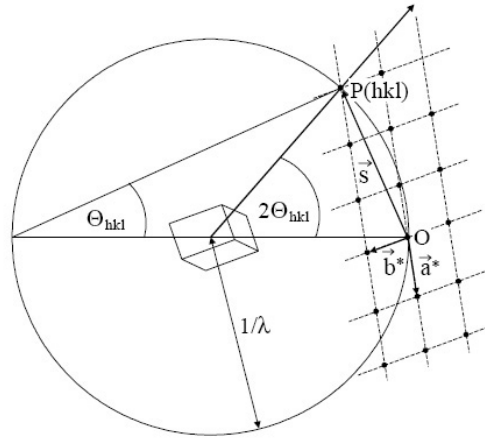


Abbildung 4.7: Darstellung der Ewald-Konstruktion zur Verbindung von realem und reziprokem Raum.

$$|F(hkl)|^2 = |F(\bar{h}\bar{k}\bar{l})|^2 \quad (4.5.9)$$

Die Intensität des Reflexes  $hkl$  ist identisch mit der Intensität des invertierten Reflexes  $\bar{h}\bar{k}\bar{l}$ . Daher muß bei der Messung der Reflexintensitäten nur die Hälfte des reziproken Raums erfasst werden. Durch Symmetrien des Kristallgitters wird das bei der Messung zu erfassende Volumen des reziproken Raums zusätzlich verkleinert. Das Friedelsche Gesetz gilt jedoch nicht bei anomaler Diffraktion. Mit Hilfe von anomaler Streuung kann unter Ausnutzung der Intensitätsdifferenzen der einzelnen Friedel-Paare das Phasenproblem gelöst werden.

#### 4.5.6 Temperaturfaktoren

Der in Gleichung 4.5.5 definierte Strukturfaktor  $F(hkl)$  kann auch durch die Summe der Beiträge aller Atome in der Elementarzelle ausgedrückt werden:

$$F(hkl) = \sum_j^{n_{Atom}} f_j^0(s) \cdot e^{-\frac{1}{4}Bs^2} \cdot e^{2\pi i \cdot \vec{s} \cdot \vec{r}_j} \quad (4.5.10)$$

$f_j^0(s)$ : Streufaktor für punktförmiges Atom  $j$

$B$ : isotroper Temperaturfaktor (B-Faktor)

Die thermischen Bewegungen der Atome und die statistischen Fehlordnungen im Kristall führen zu einer auflösungsabhängigen Veränderung der Intensitäten (Debye, 1914), die durch einen Korrekturterm berücksichtigt werden. Dieser wird zusammengefasst im isotropen Temperaturfaktor  $B$ , der auch als isotroper Versetzungsfaktor bezeichnet wird und proportional zum mittleren Verschiebungsquadrat  $\langle u^2 \rangle$  der Atome in einer Koordinate ist:

$$B = 8\pi^2 \langle u^2 \rangle \quad (4.5.11)$$

Ein mittlerer B-Faktor von  $30 \text{ \AA}^2$  entspricht einem mittleren Verschiebungsquadrat von  $0,62 \text{ \AA}$ . Nach Wilson (1949) läßt sich der mittlere Temperaturfaktor aus den gemessenen Intensitäten abschätzen:

$$\ln \frac{\langle I(s) \rangle}{\sum_j (f_j^0)^2} = \ln C - 2 \cdot B \frac{\sin^2 \Theta}{\lambda^2} \quad (4.5.12)$$

Wird der natürliche Logarithmus des Quotienten aus der gemessenen mittleren Intensität  $\langle I(\vec{s}) \rangle$  und die unter Vernachlässigung thermischer Bewegung berechnete mittlere Intensität  $\sum_j (f_j^0)^2$  gegen  $\frac{\sin^2 \Theta}{\lambda^2}$  aufgetragen, so lassen sich der Skalierungsfaktor C aus dem y-Achsenabschnitt und der mittlere Temperaturfaktor B aus der Steigung der Geraden ermitteln.

#### 4.5.7 Fouriertransformation und Phasenproblem

Der Strukturfaktor  $F(hkl)$  ist in Gleichung 4.5.5 als Funktion der ortsabhängigen Elektronendichte  $\rho_{el}(\vec{r})$  dargestellt. Mathematisch betrachtet handelt es sich bei der Röntgenstreuung an Kristallen um eine Fouriertransformation der Elektronendichte in den reziproken Raum (Fourieranalyse). Umgekehrt läßt sich die Elektronendichte am Ort xyz durch die entsprechende Rücktransformation (Fouriersynthese) der komplexen Strukturfaktoren berechnen. Dabei kann das Integral durch eine Summation ersetzt werden, da die Strukturfaktorfunktion gemäß den Laue-Bedingungen (vgl. Gleichung 4.5.4) nur für diskrete Reflexe ungleich Null ist:

$$\rho_{el}(x, y, z) = \frac{1}{V_{EZ}} \sum_h \sum_k \sum_l F(hkl) \cdot e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} \quad (4.5.13)$$

Der Strukturfaktor  $F(hkl)$  eines Reflexes hkl ist eine komplexe Zahl, die durch Amplitude und Phase beschrieben werden kann:

$$F(hkl) = |F(hkl)| \cdot e^{i\varphi_{hkl}} \quad (4.5.14)$$

$|F(hkl)|$ : Strukturfaktoramplitude  
 $\varphi_{hkl}$ : Strukturfaktorphase

Die Strukturfaktoramplituden  $|F(hkl)|$  sind durch Messung der Reflexintensitäten  $I(hkl)$  experimentell zugänglich. Die observierten Intensitäten  $I_{obs}(hkl)$  sind dabei proportional zum Produkt aus den komplexen Strukturfaktoren  $F(hkl)$  und ihren konjugiert komplexen Strukturfaktoren  $F^*(hkl)$ :

$$I_{obs}(hkl) \sim F(hkl)^2 = F(hkl) \cdot F^*(hkl) \quad (4.5.15)$$

Die Phasen  $\varphi_{hkl}$  der Strukturfaktoren sind dagegen experimentell nicht direkt zugänglich und müssen indirekt bestimmt werden. Dies wird als Phasenproblem der Röntgenstrukturanalyse bezeichnet. Für die Bestimmung der Phasen kommen in der Proteinkristallographie vier Methoden in Betracht: multipler isomorpher Ersatz (MIR), molekularer Ersatz (MR), multiple anomale Dispersion (MAD) und direkte Methoden bei atomarer Auflösung.

#### 4.5.8 Datensammlung

Die möglichst genaue und vollständige Messung der Reflexintensitäten ist für die Röntgenstrukturanalyse von entscheidender Bedeutung, da die Qualität der gemessenen Daten ausschlaggebend für den Gang der Strukturlösung und die erreichbare Genauigkeit des Strukturmodells ist. Für die Messungen wurde in dieser Arbeit sowohl CuK $\alpha$ -Strahlung als auch Synchrotron-Strahlung verwendet. Der Kristall wurde dazu auf einem Goniometerkopf montiert und während der Messung in kleinen Winkelintervallen um eine Achse gedreht (Arndt et al., 1973). Nach jeder Aufnahme wurden die gestreuten und vom Detektor akkumulierten Röntgenquanten zusammengefasst und die gemessenen Intensitätswerte zusammen mit den Daten zur Geometrie

der Messanordnung gespeichert. Zur Detektion der Reflexe wurden zweidimensionale, ortsempfindliche Detektoren, wie *image plates* oder CCD-Detektoren (*charge coupled devices*) verwendet. Abbildung 4.8 zeigt eine schematische Darstellung der entsprechenden Messanordnung.

### Die Image Plate

Die *image plate* besteht aus einer Trägerplatte, die mit einer röntgensensitiven Beschichtung aus  $\text{Eu}^{3+}$ -dotiertem  $\text{BaFCl}$  überzogen ist. Bei Absorption von Röntgenquanten werden die  $\text{Eu}^{3+}$ -Ionen (sogenannte Farbzentren) in einen metastabilen Zustand angeregt. Das Auslesen einer *image plate* erfolgt durch Bestrahlung mit rotem Licht eines Helium-Neon-Lasers, wodurch die Farbzentren unter Emission von blauem Licht wieder in den Grundzustand zurückkehren. Die dabei emittierte Strahlung wird von einem Lichtverstärker (Photomultiplier) detektiert. Vor jeder Aufnahme (*image*) müssen eventuell angeregte Farbzentren durch Bestrahlung mit weißem Halogenlicht gelöscht werden.

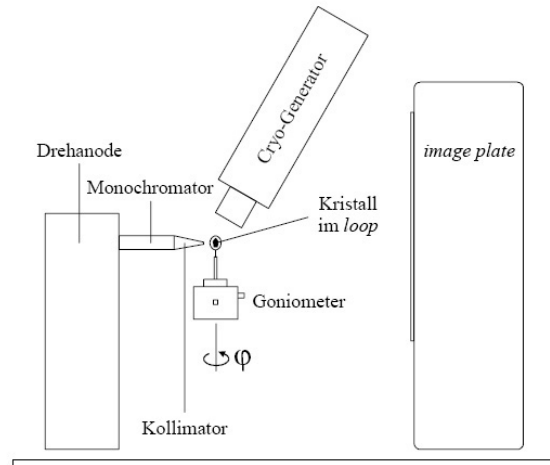
In dieser Arbeit wurde die *image plate* der Hausanlage (MAR300, Marresearch) an einer Kupfer-Drehanode (Rigaku) verwendet. Die Belichtungszeit pro Bild betrug je nach Streukraft der Kristalle 10-30 min. Die Kristalle wurden dabei in Winkelintervallen von  $0.1-1^\circ$  pro Bild um den Winkel  $2\varphi$  gedreht. Die optimalen Datensammlungsparameter wie z. B. Kristall-Detektor-Abstand, Oszillationswinkel und Belichtungszeit wurden mit dem Programmpaket HKL2000 (Otwinowski and Minor, 1997) sowie MOSFLM (Leslie, 1991) bestimmt. Dazu wurden zwei bis drei Aufnahmen bei verschiedenen Winkeln ausgewertet.

### CCD-Detektoren

Die Abkürzung CCD (*charge coupled device*) kann als ladungsgekoppeltes Bauelement übersetzt werden. Dahinter verbirgt sich ein Bildsensor, der in den letzten Jahren sowohl in der Wissenschaft als auch in der Unterhaltungselektronik weite Verbreitung gefunden hat. In der Proteinkristallographie werden CCD-Detektoren vor allem zur Messung mit Synchrotron-Strahlung verwendet. Die einfallende Röntgenstrahlung wird an einer fluoreszierenden Phosphorbeschichtung in sichtbares Licht umgewandelt, das über Glasfaserkabel an einen CCD-Detektor weitergeleitet wird. Die Licht-Photonen treffen dort auf einen dotierten Silizium-Kristall, der proportional zur Photonenzahl elektrische Ladungen in Gestalt frei beweglicher Elektronen erzeugt, indem Valenzelektronen im Leitungsband angeregt werden und dadurch sogenannte Elektronen-Loch-Paare entstehen. Die Mindestenergie für eine solche Anregung beträgt 1.14 eV. Bis zu einer Energie von 5 eV werden einzelne Elektronen-Loch-Paare gebildet. Bei mehr als 5 eV kommt es zu multiplen Paaren. Die in den einzelnen Sensorzellen entstandenen unterschiedlich großen Ladungspakete werden nach der Belichtung durch periodische Potentialänderungen an der Elektrodenstruktur horizontal durch den Siliziumkristall geschoben. Bei jedem Verschiebungsvorgang kommt das jeweils letzte Ladungspaket am Ausgangsfenster an. Dort befindet sich ein Auswerteverstärker, der die enthaltene Ladung erfasst und in eine proportionale Spannung umsetzt, die dann detektiert wird. Vorteile von CCD-Detektoren liegen in einer extrem schnellen Auslesezeit (Sekunden), in einer hohen Detektorauflösung und der Vermeidung von anfälliger Mechanik im Gehäuse des Detektors. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der CCD-Detektor am Synchrotron-Messplatz BW6 in Hamburg sowie an der ID14 des ESRF, Grenoble verwendet.

#### 4.5.9 Prozessierung, Skalierung und Reduktion kristallographischer Daten

Für die Prozessierung der Röntgendaten wurde das Programmpaket HKL2000 (Otwinowski and Minor, 1997) sowie MOSFLM (Leslie, 1991) verwendet. Ziel der Prozessierung und Datenreduk-



**Abbildung 4.8:** Messanordnung an der *image plate*. Der Kristall wird lediglich um die  $\varphi$ -Achse gedreht. Der Cryo-Generator kühlt den Kristall auf 100 K mittels Stickstoffstrom.

tion ist es, jedem Reflex  $hkl$  eine gemittelte Intensität zuzuordnen. Zunächst werden auf den Bildern Reflexe identifiziert, mit denen die Orientierungsmatrix berechnet und die Raumgruppe bestimmt werden kann. Aus starken Reflexen werden mittlere Reflexprofile errechnet, die zur Bestimmung der Intensitäten aller Reflexe dienen. Die gemessenen Rohintensitäten werden dann um Absorption, Lorentzpolarisierung und andere Faktoren korrigiert. Elementarzellenparameter, Kristallorientierung, Messgeometrie und Mosaizität werden im Anschluß mit Hilfe starker Reflexe verfeinert (*postrefinement*). Das Ergebnis der Prozessierung sind die Intensitäten der integrierten Reflexe sowie deren Standardabweichung. Durch die sich während der Messung ändernden experimentellen Bedingungen (schwankende Intensität des Röntgenstrahls, Strahlenschäden am Kristall, Anisotropie des Kristalls etc.) wird eine interne Skalierung der Intensitäten nötig. Dazu werden die Reflexe einer vorgegebenen Anzahl von Bildern mit einem Skalierungsfaktor und einem auflösungsabhängigen Exponentialfaktor versehen, so dass mehrfache Messungen eines Reflexes möglichst geringe Abweichungen von der gemittelten Intensität dieses Reflexes aufweisen. Nach der Skalierung werden die Intensitäten symmetrieäquivalenter Reflexe gemittelt und auf eine asymmetrische Einheit reduziert. Zur Skalierung und Datenreduktion wurde das Programm SCALEPACK aus dem HKL2000 Programmpaket (Otwinowski and Minor, 1997) verwendet. Die verschiedenen MAD-Datensätze, die bei unterschiedlichen Wellenlängen an einem Kristall gemessen wurden, wurden mit SCALEPACK (Otwinowski and Minor, 1997) auf einen Standard skaliert und die erhaltenen Intensitäten mit dem Programm TRUNCATE (CPP4, 1994) in Strukturfaktoramplituden umgerechnet. Als Maß für die Datenqualität werden üblicherweise mehrere statistische Werte in Auflösungsschalen angegeben. So ist der für symmetrieverwandte Reflexintensitäten  $I(hkl)$  definierte  $R_{sym}$  ein Maß für die Übereinstimmung mehrfach gemessener, symmetrisch verwandter und identischer Reflexe:

$$R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl)_i - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl)_i|} \quad (4.5.16)$$

Der häufig verwendete  $R_{sym}$  ist allerdings stark von der gemessenen Anzahl  $n_{hkl}$  symmetrieverwandter Reflexe (sogenannte Multiplizität) abhängig und kann daher durch die Einführung eines im Bezug auf die Redundanz gewichteten  $R_{meas}$  korrigiert werden. Da eine hohe Redundanz die Datenqualität verbessert, ist auch die mittlere Multiplizität ein Maß für die Güte der gemessenen Daten. Weitere wichtige Werte sind die Vollständigkeit der gesammelten Daten sowie das Signal/Rausch-Verhältnis  $\frac{I}{\sigma}(I)$ , das durch den Quotienten aus der mittleren Reflexintensi-

tät I und der zugehörigen Standardabweichung  $\sigma(I)$  beschrieben wird. Für die Skalierung eines Schweratomdatensatzes auf den nativen Datensatz gilt der isomorphe R-Faktor  $R_{iso}$  (vgl. 4.5.17) als Gütekriterium. Durch Fehler im Kristall oder durch Umwandlungen treten im Vergleich zu einem nativen Kristall Änderungen in den Reflexintensitäten auf, die für die Bestimmung initialer Phasen verwendet werden können (Green et al., 1954, Crick & Magdoff, 1956). Hierzu wurde in dieser Arbeit das Programm SCALEIT (CCP4, 1994) verwendet.

$$R_{iso} = \frac{\sum_{hkl} |F_{PH} - F_P|}{\sum_{hkl} |F_P|} \quad (4.5.17)$$

Im allgemeinen besitzen gute Schweratomderivate  $R_{iso}$ -Werte von etwa 10 % bis 30 %. Bei Werten größer als 30 % ist mit Nicht-Isomorphie zwischen derivatisiertem und nativem Kristall zu rechnen. Der auflösungsabhängige Verlauf der in Gleichung 4.5.18 definierten isomorphen Differenzen  $\Delta_{iso}$  gibt einen Hinweis auf die Qualität eines Derivats. Die isomorphen Differenzen sind proportional zu den Strukturfaktoren  $F_P$  und nehmen daher bei isomorphen Derivaten mit zunehmender Auflösung ab, wohingegen der nichtisomorphe Anteil mit steigender Auflösung gleich bleibt oder sogar zunimmt (McRee, 1992).

$$\Delta_{iso} = \langle |F_{PH} - F_P| \rangle \quad (4.5.18)$$

#### 4.5.10 Bestimmung nicht-kristallographischer Symmetrie

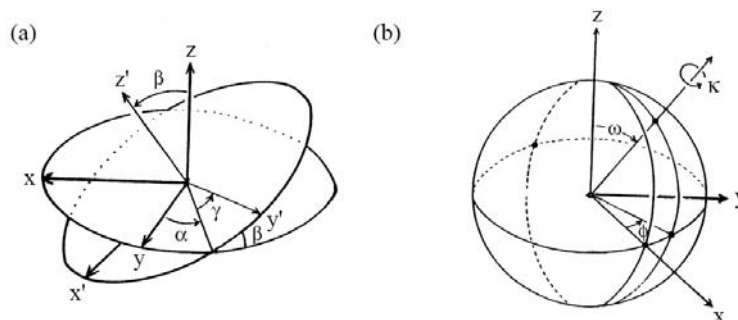
Die asymmetrische Einheit einer Elementarzelle enthält alle Informationen, die für die Strukturlösung nötig sind. Durch Anwendung der kristallographischen Symmetrieeoperationen der zugrunde liegenden Raumgruppe läßt sich aus ihr das Kristallgitter aufbauen. Enthält die asymmetrische Einheit mehrere identische Moleküle, so werden diese durch lokale, nur innerhalb der asymmetrischen Einheit gültige Symmetrieeoperationen ineinander überführt. Diese lokale Symmetrie wird als nichtkristallographische Symmetrie (NCS) bezeichnet. Im Fall von Proteinkristallen handelt es sich dabei um eine geschlossene Punktgruppensymmetrie, bei der die chiralen Moleküle durch eine n-zählige Rotation ineinander überführt werden. Analog zur kristallographischen Symmetrie wird auch die NCS durch einen Rotations-Translations-Operator (sogenannter RT-Operator) beschrieben. Durch den RT-Operator wird der ursprüngliche Koordinatensatz  $(x_0, y_0, z_0)$  in den symmetrieverwandten Koordinatensatz  $(x_1, y_1, z_1)$  überführt:

$$\begin{pmatrix} x_1 \\ y_1 \\ z_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} x_0 \\ y_0 \\ z_0 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} t_x \\ t_y \\ t_z \end{pmatrix} \quad (4.5.19)$$

Entsprechend der Rotationsmatrix bewirkt der RT-Operator eine Drehung der ursprünglichen Koordinaten  $(x_0, y_0, z_0)$  um den kristallographischen Ursprung. Durch die anschließende Translation  $(t_x, t_y, t_z)$  werden diese Koordinaten dann zu den Zielkoordinaten  $(x_1, y_1, z_1)$  verschoben. Je nach Problemstellung werden nicht-kristallographische Symmetrien auch durch Eulerwinkel  $\alpha, \beta$  und  $\gamma$  oder Polarwinkel  $\omega, \varphi$  und  $\kappa$  beschrieben (vgl. Abbildung 4.9). Im Fall der Polarwinkel beschreibt der Winkel  $\omega$  die Verkippung der NCS-Achse von der z-Achse des kartesischen Koordinatensystems in Richtung der x-Achse. Der Winkel  $\varphi$  gibt die Drehung dieser Achse um die z-Achse in Richtung der y-Achse an und der Winkel  $\kappa$  beschreibt schließlich eine Drehung um die so erhaltene Achse.

Der Rotationsanteil R einer NCS läßt sich ohne Phaseninformationen aus den Strukturfaktoramplituden bestimmen. Die Pattersonfunktion einer Struktur besteht aus zwei Klassen von Differenzvektoren: Selbstvektoren zwischen Atomen desselben Moleküls und Kreuzvektoren zwischen





**Abbildung 4.9:** Definition a) der Euler-Winkel  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  sowie b) der Polarwinkel  $\omega$ ,  $\varphi$  und  $\kappa$  zur Beschreibung einer nicht-kristallographischen Symmetrieachse (Drenth, 1999).

Atomen verschiedener Moleküle. Zur Bestimmung des Rotationsanteils sind nur die Selbstvektoren eines Moleküls relevant, wobei diese zum überwiegenden Teil eine geringere Länge als die Kreuzvektoren aufweisen. Im Pattersonraum sind die Anfangswerte der Distanzvektoren im Ursprung positioniert. Die Selbstvektoren, deren relative Anordnung für jede Kopie eines Moleküls bis auf eine Rotationskomponente  $C$  identisch ist, liegen innerhalb einer Kugel, deren Radius  $R_{max}$  der Länge des größten Atomabstandes innerhalb eines Moleküls entspricht. Durch geeignete Wahl des äußeren und inneren Integrationsradius  $R_{max}$  und  $R_{min}$  werden die meisten der störenden Kreuzvektoren sowie die im Ursprung angehäuften Distanzvektoren der Atome auf sich selbst (sogenannter Ursprungsspeak) ausgeschlossen. Zur Auffindung des Rotationsanteils der NCS wird die Pattersonfunktion in vorgegebenen Schritten um den Ursprung rotiert. Bei optimaler Überlagerung der ursprünglichen Pattersonfunktion  $P_1(\vec{u})$  mit der um die Rotationsmatrix  $C$  gedrehten Pattersonfunktion  $P_2(C\vec{u})$  zeigt die von Rossmann & Blow (1962) beschriebene Rotationsfunktion  $R(\alpha, \beta, \gamma)$  ein Maximum:

$$R(\alpha, \beta, \gamma) = \int_{R_{min}}^{R_{max}} P_1(\vec{u}) P_2(C\vec{u}) d\vec{u} \quad (4.5.20)$$

Für die Berechnung der auch als Selbstrotation bezeichneten Eigenrotationsfunktion wurde das Programm POLARRFN und GLRF (CCP4, 1994) verwendet. Das Programm berechnet die Maxima der Rotationsfunktion sowohl in Euler- als auch in Polarwinkeln. Da in der Regel nach Rotationssymmetrien wie zwei-, drei- oder vierzähligen Drehachsen gesucht wird, entsprechen diese NCS-Achsen Werten des Polarwinkels  $\kappa$  von  $180^\circ$ ,  $120^\circ$  oder  $90^\circ$ .

#### 4.5.11 Lösung des Phasenproblems

Wie alle elektromagnetischen Wellen, haben Röntgenstrahlen Amplituden- und Phaseninformation. Um eine Elektronendichte zu berechnen, werden beide Informationen benötigt. Leider können nur die Amplituden mittels Intensitäten gemessen werden, die Phaseninformation geht bei der Aufnahme des Bildes verloren. Diese Problematik wird in der Kristallographie als das „Phasenproblem“ bezeichnet. Anhand von Modellrechnungen konnte gezeigt werden, dass eine korrekte Phase für die Strukturlösung wichtiger ist, als eine korrekte Amplitude. Es gibt verschiedene Ansätze, das Phasenproblem zu lösen. Bei Vorliegen einer homologen und bereits bekannten Struktur kann diese als Suchmodell zur Phasenbestimmung mittels Molekularem Ersatz (*molecular replacement*) verwendet werden. Als weitere Methode existiert die Phasenbestimmung

durch multiplen isomorphen Ersatz (MIR). Hierbei werden Schweratomverbindungen mit hohen Elektronenzahlen spezifisch an definierten Stellen im Protein gebunden, ohne dass dabei signifikante Änderungen der Kristallpackung oder der Proteinstruktur auftreten. Dafür werden neben dem nativen Datensatz noch ein oder mehr Schweratomderivat-Datensätze benötigt. Als mittlerweile häufigste Methode der Strukturaufklärung neuer Proteinstrukturen wird die MAD-Methode (multiple anomale Dispersion) verwendet, bei der ein Schweratomderivat bei mehreren Wellenlängen gemessen wird.

#### 4.5.12 Phasenbestimmung durch multiple anomale Dispersion (MAD)

##### Anomale Streuung

Nach Gleichung 4.5.9 werden die Elektronen im Protein als unabhängig vom Atomkern betrachtet. Diese Vereinfachung trifft nicht mehr zu, wenn die Wellenlänge der einfallenden Röntgenstrahlung im Bereich einer Absorptionskante eines Atoms im Proteinkristall liegt. Die Absorptionskanten der häufigsten Atome in Proteinen (C, N, O, S) liegen sehr weit entfernt von den in der Proteinkristallographie gebräuchlichen Wellenlängen. In Anwesenheit von schwereren Atomen im Kristall, deren Absorptionskante der einfallenden Strahlung entspricht, unterscheiden sich die Intensität der Friedel-Paare, was als anomale Diffraktion bezeichnet wird. Diese Anomalie entsteht dadurch, dass zur kohärenten Strahlung die inkohärente, welche durch inelastische Streuung an Elektronen der inneren Schalen emittiert wird, hinzukommt. Dabei sind die Intensitätsunterschiede abhängig vom Atom, das für diese anomale Diffraktion verantwortlich ist, und von der Wellenlänge des Röntgenstrahls. Aus den auftretenden Intensitätsunterschieden zwischen den Friedel-Paaren lässt sich schließlich eine Phaseninformation ableiten. Bei Verwendung von Synchrotron-Strahlung kann die Wellenlänge zwischen 0,6 und 2 Å variiert werden, um die Absorptionskante des Schweratoms exakt zu erfassen und damit den Effekt der anomalen Streuung relativ groß werden zu lassen. Die zur normalen Streuung zusätzlichen Terme sind in Gleichung 4.5.21 dargestellt.

$$f = f'(\lambda) + i \cdot f''(\lambda)\lambda \quad (4.5.21)$$

$f'(\lambda)$ : dispersiver Term

$f''(\lambda)$ : Absorptionsterm der anomalen Streuung

Damit ergeben sich folgende Strukturfaktoren:

$$F_{PH}^+(hkl) = F_P^+(hkl) + F_H^+(hkl) = F_P^+(hkl) + F_{HN}^+(hkl) + F_{HA}^+(hkl) \quad (4.5.22)$$

$$F_{PH}^-(hkl) = F_P^-(hkl) + F_H^-(hkl) = F_P^-(hkl) + F_{HN}^-(hkl) + F_{HA}^-(hkl) \quad (4.5.23)$$

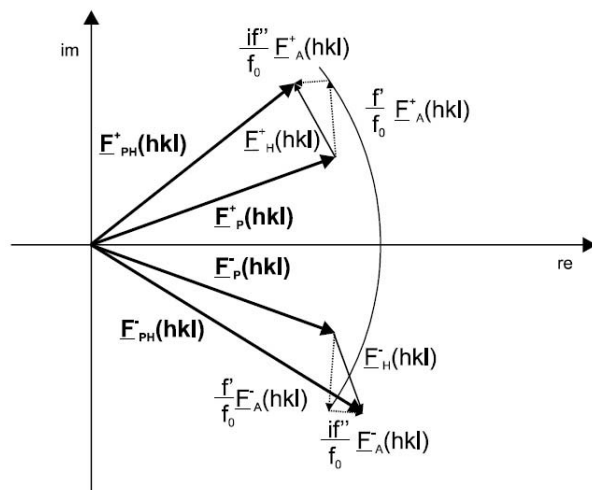
$F_{PH}$ : gemessener Strukturfaktor Protein mit Schweratom

$F_{HN}$ : normaler Anteil des Strukturfaktors des anomalen Streuers

$F_{HA}$ : anomaler Anteil des Strukturfaktors des anomalen Streuers

##### MAD-Experiment

Zum genaueren Verständnis ist die Auftragung dieser Zusammenhänge in Abbildung 4.10 dargestellt. Der Unterschied zwischen den beiden Strukturfaktoren  $F_{PH}^+$  und  $F_{PH}^-$  beträgt genau  $2 F_{HA}$ .



**Abbildung 4.10:** Zusammensetzung des Strukturfaktors für einen Reflex  $hkl$  unter Berücksichtigung der anomalen Streuung. Dabei setzt sich  $F_H$  aus einem anomalen und einem normalen Anteil des Strukturfaktors des anomalen Streuers zusammen.

Der anomale Anteil der Streuung liegt bei einem typischen MAD-Experiment an Proteinkristallen durchschnittlich im Bereich von 3-5 %, was eine sehr sorgfältige Datensammlung erforderlich macht, die oft nur durch eine hohe Redundanz der Daten erreicht wird. Die Differenzen zwischen den Friedel-Partnern wird Bijvoet-Differenzen genannt. Diese Differenzen können bei den Messungen bestimmt werden und zur Phasenbestimmung herangezogen werden (Hendrickson, 1985; Hendrickson et al., 1990). Zur Phasierung werden mehrere Datensätze bei unterschiedlicher Wellenlänge aufgenommen, bei denen die jeweiligen  $f'$  und  $f''$  unterschiedliche Anteile haben. Der wellenlängenabhängige Verlauf von  $f'$  und  $f''$  ist in Abbildung 4.11 für Selen dargestellt. Zur optimalen Ausnutzung der Anteile von  $f'$  und  $f''$  wird bei der sog. *peak*-Wellenlänge (Maximum der  $f''$ -Kurve) und bei der sog. *inflection-point*-Wellenlänge (Minimum von  $f'$  und Wendepunkt von  $f''$ ) gemessen. Da diese Wellenlängen sehr dicht beisammen liegen und zudem von der Umgebung der anomalen Streuer im Protein abhängen, muß vor der Datensammlung ein Fluoreszenzscan am Proteinkristall durchgeführt werden, bei dem die Kurven von  $f'$  und  $f''$  experimentell ermittelt werden können. Zusätzlich wird noch ein weiterer Datensatz weit entfernt von der Absorptionskante gemessen, der als Referenzdatensatz dient (*high* oder *low energy remote*).

### Phasenbestimmung

Um die Bindungsstellen der anomalen Streuer zu erhalten, werden die anomalen Differenzen  $|F_{ano}|$  in eine Differenz-Pattersonfunktion eingesetzt. Die Pattersonfunktion (vgl. Gleichung 4.5.24) ist eine Fouriersynthese der Reflexintensitäten (Patterson, 1934) und kann ohne Phaseninformation berechnet werden. Hierbei bezeichnen  $u$ ,  $v$  und  $w$  relative Koordinaten in der Elementarzelle.

$$P(u, v, w) = \frac{1}{V_{EZ}} \sum_{hkl} F(hkl)^2 \cdot \cos[2\pi(hu + kv + lw)] \quad (4.5.24)$$

Die Funktionsmaxima entsprechen den Abstandsvektoren der Atome in der Elementarzelle. Da zwischen jedem Paar von Atomen zwei entgegengesetzte Vektoren (jeweils von Atom A nach Atom B und umgekehrt) existieren, besitzt die Patterson-Raumgruppe im Vergleich zur realen Raumgruppe des Kristalls eine zusätzliche Zentrosymmetrie. In einer Zelle mit  $N$  Atomen

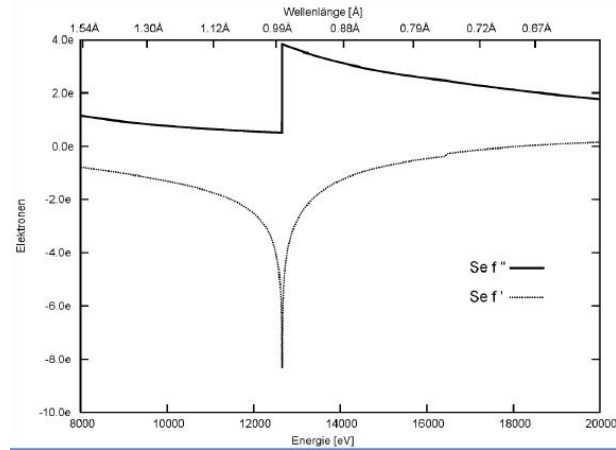


Abbildung 4.11: Wellenlängenabhängiger Verlauf von  $f'$  und  $f''$  für Selen.

existieren  $N \cdot (N - 1)$  unterschiedliche Vektoren. Bei Kristallen mit nur wenigen Atomen in der Elementarzelle können die Positionen aller Atome direkt aus diesen Vektoren bestimmt werden. In Proteinkristallen ist die Zahl der Atome für dieses Vorgehen allerdings viel zu groß. Es lassen sich jedoch die Positionen der Schweratome eines Derivats mit Hilfe der Differenz-Pattersonfunktion bestimmen. Durch den Einbau von nur wenigen Schweratomen an definierte Bindungsstellen im Protein wird das Problem auf ein Problem mit wenigen Atomen reduziert. Aus der Differenz-Pattersonfunktion lassen sich also die Positionen der Schweratome ermitteln. Dazu werden die Bijvoet-Differenzen berechnet (Drenth, 1999).

Die Differenz-Pattersonfunktion  $P(u,v,w)$  mit den Koeffizienten  $|\Delta F_{ano}|^2$  liefert dann die Bindungsstellen der anomalen Streuer.

$$\Delta P(u, v, w) = \frac{1}{V_{EZ}} \sum_{hkl} |\Delta F_{ano}|^2 \cdot \cos[2\pi(hu + kv + lw)] \quad (4.5.25)$$

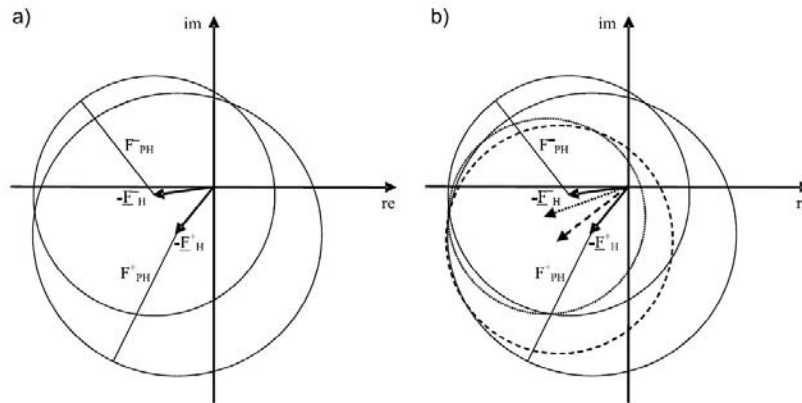
- $F_{PH}^+$  Amplitude des Struktur factors des Reflexes (hkl)
- $F_{PH}^-$  Amplitude des Struktur factors des Reflexes ( $\bar{h}kl$ )
- $\Delta F_{ano}$  normierte Differenz der Struktur factor amplituden des Friedelpaares

Die Phasen der Struktur factors  $F_P$  des nativen Proteins können mit Hilfe der Harker-Konstruktion (vgl. Abbildung 4.12) bestimmt werden (Harker, 1956). Gemessen werden  $F_{PH}^+$  und  $F_{PH}^-$ . Da sich die Struktur factors  $F_{PH}$  aus den Anteilen des Proteins und des Schweratoms zusammensetzen gilt:

$$F_P^+ = -F_H^+ + F_{PH}^+ \quad (4.5.26)$$

$$F_P^- = -F_H^- + F_{PH}^- \quad (4.5.27)$$

$F_H^+$  und  $F_H^-$  können aus den Atompositionen der anomalen Streuer bestimmt werden. Da die reinen nativen Struktur factors  $F_P^+$  und  $F_P^-$ , die keinen anomalen Anteil enthalten, aufgrund des Friedel-Gesetzes (vgl. Gleichung 4.5.9) den gleichen Wert haben müssen, ist dieses Gleichungssystem erfüllt, wenn sich die Kreise für  $-F_{PH}^+ + F_H^+$  und  $-F_{PH}^- + F_H^-$  schneiden. Die Zweideutigkeit der Phasen, die wiederum durch die zwei Schnittpunkte der Kreise (vgl. Abbildung 4.12a) zustande kommt, läßt sich durch die Messung bei einer zweiten Wellenlänge in der Nähe der Absorptionskante des anomalen Streuers (vgl. Abbildung 4.12b) lösen, da die reinen Proteinstruktur factors  $F_P^+$  und  $F_P^-$  unabhängig von der Wellenlänge sind. Der Vorteil der MAD-Methode ist, dass alle Datensätze am gleichen Kristall gemessen werden und nur ein Derivat für die Phasenbestimmung



**Abbildung 4.12:** Harker-Konstruktion zur Phasenbestimmung unter Berücksichtigung des anomalen Signals. a) Experiment bei nur einer Wellenlänge; die Schnittpunkte der beiden Kreise stellen die beiden möglichen Lösungen für  $F_P$  dar. b) Experiment bei zwei Wellenlängen;  $F_P$  kann nun eindeutig bestimmt werden.

nötig ist, und in der Regel keine Non-Isomorphie entsteht. Zusätzlich können Selen-Atome als anomale Streuer sehr einfach als Selenomethionin inkorporiert werden, was zudem den Vorteil hat, dass beim anschließenden Modellbau sehr einfach an den Selenomethionin-Positionen mit dem Bau des Modells begonnen werden kann. Zur Lokalisierung der anomalen Streuer wurden in dieser Arbeit die Programme SHELXD (Schneider and Sheldrick, 2002) und SHAKE&BAKE (Weeks and Miller, 1999) verwendet. Die Phasierung erfolgte mit dem Programm SHARP (De La Fortelle and Bricogne, 1997).

#### 4.5.13 Phasenbestimmung durch molekularen Ersatz

Die Methode des molekularen Ersatzes (MR) kann zur Strukturaufklärung von Proteinen angewendet werden, bei denen die Raumstruktur eines ähnlichen Proteins bereits bekannt ist. Proteine mit einer Sequenzidentität von mehr als 30 % besitzen mit hoher Wahrscheinlichkeit auch eine vergleichbare dreidimensionale Faltung (Sander & Schneider, 1991). Aufgrund statistischer Überlegungen kann außerdem davon ausgegangen werden, dass für lösliche, globuläre Proteine nur eine begrenzte Anzahl von etwa 500 bis 1000 Strukturfamilien existiert (Schulz, 1981; Chothia, 1992; Benner et al., 1997). Da die Zahl der veröffentlichten Proteinstrukturen in den letzten Jahren stark ansteigt, wird es zunehmend wahrscheinlicher, durch Sequenzvergleiche und Sekundärstrukturvorhersagen ein geeignetes Suchmodell für die Strukturlösung eines Proteins zu finden. Die Methode des molekularen Ersatzes ermöglicht es, ein atomares Suchmodell korrekt in der asymmetrischen Einheit einer unbekannt Kristallstruktur zu platzieren. Bei dieser Suche handelt es sich um ein 6-dimensionales Problem, das in eine Rotations- und eine Translationsuche unterteilt werden kann (Rossmann & Blow, 1962). Das grundlegende Prinzip der Methode ist der Vergleich der Pattersonfunktionen (vgl. Gleichung 4.5.24) von Suchmodell und Zielmolekül. Aus dem platzierten Modell können anschließend MR-Phasen bestimmt werden, die zusammen mit den experimentell gemessenen Strukturfaktoramplituden zur Berechnung der Elektronendichte herangezogen werden. Für eine erfolgreiche Suche ist der Grad der strukturellen Verwandtschaft zwischen Suchmodell und Zielstruktur von großer Bedeutung. Eine große Anzahl von Molekülen in der Elementarzelle erschweren allerdings die Suche nach der korrekten Lösung.

#### 4.5.14 Modellbau und Elektronendichtekarten

##### Modellbau

Sind die Phasen der Strukturfaktoren so gut bestimmt, dass daraus zumindest eine partiell interpretierbare Elektronendichte resultiert, kann mit dem Bau eines Proteinmodells begonnen werden. Je nach Qualität der Elektronendichte können dabei Sekundärstrukturelemente zugeordnet, der Verlauf der Polypeptidkette und auch bereits Seitenketten identifiziert werden. Allerdings ist die aus den initialen und anschließend modifizierten Phasen berechnete Elektronendichte meist noch stark mit Fehlern behaftet, so dass die vollständige Struktur nicht in einem Schritt modelliert werden kann. Daher wird das Proteinmodell in einem zyklischen Verfahren aus Korrektur und Neubau von Teilen des Modells sowie anschließender Strukturverfeinerung schrittweise verbessert. Oft kann der Modellbau stark erleichtert werden, wenn eine Proteinstruktur mit ähnlicher Faltung bereits bekannt ist. In der vorliegenden Arbeit wurde zuerst mit Hilfe des interaktiven Graphikprogramms MAIN (Turk, 1992) ein Polyalaninmodell in die experimentellen MAD-Phasen eingebaut. Dieses Teilmodell wurde dann als Suchmodell für den molekularen Ersatz in anderen Kristallformen verwendet. Zur Ergänzung und Korrektur der Modelle wurden die im folgenden beschriebenen Elektronendichtekarten verwendet.

##### $(F_{obs}-F_{calc})$ -Elektronendichtekarte

Die  $(F_{obs}-F_{calc})$ -Differenz-Fourierkarte wird mit den Koeffizienten  $(F_{obs} - F_{calc}) \cdot \exp(i\varphi_{calc})$  berechnet. Diese Karten zeigen den Unterschied zwischen dem Modell und der tatsächlichen Struktur. Fehlende Atome erscheinen mit positiver Differenzdichte, falsch positionierte Bereiche mit negativer Differenzdichte. Die Differenzen erscheinen mit halber tatsächlicher Höhe und sind signifikant ab einem Differenzdichteniveau von etwa drei Standardabweichungen der durchschnittlichen Elektronendichte ( $3\sigma$ ). Diese Dichtekarten werden sowohl für den Einbau fehlender Aminosäuren, Wassermoleküle oder Liganden als auch zur Korrektur von Modellbereichen, verwendet.

##### $(2F_{obs}-F_{calc})$ -Elektronendichtekarte

Diese Dichtekarte wird mit den Koeffizienten  $(2F_{obs} - F_{calc}) \cdot \exp(i\varphi_{calc})$  berechnet und entspricht der Addition einer  $(F_{obs} - F_{calc}) \cdot \exp(i\varphi_{calc})$ -Differenz-Fourierkarte mit einer  $F_{obs} \cdot \exp(i\varphi_{calc})$ -Karte. Sie wird zumeist oberhalb eines Differenzdichteniveaus von etwa  $1\sigma$  dargestellt und zeigt neben der Elektronendichte des Modells die Differenzdichte in voller Höhe.  $(2F_{obs}-F_{calc})$ -Dichtekarten sind allerdings stark vom Modell beeinflusst (sog. *modelbias*).

## 4.6 Verfeinerung

Die auf der Grundlage eines initialen Modells errechneten Strukturfaktoren stimmen in der Regel nur schlecht mit den gemessenen Daten überein. Ziel der Verfeinerung des Proteinmodells ist es, durch Variation der Ortskoordinaten und B-Faktoren der Atome eine möglichst gute Übereinstimmung zwischen berechneten und gemessenen Strukturfaktoren zu erreichen. Ein Maß für den Grad an Übereinstimmung von gemessenen Strukturfaktoramplituden  $F_{obs}$  und den aus dem Modell berechneten Strukturfaktoramplituden  $F_{calc}$  ist der kristallographische R-Faktor  $R_{cryst}$  (vgl. Gleichung 4.6.28). Initiale Proteinmodelle weisen in der Regel einen R-Faktor von 40-50 % auf, eine zufällige Verteilung von Proteinatomen in der asymmetrischen Einheit resultiert in einem R-Faktor von ca. 59 % (Wilson, 1949). Verfeinerte Röntgenstrukturen erreichen dagegen, je nach Auflösung der röntgenographischen Daten, R-Faktoren zwischen etwa 10 % und 30 %.

$$R_{cryst} = \frac{\sum_{hkl} |F_{obs}(hkl) - F_{calc}(hkl)|}{\sum_{hkl} |F_{obs}(hkl)|} \quad (4.6.28)$$

Durch die Strukturverfeinerung werden die Ortskoordinaten und B-Faktoren der Proteinatome so verändert, dass die aus dem Modell berechneten Strukturfaktoramplituden optimal mit den experimentell bestimmten Strukturfaktoramplituden übereinstimmen. Da die gemessenen Daten stets Fehler enthalten, muß gleichzeitig die Modellierung des experimentellen Rauschens ausgeschlossen werden (*overfitting*). Bei der Verfeinerung sollte die Zahl der zu verfeinernden Parameter (Variablen) die Zahl der Observablen (der Röntgenreflexe) nicht übersteigen. Die Zahl der Röntgenreflexe ist durch die Auflösungsgrenze, die Vollständigkeit der gesammelten Daten und die Raumgruppe des Kristalls begrenzt, weshalb zusätzliche Bedingungen in die Verfeinerung eingeführt werden. Die stereochemischen Parameter von Peptidstrukturen (Bindungsabstände und Bindungswinkel, Chiralität und Torsionswinkel) sind mit großer Genauigkeit aus den Röntgenstrukturen kleinerer Moleküle bekannt (Engh and Huber, 1991). Diese können verwendet werden, um die Werte der verfeinerten Parameter zu beschränken. Die Einschränkungen (*restraints*) wirken dabei wie zusätzliche, künstliche Observablen. Analog dazu kann auch die Ähnlichkeit NCS-verwandter Polypeptidketten zur Begrenzung der freien Verfeinerungsparameter verwendet werden (Kleywegt, 1996; Kleywegt and Read, 1997). Zu Beginn der Strukturverfeinerung sollte die Anzahl der verfeinerten Parameter zunächst gering gehalten und dann von Runde zu Runde langsam erhöht werden (Kleywegt and Jones, 1995). Gute Proteinmodelle weisen am Ende der Verfeinerung sinnvolle Stereochemie und Temperaturfaktoren auf und erklären die kristallographischen und biochemischen Daten mit einer möglichst geringen Anzahl von Parametern. Werden zu viele Parameter gleichzeitig freigegeben, besteht die Gefahr des *overfitting*. Um dies zu vermeiden, wird ein zufälliger Satz von etwa 3-5 % der Röntgenreflexe ausgewählt und nicht in die Verfeinerung einbezogen (Testdatensatz). Mit diesen Reflexen wird in Analogie zum kristallographischen R-Faktor  $R_{cryst}$  der freie R-Faktor  $R_{free}$  berechnet (Bruenger, 1992):

$$R_{free} = \frac{\sum_{hkl \in T} |F_{obs}(hkl) - F_{calc}(hkl)|}{\sum_{hkl \in T} |F_{obs}(hkl)|} \quad (4.6.29)$$

T: Röntgenreflexe im Testdatensatz

Ein *overfitting* zeichnet sich dadurch aus, dass  $R_{cryst}$  im Laufe der Verfeinerung kleiner wird, während  $R_{free}$  gleich bleibt oder sogar ansteigt. Die Größe von  $R_{free}$  korreliert mit dem mittleren Phasenfehler des Modells und kann daher als Kriterium für den Fortschritt der Verfeinerung angesehen werden (Kleywegt and Bruenger, 1996). Die absoluten Werte des kristallographischen und des freien R-Faktors sollten sich dabei um nicht mehr als 5 % unterscheiden.

#### 4.6.1 Verfeinerung von Temperaturfaktoren

Statistische Fehlerrordnungen und thermische Bewegungen der Atome im Proteinkristall bewirken eine auflösungsabhängige Änderung der Reflexintensitäten, die durch eine Minimierung der Temperaturfaktoren modelliert werden kann. In Abhängigkeit von der Auflösung der gemessenen Daten werden dabei unterschiedlich viele Verfeinerungsparameter zugelassen. Bei Auflösungen oberhalb 3 Å wird nur ein mittlerer B-Faktor für das gesamte Protein bestimmt, bei Auflösungen zwischen 3 Å und 2,5 Å werden dagegen meist zwei B-Faktoren pro Aminosäure verfeinert (jeweils ein B-Faktor für alle Atome der Hauptkette und der Seitenkette). Individuelle isotrope B-Faktoren lassen sich erst unterhalb einer Auflösung von etwa 2,5 Å sinnvoll verfeinern. Dabei wird einschränkend angenommen, dass sich die B-Faktoren benachbarter Atome nicht beliebig

stark voneinander unterscheiden. Ab einer Auflösung von etwa  $1,4 \text{ \AA}$  lassen sich sogar anisotrope B-Faktoren verfeinern.

### 4.6.2 Rigid body-Verfeinerung

Die *rigid body*-Verfeinerung wird häufig am Anfang einer Verfeinerung angewandt. Dabei werden definierte Atomgruppen (z.B. das ganze Molekül, einzelne Domänen oder Sekundärstrukturelemente) als starre Körper definiert, deren Rotations- und Translationsfreiheitsgrade unabhängig voneinander verfeinert werden können. Dadurch wird nur eine geringe Anzahl von freien Parametern eingeführt, und die Verfeinerung kann bei niedriger Auflösung durchgeführt werden. Der Konvergenzradius wird damit vergrößert. Oft wird diese Methode auch angewendet, um Modelle korrekt in unterschiedlichen Einheitszellen zu positionieren, wenn leichte Änderungen in den Zellparametern auftreten.

### 4.6.3 Molekulardynamik-Simulation (simulated annealing)

Zu Beginn der Strukturlösung bietet sich zunächst eine Verfeinerung des Modells durch eine Molekulardynamik-Simulation (*simulated annealing*) an. Dabei werden den Modellatomen Anfangsgeschwindigkeiten zugeordnet, die den molekularen Bewegungen bei hohen Temperaturen (2000-3000 K) entsprechen. Lokale Minima können hierdurch von den Atomen verlassen werden. Nun wird das Molekül in der Simulation schrittweise abgekühlt, um so ein Energieminimum und optimale Torsionswinkelparameter zu finden.

### 4.6.4 Einbau von Wassermolekülen und Liganden

Wassermoleküle wurden ebenfalls mit dem Programm CNS (Brünger et al., 1999) eingebaut und zusätzlich manuell gebaut. Dabei wurden nur solche Wassermoleküle akzeptiert, die mindestens  $2,2 \text{ \AA}$  von allen anderen Atomen entfernt lagen und zusätzlich eine Wasserstoffbrücke ( $2,4 - 3,2 \text{ \AA}$ ) zu einem Donor- oder Akzeptoratom des Proteins ausbilden konnten.

## 4.7 Proteinstrukturen

### 4.7.1 Homologiemodell

Anhand von Sequenzvergleichen lassen sich vielfach Aussagen über Funktion und Faltung eines unbekanntes Proteins machen, da funktionell und strukturell verwandte Proteine oft auch auf Sequenzebene Ähnlichkeiten aufweisen. Eine beliebige Sequenz kann mit Hilfe des Programms BLAST (Altschul et al., 1997) mit Einträgen von Sequenzdatenbanken verglichen werden. Bei ausreichend hoher Sequenzidentität ( $> 25\%$ ) zu einem strukturell bekannten Enzym ist es möglich, ein Homologiemodell des unbekanntes Proteins zu berechnen. Grundlage des Modells ist eine Überlagerung der beiden Aminosäuresequenzen (*alignment*). Für die Erstellung des Modells der CPN wurde mit dem Programm CLUSTALW (Higgins et al., 1994) ein Sequenzvergleich durchgeführt.

### 4.7.2 Qualität von Proteinstrukturen

Proteinstrukturen beinhalten auch nach der Strukturverfeinerung noch Fehler. Diese sind allerdings unterschiedlich schwerwiegend und beschränken sich meist auf eng begrenzte Bereiche der



Struktur. Zur Beurteilung der Qualität eines Strukturmodells gibt es zahlreiche Kriterien, die sich entweder auf die Gesamtstruktur oder aber auf lokale Bereiche wie etwa einzelne Aminosäurereste beziehen (Dodson et al., 1998). Damit die Qualitätskriterien unabhängig und aussagekräftig sind, dürfen sie nicht in den Zielfunktionen der zur Verfeinerung verwendeten Programme enthalten sein. Programme zur Validierung von Proteinstrukturen wie PROCHECK (Laskowski et al., 1993) verwenden möglichst viele unabhängige Kriterien sowie statistische Analysen, um Fehler in Proteinmodellen sicher aufzufinden. Letztlich ist die Güte eines Strukturmodells aber entscheidend von der Qualität der gemessenen kristallographischen Daten abhängig. Der kristallographische R-Faktor  $R_{cryst}$  (vgl. Gleichung 4.6.28) beschreibt die Übereinstimmung zwischen den gemessenen Strukturfaktoramplituden  $F_{obs}$  und den aus dem Strukturmodell berechneten Strukturfaktoramplituden  $F_{calc}$ . Da er stark vom Verhältnis der Observablen zur Anzahl der verfeinerten Parameter abhängig ist, besitzt er für sich betrachtet nur eine geringe Aussagekraft. Zusammen mit dem freien R-Faktor  $R_{free}$  (vgl. Gleichung 4.6.29) können aber Rückschlüsse auf den Verlauf der Strukturverfeinerung gezogen werden. Die Torsionswinkel  $\phi$  und  $\varphi$  der Polypeptid-Hauptkette sind aufgrund der sterischen Hinderungen zwischen Haupt- und Seitenkettenatomen für alle Aminosäuren mit Ausnahme von Glycin stark eingeschränkt. Zur Veranschaulichung werden die Torsionswinkel der einzelnen Aminosäuren daher im sogenannten Ramachandran-Diagramm gegeneinander aufgetragen (Ramachandran, 1968). Innerhalb des in dieser Arbeit verwendeten Programms PROCHECK (Laskowski et al., 1993) wird das Ramachandran-Diagramm anhand einer Statistik über die Winkelverteilung in hoch aufgelösten Proteinstrukturen in vier Bereiche unterteilt, die mit „energetisch günstig“, „erlaubt“, „zusätzlich erlaubt“ und „verboten“ bezeichnet werden. Der von Engh & Huber (1991) abgeleitete Satz von idealen Bindungslängen und Bindungswinkeln für Proteine beruht auf einer Analyse hochaufgelöster Kristallstrukturen von Verbindungen mit kleiner Molekularmasse (Engh and Huber, 1991). Die mittleren quadratischen Abweichungen (rmsd) von diesen Idealwerten können für Proteinstrukturen mit Programmen wie PROCHECK analysiert werden. Da diese stereochemischen Parameter in den Zielfunktionen der verwendeten Verfeinerungsprogramme enthalten sind, ist ihre Aussagekraft über die generelle Richtigkeit einer Struktur eher beschränkt. Allerdings können aus der rmsd Hinweise auf die Qualität und den Verlauf der Strukturverfeinerung erhalten werden. Liegen in der asymmetrischen Einheit mehrere Kopien eines Moleküls vor, so sollten diese abgesehen von den an Kristallkontakten beteiligten Bereichen annähernd identisch sein. Als Qualitätskriterium eines Strukturmodells kann die rmsd der überlagerten Atomkoordinaten bestimmt werden, wobei größere Abweichungen aus der Umgebung oder der Funktion des Moleküls erklärbar sein sollten. Wurde die Ähnlichkeit NCS-verwandter Moleküle in den Zielfunktionen der verwendeten Verfeinerungsprogramme bereits berücksichtigt, so können Abweichungen zwischen den Molekülen anhand von Elektronendichte-Korrelationen identifiziert werden.

### 4.7.3 Darstellung und Analyse von Proteinstrukturen

Die atomare Darstellung von Proteinen ist aufgrund ihrer Größe und Komplexität meist nur in kleinen Ausschnitten möglich. Aus Gründen der Anschaulichkeit werden daher Abstraktionen bei der Darstellung größerer Bereiche verwendet. Sekundärstrukturelemente werden häufig in Form von Bändermodellen (*ribbon*-Darstellungen) dargestellt. Die Zuordnung der einzelnen Aminosäurereste zu Sekundärstrukturen erfolgte in dieser Arbeit manuell. Darstellungen von atomaren Modellen,  $C\alpha$ -Hauptketten und Bändermodellen wurden mit dem Programm PYMOL (De Lano, 2002) erstellt. Zur Darstellung der Oberflächen wurde mit dem Programm GRASP (Nicholls et al., 1991) gearbeitet und die Daten anschließend in PYMOL (De Lano, 2002) weiter bearbeitet.

#### 4.7.4 Proteinstrukturvergleiche

Die meisten der zur Zeit bekannten Proteinstrukturen besitzen keine einzigartige Faltung, sondern sind Mitglieder von Strukturfamilien. Häufig werden überraschend ähnliche Strukturen auch dann beobachtet, wenn die betreffenden Proteine weder in ihrer Sequenz noch in ihrer Funktion miteinander verwandt sind. Der strukturelle Vergleich von Proteinen erfordert die möglichst genaue Überlagerung der zu vergleichenden Moleküle. Als Kriterien für die Ähnlichkeit von Molekülen werden die mittlere quadratische Abweichung (rmsd) der Positionen sich entsprechender Atome (Maiorov and Crippen, 1994) oder sogenannte Distanzmatritzen (Holm and Sander, 1993) verwendet. Entscheidend für die optimale Überlagerung von Proteinstrukturen ist die Zuordnung der sich entsprechenden Aminosäurereste. Diese kann zum Beispiel auf einem *alignment* der Proteinsequenzen basieren.

# 5 Ergebnisse – $\beta$ Amyloid-Precursorprotein (APP)

Zur Kristallisation werden große Mengen homogenen Materials von kompakt gefalteten Proteindomänen benötigt. Bei der Überlegung, welche Fragmente eines Proteins sich zur Kristallisation eignen, können zwar Sekundärstrukturvorhersagen miteinbezogen werden, diese zeigen allerdings nur eine gewisse Wahrscheinlichkeit bestimmter Konformationen an. Basierend auf der mittels PSIPRED (Jones, 1999) angefertigten Sekundärstrukturvorhersage (vgl. Abbildung 5.1) wurden bereits in eigener Vorarbeit verschiedene Fragmente der  $\beta$ APP-Ektodomäne kloniert (Keil, 2003). Aufgrund der nur in neuronalem  $\beta$ APP vorkommenden KPI-Domäne ist zu vermuten, dass sich an dieser Stelle ein flexibler Linker zwischen verschiedenen Domänen befinden könnte, weshalb zusätzlich zu dem Gesamtektodomänen-Konstrukt auch eine N-terminale und eine C-terminale Hälfte der  $\beta$ APP-Ektodomäne kloniert wurden.

## 5.1 C-terminale Hälfte der $\beta$ APP-Ektodomäne (bappS4)

### 5.1.1 Klonierung und Expression

Das C-terminale Konstrukt bappS4 beginnt nach Exon 7 (Insertionsstelle der KPI-Domäne) in der Mitte der Ektodomäne und reicht bis kurz vor die Transmembrandomäne.

Für die Klonierung wurden die durch PCR vervielfältigte Insert-DNA und das Plasmid pET22b mit den Restriktionsenzymen *NdeI* & *HindIII* geschnitten und nach einer Dephosphorylierung der Plasmidenden ligiert. Anschließend wurden positive Klone über eine Transformation in den *E.coli*-Klonierungsstamm *DH5 $\alpha$*  und Kultivierung auf Ampicillinplatten selektiert, die isolierte DNA wurde über qualitative Restriktionsverdauung überprüft und schließlich sequenziert. Die Kontrolle der Sequenz mit dem Programm BioEdit (Hall, 1999) ergab, dass die DNA fehlerfrei in das Plasmid eingesetzt wurde und auch keine Mutationen innerhalb des Inserts vorkamen.

Daher wurde als nächstes Experiment ein Expressionstest in *E.coli*-Bakterien verschiedener Expressionsstämme (*Rosetta(DE3)* und *BL21(DE3)pRIL*) und bei unterschiedlichen Temperaturen (37 °C und bei RT) durchgeführt. Innerhalb der *Rosetta(DE3)*-Zellen war bei keiner der getesteten Temperaturen eine Expression zu beobachten, aber eine Kultivierung in *BL21(DE3)pRIL*-Zellen zeigte bereits eine Stunde nach der Induktion mit IPTG eine deutliche Überexpression, die mit der Zeit proportional anstieg. Nach 4 h Wachstum war allerdings keine weitere Verbesserung der Expression mehr zu erkennen, weshalb die Zellen nach dieser Zeit geerntet wurden. Ergänzend wurde ein Löslichkeitstest durchgeführt, der zeigte, dass das bappS4-Konstrukt bei 37 °C zwar größtenteils als Einschlußkörper exprimiert wurde, dass sich dieses Verhältnis aber bei einer Expression bei Raumtemperatur zugunsten von löslichem Material verschieben ließ.

### 5.1.2 Reinigung

Das überexprimierte Material wurde nach einer vierstündigen Inkubation bei Raumtemperatur durch Zentrifugation geerntet und das Pellet in Bindepuffer (100 mM Tris, pH 8.0, 500 mM NaCl) wieder resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Nach erneuter Zentrifugation



wurde der Überstand auf eine selbstgepackte, mit Bindepuffer äquilibrierte, NiNTA-Säule per Schlauchpumpe aufgetragen. Der am Protein angehängte His-tag konnte bei einer Flußrate von 1 ml/min an das Säulenmaterial binden, wodurch eine erste Abtrennung von anderen Proteinen bewirkt werden konnte. Ein anschließendes Spülen der Säule mit Bindepuffer, bis der Detektor wieder die Basislinie erreicht hatte, trennte unspezifisch gebundenes Material von den Bindungsstellen der Säule ab, und ein folgender Waschschrift (Bindepuffer mit 40 mM Imidazol) spülte die schwach gebundenen Proteine von der Säule. Abschließend wurde die C-terminale Hälfte der  $\beta$ APP-Ektodomäne mit einem 250 mM Imidazol enthaltenden Elutionspuffer von der Säule eluiert. Wie auf dem SDS-Gel in Abbildung 5.2 sichtbar, war das Protein nach diesem Schritt schon nahezu rein. Um letzte Rückstände noch zu entfernen wurde das Protein auf 10 mg/ml aufkonzentriert und abschließend auf eine Gelfiltrationssäule S75 aufgetragen. Der Elutionspeak wurde vereinigt und für weitere Experimente wieder auf 10 mg/ml einkonzentriert. Die Ausbeute an reinem Protein betrug 10 mg pro Liter Kulturmedium. Einen Überblick über die Expression und Reinigung des bappS4-Konstruktes bietet das SDS-Gel in Abbildung 5.2.

### 5.1.3 Expression und Reinigung von SeMet-bappS4

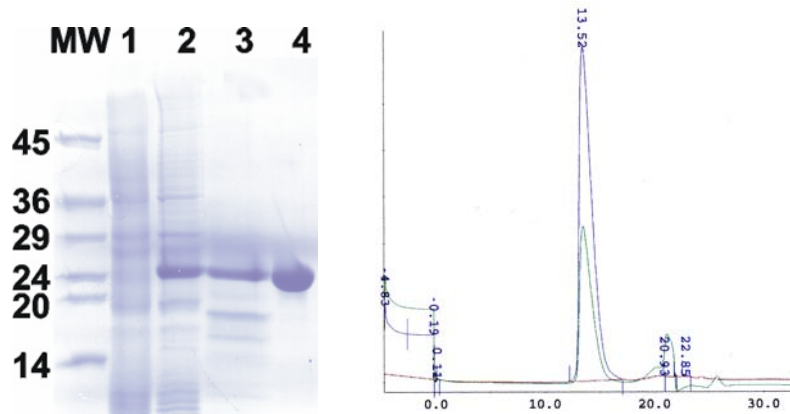
Um das Phasenproblem zu lösen, wurde versucht, den anomalen Streuer Selen in Form von Seleno-L-Methionin (SeMet) in das bappS4-Konstrukt zu inkorporieren, um anschließend mittels MAD-Phasierung die Struktur zu erhalten. Dafür wurde das bappS4-Konstrukt in den Methionin-auxotrophen *E. coli*-Stamm B834(DE3) transformiert und in Minimal-Medium mit 25 mg/l SeMet kultiviert. Die Expression und Reinigung erfolgte identisch zum unmarkierten bappS4. Um eine Oxidation des Selen zu verhindern, wurde nach dem NiNTA-Schritt zu allen Puffern 5 mM DTT zugegeben. Die Ausbeute an reinem Protein betrug 6 mg pro Liter Kulturmedium.

### 5.1.4 Biochemische Charakterisierung des reinen bappS4-Proteins und SeMet-bappS4-Proteins

Eine SDS-PAGE-Analyse des bappS4-Fragments ergab, dass das Protein auf einer erwarteten Höhe von ca. 26 kDa lief. Das Protein wurde zusätzlich auch per N-terminalem Edman-Abbau ansequenziert und als das Zielprotein bestätigt.

#### Analytische Gelfiltration

Zur genaueren Analyse des Molekulargewichts der eluierten Probe wurde auch eine analytische Gelfiltration durchgeführt (vgl. Abbildung 5.2). Hierzu wurde die Gelfiltrationssäule Sephadex 75 mit einem Standard der Firma BioRad geeicht. Dieser Standard enthält verschiedene Proteine mit bekanntem Molekulargewicht. Mithilfe des erhaltenen Elutionsprofils konnte anschließend eine Eichgerade erstellt werden, indem das benötigte Volumen eines eluierten Proteins gegen den Logarithmus seines Molekulargewichts aufgetragen wurde. Mit dieser Eichgerade konnte schließlich das Molekulargewicht der eluierten bappS4-Probe berechnet werden. Es wurde ein Wert von 32 kDa für das bappS4-Fragment ermittelt. Da das klonierte Monomer ein Molekulargewicht von 26 kDa besitzt, ist hier von einem Laufverhalten als Monomer auszugehen. Das etwas höhere Molekulargewicht bei der Bestimmung über eine Gelfiltrationssäule läßt sich durch interaktive Wechselwirkungen des Proteins mit dem Säulenmaterial erklären oder durch die Abhängigkeit des Laufverhaltens vom hydrodynamischen Radius. Daher können das Molekulargewicht betreffende Ergebnisse, die über eine Größenausschlußchromatographie erhalten wurden, nur als erste Hinweise in Hinblick auf ein Oligomerisierungsverhalten angesehen werden. Um eine definitive Aussage darüber treffen zu können, sind andere unabhängige Methoden wie zum Beispiel die Ultrazentrifugation notwendig.



**Abbildung 5.2:** Reinigungsüberblick und analytische Gelfiltration des bappS4-Proteins. Linke Seite: Coomassiegefärbtes SDS-Polyacrylamidgel, MW: Proteinmarker, 1: uninduziert, 2: induziert, 3: Elution der Ni-NTA-Säule, 4: Elution der Gelfiltration. Rechte Seite: Chromatogramm der analytischen Gelfiltration. Das bappS4-Protein eluiert hochrein und als homogener *peak* bei einem scheinbaren Molekulargewicht von 32 kDa.

### Massenspektroskopie

Die Masse des Proteins wurde schließlich auch noch mit Hilfe von Elektronenspray-Ionisations-Massenspektroskopie verifiziert und mit der theoretisch berechneten Masse verglichen. Diese Methoden wurden ebenfalls für das mit Selenomethionin versetzte bappS4 angewendet, wobei hier vor allem die Elektronenspray-Ionisations-Massenspektroskopie ein wichtiges Ergebnis lieferte. Bei vollständigem Ersatz aller neun in der Sequenz vorhandenen Methionine beträgt die Massendifferenz zwischen bappS4 und SeMet-bappS4 422 Da. Das Massenspektrum für natives bappS4 zeigte einen *peak* bei 26,4 kDa, bei SeMet-bappS4 verschob sich der *peak* zu 26,8 kDa. Daraus ergab sich eine Massendifferenz, die den Ersatz sämtlicher Methionine durch Selenomethionin bestätigte.

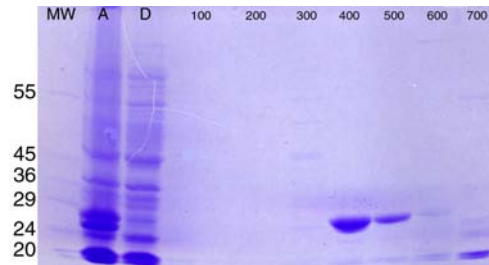
### Ultrazentrifugation

Da Molekulargewichtsbestimmungen über Größenausschlusschromatographie zum Einen durch Wechselwirkungen des Proteins mit dem Säulenmaterial verfälscht werden können und zum Anderen ein vom hydrodynamischen Radius abhängiges Ergebnis liefern, läßt sich eine definitive Aussage über das Oligomerisierungsverhalten eines Proteins nur über Ultrazentrifugation treffen. In Hinblick auf die in der Literatur viel diskutierte Dimerisierung (Scheuermann et al., 2001; Wang and Ha, 2004) des Amyloid-Vorläuferproteins bzw. seinem Verhalten als Monomer mit hohem Stokes Radius (Gralle et al., 2002; Botelho et al., 2003) wurde in dieser Arbeit sowohl ein Sedimentationslauf als auch ein Gleichgewichtslauf durchgeführt. Dabei lieferte vor allem der Gleichgewichtslauf die von Wechselwirkungen und hydrodynamischem Radius unabhängigen Daten und konnte in diesem Fall die Ergebnisse der analytischen Gelfiltration bestätigen. Somit ergab sich für das bappS4-Konstrukt ein monomeres Laufverhalten mit einer über UZ ermittelten Masse von 26,36 kDa.

### Heparinbindung

In der Literatur sind für die  $\beta$ APP-Ektodomäne mehrere Heparinbindedomänen beschrieben (Clarris et al., 1997; Rossjohn et al., 1999). Um die C-terminale Hälfte der  $\beta$ APP-Ektodomäne auf ihr Heparin-Bindungsvermögen zu testen, wurde das Protein auf eine Heparinsäule von

Pharmacia aufgetragen. Dabei ergab sich eine sehr starke Bindung des Proteins an das Säulenmaterial, so dass das bappS4-Konstrukt nur mit einer hohen Salzkonzentration von 400-500 mM NaCl wieder eluiert werden konnte (vgl. Abbildung 5.3). Dies bestätigt eine Bindung der  $\beta$ APP-Ektodomäne an Heparin im C-terminalen Bereich. Diese Erkenntnisse wurden mit Circular-Dichroismus-Messungen des bappS4-Konstruktes mit gebundenem Heparin noch weiter vertieft.



**Abbildung 5.3:** Heparinbindetest des bappS4-Proteins. Coomassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel. MW: Proteinmarker, A: Auftrag, D: Durchfluss, 100-700: mM Konzentration NaCl.

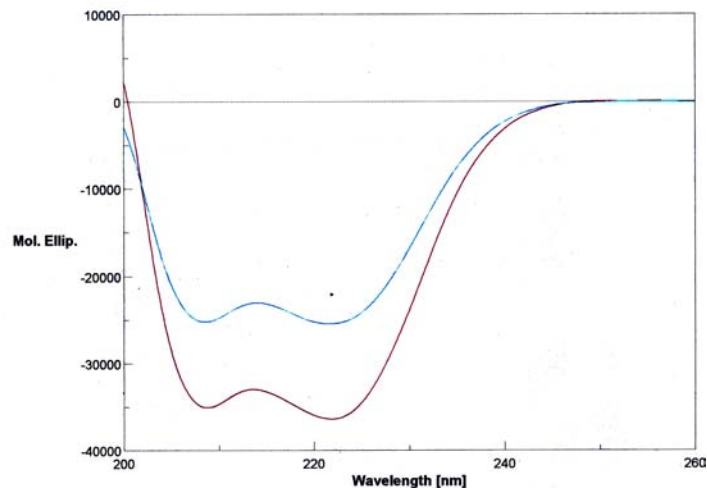
### Circular Dichroismus (CD)

Um die biochemische Charakterisierung zu vertiefen, wurden mit dem bappS4-Protein auch CD-Studien durchgeführt. Mit dieser Methode lassen sich Aussagen über die Sekundärstrukturelemente machen sowie über die Stabilität des Proteins. Dabei ergeben sich je nach Anteilen an  $\alpha$ -helikaler Struktur und Vorkommen von  $\beta$ -Strängen unterschiedliche Spektren. Die Sekundärstrukturvorhersage der  $\beta$ APP-Ektodomäne zeigt für den C-terminalen Bereich eine rein  $\alpha$ -helikale Faltung (vgl. Abbildung 5.1). Diese rein theoretische Vorhersage konnte durch das erhaltene CD-Spektrum voll bestätigt werden. Die Experimente wurden mit einer Proteinkonzentration von  $150 \mu\text{g/ml}$  in einem Puffer mit 5 mM Tris und 150 mM NaCl bei einem pH von 8,0 durchgeführt. Durch die tatsächlich rein  $\alpha$ -helikale Struktur ergab sich ein nahezu beispielhaftes  $\alpha$ -Helix-Spektrum mit negativen Banden bei 207 und 223 nm sowie einer positiven Bande um 193 nm (vgl. Abbildung 5.4). Eine zusätzlich angefertigte Schmelzkurve zeigte, dass das bappS4-Protein bei erhöhter Temperatur präzipitierte.

Da sich innerhalb der C-terminalen Hälfte der  $\beta$ APP-Ektodomäne laut Literatur auch mehrere Heparinbindestellen befinden (Clarris et al., 1997; Rossjohn et al., 1999), wurden die gleichen Experimente auch mit  $150 \mu\text{g/ml}$  Heparin im Puffer durchgeführt, um zu untersuchen, ob sich bei gebundenem Heparin eventuell eine Änderung der Struktur erkennen lässt. Da Heparin eine Eigenabsorption besitzt, wurden hierzu zunächst Messungen mit reinem Heparin-versetztem Puffer durchgeführt und die Heparin-Absorption anschließend von den Messungen mit Protein abgezogen. Anschließend wurden die gemessenen Spektren von bappS4 mit Heparin und ohne Heparin übereinander gelegt und miteinander verglichen (vgl. Abbildung 5.4). Deutlich erkennbar ist, dass das Spektrum von bappS4 mit gebundenem Heparin bei 210 und 220 nm tiefere Minima zeigt, was normalerweise auf einen höheren Anteil  $\alpha$ -helikaler Struktur schließen lässt. Um jeglichen Zweifel eines konzentrationsbedingten Effektes auszuschließen und eine genaue Bestimmung vornehmen zu können, wurden dieselben Proben, die vermessen wurden, nochmal ohne Verdünnung auf ihre Konzentration überprüft und mit diesen Werten die enthaltenen Anteile von Sekundärstrukturelementen berechnet (vgl. Tabelle 5.1).

Dabei scheint es tatsächlich so, als würde bei gebundenem Heparin die bappS4-Struktur weniger Anteile an Zufallsfaltung haben, aber dafür mehr Anteile an  $\alpha$ -helikalen Strukturen. Nun kann es zum Einen sein, dass sich mehr  $\alpha$ -helikale Strukturen bei gebundenem Heparin ausbilden, oder aber, dass sich die vorhandenen  $\alpha$ -helikalen Strukturen in der Bindung mit Heparin fester formieren und so den Anschein einer mehr  $\alpha$ -helikalen Struktur erwecken.





**Abbildung 5.4:** Circular Dichroismus Spektrum des reinen bappS4-Proteins (blau) überlagert mit dem Spektrum von bappS4 mit gebundenem Heparin (rot). Es handelt sich um eine rein  $\alpha$ -helikale Struktur, sichtbar an den Minima bei 210 und 220 nm sowie dem Maxima bei 215 nm. Die tieferen Minima des Spektrums von bappS4 mit gebundenem Heparin (rot) lassen in dieser Struktur höhere Anteile an  $\alpha$ -helikalen Elementen vermuten. Konzentrationsbedingte Effekte konnten ausgeschlossen werden.

**Tabelle 5.1:** Basierend auf den CD-Spektra berechnete Sekundärstrukturelemente für die C-terminale  $\beta$ APP-Ektodomänenhälfte mit und ohne gebundenem Heparin

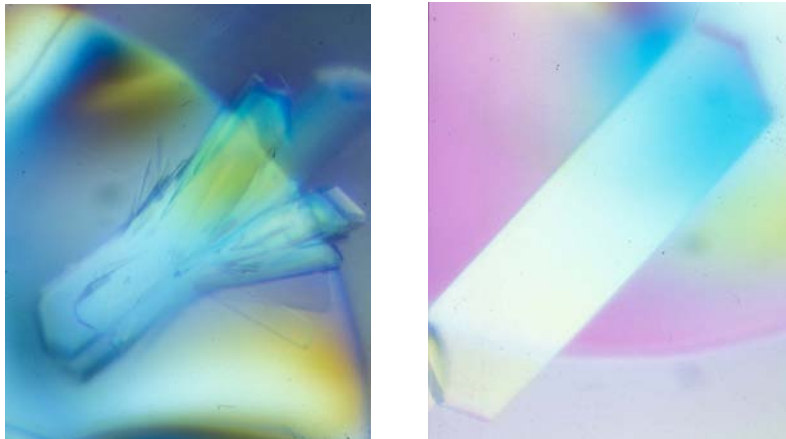
	bappS4 (200- 260nm)	bappS4 + Hep (200- 260nm)	bappS4 (205- 260nm)	bappS4 + Hep (205- 260nm)	bappS4 (210- 260nm)	bappS4 + Hep (210- 260nm)
Helix	68,9%	89,1%	73,9%	88,5%	76,6%	88,9%
Antiparallel	1,2%	0,2%	1,3%	0,2%	1,5%	0,2%
Parallel	3,8%	2,8%	4,5%	3,3%	4,7%	3,5%
Beta-Turn	14,3%	6,5%	9,1%	3,3%	8,6%	3,3%
Rndm.	17,5%	6,2%	11,7%	3,1%	12,3%	3,2%
Coil						

Eine zusätzlich angefertigte Schmelzkurve zeigte, dass das bappS4-Protein mit gebundenem Heparin im Gegensatz zu der ungebundenen Probe bei erhöhter Temperatur nicht präzipitierte. Dies zeugt von einer erhöhten Stabilität und Hitzeresistenz des bappS4-Proteins mit gebundenem Heparin.

### 5.1.5 Kristallisation und Charakterisierung der Kristalle

Die Kristallisation von bappS4 wurde nach der Sitztropfenmethode durchgeführt. Dazu wurde die Proteinkonzentration auf 10 mg/ml in 5 mM Tris und 150 mM NaCl bei einem pH von 8,0 eingestellt und diverse Kristallisationsansätze mit dem Roboter und per Hand pipettiert. Nach bereits zwei Tagen entstanden verwachsene Kristalle innerhalb der Pufferbedingung 0,1 M Phosphat-Citrat, 10 % Isopropanol und 0,2 M Lithiumsulfat bei einem pH von 4,2. Eine Optimierung der Pufferbedingung zu einem pH von 4,0 resultierte in Einkristallen mit einer maximalen Kantenlänge von 400  $\mu\text{m}$  x 100  $\mu\text{m}$  x 100  $\mu\text{m}$  (vgl. Abbildung 5.5). Als Kryoprotektanz wurde 30 % (v/v) PEG300 verwendet. Die Kristallform ließ sich der primitiv tetragonalen Raumgruppe P4 zuordnen. Es wurden 2 Moleküle in der asymmetrischen Einheit bestimmt, wobei der Matthews-Parameter 2,2  $\text{\AA}^3/\text{Da}$  betrug. Dies entspricht einem Solvensgehalt von 44 % (Matthews, 1968).





(a) verwachsener Einkristall  
von bappS4

(b) optimierter Einkristall  
von bappS4

**Abbildung 5.5:** Auf der linken Seite ein verwachsener bappS4-Kristall, der mithilfe von Puffer-Optimierung zu einem Einkristall (rechts) mit ca.  $400\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$  Kantenlänge verbessert werden konnte.

Die Kristallisation des SeMet-bappS4-Proteins konnte mit derselben Pufferbedingung reproduziert werden, wobei wie bei der Reinigung auch hier ein Tropfen DTT an den Rand des Kristallisationswells pipettiert wurde, um eine Oxidation des Selen zu verhindern.

### 5.1.6 Kristallographische Datensammlung

Vor der Sammlung der vollständigen Datensätze mit Hilfe von Synchrotron-Strahlung wurden von allen Kristallen zur Ermittlung des Diffraktionsvermögens einzelne Aufnahmen von verschiedenen Kristallorientierungen auf einer Röntgenanlage mit  $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung (Rigaku, hausinterne Röntgenanlage) unter Cryo-Bedingungen gemacht. Anhand der erhaltenen Reflexmuster wurden Anisotropie und Auflösungsgrenze der Streuung eines jeden Kristalls beurteilt. Die besten Kristalle wurden dann an der *beamline* BW6 am deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) bei 100 K im Stickstoffstrom vermessen. Zur Strukturlösung mit multipler anomaler Dispersion (MAD) wurden Datensätze bei drei unterschiedlichen Wellenlängen am selben bappS4-SeMet-Kristall aufgenommen. Die Wellenlängen waren zuvor durch eine Fluoreszenz-Messung des Kristalls bestimmt worden. Der *peak*-Datensatz (Maximum von  $f''$ ) wurde als erster bei  $\lambda=0.9787\ \text{\AA}$  gemessen, anschließend der *inflection point*- bzw. *edge*-Datensatz (Minimum von  $f'$ ) bei  $\lambda=0.9790\ \text{\AA}$ . Als dritter Datensatz wurde ein *high energy remote*-Datensatz bei  $\lambda=0.92\ \text{\AA}$  aufgenommen. Zusätzlich zu den Selenomethioninkristallen wurden *gesoakte* Kristalle mit über 50 verschiedenen Schwermetallen vermessen. An dieser Stelle sei nur der Kristall mit gebundenem Ammoniumtetrachloro-Osmat  $(\text{NH}_4)_2\text{OsCl}_6$  genannt, mit dem letztendlich phasiert wurde. Dieser Kristall wurde nach einer Fluoreszenz-Messung bei der *peak*-Wellenlänge  $\lambda=1,13985\ \text{\AA}$  und der *inflection-point*-Wellenlänge  $\lambda=1,14040\ \text{\AA}$  vermessen. Zusätzlich wurde auch hier ein *high energy remote*-Datensatz bei  $\lambda=1.137\ \text{\AA}$  aufgenommen. Alle gemessenen Daten wurden mit dem HKL2000-Programmpaket (Otwinowski & Minor, 1997) sowie MOSFLM (Leslie, 1999) ausgewertet und skaliert. Tabelle 5.2 zeigt die Statistiken des nativen Datensatzes und der Datensätze des mit  $(\text{NH}_4)_2\text{OsCl}_6$  gesoakten bappS4-Kristalls, der zur Phasierung der Struktur herangezogen wurde. Daraus geht hervor, dass sich die Achsen der Kristalle nur unwesentlich unterscheiden (<1% Unterschied). Dies ist eine wichtige Voraussetzung für eine mögliche Phasenerweiterung der experimentellen Phasen aus der MAD-Messung auf den nativen Datensatz.

Tabelle 5.2: Statistiken der Datensammlung der bappS4-Kristalle

Datensatz	bappS4 nativ	$(\text{NH}_4)_2\text{OsCl}_6$ <i>peak</i>	$(\text{NH}_4)_2\text{OsCl}_6$ <i>edge</i>	$(\text{NH}_4)_2\text{OsCl}_6$ <i>remote</i>
Raumgruppe		P4 <sub>1</sub>		
Moleküle pro asymmetrischer Einheit		2		
<b>Datensammlung</b>				
Zellkonstanten				
a=b (Å)	100,65		100,81	
c (Å)	46,05		45,94	
$\alpha = \beta = \gamma$ (°)	90	90	90	90
Auflösung (Å) <sup>a</sup>	20-2,1 (2,13- 2,10)	20-2,5 (2,53- 2,50)	20-2,5 (2,53- 2,50)	20-2,5 (2,53- 2,50)
Anzahl der Reflexe				
gemessen	77682	85452	87028	87152
unabhängig	26655	30437 <sup>b</sup>	30879 <sup>b</sup>	30963 <sup>b</sup>
Vollständigkeit (%) <sup>a</sup>	97,7 (98,1)	97,4 (99,5) <sup>b</sup>	98,5 (99,3) <sup>b</sup>	98,7 (99,4) <sup>b</sup>
$R_{\text{merge}}$ (%) <sup>ac</sup>	6,1 (45,9)	6,9 (41,4) <sup>b</sup>	7,0 (41,0) <sup>b</sup>	7,0 (42,0) <sup>b</sup>
$\langle I \rangle / \langle \sigma \rangle$ <sup>a</sup>	12,5 (2,3)	12,1 (2,7) <sup>b</sup>	12,2 (2,6) <sup>b</sup>	12,1 (2,6) <sup>b</sup>
Wellenlänge (Å)	1,05	1,13985	1,14040	1,137
$f'$ (e <sup>-</sup> )		-11,1	-30,9	-12,1
$f''$ (e <sup>-</sup> )		27,0	15,9	9,8

<sup>a</sup> Werte in Klammern entsprechen der höchsten Auflösungsschale.

<sup>b</sup> Für die MAD-Datensätze wurden die Friedelpaare als unabhängig betrachtet.

<sup>c</sup>  $R_{\text{merge}} = \sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i I_i(h)$ .

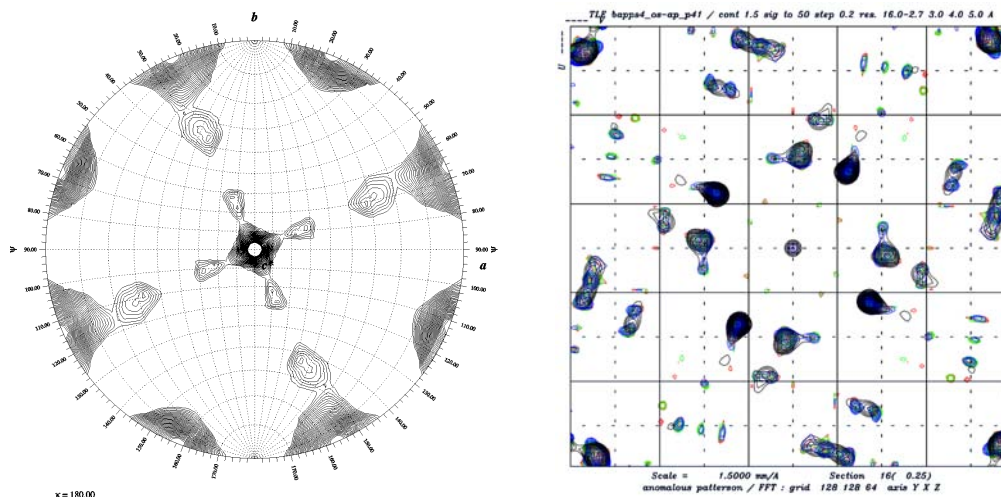
### 5.1.7 Strukturlösung

#### MAD-Phasierung

Die Datensätze wurden mit dem HKL Programmpaket (Otwinowski & Minor, 1997) sowie MOS-FLM (Leslie, 1999) prozessiert und skaliert. Initiale Versuche, das Phasenproblem mit den Datensätzen der Selenkristalle zu lösen, führten leider zu keinem Erfolg; die Selen-Positionen waren nicht bestimmbar. Dies könnte daran gelegen haben, dass 18 Selen (9 Methionine im Monomer und 2 Moleküle in der asymmetrischen Einheit) aufgrund der Menge nicht mehr gut bestimmbar sind. Daher wurden parallel zu weiteren Auswertungsversuchen neue Kristallisationsansätze pipettiert und die bappS4-Kristalle mit über 50 verschiedenen Schwermetallen in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt. Gebundenes Schwermetall zeigte sich nur bei bappS4-Kristallen, die über Nacht in Puffer mit 5 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{OsCl}_6$  inkubiert wurden. Daher wurden die Osmium-Datensätze für die Phasierung verwendet, während die nativen Datensätze mit den SeMet-Kristallen aufgenommen wurden, da diese im Vergleich zu den nativen bappS4-Kristallen ein besseres Streuverhalten zeigten. Eine mit dem Programm GLRF (Tong & Rossmann, 1990) berechnete Selbstrotation zeigte zusätzlich zu der kristallographischen Vierfach-Symmetrieachse eine lokale Zweifach-Achse auf der xy-Ebene, 22° von der x-Achse entfernt (vgl. Abbildung 5.6).

Aufgrund der recht kurzen z-Achse konnten nur einige wenige 00*l* Reflexe erkannt werden, was keine klare Unterscheidung der Raumgruppe zwischen P4, P4<sub>1/3</sub> oder P4<sub>2</sub> möglich machte. Die weiteren Berechnungen wurden daher in allen Raumgruppen parallel durchgeführt. Mit Suchmethoden innerhalb des realen Patterson-Raums konnte mit dem Programm RSPS (CCP4) und den anomalen Differenz-Daten des *peak*-Datensatzes von Osmium eine hoch besetzte Schwermetallposition bestimmt werden. Die Harker Plots von anomalen Differenz-Patterson-Mappen bei  $w=0$ ,  $w=\frac{1}{4}$  und  $w=\frac{1}{2}$  zeigten ausschließlich in der Harker Sektion von  $w=\frac{1}{4}$  einen starken *peak*, was auf eine Raumgruppe P4<sub>1</sub> bzw. P4<sub>3</sub> hindeutete (vgl. Abbildung 5.6). Dementsprechend zeigten die Real-Raum Patterson-Suche mittels dem Programm RSPS (CCP4) eine klare Lösung, entsprechend einer Osmium-Position in der Raumgruppe P4<sub>1</sub>, dagegen nicht in P4 und P4<sub>2</sub>. Durch Verfeinerung dieser bestimmten Osmium-Position und Verwendung aller drei Osmiumdatensätze konnte schließlich mit den Programmen MLPHARE (Otwinowski, 1991) und SHARP (De La Fortelle and Bricogne, 1997) experimentelle Phasen berechnet werden. Diese ergaben einen *figure of merit*-Wert von 0,43 (20-2,7 Å, FOM=0,53 für die letzte Auflösungsschale 3,44-3,99 Å) mit einem recht hohen Temperaturfaktor von 110 Å<sup>2</sup>.

Die initialen Phasen wurden weiter durch *solvent flattening* mit den Programmen DM (CCP4) und SOLOMON (Abrahams and Leslie, 1996) verbessert. Schließlich konnten anomale Differenzdichten mit den Programmen FFT und PEAKMAX (CCP4) erstellt und weiter analysiert werden. Die initialen Dichten waren von sehr guter Qualität, wobei die P4<sub>1</sub>-Dichte deutlich besser war als die P4<sub>3</sub>-Dichte, weshalb mit dieser weitergearbeitet wurde.

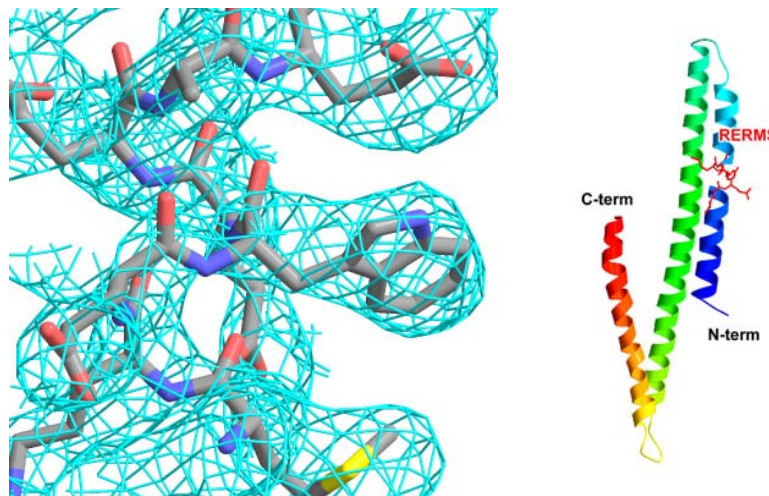


**Abbildung 5.6:** Selbstrotation und Harker Plot der bappS4-Datensätze. Links: Selbstrotation der Osmiumdatensätze von bappS4. Deutlich erkennbar ist eine zusätzlich zur kristallographisch vertretenen Vierfach-Symmetrieachse auftretende Zweifach-Achse. Rechts: Harker Plot, deutlich sichtbar die *peaks* von gebundenem Osmium.

## Modellbau

In Übereinstimmung mit der Sekundärstrukturvorhersage (vgl. Abbildung 5.1) und CD-Messungen (vgl. Abbildung 5.4) waren in der Dichte nur  $\alpha$ -helikale Strukturen erkennbar. Für den initialen Modellbau wurden mit Hilfe des interaktiven Grafikprogramms MAIN (Turk, 1992) mehrere Polyalaninketten in die initiale Elektronendichtekarte modelliert. Anschließend wurde ein gut definiertes Tryptophan als Startpunkt für den manuellen Aminosäure-Einbau bestimmt und im Falle von guter Elektronendichte wurden die Alanine der vorab hineingelegten Polyalaninkette durch Aminosäure-Reste, entsprechend der Sequenz, ausgetauscht (vgl. Abbildung 5.7). Auf die-

sem Weg konnte eines von zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit teilweise fertig gestellt werden. Es entstand ein initiales Modell des bappS4-Konstruktes, bestehend aus 3  $\alpha$ -Helices, die jeweils mit einer Haarnadel-Kehre miteinander verbunden sind (vgl. Abbildung 5.7).



**Abbildung 5.7:** Initiale Dichte und initiales Modell des bappS4-Proteins. Die initiale Dichte (links) guter Qualität, die aus der Osmiumphasierung des bappS4-Kristalls berechnet werden konnte, führte schließlich zu einem initialen Modell der CAPPD Domäne von  $\beta$ APP (rechts). Dieses besteht aus 3 langen  $\alpha$ -Helices, die durch Haarnadelkehren miteinander verbunden sind. In der Mitte der ersten  $\alpha$ -Helix ist die in der Literatur beschriebene RERMS-Sequenz als stick-Modell dargestellt.

## Verfeinerung

Weder eine Verfeinerung noch *solvent flattening* konnten die initiale Dichte wesentlich verbessern und erweitern. So blieb bis zum Ende das zweite Molekül in der asymmetrischen Einheit nicht sichtbar, und das initiale bappS4-Modell konnte nicht verfeinert werden. Auch diverse Versuche, das fehlende zweite Molekül mit dem bereits fertig gebauten ersten Molekül als molekularen Ersatz in der Einheitszelle mithilfe des Programms AMORE (CCP4) zu suchen, schlugen fehl. Hierfür wurde sowohl das gesamte Molekül als auch nur Teilstücke des Modells gesucht, wobei alle Berechnungen ähnliche Ergebnisse von sich gegenseitig überlappenden Molekülen, lieferten. Das initiale bappS4-Modell zeigt 3 lange Helices, bestehend aus 1015 Atomen in 132 Resten, die von 207 erwarteten inklusive Seitenketten gebaut wurden. In der Mitte der ersten Helix findet sich die mehrfach in der Literatur beschriebene RERMS-Sequenz (vgl. Abbildung 5.7). Zusätzlich zu diesem Modell waren auch noch einige Segmente einer weiteren Polyalaninkette sichtbar, wodurch sich die Gesamtzahl der definierten Atome auf 1401 in insgesamt 205 Resten erhöhte. Bei dieser halbtransparenten Polyalaninkette könnte es sich um einen Teil des zweiten Moleküls in der asymmetrischen Einheit handeln. Auf der Suche nach dem Grund für die Unvollständigkeit fällt bei Betrachtung der SHARP-Ergebnisse auf, dass zwar mehrere positive Schwermetall-Positionen gefunden wurden, dass aber zu diesen Ergebnissen auch jeweils eine negative Position gefunden wurde (vgl. Abbildung 5.8). Dies lässt eine multiple Orientierung des zweiten bappS4-Moleküls in den Kristallen vermuten. Zu dieser Theorie würde auch der mit über 100 recht hohe B-Faktor des gefundenen Osmium-Ions passen.

Peak	Height [rms]	Coordinates (fractional)			Coordinates (orthogonal)			[0]	[1]	[2]	[3]	[4]	Remark
1	12.85	0.3562	0.0085	0.2500	35.91	0.85	11.49	☺	☺	☺	☺	☺	2.99 Å from G-SITE-01 = C-SITE-01
2	11.99	0.3491	0.9509	0.2500	35.20	95.88	11.49	☺	☺	☺	☺	☺	2.86 Å from G-SITE-01 = C-SITE-01
3	-11.55	0.9927	0.6265	0.0000	100.09	63.17	0.00	☺	☺	☺	☺	☺	2.50 Å from G-SITE-01 = C-SITE-01
4	-11.55	0.3735	0.9927	0.2500	37.66	100.09	11.49	☺	☺	☺	☺	☺	2.50 Å from G-SITE-01 = C-SITE-01
5	-9.06	0.9681	0.6671	0.0000	97.61	67.26	0.00	☺	☺	☺	☺	☺	2.29 Å from G-SITE-01 = C-SITE-01
6	8.87	0.3552	1.0000	0.2500	35.81	100.82	11.49	☺	☺	☺	☺	☺	2.13 Å from G-SITE-01 = C-SITE-01
7	8.86	0.3168	0.9819	0.2500	31.94	99.00	11.49	☺	☺	☺	☺	☺	3.64 Å from G-SITE-01
8	-8.84	0.3766	0.0000	0.2500	37.97	0.00	11.49	☺	☺	☺	☺	☺	3.20 Å from G-SITE-01
9	-8.30	0.3343	1.0000	0.2500	33.70	100.82	11.49	☺	☺	☺	☺	☺	2.82 Å from G-SITE-01 = C-SITE-01
10	-8.30	0.3343	0.0000	0.2500	33.70	0.00	11.49	☺	☺	☺	☺	☺	2.82 Å from G-SITE-01 = C-SITE-01
11	8.10	0.3878	0.9738	0.2500	39.09	98.18	11.49	☺	☺	☺	☺	☺	3.56 Å from G-SITE-01
12	-6.86	0.2987	0.3977	0.0000	30.12	40.09	0.00	☺	☺	☺	☺	☺	36.51 Å from G-SITE-01
13	6.35	0.0979	0.6387	0.2500	9.87	64.40	11.49	☺	☺	☺	☺	☺	16.63 Å from G-SITE-01
14	5.87	0.9415	0.0693	0.2353	94.93	6.99	10.82	☺	☺	☺	☺	☺	37.44 Å from G-SITE-01
15	5.45	0.0164	0.2308	0.2500	1.65	23.27	11.49	☺	☺	☺	☺	☺	16.84 Å from G-SITE-01
16	5.21	0.9380	0.9333	0.0000	94.57	94.10	0.00	☺	☺	☺	☺	☺	29.14 Å from G-SITE-01

**Abbildung 5.8:** Mithilfe des Programms SHARP gefundene Schwermetallpositionen. Deutlich erkennbar ist, dass zu jeder gefundenen Schwermetallposition eine negative Gegenposition gefunden wurde. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine Fehlordnung innerhalb des Kristalls.

## 5.2 N-terminale Hälfte der $\beta$ APP-Ektodomäne (bappS3)

### 5.2.1 Klonierung und Expression

Die N-terminale Hälfte der  $\beta$ APP-Ektodomäne wurde entsprechend der Beschreibung für die C-terminale Hälfte kloniert. Auch bei diesem Konstrukt (bappS3) wurde ein Histidin-tag angehängt, um eine erleichterte Reinigung zu ermöglichen. Nach einer positiv ausgefallenen Kontrolle der Sequenzierungsdaten wurde auch in diesem Fall, parallel zu dem C-terminalen Konstrukt, Expressionstests in den *E.coli*-Stämmen *BL21(DE3)pRIL* sowie *Rosetta(DE3)* angeschlossen. In beiden Fällen war weder bei einer Expression bei 37 °C noch bei Raumtemperatur die Überexpression des Zielproteins auf dem Coomassie-Gel sichtbar. In der N-terminalen Hälfte der  $\beta$ APP-Ektodomäne finden sich 12 Cysteine, und die Struktur der GFLD zeigt, dass dieser Bereich mehrere Disulfidbrücken in seiner Faltung aufweist (Rossjohn et al., 1999). Cytosolische Bakterienproteine besitzen keine Disulfidbrücken, daher kommt es bei einer Expression von Proteinen, die Cysteine enthalten, oft zu Schwierigkeiten. Meist bleibt nur der Ausweg in Form von Einschlußkörpern zu exprimieren und anschließend eine geeignete Rückfaltungsbedingung zu suchen oder aber auf ein eukaryotisches oder periplasmatisches Expressions-System auszuweichen. Beide Varianten gestalten sich als aufwendig, und so ist die Möglichkeit, ein Protein löslich in *E.coli*-Bakterien anzuziehen, in jedem Fall vorzuziehen. Daher wurde noch ein weiterer Expressionstest in dem *E.coli*-Bakterienstamm *OrigamiB(DE3)* von Novagen durchgeführt. Dieser Stamm besitzt Mutationen innerhalb der Gene der Thioredoxin-Reduktase (*trxB*) sowie der Glutathion-Reduktase (*gor*), weshalb es zu einer Änderung des Redox-Potentials im Cytosol kommt und die Bildung von Disulfidbrücken in vielen Fällen mit sehr viel höherer Wahrscheinlichkeit ermöglicht wird. Das bappS3-Konstrukt konnte auf diesem Weg tatsächlich überexprimiert werden. Expressionstests bei verschiedenen Temperaturen ergaben, dass das Protein zwar sowohl bei 37 °C als auch bei RT in Form von Einschlußkörpern exprimiert wurde, aber zu geringem Teil auch in löslicher Form vorlag. Eine RT-Expression konnte den Anteil an löslichem Material noch erhöhen, und auch eine Inkubation über Nacht brachte ein noch besseres Ergebnis. Daher wurde im Folgenden bei RT über Nacht exprimiert und anschließend mit dem löslich exprimierten bappS3-Protein weitergearbeitet.



### 5.2.2 Reinigung

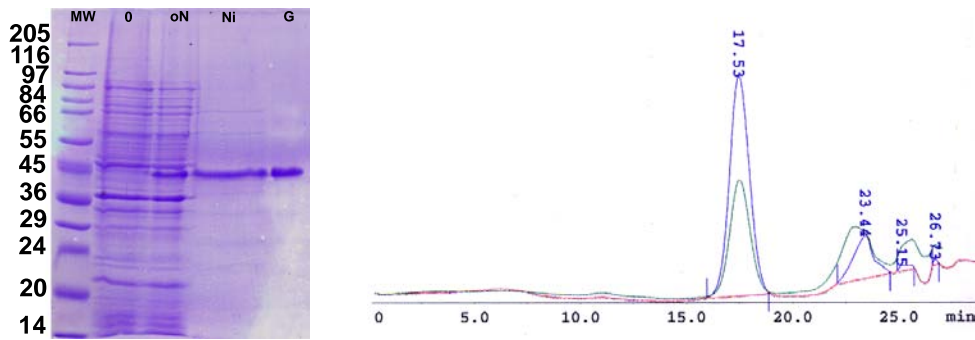
Das überexprimierte Material wurde am Morgen nach der Induktion durch Zentrifugation geerntet und das Pellet in Bindepuffer (20 mM Phosphatpuffer, pH 7,2, 500 mM NaCl) wieder resuspendiert. Da sich das bappS3-Konstrukt über eine normal übliche NiNTA-Säule, wie sie im Fall des bappS4-Konstruktes verwendet wurde, nur ungenügend aufreinigen ließ, wurde in diesem Fall eine Ni-Sepharose-FF-Säule für den ersten Reinigungsschritt verwendet. Der Aufschluß der Zellen erfolgte mittels Ultraschall. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde der Überstand auf die mit Bindepuffer äquilibrierte Ni-Sepharose-FF-Säule per Schlauchpumpe aufgetragen. Dieses Säulenmaterial bindet verglichen mit dem Ni-NTA-Material sehr viel spezifischer an Histidin, und daher können auch nur schwach bindende *His-tag*-Proteine über dieses Säulenmaterial sehr gut aufgereinigt werden. Die Säule wurde anschließend mit Bindepuffer gewaschen, bis der Detektor wieder die Basislinie erreichte und es folgte ein Waschschrift mit Bindepuffer und 50 mM Imidazol. Dadurch wurden unspezifisch gebundene Protein wieder entfernt. Schließlich wurde das bappS3-Konstrukt mit 500 mM Imidazol eluiert. Um letzte Rückstände noch zu entfernen, wurde das Protein auf 10 mg/ml aufkonzentriert und abschließend auf eine Gelfiltrationssäule S200 aufgetragen. Der Elutionspeak wurde vereinigt und für weitere Experimente wieder auf 10 mg/ml einkonzentriert. Die Ausbeute an reinem Protein betrug weniger als 0,5 mg pro Liter Kulturmedium. Einen Überblick über die Expression und Reinigung des bappS3-Konstruktes bietet das SDS-Gel in Abbildung 5.9.

### 5.2.3 Biochemische Charakterisierung des bappS3-Proteins

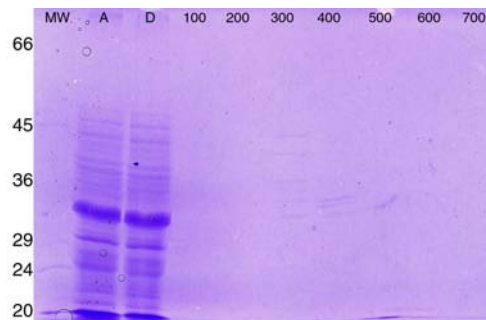
Eine SDS-PAGE-Analyse des bappS3-Fragments zeigte, dass das Protein entsprechend dem erwarteten Molekulargewicht von ca. 32 kDa lief. Das Protein wurde zusätzlich auch per N-terminalem Edman-Abbau ansequenziert und als das Zielprotein bestätigt. Die Masse des Proteins wurde schließlich auch noch mit Hilfe von Massenspektroskopie verifiziert und mit der theoretisch berechneten Masse verglichen. Zur genaueren Analyse des Molekulargewichts der eluierten Probe wurde auch eine analytische Gelfiltration durchgeführt (vgl. Abbildung 5.9). Hierzu wurde die Gelfiltrationssäule Sephadex 200, wie bereits für das bappS4-Konstrukt beschrieben, mit einem Standard der Firma BioRad geeicht. Es wurde ein Wert von 100 kDa für das bappS3-Fragment ermittelt. Da das klonierte Monomer ein Molekulargewicht von 32 kDa besitzt, ist hier von einem Laufverhalten als Dimer oder sogar Trimer auszugehen. Allerdings bleibt zu bedenken, dass eine derartige Molekulargewichtsbestimmung sowohl von Interaktionen zwischen Protein und Säulenmatrix als auch vom hydrodynamischen Radius des Proteins abhängt. Um eine definitive Aussage darüber treffen zu können, steht eine Ultrazentrifugation noch aus.

### 5.2.4 Heparinbindung

In der Literatur sind für die  $\beta$ APP-Ektodomäne mehrere Heparinbindedomänen beschrieben (Clarris et al., 1997; Rossjohn et al., 1999). Um die N-terminale Hälfte der  $\beta$ APP-Ektodomäne auf ihr Heparin-Bindungsvermögen zu testen, wurde das Protein auf eine Heparinsäule von Pharmacia aufgetragen. Obwohl auch für den N-terminalen Bereich Heparinbindestellen beschrieben wurden, ergab sich überraschenderweise keine Bindung des bappS3-Proteins an die Heparin-gebundene Säulenmatrix. Eine SDS-PAGE Analyse des Experimentes zeigt deutlich, dass das Protein komplett im Durchlauf wiederzufinden war und somit gar nicht an die exponierten Glykane gebunden hatte (vgl. Abbildung 5.10). Daher wurden in diese Richtung auch keine weiteren biochemischen Studien durchgeführt.



**Abbildung 5.9:** Reinigungsüberblick und analytische Gelfiltration des bappS3-Proteins. Links: Coomassiegefärbtes SDS-Polyacrylamidgel; MW: Proteinmarker, 0: uninduziert, oN: induziert, Ni: Elution der Ni-NTA-Säule, G: Elution der Gelfiltration. Rechts: Chromatogramm der analytischen Gelfiltration von bappS3. Das Protein eluiert nach Abtrennung der Aggregate hochrein in Form eines homogenen *peaks* mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 100 kDa.



**Abbildung 5.10:** Heparinbindetest des bappS3-Proteins. MW: Proteinmarker, A: Auftrag, D: Durchfluss, 100-700: mM Konzentration von NaCl.

## 5.2.5 Kristallisation

Das homogen aufgereinigte bappS3-Protein wurde wie bereits für das bappS4-Konstrukt beschrieben in Kristallisationsansätzen mit dem Roboter pipettiert. Aufgrund der geringen Proteinausbeute wurde in diesem Fall auf das Pipettieren per Hand verzichtet. Es wurde die Sitztropfenmethode angewendet, wobei jeweils 100  $\mu$ l Reservoirpuffer ins *well* gegeben wurden und 200 nl Protein mit der gleichen Menge Reservoirpuffer vermischt wurden. Bis heute konnte allerdings noch keine Kristallisationsbedingung gefunden werden.

## 5.3 gesamte $\beta$ APP-Ektodomäne (bappS1)

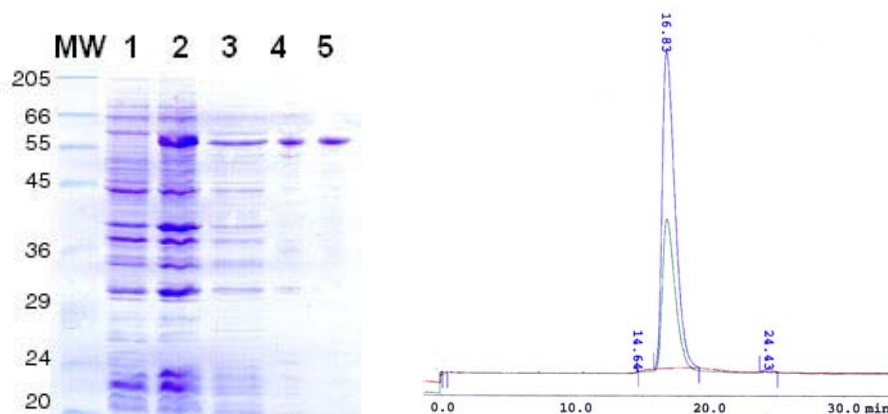
### 5.3.1 Expression

Das Konstrukt bappS1-NC wurde aufgrund von Sekundärstrukturvorhersagen so gewählt, dass es eine wahrscheinlich kompakt gefaltete N-terminale Domäne ohne einen potentiell flexiblen Linker am C-Terminus umfasst. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die gesamte Ektodomäne zusammen mit dem Linker eine gefaltete Einheit bildet. Das bappS1-Konstrukt wurde in den *E.coli*-Bakterienstämmen *Rosetta(DE3)* und *BL21(DE3)pRIL* auf Expression getestet, aber in beiden Fällen ergab sich weder bei 37 °C noch bei Raumtemperatur eine auf dem Coomassie-Gel sichtbare Expression. Das Vollängen-Konstrukt beinhaltet ebenso wie bereits das bappS3-Konstrukt 12 Cysteine im N-terminalen Bereich der Sequenz. Auch hier ergab die Expression mit dem *E.coli*-Stamm *OrigamiB(DE3)* eine deutliche Überexpression des Vollängenkonstruktes,

wobei ein anschließender Löslichkeitstest zeigte, dass nahezu alles in Form von Einschlusskörpern exprimiert wurde. Eine Expression bei Raumtemperatur machte allerdings zumindest einen Teil des Materials in löslicher Form verfügbar. Daher erfolgte die Expression bei Raumtemperatur in *Origami B(DE3)*-Zellen. Da sich bei einer Inkubation über Nacht noch eine gesteigerte Expression zeigte, wurden die Zellen jeweils erst am Morgen nach der Induktion geerntet.

### 5.3.2 Reinigung

Im Gegensatz zu den beiden Hälften der  $\beta$ APP-Ektodomäne besitzt das bappS1-Konstrukt keinen angehängten *His-tag*, weshalb bei der Reinigung andere Strategien eingesetzt wurden. Es zeigte sich aber als sehr vorteilhaft, dass das Vollängenkonstrukt einige Bindedomänen besitzt, die zur Aufreinigung genutzt werden konnten. Dazu wurde das Protein zunächst in 10 mM Phosphatpuffer, pH8, auf eine im gleichen Puffer (Bindepuffer) äquilibrierte 5 ml Heparinsäule von Pharmacia aufgetragen. Die Säule wurde nach dem Auftrag weiter mit Bindepuffer gespült, bis sich die Absorption wieder auf der Basislinie einpendelte. Dann wurde die Säule mit 10 mM Phosphatpuffer, pH8 und 1 M NaCl mit einem Gradienten von 1,5% pro Säulenvolumen gespült und das bappS1-Protein schließlich eluiert. Auf diesem Weg wurde das Protein schon zu einem Großteil angereichert, und die Existenz der Heparinbindedomäne konnte aufgrund der festen Bindung an das Säulenmaterial ebenfalls bestätigt werden. Das angereicherte bappS1-Protein wurde anschließend noch auf einer mit Kupfer beladenen Metallsäule (IMAC) von Amersham Pharmacia mit 1 ml Säulenvolumen weiter aufgereinigt, und die letzten Rückstände wurden mittels einer S200-Gelfiltrationssäule abgetrennt. Das SDS-PAGE-Gel in Abbildung 5.11 zeigt sehr deutlich die Überexpression, sowie die einzelnen Schritte der Reinigung, die in sauberem bappS1-Material resultierte. Eine analytische Gelfiltration zeigt, dass das Protein hochrein in Form eines homogenen *peaks* bei einem scheinbaren Molekulargewicht von 190 kDa eluierte (vgl. Abbildung 5.11).



**Abbildung 5.11:** Reinigungsüberblick und analytische Gelfiltration des bappS1-Proteins. Links: Coomassiegefärbtes SDS-Polyacrylamidgel, MW: Proteinmarker, 1: uninduziert, 2: induziert, 3: Elution der Heparinsäule, 4: Elution der Cu-Säule, 5: Elution der Gelfiltration. Rechts: Chromatogramm der analytischen Gelfiltration nach Abtrennung von Aggregaten. Das Protein eluierte hochrein in Form eines homogenen *peaks* bei einem scheinbaren Molekulargewicht von 190 kDa.

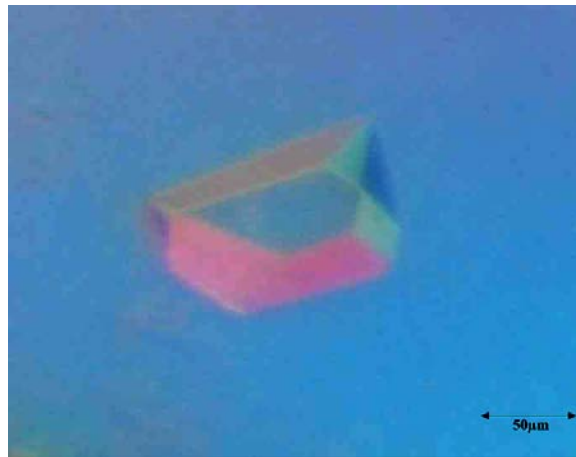
### 5.3.3 Kristallisation und Charakterisierung der Kristalle

Die Kristallisation von bappS1 wurde nach der Sitztropfenmethode durchgeführt. Dazu wurde die Proteinkonzentration auf 10 mg/ml in 5 mM Tris und 150 mM NaCl bei einem pH von 8,0 eingestellt und diverse Kristallisationsansätze mit dem Roboter und per Hand pipettiert. Nach



zwei Wochen entstanden Einkristalle innerhalb der Pufferbedingung 0,1 M Hepes, 28 % PEG 400 und 0,2 M  $\text{CaCl}_2$  bei einem pH von 7,2. Diese Kristalle waren allerdings sehr klein und hatten nur eine maximale Kantenlänge von  $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$  (vgl. Abbildung 5.12).

Um die Kristallgröße zu erhöhen, wurden weitere Ansätze pipettiert mit erhöhter Proteinkonzentration, einem 2:1 Tropfenverhältnis, Variationen in Salz und Fällungsmittel des Puffers, sowie Additivscreens, allerdings ohne Erfolg. Auch sogenanntes *seeding*, bei dem ein gewachsener Kristall als Initiationskeim in einen neuen Protein/Pufferansatz überführt wird, brachte keine Vergrößerung der initialen Kristalle mit sich.

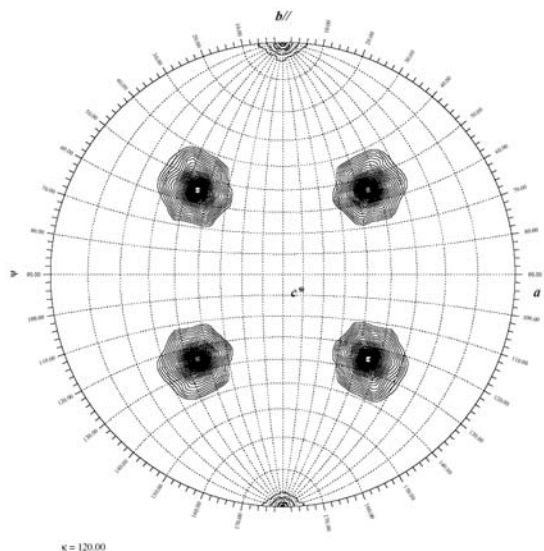


**Abbildung 5.12:** Kristall des bappS1-Proteins. Nach 2 Wochen entstanden die abgebildeten Kristalle mit maximalen Kantenlängen von  $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ .

### 5.3.4 Kristallographische Datensammlung

Die Kristalle waren für Messungen an der hausinternen Röntgenanlage zu klein und gaben kein Streumuster. Selbst an der Synchrotron-*beamline* BW6 am DESY in Hamburg konnte aufgrund des schlechten Streuverhaltens nur ein Datensatz bis  $3,5\ \text{\AA}$  aufgenommen werden. Eine Messung am ESRF in Grenoble ergab allerdings einen Datensatz bis  $2,1\ \text{\AA}$ . Dieser wurde für die weiteren Auswertungen genutzt. Die Datensätze wurden mit dem HKL 2000 Programmpaket (Otwinowski & Minor, 1997) sowie MOSFLM (Leslie, 1999) prozessiert und skaliert. Da die Kristalle der Raumgruppe I222 zuzuordnen waren, ergab sich eine innenzentrierte Symmetrie mit einer kristallographischen Symmetrie von 3 Zweifachachsen. Eine mit dem Programm GLRF (Tong & Rossmann, 1990) berechnete Selbstrotation zeigte zusätzlich eine Dreifachachse, weshalb von einem Vielfachen von drei Molekülen in der asymmetrischen Einheit auszugehen war (vgl. Abbildung 5.13).

Für eine genaue Bestimmung, wurde eine Matthews-Berechnung durchgeführt. Es ergab sich das überraschende Ergebnis, dass nur 1 Molekül mit einem Molekulargewicht von 55 kDa Platz in der asymmetrischen Einheit finden würde. Die Packung hätte dann einen Solvensgehalt von 40 % (Matthews, 1968). Dieses Ergebnis stand deutlich im Widerspruch zu der mittels Selbstrotation ermittelten Dreifachachse. Daher war es unmöglich, dass sich das komplette Vollängen-Konstrukt der  $\beta$ APP-Ektodomäne in der Kristallpackung befand.



**Abbildung 5.13:** Selbstrotation der bappS1-Datensätze. Die mit dem Programm GLRF berechnete Selbstrotation zeigt zusätzlich zu der kristallographischen Symmetrie von drei 2-fach Achsen eine additive Dreifachachse. Daher muß von einem Vielfachen von drei Molekülen in der asymmetrischen Einheit ausgegangen werden.

### 5.3.5 Biochemische Charakterisierung der $\beta$ APP-Ektodomäne

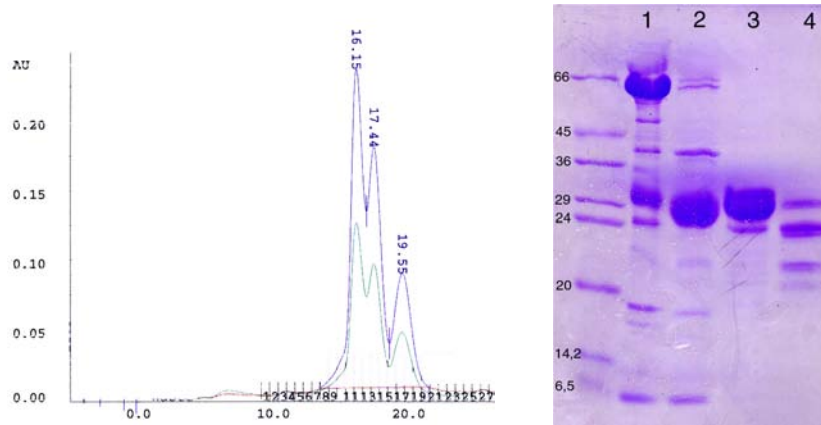
Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse standen weitere Versuche an, um zunächst die Kristalle weiter zu charakterisieren. Es wurden mehrere Kristalle aus dem *well* gefischt und in SDS-Probenpuffer aufgelöst. Eine darauffolgende SDS-PAGE ermittelte ein Protein mit einem Laufverhalten von ca. 20 kDa. Diese Probe wurde per Western Blot auf eine Membran übertragen und per N-terminalem Edman-Abbau ansequenziert, wobei sich die Startsequenz STPD AV ergab. Dies entspricht exakt der Startsequenz des C-terminalen Konstruktes bappS4. Aufgrund dieser Daten wurde eine proteolytische Segmentierung des Vollängenkonstrukts angenommen, die durch einen durchgeführten Abbautest überprüft wurde.

#### Abbautest und analytische Gelfiltration

Frisches bappS1-Protein wurde exprimiert und aufgereinigt. Nach Abtrennung der letzten bappS1-Aggregate mittels einer abschließenden Gelfiltration wurde die Homogenität des Proteins über eine analytische Gelfiltration bestätigt. Diese Probe wurde nach einer einwöchigen Inkubation bei 4 °C erneut mittels einer analytischen Gelfiltration überprüft. Dabei wurde ersichtlich, dass das bappS1-Protein mit der Zeit in drei Fragmente zerfiel (vgl. Abbildung 5.14).

Die unterschiedlichen *peaks* wurden jeweils in Fraktionen gesammelt und vereinigt, um eine biochemische Charakterisierung der einzelnen Fragmente zu ermöglichen. Ein Auftrag dieser Proben auf ein SDS-PAGE-Gel ergab ungefähre Laufhöhen von 55 kDa für das erste Eluat sowie ähnliche Laufhöhen von 25-30 kDa für die beiden folgenden *peaks*. Zusätzlich befanden sich im auslaufenden Bereich des letzten Eluats zwei weitere Banden von ca. 22 und 24 kDa Größe (vgl. Abbildung 5.14). Bei einem Vergleich der Molekulargewichte, die aus der SDS-PAGE abgeleitet werden konnten mit denen, die sich mithilfe einer Eichung der Gelfiltrationssäule mittels Standardproteinen ergaben, lassen sich folgende Ergebnisse festhalten.

Das Protein, das im ersten *peak* eluiert, scheint mit einem monomeren Molekulargewicht von ca. 55 kDa zu einer Oligomerisierung zu tendieren, da es die Gelfiltrationssäule mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 190 kDa durchläuft. Dieses Verhalten ist identisch mit dem ursprünglichen



**Abbildung 5.14:** Analytische Gelfiltration und SDS-PAGE zur Untersuchung der proteolytischen Segmentation von bappS1 Links: Analytische Gelfiltration des homogenen aufgereinigten bappS1-Proteins, nachdem es eine Woche bei 4 °C inkubiert wurde. Größen der Eluate: 190 kDa, 100 kDa sowie 40 kDa, Rechts: Coomassiegefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der einzelnen *peaks*. 1: erster *peak* (ca. 55 kDa) , 2: zweiter *peak* (ca. 25 - 30 kDa), 3: dritter *peak* (ca. 25 - 30 kDa), 4: auslaufendes Ende des dritten *peaks* (ca. 22 und 24 kDa).

bappS1-Konstruktes. In der Tat bestätigte ein Edman-Abbau den N-terminalen Sequenzstart MLEV, der dem Sequenzstart des bappS1-Konstruktes entspricht. Es handelt sich also bei dem ersten *peak* um das original eingesetzte bappS1-Konstrukt. Auch bei einem Vergleich der Molekulargewichte des im nächsten *peak* eluierenden Proteins scheint ein Oligomerisierungsverhalten vorzuliegen, da durch SDS-PAGE ein Monomer-Gewicht von 25 bis 30 kDa bestimmt wurde, das Protein bei der Gelfiltration allerdings entsprechend einer Größe von 100 kDa eluierte. Auch in diesem Fall wurde ein Edman-Abbau durchgeführt, der das Fragment als Teil von bappS1 verifizierte. Der ermittelte N-Terminus MLEV gleicht dem des vollständigen bappS1-Konstruktes, aufgrund des geringeren Molekulargewichtes ist in diesem Fall jedoch von der N-terminalen Hälfte der  $\beta$ APP-Ektodomäne auszugehen. Im letzten Fall stehen sich 25-30 kDa (SDS-PAGE) einem Molekulargewicht von 40 kDa (Gelfiltration) gegenüber, was auf ein monomeres Laufverhalten dieses Fragmentes hinweist. Der N-Terminus wurde mit TTTE bestimmt, welcher sich kurz vor dem klonierten N-Terminus des bappS4-Konstruktes befindet. In Übereinstimmung mit der durch SDS-PAGE bestimmten Größe handelt es sich in diesem Fall wahrscheinlich um die C-terminale Hälfte der  $\beta$ APP-Ektodomäne. Eine N-terminale Sequenzierung der beiden Banden, die am Ende des letzten *peaks* auftraten, ergab unterschiedliche Start-Sequenzen wie AVDK und STPD für die erste Bande. Diese Sequenzen finden sich am Übergang der N-terminalen Ektodomänenhälfte zur C-terminalen Ektodomänenhälfte - sowie für die zweite Bande MLEV (N-Terminus des bappS1-Konstruktes) und DGNA (6 Aminosäuren hinter dem bappS1-N-Terminus). Betrachtet man diese Ergebnisse genauer, so fallen einige Zusammenhänge auf. Zum Einen kann man anhand der Größen und N-Termini der verschiedenen Fragmente einen definierten Spaltbereich erkennen, der sich etwa in der Mitte der  $\beta$ APP-Ektodomäne befindet (vgl. Abbildung 5.1, rote Pfeile). Es ist bekannt, dass Proteasen bevorzugt in flexiblen Bereichen schneiden. Dazu gehören zum Beispiel zwei getrennte Domänen, die über einen flexiblen Linker miteinander verbunden sind. Geht man auch bei der  $\beta$ APP-Ektodomäne von verschiedenen, voneinander unabhängigen Domänen aus, die durch ein flexibles Teilstück verbunden sind, so könnten die vorliegenden Daten diese Theorie unterstützen. Ein Vergleich mit der mittels PSIPRED (Jones, 1999) erstellten Sekundärstrukturvorhersage bestätigt, dass das bappS1-Konstrukt in einer Region ohne vorhergesagte Sekundärstruktur gespalten wurde, während die N-terminale und C-terminale Hälfte scheinbar gut strukturiert sind (vgl. Abbildung 5.1). Zusätzlich liegt das APP-Protein neuronal und nicht-neuronal in zwei verschiedenen Formen vor. Bei der nicht-neuronalen Variante existiert zwischen

Exon 7 und 8 eine zusätzliche Protease-Inhibitor-Domäne vom Kunitz-Typ (KPI-Domäne). Ein derartiger Einschub einer zusätzlichen Domäne in eine Proteinstruktur unterstützt ebenfalls die Annahme, dass es sich um unabhängige Domänen handeln muß, da sonst eine zusätzlich eingefügte Domäne zu Problemen der Faltung oder Interaktion führen müsste. Die ermittelten Protease-Schnittstellen beim bappS1-Konstrukt sind übereinstimmend dazu rund um die Insertionsstelle der KPI-Domäne lokalisiert (vgl. Abbildung 5.1).

Desweiteren ist festzuhalten, dass sich auch das Oligomerisierungsverhalten konsistent darstellt. Das Vollängen-Konstrukt bappS1 zeigte bei der Gelfiltration Hinweise auf eine Oligomerisierung. Dieses Verhalten konnte auch bei dem N-terminalen Spaltfragment beobachtet werden. Übereinstimmend mit diesen Daten eluierte auch die klonierte N-terminale Ektodomänenhälfte bappS3 in Form eines Oligomers. Betrachtet man nun das C-terminale Spaltfragment, so scheint dieses ein monomeres Laufverhalten auf der Gelfiltrationssäule aufzuweisen. Dem entsprechend eluierte ebenfalls bereits die klonierte C-terminale Ektodomänenhälfte bappS4 in Form eines Monomers. Die Daten der Spaltfragmente allerdings basieren auf einer Molekulargewichtsbestimmung mittels Gelfiltration. Das bedeutet, dass die Möglichkeit von Interaktionen zum Säulenmaterial sowie die Abhängigkeit vom hydrodynamischen Radius besteht. Für das C-terminal klonierte bappS4-Konstrukt wurde das Monomer jedoch auch mittels Ultrazentrifugation verifiziert.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, dass die  $\beta$ APP-Ektodomäne wahrscheinlich aus zwei unabhängigen Domänen besteht (N-terminale und C-terminale Hälfte), die durch einen Linker miteinander verknüpft sind. Dies resultiert in einem höchst flexiblen Protein. Für das in der Literatur kontrovers diskutierte Oligomerisierungsverhalten scheint der N-Terminus der  $\beta$ APP-Ektodomäne verantwortlich zu sein, wobei noch weitere Daten für eine genaue Lokalisation des Oligomerisierungsursprungs ausstehen.

# 6 Ergebnisse – Carboxypeptidase N (CPN)

## 6.1 Klonierung, Expression und Reinigung

Die rekombinant aufgereinigte CPN wurde freundlicherweise bereitgestellt von Ervin Erdös und Randal Skidgel (Departments of Pharmacology and Anesthesiology, University of Illinois College of Medicine at Chicago, Illinois, USA). Die Klonierung, Expression und Reinigung erfolgte wie beschrieben in Quagraine et al, 2005 und soll hier nur kurz zusammengefasst werden. Die katalytische Domäne kodierende cDNA wurde in den Hefe-Expressions-Vektor pPIC9 (Invitrogen) kloniert und in den *Pichia pastoris*-Stamm *GS115* transformiert. Anschließend wurde die rekombinante CPN1 in Hefe exprimiert und durch Zentrifugation geerntet. Die Reinigung erfolgte über mehrere Fällungsschritte in gesättigtem Ammoniumsulfat, wobei das Pellet immer wieder in PBS-Puffer resuspendiert wurde. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde der Überstand auf eine butyl-Sepharose-Säule (Pharmacia) aufgetragen und die Protein enthaltenden Fraktionen wieder vereinigt und auf eine p-Aminobenzoylarginine-Sepharose-Affinitäts-Säule aufgetragen. Die eluierte CPN1 wurde abschließend über eine Gelfiltrationssäule Hiload 16/60 Superdex 200 gereinigt, um letzte Rückstände zu entfernen und die Aktivität der eluierten CPN1 wurde mit  $50 \mu\text{mol}/\text{min}\&\text{mg}$  bestimmt.

## 6.2 Kristallisation

Da in Vorarbeiten von Dr.Klaus Maskos alle Versuche, sowohl native als auch rekombinante CPN in Form des gesamten Heterotetramers zu kristallisieren, scheiterten, wurde die Konzentration auf die Kristallisation und Strukturlösung der intakten bzw. fragmentierten Polypeptidkette der katalytischen Domäne der Carboxypeptidase N gelegt. Die Kristallisationsansätze der CPN1 wurden nach der Sitztropfenmethode durchgeführt. Dazu wurde die Proteinkonzentration in 10 mM Tris, pH 8,0 und 40 % Glycerin auf  $14 \text{ mg/ml}$  eingestellt und diverse Kristallisationsansätze mit dem Roboter pipettiert. Nach ca. 3 Monaten zeigten sich kleine, gut streuende, Kristalle innerhalb der Pufferbedingung 0,1 M Hepes, 2 M Ammoniumsulfat und 5 mM EDTA bei einem pH von 7,5. Dies war trotz intensiver Suche die einzige gefundene Kristallisationsbedingung. Die Kristalle ließen sich der triklinen Raumgruppe  $P3_121$  zuordnen mit Zellparametern von  $a=b=150 \text{ \AA}$  und  $c=54,9 \text{ \AA}$ . Es wurde ein einzelnes Molekül in der asymmetrischen Einheit bestimmt, entsprechend einem Matthews-Parameter von  $3,59 \text{ \AA}^3/\text{Da}$  und einem Solvensgehalt von 65,44 % (Matthews, 1968). Als Kryoprotektanz wurde reines Perfluoropolyether verwendet, durch das die Kristalle vor dem Montieren auf die Röntgenanlage kurz durchzogen wurden.

## 6.3 Kristallographische Datensammlung

Vor der Sammlung der vollständigen Datensätze mit Hilfe von Synchrotron- Strahlung wurden von allen Kristallen zur Ermittlung des Diffraktionsvermögens einzelne Aufnahmen von verschiedenen Kristallorientierungen auf einer Röntgenanlage mit  $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung (Rigaku, hausinterne Röntgenanlage) unter Cryo-Bedingungen gemacht. Anhand der erhaltenen Reflexmuster wurden Anisotropie und Auflösungs-grenze der Streuung eines jeden Kristalls beurteilt. Vom besten Kris-

tall wurde dann an der beamline BW6 am DESY bei einer Wellenlänge von  $1,05 \text{ \AA}$  bei 100 K im Stickstoffstrom ein  $2,1 \text{ \AA}$  Datensatz gemessen.

## 6.4 Strukturlösung

### 6.4.1 Molekularer Ersatz

Die Datensätze wurden mit dem HKL 2000 Programmpaket DENZO & SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997) prozessiert und skaliert. Da sich Carboxypeptidasen innerhalb der Unterfamilien sehr ähnlich in ihrer Sequenz und auch Struktur sind, konnte in diesem Fall die Strukturlösung über den Weg des molekularen Ersatzes mithilfe des Programms PHASER (CCP4) durchgeführt werden. Dazu wurde die Struktur der Carboxypeptidase CPD-2 der Ente (PDB-Code 1H8L) als Suchmodell verwendet und nach Rechnungen in allen P3-Raumgruppen konnte in der Raumgruppe P3<sub>1</sub>21 ein Molekül mit einem initialen R-Faktor von 38 % gefunden werden.

### 6.4.2 Modellbau

Für den erstmaligen Modellbau wurde die mittels PHASER (CCP4) berechnete Elektronendichtekarte verwendet und zunächst das Suchmodell CPD-2 in die Dichte gelegt. Nicht oder nur schlecht definierte Aminosäurereste wurden als Alanine definiert, in der CPN-Struktur fehlende Regionen wurden gelöscht, zusätzliche Regionen wurden zunächst vernachlässigt. Der Modellbau wurde immer wieder unterbrochen und die Struktur verfeinert, wodurch sich neue positive und negative Differenzdichten ergaben. So konnten Stück für Stück die zu Alaninresten mutierten Seitenketten entsprechend aktualisiert werden und neue Bereiche der CPN eingefügt werden, bis es zu keiner weiteren Verbesserung durch Verfeinerung kam. Bis zum Ende nicht definierte Bereiche wurden auf die *occupancy* 0 gesetzt. Die Region um die Plasminschnittstelle wurde bis zum Ende nicht sichtbar, was wohl in einer Spaltung der Polypeptidkette an dieser Stelle begründet liegt und flexible Endstücke zur Folge hat. Ebenso fehlt am Ende der Struktur ein Bereich von rund 40 Aminosäuren.

### 6.4.3 Verfeinerung

Die Verfeinerung erfolgte mit dem Programm CNS (Brünger et al., 1999) unter Verwendung der initialen Lösung aus dem molekularen Ersatz. Die Position des als starrer Körper (*rigid-body*) behandelten CPN-Moleküls wurde zunächst durch eine *rigid-body*-Verfeinerung optimiert. Anschließend konnte das Modell unter Verwendung von *simulated annealing* verbessert werden, und die B-Faktoren wurden mit zwei Gruppen pro Rest verfeinert. Wenn Unterschiede in der ( $F_{obs} - F_{calc}$ )-Elektronendichte sichtbar waren, wurde zwischen den Verfeinerungsrunden die Proteinkette manuell mit dem Programm O modifiziert (Jones et al., 1990). Das *annealing* wurde bei 5000 K gestartet und das Modell dann stufenweise in 50 K Schritten abgekühlt. Die Statistiken der Verfeinerungen sind in Tabelle 6.1 dargestellt.

### 6.4.4 Qualität der CPN1-Struktur

Die Qualität des verfeinerten Modells hängt von der Übereinstimmung mit den gemessenen Daten und von sinnvollen stereochemischen Parametern ab. Die Qualität der verfeinerten Struktur wurde mit Hilfe des Programms PROCHECK (Laskowski et al., 1993) überprüft. In Tabelle 6.1 sind die Qualitätskriterien aufgelistet, die üblicherweise für die Beurteilung des Verlaufs einer Verfeinerung herangezogen werden.

**Tabelle 6.1:** Statistiken der Datensammlung der CPN-Kristalle  
**CPN-Datensatz**

Raumgruppe	P3 <sub>1</sub> 21
Moleküle pro asymmetrischer Einheit	1
<b>Datensammlung</b>	
Zellkonstanten	
a=b (Å)	150,03
c (Å)	54,91
$\alpha=\beta$ (°)	90
$\gamma$ (°)	120
Auflösung (Å)	2,1 (2,17-2,10)
$V_M$ (Å <sup>3</sup> /Da)	3,59
Anzahl der Reflexe:	
gemessen	624595
unabhängig	41723
Rmsd gebundene Bs	3,4
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle^a$	15,26 (4,37)
$R_{merge}$ (%) <sup>ab</sup>	6,8 (28,0)
Vollständigkeit (%) <sup>a</sup>	99,1 (99,4)
Wellenlänge (Å)	1,05
Multiplizität	3,356 (3,348)
<b>Verfeinerung</b>	
Anzahl definierter Proteinatome	3182
Anzahl Wassermoleküle	379
Auflösung	20.0 - 2,1
Reflexe benutzt für die Verfeinerung	38734
Reflexe ausgewählt für $R_{free}$	2069
finaler B-Faktor Verfeinerung/Wilson (Å <sup>2</sup> )	27,1/25,0
finaler R-Faktor (%) <sup>c</sup>	17,89 (22,41)
finaler $R_{free}$ (%)	20,08 (25,37)
rms-Abweichung der Geometrie:	
Bindungslängen (Å)	0,007
Bindungswinkel (°)	1,27
Ramachandran-Winkel im	
günstigsten Bereich (%)	87,3
erlaubten Bereich (%)	12,4
generell erlaubten Bereich (%)	0,3

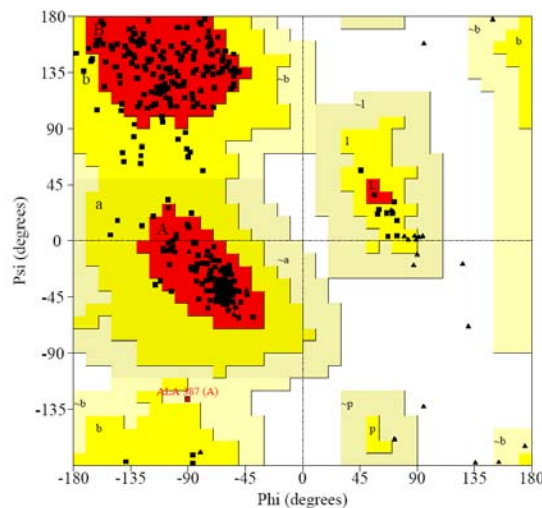
<sup>a</sup> Werte in Klammern entsprechen der höchsten Auflösungsschale 2,17-2,10 Å.

<sup>b</sup>  $R_{merge} = \sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i I_i(h)$ .

<sup>c</sup>  $R_{factor} = \sum |F_{obs} - F_{calc}| / \sum F_{obs}$ , wobei  $F_{obs}$  die gemessene und  $F_{calc}$  die berechnete Strukturfaktor-Amplitude darstellt.

Dabei weisen die erhaltenen R-Faktoren für die Auflösung von 2,1 Å sinnvolle Werte auf. Ebenso liegen die stereochemischen Parameter, wie die mittleren quadratischen Abweichungen (rmsd) der Bindungswinkel- und Längen, in sinnvollen Bereichen (Engh & Huber, 1991). Zur Beurteilung der stereochemischen Parameter des verfeinerten Modells gehört auch die Analyse der Hauptkettentorsionswinkel  $\varphi$  und  $\Psi$ . Dazu wurde mit dem Programm PROCHECK ein so ge-

nanntes Ramachandran-Diagramm erstellt. Da die Torsionswinkel im verwendeten Verfeinerungsprogramm CNS (Brünger et al., 1999) nicht eingeschränkt werden und somit prinzipiell in weiten Bereichen variieren können, läßt sich ihre Verteilung zur Qualitätskontrolle verwenden. Insgesamt befinden sich 87,3% aller Reste (Glycin und Prolin ausgenommen) des verfeinerten Modells im energetisch günstigsten Bereich (vgl. Tabelle 6.1). Die übrigen Reste liegen im zusätzlich erlaubten Bereich außer Ala387, das sich trotz intensiver Verfeinerungen im generell erlaubten Bereich befindet. Im Hinblick auf eine gute Positionierung dieses Alanins innerhalb der Dichte ist dies allerdings zu akzeptieren (vgl. Abbildung 6.1).



**Abbildung 6.1:** Ramachandran-Diagramm der CPN-Struktur. Glycine sind als Dreiecke dargestellt, alle anderen Aminosäuren (außer Prolin) werden durch Quadrate symbolisiert. Je dunkler der Hintergrund, desto bevorzugter ist die ( $\varphi$ ,  $\Psi$ )-Konformation (Laskowski et al., 1993).

## 6.5 Strukturbeschreibung der CPN1

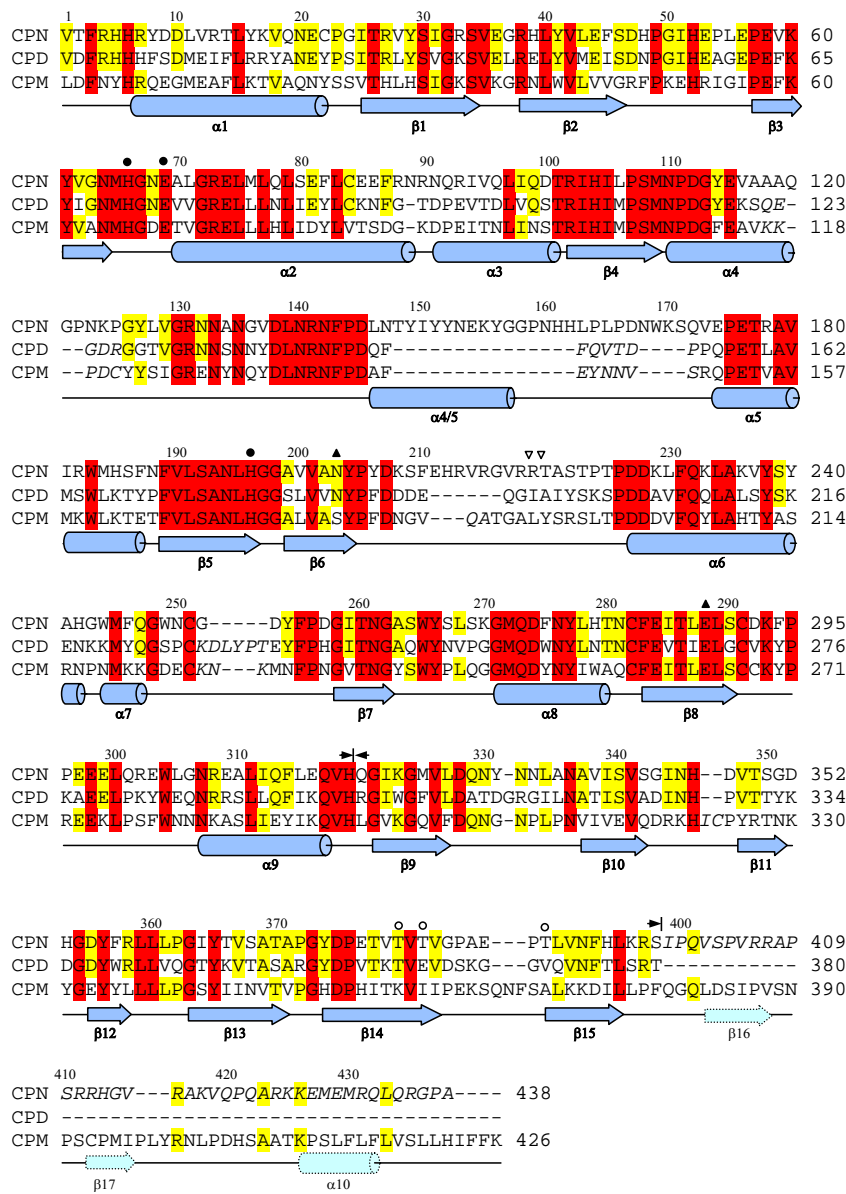
### 6.5.1 Beschreibung der Gesamtstruktur

Aufgrund charakteristischer Wasserstoffbrücken-Bindungsmuster zwischen den Atomen der Peptidbindungen lassen sich Sekundärstrukturelemente definieren. Eine primäre Zuordnung der Sekundärstrukturelemente der CPN1 erfolgte durch die Sekundärstruktur-Vorhersage mithilfe des Programms PSIPRED (Jones, 1999).

Diese Werte wurden schließlich mit dem Programm O (Jones et al., 1990) überprüft und eine genaue Zuordnung ermittelt, die in Abbildung 6.2 in der untersten Zeile aufgeführt ist. Damit verfügt die gelöste Struktur der CPN1 insgesamt über 10  $\alpha$ -Helices und 14  $\beta$ -Stränge. Die Polypeptidkette der C-terminal um ca. 20 Reste verkürzten CPN1 konnte in der Elektronendichte von Lys-1 bis Ser398 definiert werden, abgesehen von neun Resten um die proteasesensitive Schnittstelle Arg218-Arg219 (vgl. Abbildung 6.2). Dieses Konstrukt ist zwar temperatursensitiver als das Tetramer, behält aber seine hydrolytische Aktivität bei Raumtemperatur vollständig, so dass es typische CPN-Substrate mit einer leicht verstärkten Rate spaltet.

Die katalytische Domäne der CPN ist aus 2 Domänen aufgebaut, wobei die „klassische“ Carboxypeptidase Domäne Val1 bis His319 umfasst und sowohl die katalytischen Reste beinhaltet als auch die für die Substratbindung verantwortlichen Reste. Daran schließt sich N-terminal eine sogenannte Trans-Thyretin(TT)-Domäne an, die bei Gln320 beginnt und sich bis zum Ende der Struktur (Ser398) zieht.





- = Aminosäurereste, involviert in Zinkbindung
- ▲ = Aminosäurereste, beteiligt an der Katalyse
- = glykosylierte Threonin-Reste in der CPN-Struktur
- ▽ = Plasmin-Schnittstellen
- ▶◀ = Domänenstart/-ende

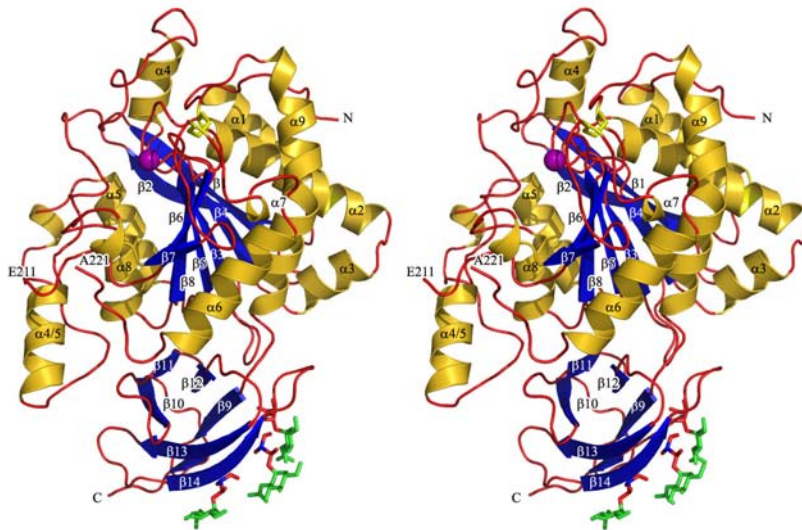
**Abbildung 6.2:** Topologie-Alignment der humanen CPN1 mit humaner CPM und CPD-2 der Ente. Die Sekundärstrukturelemente Helices und Blattblätter der CPN-Struktur sind in der letzten Zeile als Zylinder und Pfeile dargestellt. Strikt und hoch konservierte Bereiche sind in rot bzw. gelb angezeigt.

Diese Transthyretin-Domäne ist ein charakteristisches Merkmal, das alle Mitglieder der MCP N/E-Unterfamilie miteinander teilen (Aloy et al., 2001). Dieses humane CPN1-Molekül ist topologisch ähnlich zu den Strukturen der CPD-2 der Ente (Gomis-Ruth et al., 1999, PDB:1QMU) sowie humaner CPM (Reverter et al., 2004, PDB:1UWY), was durch eine Berechnung der rms-Abweichungen mit einem Grenzwert von  $2,0 \text{ \AA}$  verdeutlicht wird. Dabei ergeben sich relativ niedere Werte von  $0,72 \text{ \AA}$  bzw.  $0,86 \text{ \AA}$  für 334 bzw. 328 topologisch äquivalente  $C_{\alpha}$ -Atome. Die CPN1-Polypeptidkette ist innerhalb der Carboxypeptidase-Domäne durch 2 Disulfidbrücken verknüpft, wobei Cys22 eine Verbindung mit Cys84 eingeht und Cys251 mit Cys291. Ein weiteres Cystein ohne Bindungspartner (Cys282) erstreckt sich, ebenso wie das entsprechende Cystein in der CPD-2 und CPM, in eine innere Tasche. Am N-terminalen Ende der TT-Domäne tauchte überraschenderweise zusätzliche Dichte bei 3 Threonin-Resten auf, die mit 3 N-Acetylglucosaminen besetzt werden konnte (vgl. Abbildung 6.3).

### 6.5.2 Strukturbeschreibung der Carboxypeptidase-Domäne

Die C-terminal gelegene Carboxypeptidase-Domäne ist von kugelförmiger Gestalt und weist eine für Metallo-Carboxypeptidasen typische  $\alpha/\beta$  Hydrolase-Faltung auf (Rees et al., 1983). Diese ist aufgebaut aus einem zentralen acht Stränge umfassenden  $\beta$ -Faltblatt (angeordnet in der Reihenfolge  $\beta_1, \beta_2, \beta_4, \beta_3, \beta_5, \beta_8, \beta_6, \beta_7$ , wie in Abbildung 6.3 zu sehen), das auf der einen Seite von sechs  $\alpha$ -Helices flankiert wird ( $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_6, \alpha_7$  und  $\alpha_9$ ) und auf der anderen Seite von weiteren 4 ( $\alpha_4$ , eine im Vergleich zu anderen Strukturen neue Helix  $\alpha_4/5, \alpha_5$  und  $\alpha_8$ ). Die Nummerierung ist dabei angelehnt an die Sekundärstruktur-Nomenklatur der CPM (GomisRuth99; Reverter04). Das zentrale  $\beta$ -Faltblatt läßt sich wiederum unterteilen in einen breiten Kern aus vier parallelen Strängen ( $\beta_4, \beta_3, \beta_5$  und  $\beta_8$ ), der von Paaren antiparalleler Stränge ( $\beta_1$  und  $\beta_2$ ) und parallel verdrehter Stränge ( $\beta_6$  und  $\beta_7$ ) gesäumt wird. Die meisten  $\alpha$ -Helices verlaufen annähernd antiparallel zu den Faltblatt-Strängen, nur eine  $\alpha$ -Helix ist fast senkrecht dazu angeordnet ( $\alpha_3$ ). Bemerkenswerterweise besitzt die lange terminale Helix  $\alpha_9$  einen Knick zwischen den Resten Leu305 und Gly306, da die Carbonylgruppen an dieser Stelle aus der Helixachse herausweisen und so das Netzwerk durchgehender Wasserstoffbrücken unterbrechen.

Die interne Disulfidbrücke zwischen Cys22 und Cys84 verknüpft die  $\alpha_1$ - $\beta_1$ -Kehre mit der  $\alpha_2$ -Helix, während die Disulfidbrücke zwischen Cys251 und Cys291 die  $\alpha_7$ - $\beta_7$ -Kehre mit der  $\beta_8$ - $\alpha_9$ -Kehre verbindet. Die zuletzt genannte Disulfidbrücke findet sich auch in den Strukturen der CPM und CPD-2, Cys251 dagegen ist in der CPN1 aufgrund angrenzender Deletionen innerhalb der Sequenz verschoben (vgl. Abbildung 6.2). Ebenfalls vergleichbar mit anderen Carboxypeptidasen ist das hydrophobe Innere der CPN-Carboxypeptidase-Domäne. Davon ausgenommen sind ausschließlich das zentrale Ionenpaar Lys60 und Glu284, einige partiell verdeckte, geladene Reste, sowie zwei Salzbrücken nahe der Oberfläche, die sich von His6 zu Glu74 erstrecken und von Arg27 über Glu44 bis zu Arg102 und zwei benachbarte Wasserstoff-verbrückte Histidinpaare (His161 und His162, sowie His185 und His279), die sich an der Oberfläche befinden. Eine optimale Überlagerung mit den Carboxypeptidase-Domänen der CPM und CPD-2 zeigt, dass 266 bzw. 268 der CPN1  $C_{\alpha}$ -Atome topologisch äquivalent mit den  $C_{\alpha}$ -Atomen der Vergleichsstrukturen sind und nur eine rms-Abweichung von  $0,60$  bzw.  $0,74 \text{ \AA}$  aufweisen. Von diesen Resten sind 50 bzw. 42% auch chemisch identisch (vgl. Abbildung 6.2). In der CPN1 findet sich auch die für Carboxypeptidasen charakteristische *cis*-Peptidbindung zwischen Pro205 und Tyr206, die wahrscheinlich für eine korrekte Platzierung der Asp203- und Asp207-Seitenketten benötigt wird. Vor allem der letztgenannte Rest spielt ebenso wie bei der CPM und CPD-2 eine wichtige Rolle bei der Spezifität für basische P1'-Reste. Neben all diesen Gemeinsamkeiten finden sich auch einige Unterschiede der CPN1-Struktur zu der von CPM, die vor allem auf diversen Insertionen in der CPN-Sequenz im Vergleich zu der CPM-Sequenz basieren. So ist die Helix  $\alpha_2$  der CPN durch

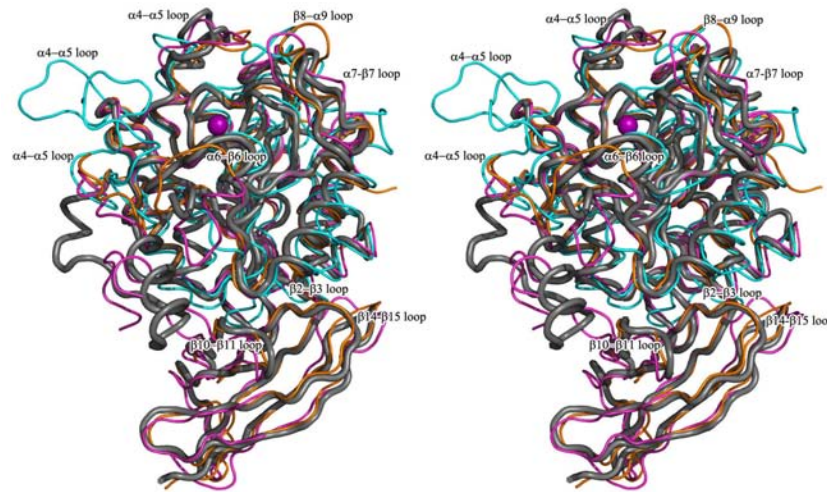


**Abbildung 6.3:** Stereo-Abbildung der humanen CPN1-Struktur, oben die Carboxypeptidase-Domäne, unten die TT-Domäne. Helices ( $\alpha 1$  bis  $\alpha 9$ ) und  $\beta$ -Faltblätter ( $\beta 1$  bis  $\beta 15$ ) sind als orange Helices bzw. blaue Pfeile dargestellt, ungeordnete Ketten als rote Linien. Zusätzlich ist dargestellt: das im aktiven Zentrum positionierte Zinkion, eingefügt entsprechend der CPM-Struktur (pinke Kugel), die Disulfidbrücken (gelbes Stick Modell), die drei glykosylierten Reste Thr380, Thr382 und Thr390 sowie die O-verknüpften Zucker (orange bzw. grüne Stick Modelle).

eine Insertion von einem Rest zwischen Phe87 und Asn91 etwas länger und Helix  $\alpha 4$  ist aufgrund einer Insertion zwischen Val116 und Val129 sogar um 3 Reste länger. Eine 19 Reste umfassende Insertion zwischen Leu146 und Val173 bewirkt eine signifikante Änderung verglichen mit den anderen Carboxypeptidase-Strukturen. Hier bildet sich in der CPN-Struktur eine neue Helix, bezeichnet als  $\alpha 4/5$ , die abwärts gerichtet ist und den Bereich durchläuft, der in der CPM-Struktur durch das C-terminale Ankersegment besetzt wird. Anschließend verläuft die Polypeptidkette wieder gen C-Terminus der Struktur, wobei sich zwischen der  $\beta 6$ - $\alpha 6$ -Kehre die Plasminschnittstelle befindet und die Reste Glu211 bis Ala221 undefiniert bleiben. Trotz dieses in der Struktur fehlenden Bereiches läßt sich aufgrund des Sequenzalignments feststellen, dass diese Kehre bei der CPN 3 Reste mehr umfasst als bei der CPM und sogar 6 Reste mehr, verglichen mit der CPD-2. Desweiteren ist festzustellen, dass sich die  $\alpha 7$ -Helix nur noch auf eine kurze helikale Windung reduziert hat. Die Ähnlichkeit der Carboxypeptidase-Domäne der CPN1 mit der von CPA ist noch viel geringer. Hier zeigen sich Unterschiede vor allem darin, dass die  $\alpha 4$ - $\alpha 5$ -Kehre in entgegengesetzte Richtungen weisen und bei der CPA einen ausgeprägteren Zugang zum aktiven Zentrum bilden (vgl. Abbildungen 6.3 und 6.4).

### 6.5.3 Strukturbeschreibung der Trans-Thyretin(TT)-Domäne

Die TT-Domäne der CPN1 setzt sich wie auch die der CPM- und CPD-2-Struktur aus einem  $\beta$ -Gewinde, bestehend aus sieben Strängen ( $\beta 9$  bis  $\beta 15$ ), zusammen. Dabei falten diese sich auf eine Art, dass sich im Inneren ein hydrophobes Zentrum ergibt, das umgeben wird von einem antiparallelen 4-Strang-Faltblatt ( $\beta 11$ ,  $\beta 10$ ,  $\beta 13$  und  $\beta 14$ ) und einem gemischten 3-Strang-Faltblatt ( $\beta 12$ ,  $\beta 9$  und  $\beta 15$ ) (Vgl. Abbildung 6.3). Durch die sieben fortlaufend auf- und abwärts gerichteten  $\beta$ -Stränge innerhalb der TT-Domäne sind der N-Terminus, der die Domäne mit der  $\alpha 9$ -Helix der CP-Domäne verbindet, und der C-Terminus an entgegengesetzten Enden des  $\beta$ -Gewindes positioniert. Anders als bei der CPM, aber ähnlich der CPD-2, ist die Kehre zwischen  $\beta 14$  und  $\beta 15$  nicht exponiert, und  $\beta$ -Strang 11 bildet auch keine extra Wölbung aus, weshalb die TT-

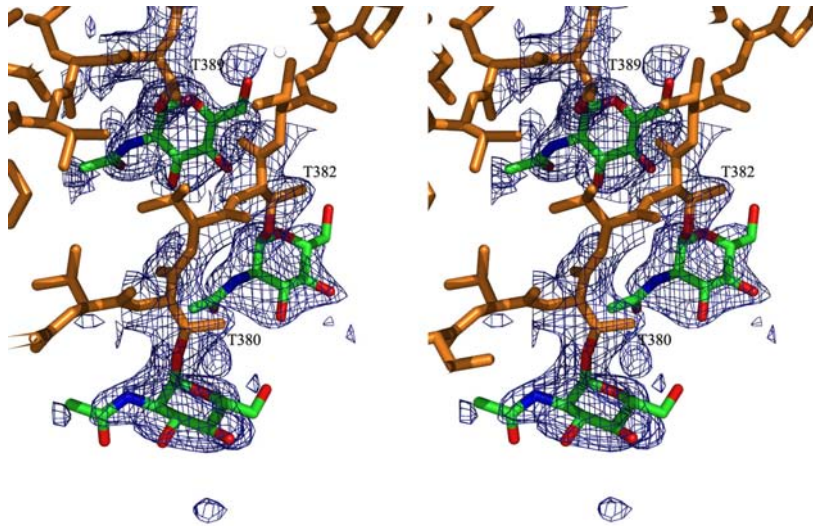


**Abbildung 6.4:** Stereo-Abbildung der humanen CPN1-Struktur (dicke graue Linie), übereinandergelagert mit humaner CPM in pink (Reverter et al., 2004, PDB:1UWY), CPD-2 der Ente in orange (Gomis-Ruth et al., 1999, PDB:1QMU) und boviner CPA in blau (Rees and Lipscomb, 1982b, PDB:4CPA). Additiv dargestellt ist das katalytische Zinkion der CPM als pinke Kugel und einige CPN1-Kehren, die im Text angesprochen werden sind markiert.

Domäne eher einer zylindrischen Form gleicht als einer kegelförmigen. Dies läßt vermuten, dass im Vergleich zur CPM auch eine reduzierte Interaktion zwischen den beiden CPN1-Domänen stattfindet. Eine nähere Verwandtschaft der TT-Domäne von CPN1 zu der von CPD-2 im Gegensatz zu der von CPM zeigt sich auch anhand der unterschiedlichen rms-Abweichungen der äquivalenten  $\alpha$ -Kohlenstoffatome. Dabei ergibt sich im Vergleich mit der CPD-2 ein Wert von 0,63 %, im Vergleich mit der CPM dagegen ein Wert von 1,02 %. Dementsprechend ergibt sich im Vergleich mit der CPD-2 auch eine Sequenzidentität von 52 %, während diese im Vergleich mit der CPM nur 36 % beträgt (vgl. Abbildung 6.2). Die Interaktion der beiden CPN1-Domänen untereinander basiert auf einer Mischung aus sowohl hydrophoben als auch hydrophilen Wechselwirkungen und umfasst zwei hydrophobe Gruppen, eine in den regulatorischen Carboxypeptidasen stark konservierte Salzbrücke zwischen Asp227 und Arg358 (Aloy et al., 2001) sowie ein verdecktes Histidin346.

Am Ende des  $\beta$ 14-Strangs und zu Beginn des  $\beta$ 15-Strangs sind drei Threonin-Reste (380, 382, 389) über eine O-glykosydische Bindung mit N-Acetylglucosamin-Zuckern verknüpft. In jedem Fall ist nur ein Zucker per Dichte definiert, wobei die Möglichkeit bestehen würde, auch längere Zuckerketten an diesen Stellen unterzubringen (vgl. Abbildung 6.5). Ursprünglich wurde die CPN1-Untereinheit in der Literatur als nicht glykosyliert beschrieben (Levin et al., 1982), auch wenn Glykosylierungen dieses Fragmentes nicht weiter untersucht wurden. Bei den kristallographisch offengelegten Glykosylierungen handelt es sich eventuell um Artefakte der Hefe-Expression. Allerdings könnte eine Glykosylierung der CPN1 ein lang bestehendes Rätsel um das Molekulargewicht erklären. Intakte und verkürzte CPN1 wurden in der Literatur stets mit einem durch SDS-PAGE ermittelten Molekulargewicht von 55-56 kDa bzw. 48-49 kDa beschrieben, was im Gegensatz zu den mit der Sequenz berechneten Werten von 50 kDa bzw. 45 kDa stand (Plummer, 1978; Levin et al., 1982; Quagraine et al., 2005). Datenbank-Analysen von O-glykosylierten Serin- bzw. Threoninresten zeigen, dass sowohl eine Nachbarschaft von Serin- bzw. Threoninresten die O-Glykosylierungswahrscheinlichkeit erhöht als auch ein Prolinrest auf einer +3 oder -1 Position (Christlet and Veluraja, 2001). Die glykosylierten Threoninreste befinden sich räumlich in enger Nachbarschaft; eine Überprüfung der Sequenz zeigt, dass sich auch Prolinreste an entsprechenden Positionen befinden. So findet sich drei Positionen hinter





**Abbildung 6.5:** Stereo-Abbildung der Glykosylierungsstellen der CPN1. Dargestellt sind Thr380, Thr382 und Thr390 (Stick Modell mit blau markierten N-Atomen, rot markierten O-Atomen und orange markierten C-Atomen) und die kovalent verknüpften N-Acetylglucosamine (grüne C-Atome). Die Struktur wurde um die Zucker und gebundenen Threonine mit  $2F_{obs} - F_{calc}$  Elektronendichte unterlegt (blau, Konturierungslevel  $1\sigma$ ).

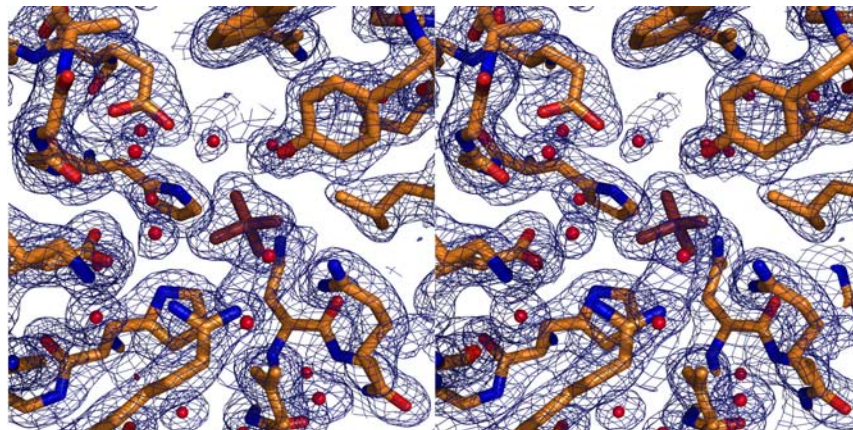
Thr382 ein Prolin ebenso wie eine Position vor Thr389. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass Cysteinreste und große bzw. aromatische Reste eine inhibierende Wirkung auf Glykosylierungen haben. Dies bestätigend ist in weiter Umgebung der glykosylierten Threonine kein derartiger Rest in der Sequenz. Die Eingabe der CPN-Sequenz auf dem NetOGlyc 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc>) ergab dementsprechend für die drei betreffenden Threonine in herausragenden I-Werten von 0,278, 0,538 und 0,283, was abgesehen von den Werten für Thr223 (0,695) und Thr370 (0,270) mit Abstand die höchsten Werte der gesamten CPN1-Sequenz darstellen. Daher könnten diese drei Threoninreste der CPN1 nicht nur in Hefezellen dazu neigen, längere Glykosylierungsketten zu tragen, sondern auch in Säugetierzellen.

#### 6.5.4 Das aktive Zentrum der CPN1

An einer Stelle ist die Oberfläche der kugelförmigen CP-Domäne eingeebult und formt die Grube des aktiven Zentrums (auf der rechten Seite der Abbildung 6.3). In der Struktur der CPN1 besteht die Basis dieser Grube - ähnlich wie bei den anderen Metallo-Carboxypeptidasen - aus den  $\beta$ -Strängen  $\beta 5$  und  $\beta 6$  sowie dem angebondenen  $\beta 8$ . Die Wand dieses Grubenschachtes wird im Wesentlichen von 2 Ausstülpungen gebildet, die durch die mehrzähligen Windungen der  $\alpha 4$ - $\alpha 4/5$  Helix bei Arg131 und Asn140 entstehen, durch das Überstehen der  $\beta 3$ - $\alpha 2$ -Kehre bei His65 sowie durch die  $\alpha 7$ - $\beta 7$ -Haarnadel-Kehre und durch das  $\beta 7$ - $\alpha 8$ -Segment. CPN1 teilt diese wandformenden Segmente mit den Strukturen der CPM und CPD-2 (vgl. Abbildung 6.4). Dagegen ist das  $\alpha 4$ - $\alpha 5$ -Segment der CPA insofern anders gefaltet, als sich der Anfangsbereich weniger tief in die Grube erstreckt, dagegen der C-Terminus eine ausgeprägtere Umrahmung ausbildet. Diese stellt für CPA/B Protein-Inhibitoren eine charakteristische und ideale Auflagefläche dar. Hier seien beispielhaft der Kartoffel-Carboxypeptidase-Inhibitor zu nennen (Rees and Lipscomb, 1982b, PCI, PDB:4CPA), der vom Blutegel abgeleitete Carboxypeptidase-Inhibitor (Reverter et al., 2000, LCI, PDB:1DTD), der endogene Carboxypeptidase-Inhibitor Latexin (Pallares et al., 2005; Aagaard et al., 2005, PDB:2BO9) und der Carboxypeptidase-Inhibitor aus dem Holzbock (Arolas et al., 2005, TCI, PDB:1ZLH). Modellierungsstudien haben ergeben, dass es aufgrund der herausragenden  $\alpha 4$ - $\alpha 5$ - (um Tyr127) und  $\alpha 7$ - $\beta 7$ -Kehren zu Zusammenstößen der CPN/E-Peptidasen

mit Teilen des Inhibitor führen würde. Dies deckt sich mit Experimenten, bei denen sich diese Inhibitoren als wirkungslos erwiesen gegenüber tetramerer CPN (Redlitz et al., 1995), der CPN1-Untereinheit (Black, J. and Skidgel, R.A., nicht veröffentlichte Daten), CPD-2 (Gomis-Ruth et al., 1999) und CPM (Black, J. and Skidgel, R.A., nicht veröffentlichte Daten). Der Orientierung der definierten Schnittstellen nach zu urteilen dürfte die intakte  $\beta 6-\alpha 6$ -Kehre der CPN1 in der Lage sein, sich in Richtung des aktiven Zentrums auszudehnen, was auch eine Interaktion mit längeren Polypeptidketten ermöglichen würde. Separate Enden dagegen erlauben eventuell eine weniger erzwungene Annäherung zum aktiven Zentrum, was die Erhöhung der Aktivität nach einer Spaltung erklären würde (Levin et al., 1982; Quagraine et al., 2005).

Innerhalb des aktiven Zentrums war gut definierte Elektronendichte sichtbar, die sich in der Nähe der Stelle befand, an der man das Zinkion erwartet hätte. Da der Kristallisationspuffer das chelatierende EDTA enthielt, wurde der kristallisierten Carboxypeptidase N wahrscheinlich zuvor gebundenes Zink entzogen, wobei das Enzym ebenfalls im Kristallisationspuffer enthaltenes Sulfat an dieser Stelle binden konnte (vgl. Abbildung 6.6). Dies ist möglich, da die tetraedrisch um den Schwefel angeordneten Sauerstoffatome des Sulfations ideal positioniert sind um kurze Wasserstoffbrücken zu bilden mit den zwei entfernt gelegenen Guanidinium Stickstoff-Atomen des Arg141 und Arg131 sowie mit dem  $N\delta 2$ -Atom des Asn140 und dem  $N\delta 1$ -Atom des Imidazolrings von His196. Dieser musste für eine derartige Interaktion um seine  $C\beta-C\gamma$ -Bindung gedreht werden. Ein derartig gebundenes Sulfation wurde auch schon bei der Struktur der freien CPD-2 beobachtet und erfüllt wahrscheinlich den Zweck, einige der Seitenketten an der Wand zum aktiven Zentrum zu fixieren (GomisRuth99). Zu diesen Seitenketten gehören unter anderem Aminosäuren, die eine wichtige Rolle bei der Katalyse selbst oder für die Erkennung und Bindung des Substrates spielen (vgl. Abbildungen 6.6).



**Abbildung 6.6:** Stereo-Abbildung des aktiven Zentrums der CPN1 mit gebundenem Sulfat. Die Abbildung wurde im Vergleich zu Abbildung 6.3 um  $90^\circ$  gedreht. Dargestellt ist das CPN1-Modell, unterlegt mit  $2F_{obs}-F_{calc}$  Elektronendichte (blau), die mit  $1\sigma$  konturiert wurde. Deutlich sichtbar sind die Seitenketten, die das aktive Zentrum einrahmen, sowie das gebundene Sulfation und einige Wassermoleküle.

# 7 Diskussion - $\beta$ -Amyloid-Precursorprotein (APP)

## 7.1 C-terminale Hälfte der $\beta$ APP-Ektodomäne (bappS4)

### 7.1.1 Expression und Reinigung

Das Konstrukt bappS4 wurde in Zellen des *E.coli*-Expressionsstamm *BL21(DE3)pRIL* deutlich überexprimiert. Ein Löslichkeitstest zeigte, dass die Expression bei Raumtemperatur große Ausbeuten an löslichem Material lieferte. Durch den bei der Klonierung angehängten Histidin-*tag* konnte das Protein mittels einer NiNTA-Säule bereits von den meisten Unreinheiten abgetrennt werden. Nach einem abschließenden Gelfiltrationslauf mit einer S75-Säule eluierte das bappS4-Protein hochrein und zeigte einen homogenen *peak* auf dem Chromatogramm (vgl. Abb. 5.2). Ein EDMAN-Abbau verifiziert das Protein als das Zielprotein. Sowohl eine SDS-PAGE als auch eine durchgeführte massenspektrometrische Untersuchung bestätigte das zuvor berechnete Molekulargewicht von 26 kDa. Dieses Molekulargewicht wurde verglichen mit den Daten der Gelfiltration, die eine Molekulargewichtsbestimmung mittels Eichung mit Standardproteinen bekannten Gewichts möglich macht. Dabei ergab sich, dass das Protein auf der Gelfiltrationssäule mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 40 kDa eluierte, was einem monomeren Laufverhalten entspricht. Zwar sind über Gelfiltration bestimmte Molekulargewichte abhängig vom hydrodynamischen Radius, dieses Ergebnis konnte jedoch auch über eine Ultrazentrifugation bestätigt werden.

### 7.1.2 Phasierung mittels Selenomethionin

Mit 10 mg Proteinausbeute pro Liter Kulturmedium ergaben sich absolut ausreichende Mengen, um das Protein sowohl biochemisch als auch kristallographisch detailliert zu untersuchen. Bereits 2 Tage nach Pipettieren der Kristallisationsansätze wuchsen relativ große Kristalle mit einer Kantenlänge von  $400\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ . Daraufhin wurde das bappS4-Konstrukt mit inkorporiertem Selenomethionin exprimiert, aufgereinigt und kristallisiert und diese Kristalle am Synchrotron in Hamburg vermessen. Die so erhaltenen Daten wurden ausgewertet, allerdings war eine MAD-Strukturlösung mit den Selendaten nicht erfolgreich, da keine der 18 potenziellen Selenpositionen bestimmt werden konnten. Die Positionierung der Selenatome wurde anhand von anomalen und dispersiven Differenzpattersonkarten bei verschiedenen Auflösungen versucht. Auch die Einbeziehung der nativen Daten lieferte keine auswertbare Lösung. Die Statistiken der einzelnen MAD-Datensätze zeigten zwar eine gute Qualität an, offensichtlich waren die anomalen und dispersiven Differenzen jedoch nicht ausreichend genau bestimmt. Für ein schwaches bzw. irreguläres MAD-Signal können mehrere Ursachen in Betracht gezogen werden. Ein schwaches bzw. abnehmendes Streuvermögen des Kristalls kann ebenso verantwortlich dafür sein wie auch eine hohe Mosaizität. Auch ist zu bedenken, dass eine zu hohe Strahlungsexposition aufgrund zu langer Belichtungszeit zur Kristallzerstörung und somit zu wachsender Nichtisomorphie führen kann. Handelt es sich um eine Struktur mit flexiblen Regionen, so kann auch ein geringer Ordnungsgrad der Methioninreste (Unordnung, alternative Seitenkonformationen) dazu führen, dass

die Selenpositionen nicht bestimmbar sind. Außerdem gibt es auch noch experimentelle Bedingungen, die zum Zeitpunkt der Datensammlung eventuell nicht stationär gewesen sein könnten wie zum Beispiel ein Drift in der Primärstrahlung. Auch zu viele Selenpositionen können Schwierigkeiten bei der Lösung machen.

### 7.1.3 Phasierung mittels $(\text{NH}_4)_2\text{OsCl}_6$

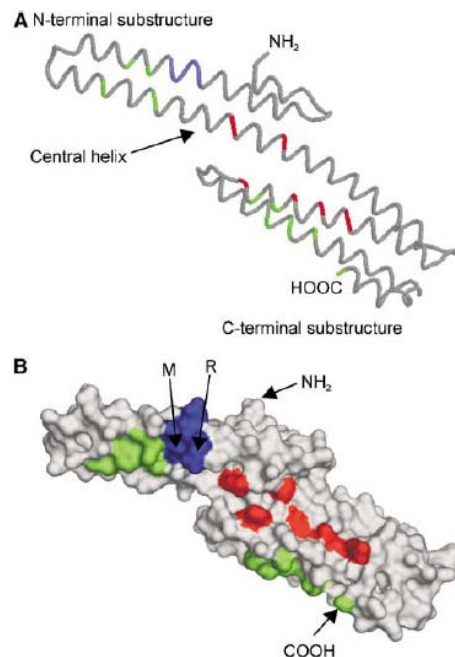
Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Selenposition-Bestimmung wurden parallel zu den Auswertungen native Kristalle mit 50 verschiedenen Schwermetallerivaten versetzt und weitere Messungen am DESY durchgeführt. Einzig  $(\text{NH}_4)_2\text{OsCl}_6$  konnte als gebundenes Schweratom identifiziert und für die Phasierung der bappS4-Struktur verwendet werden. Mit diesen Daten ließ sich ein Molekül in der asymmetrischen Einheit bauen, das zweite Molekül blieb bis zum Ende dieser Arbeit nicht sichtbar. Dabei wurde versucht, die Dichte über *solvent flattening* zu verbessern sowie das fehlende Molekül mit dem ersten bereits gebauten Molekül mittels der Methode des molekularen Ersatzes zu suchen. Alle Versuche, weitere Differenzdichte zu erhalten blieben jedoch erfolglos. Auch eine Suche mit Teilfragmenten der bappS4-Struktur ergab kein Ergebnis. Die Probleme, die sich bei der Strukturlösung ergaben, sind wahrscheinlich auf den gleichen Grund zurückzuführen, der schon die Ermittlung der Selenpositionen verhindert hatte. Zum Einen ist von einer hohen Flexibilität des Moleküls auszugehen, aber auch eine Fehlordnung im Kristall läßt sich nicht ausschließen. Ein Kristall ist ein dreidimensionales periodisches Kontinuum von theoretisch unbegrenzter Ausdehnung, aufgebaut aus Atomen, Ionen oder Molekülen. Die in dieser Definition geforderte Periodizität verlangt, dass bei Molekülkristallen die Moleküle jeder Elementarzelle in exakt derselben räumlichen Orientierung wie die in den benachbarten Zellen angeordnet sind; es darf keinen Unterschied machen, welchen Ausschnitt eines Kristallgitters man betrachtet. Natürlich ist der „ideale Einkristall“ ebenso theoretisch wie obige Definition, denn Gitterfehler und Verwachsungen sind teilweise unvermeidbar. Relativ häufig kommen Teile des Moleküls und in Extremfällen auch das ganze Molekül in mehr als einer kristallographisch unabhängigen Orientierung oder Konformation im Kristall vor. Neben dem Vorliegen mehrerer unabhängiger Moleküle in der asymmetrischen Einheit und Verzwilligung kommt auch das Phänomen der Fehlordnung in Frage. Eine Verzwilligung konnte bei den bappS4-Kristallen ausgeschlossen werden. Dies wurde mithilfe des Programmpaketes CCP4 überprüft. Bei der Fehlordnung sind die verschiedenen Molekülpositionen statistisch über den Kristall verteilt. Die aus dem Beugungsbild bestimmte Struktur stellt das „räumliche Mittel“ aller im Kristall vorkommenden Orientierungen dar. Zwar widersprechen Fehlordnungen prinzipiell der Definition eines regelmäßigen Kristalls, im allgemeinen, gerade wenn es nur zwei oder drei verschiedene Orientierungen gibt, überwiegt jedoch die Ordnung. Die entscheidende Voraussetzung für Röntgenbeugung ist damit gegeben, und das Beugungsbild sieht völlig unauffällig aus. Teilweise hat sich gezeigt, dass sich Fehlordnungen durch ein Absenken der Temperatur vermeiden lassen, da zumindest in einigen Fällen die Fehlordnung nicht statischer, sondern dynamischer Natur ist. In solchen Fällen kann die Fehlordnung als „Bewegung im Kristall“ interpretiert werden, die unterhalb einer bestimmten Energieschwelle nicht länger möglich ist. Die Datensätze von bappS4 wurden allerdings bei Temperaturen von 100 K gemessen, weshalb sich diese Fehlordnung unabhängig von der Messtemperatur zeigt. Eventuell existieren zwei (oder mehr) unterschiedliche Typen von Elementarzellen, was bedeuten würde, dass die Fehlordnung bei der Kristallisation selbst entstanden sein muß. Da die Kristalle in sehr kurzer Zeit (innerhalb von 1-2 Tagen) erschienen, muß diese Möglichkeit in Betracht gezogen werden. Eine Abhilfe könnte die Optimierung der Kristallzucht bei tieferen Temperaturen bringen. Initiale Kristallisationsversuche bei 4 °C schlugen zwar fehl, aber in diesem Bereich stehen noch viele Variationen offen.



### 7.1.4 Beschreibung der Struktur der zentralen APP-Domäne (CAPPD/E2)

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die dreidimensionale Struktur der CAPPD-Domäne der  $\beta$ APP-Ektodomäne von Wang & Ha veröffentlicht (Wang and Ha, 2004). Eine strukturelle Analyse der E2-Domäne ergab, dass diese aus rein helikalen Sekundärstruktur-Elementen aufgebaut ist und aus insgesamt sechs  $\alpha$ -Helices besteht (Wang and Ha, 2004). Dabei verbindet eine zentrale  $\alpha$ -Helix die zwei Substrukturen miteinander (vgl. Abbildung 7.1), wobei jede dieser Substrukturen eine hydrophobe Gruppe evolutionär konservierter Aminosäurereste enthält, wie auch die Faltung der E2-Domäne von anderen Mitgliedern der APP-Familie geteilt wird.

Die E2-Domäne enthält auch die in der Literatur viel beschriebene RERMS-Sequenz, die für die wachstumsvermittelnden Eigenschaften von APP verantwortlich gemacht wird (Ninomiya et al., 1993; Li et al., 1997). Zwar ist die Sequenz nicht Teil einer Tasche oder Furche (vgl. Abbildung 7.1 B, markiert in blau), aber das Pentapeptid ist zumindest an der Oberfläche exponiert. In dieser Struktur findet sich auch die hoch konservierte Heparansulfatproteoglykan- (HSPG)-Bindestelle, die sich in Form einer Furche auf der Oberfläche abzeichnet (vgl. Abbildung 7.1 B, markiert in rot). Vergleicht man diese HSPG-Bindestelle mit derjenigen der N-terminalen GFLD, so scheint die gestreckte Form der E2-Bindestelle sehr viel geeigneter zu sein, um eine feste HSPG-Bindung zu ermöglichen. Allerdings fehlen bisher experimentelle Daten, die die Bindekonstanten beider Bereiche untersuchen. Auch die Faltung der E2-Domäne erweist sich als einzigartig und zeigt nur einige strukturelle Ähnlichkeiten mit Spectrin oder  $\alpha$ -Actinin (Wang and Ha, 2004).



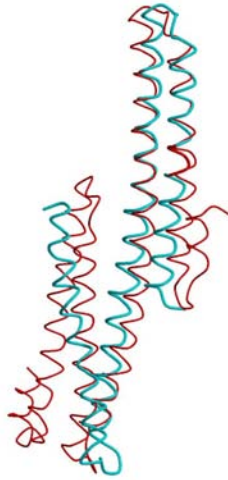
**Abbildung 7.1:** Struktur der zentralen APP-Domäne (CAPPD bzw. E2)(PBD:1RW6). (A) Rückgrat-Darstellung der E2-Domäne; die Position der RERMS-Sequenz ist in blau dargestellt, Aminosäurereste, die hydrophobe Bereiche bilden, in grün, und die konservierten Reste der HSPG-Bindestelle in rot. (B) Oberflächendarstellung von Bild (A). Beschriftet sind die N- und C-Termini, sowie die unterstrichenen Reste der RERMS-Sequenz (Reinhard et al., 2005).

### 7.1.5 Vergleich des bappS4-Modells mit der veröffentlichten CAPPD-Struktur von Wang & Ha

Die Fehlordnung in den bappS4-Kristallen machte es bis zum Ende dieser Arbeit nicht möglich, die bappS4-Struktur zu verfeinern und das zweite Molekül in der asymmetrischen Einheit aufzufinden. Die Struktur von Wang & Ha entstand aus Kristallen der Raumgruppe I422 mit einem Molekül pro asymmetrischer Einheit. Dabei ist vor allem ein recht hoher durchschnittlicher B-Faktor von  $90 \text{ \AA}^2$  (maximaler B-Faktor von  $200 \text{ \AA}^2$ ) auffällig. Dies spricht für eine unwahrscheinlich hohe Flexibilität des Moleküls. Legt man das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entstandene bappS4-Modell mit der CAPPD-Domäne von Wang & Ha übereinander, so ist zwar eine sehr ähnliche  $\alpha$ -helikale Gesamtstruktur erkennbar, allerdings scheinen die einzelnen  $\alpha$ -Helices doch sehr flexibel oder sogar unterschiedlich zu sein (vgl. Abbildung 7.2). Es ergibt sich ein rmsd-Wert größer  $7 \text{ \AA}$  für alle 132  $C_\alpha$ -Atome bzw. von  $2 \text{ \AA}$  für 113  $C_\alpha$ -Atome. Die in der Veröffentlichung angegebenen Molekulargewichts-Daten von 50 kDa, errechnet durch Gelfiltrationsexperimente sowie DLS, entsprechen einem oligomeren Lauf eines Dimers, weshalb die Autoren von einem kristallographischen Dimer ausgingen. Eine sinnvolle Übereinanderlagerung des I422-Dimers mit dem eigenen P4<sub>1</sub>-Modell war nicht möglich, da die I422-Dimere innerhalb der P4<sub>1</sub>-Kristallpackung mit den Symmetrieäquivalenten zusammenstoßen würden.

Auch ergab die Struktur dieser Veröffentlichung bei einer durchgeführten Patterson-Suche keine Lösung. Vergleicht man die Ergebnisse bezüglich des Oligomerisierungsverhalten miteinander, so eröffnen sich auch hier Unterschiede zu dem bappS4-Konstrukt. Das Konstrukt von Wang & Ha ist im Vergleich zum bappS4-Konstrukt N-terminal um 4 Aminosäuren kürzer sowie C-terminal um 10 Aminosäuren verkürzt. Die Daten von Wang & Ha ergeben, dass die E2-Domäne in der Lage ist, ein antiparalleles Dimer in Lösung auszubilden ebenso wie Spectrin und  $\alpha$ -Actinin, zwei Proteine, die einige strukturelle Ähnlichkeiten zu der E2-Domäne von APP aufweisen (Wang and Ha, 2004). Eine Dimerisierung dieser Domäne, würde die hydrophoben Oberflächenbereiche abdecken (vgl. Abbildung 7.1 B, grün markiert) und auch eine bessere Tasche für die Heparin-Bindestelle generieren, da beide Monomere eine positiv geladene Oberfläche präsentieren können. Jedoch wären auch zwei Aminosäurereste der RERMS-Sequenz an einer Dimerisierung beteiligt, was zur Folge hätte, dass das Motiv nicht mehr für andere Interaktionen zur Verfügung stehen würde. Es bleibt offen, ob eine Dimerisierung und Dissoziation von APP-Molekülen unterschiedliche Funktionen reguliert. So könnte zellgebundenes APP Dimere bilden und derart Zell-Zell-Adhäsionen *trans*-regulieren, während monomeres APP sowohl in gebundener Form als Wachstumsfaktor agieren könnte als auch, nachdem es durch  $\alpha$ -sekretorische Spaltung ins externe Milieu freigesetzt wurde. Bis heute ist die Diskussion um eine mögliche Dimerisierung des APP noch nicht eindeutig geklärt. So gibt es neben Wang & Ha auch andere Forschungsgruppen, die in ihren Arbeiten APP-Dimere beschreiben (Wang and Ha, 2004; Scheuermann et al., 2001; Soba et al., 2005). Andere wiederum sprechen von Monomeren mit hohem Stokes-Radius, was darauf schließen läßt, dass sich die E2-Domäne von APP weniger als kompaktes, sphärisches Molekül verhält als vielmehr ähnlich einer langgestreckten Struktur (Gralle et al., 2002; Botelho et al., 2003).

In Übereinstimmung mit den zuletzt genannten Forschungsergebnissen zeigt auch das bappS4-Konstrukt ein monomeres Laufverhalten. Dies wurde mit einer Molekulargewichtsbestimmung mittels Größenausschlußchromatographie bestimmt, aber auch mit Daten eines Gleichgewichtslaufs verifiziert. Somit konnten jegliche Effekte, hervorgerufen durch den hydrodynamischen Radius des Proteins oder Wechselwirkungen mit der Säulenmatrix, ausgeschlossen werden. An dieser Stelle sei auch kritisch angemerkt, dass die von Wang & Ha durchgeführten Experimente zum Oligomerisierungsverhalten der E2-Domäne nicht über eine Ultrazentrifugation verifiziert wurden. Gegen eine Dimerisierung-Hypothese spricht auch, dass alle anderen veröffentlichten



**Abbildung 7.2:** Übereinanderlagerung des bappS4-Modells (blau) mit der Struktur von Wang & Ha (rot). Beide Strukturen weisen eine ähnliche Gesamtstruktur auf, die einzelnen Helices sind allerdings in hohem Grade flexibel bis unterschiedlich.

Substrukturen der Ektodomäne inklusive der CAPPD (Dulubova et al., 2004) ein monomeres Verhalten in Lösung zeigen. Innerhalb dieser Arbeit konnte ein monomeres Verhalten der C-terminalen Ektodomänenhälfte eindeutig gezeigt werden, ob dieser Bereich in der Lage ist sowohl eine monomere als auch eine dimere Konformationen in Lösung anzunehmen bleibt unklar. So zeigen *in vivo* Studien, dass zellgebundenes APP nach der Biosynthese im endoplasmatischen Retikulum eine *cis*-Dimerisierung annehmen kann und disulfidverbrückte Dimere von APP die  $A\beta$ -Generierung beeinflussen können (Scheuermann et al., 2001). Kürzlich wurde auch belegt, dass die starke Homologie und Organisation konservierter Bereiche zwischen APP und den APP-Familienmitgliedern APLP1 und APLP2 nicht nur Homo-Oligomerisierung, sondern auch Hetero-Oligomerisierung möglich macht (Soba et al., 2005). Festzuhalten bleibt, dass es sich bei der C-terminalen Hälfte der  $\beta$ APP-Ektodomäne um eine sehr flexible Region handelt. Ob dies in einer unbekanntenen Funktion begründet liegt oder über einen Bindepartner stabilisiert werden kann, bleibt fraglich.

### 7.1.6 Heparinbindung

In der Literatur sind innerhalb der  $\beta$ APP-Ektodomäne mehrere Heparinbindestellen beschrieben (Clarris et al., 1997; Rossjohn et al., 1999), wobei es tendenziell mehr Beschreibungen zu Heparinbindestellen im N-terminalen Bereich der Ektodomäne gibt als im C-terminalen Bereich. Durch einen Auftrag des bappS4-Proteins auf eine Heparinbindesäule konnte die Existenz dieser Bindestellen im C-terminalen Bereich der  $\beta$ APP-Ektodomäne nachgewiesen werden, da es zu einer deutlichen und sehr affinen Bindung kam, die nur durch eine hochmolekulare Salzkonzentration wieder gelöst werden konnte. Durchgeführte CD-Messungen mit dem reinen bappS4-Protein und additiv zugegebenem Heparin ergaben eine Änderung der dreidimensionalen Struktur zu einer mehr helikalen Strukturierung. Da es sich um eine rein helikale Struktur handelt, besteht hier zum Einen die Möglichkeit, dass sich die Übergänge zwischen den einzelnen  $\alpha$ -Helices mehr strukturieren. Eine wahrscheinlichere Annahme ist allerdings, dass das zugegebene Heparin derart an die C-terminale Hälfte der  $\beta$ APP-Ektodomäne bindet, dass es zu einer Stabilisierung der Gesamtstruktur führt und die einzelnen  $\alpha$ -Helices nicht mehr eine derartige Flexibilität wie ohne gebundenes Heparin aufweisen. Das Phänomen, dass Heparin eine stabilisierende Wirkung auf

Proteine haben kann, wurde bereits bei Tryptase beobachtet (Schwartz and Bradford, 1989). Daher könnte ein Komplex aus dem  $\beta$ -amyloid-Vorläuferprotein mit Heparin zu einer Stabilisierung des Proteins führen und somit eventuell Fehlorderungen innerhalb des Kristalls verhindern. Kristallisationsansätze mit unterschiedlich langen Heparinketten wurden bereits angesetzt, weitere Studien sind geplant.

## 7.2 N-terminale Hälfte der $\beta$ APP-Ektodomäne (bappS3)

### 7.2.1 Expression und Reinigung

Das bappS3-Konstrukt zeigte eine Expression in Zellen des *E.coli*-Expressionsstammes *OrigamiB(DE3)*. Auch wenn ein initialer Löslichkeitstest zunächst die Expression in Form von Einschlusskörpern ergab, konnte der Anteil an löslich exprimierten Material durch eine Expression bei Raumtemperatur und Inkubation über Nacht deutlich erhöht werden. So konnte trotz der 12 Cysteine, die die Kette im N-terminalen Bereich des Proteins enthält, lösliches Protein erhalten werden. Durch den bei der Klonierung angehängten Histidin-*tag* konnte das Protein mittels einer Ni-Sepharose-FF-Säule bereits von den meisten Unreinheiten abgetrennt werden. Nach einem abschließenden Gelfiltrationslauf mit einer S200-Säule eluierte das bappS3-Protein hochrein und zeigte einen homogenen *peak* auf dem Chromatogramm (vgl. Abb. 5.9). Ein EDMAN-Abbau verifizierte das Protein als das Zielprotein. Sowohl eine SDS-PAGE als auch eine durchgeführte massenspektrometrische Untersuchung bestätigte das zuvor berechnete Molekulargewicht von 32 kDa. Dieses Molekulargewicht wurde verglichen mit den Daten der Gelfiltration, die eine Molekulargewichtsbestimmung mittels Eichung mit Standardproteinen bekannten Gewichts möglich macht. Dabei ergab sich, dass das Protein auf der Gelfiltrationssäule mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 100 kDa eluierte, was einem oligomeren Laufverhalten entspricht. Aufgrund relativ geringer Mengen an reinem, löslichen Material konnten nur Kristallisationsansätze mit dem Roboter pipettiert werden. Allerdings konnte bis zum Ende dieser Arbeit kein Kristallwachstum beobachtet werden.

### 7.2.2 Heparinbindung

In der Literatur sind innerhalb der  $\beta$ APP-Ektodomäne mehrere Heparinbindestellen beschrieben, wobei es tendenziell mehr Beschreibungen zu Heparinbindestellen im N-terminalen Bereich der Ektodomäne gibt als im C-terminalen Bereich. Ein Auftrag des bappS3-Proteins auf eine Heparinbindesäule brachte das überraschende Ergebnis, dass das Protein sich im Durchlauf befand, also nicht an die Säule gebunden hatte. Daher wurden biochemische Untersuchungen mit heparingebundenem bappS3-Protein nicht weiter verfolgt.

## 7.3 Vollängenkonstrukt der $\beta$ APP-Ektodomäne (bappS1)

### 7.3.1 Expression und Reinigung

Das Vollängenkonstrukt bappS1 zeigte bei der Expression ähnliche Schwierigkeiten wie bereits die N-terminale Hälfte bappS3. Bei der Expression in Zellen des *E.coli*-Expressionsstammes *OrigamiB(DE3)* wurde das Protein aber deutlich überexprimiert. Auch wenn ein initialer Löslichkeitstest zunächst die Expression in Form von Einschlusskörpern ergab, konnte der Anteil löslich exprimierten Materials durch eine Expression bei Raumtemperatur und Inkubation über Nacht

deutlich erhöht werden. So konnten trotz der 12 Cysteine, die die Sequenz im N-terminalen Bereich des Proteins enthält, große Mengen an löslichem Protein der Ektodomäne erhalten werden. Es gelang auch eine Reinigungsstrategie zu entwickeln, die durch Kombination verschiedener Affinitätssäulen zu hochreinem Material des *bappS1*-Konstruktes führte. Dabei wurde aus den verschiedenen Bindedomänen des  $\beta$ APP Nutzen gezogen. Das Zielprotein wurde zunächst mittels einer Heparin-Affinitätssäule von einem Großteil der Verunreinigungen abgetrennt. Eine weitere Aufreinigung erfolgte durch die nachfolgende Kupfer-Affinitätssäule, durch die das Ektodomänenprotein von weiteren unerwünschten Proteinen separiert werden konnte. Durch die abschließende Reinigung über eine Gelfiltrations-Säule konnte schließlich hochreines *bappS1*-Protein eluiert werden. Das Chromatogramm der Gelfiltration zeigte einen homogenen *peak* (vgl. Abbildung 5.11). Eine anschließende Analyse mittels reduzierender und nicht-reduzierender SDS-PAGE brachte zum Einen das Ergebnis, dass es sich bei dem vorderen Elutionspeak um Aggregate desselben Proteins handelte, zum Anderen war deutlich erkennbar, dass sich die Bande des *bappS1*-Proteins auf der erwarteten Höhe von 55 kDa befand (vgl. Abbildung 5.11). Das Protein wurde auch mittels EDMAN-Abbau als das Zielprotein bestätigt, und das Molekulargewicht von 55 kDa wurde durch eine massenspektrometrische Untersuchung verifiziert. Um nun das Molekulargewicht der eluierten Probe zu ermitteln, wurde die Gelfiltrationssäule geeicht. Dadurch ergab sich, dass das Fragment mit 190 kDa eluierte. Da das klonierte Monomer ein Molekulargewicht von 55 kDa besitzt, lagert sich das Protein scheinbar zu einem Dimer oder sogar Trimer zusammen. Über eine Trimerbildung des  $\beta$ APP gibt es bisher keinerlei Hinweise in der Literatur, eine Dimer-Bildung dagegen wurde bereits in mehreren Artikeln diskutiert (Wang and Ha, 2004; Scheuermann et al., 2001; Soba et al., 2005).

#### 7.3.2 Proteolytische Spaltung

Die Menge des aufgereinigten Materials war ausreichend, um Kristallisationsansätze durchzuführen. Nach einigen Tagen waren kleine Kristalle mit einer maximalen Kantenlänge von 100  $\mu$ m zu beobachten. Bei der Datenauswertung ergab sich allerdings, dass die Ektodomäne proteolytisch abgebaut wurde. Die Existenz von Proteasen sowohl im Cytosol als auch in der inneren und äußeren Membran des Periplasmas stellt ein grundsätzliches Problem bei der Expression rekombinanter Proteine in *E.coli* dar. Diese Proteasen dienen dem Abbau von Fremdproteinen (Goldberg & Goff, 1987) und verringern damit die Stabilität und Ausbeute des exprimierten Proteins. Eine Möglichkeit zur Inhibierung von Metalloproteasen ist die Zugabe von EDTA zu den Puffern, da dieses die für die Enzyme notwendigen Metallionen abfängt. Da die Reinigung des *bappS1*-Proteins allerdings mittels einer Kupfer-Affinitätssäule durchgeführt wurde, waren chelatierende Reagentien kein Mittel der Wahl. Zwar wurde, nachdem die Instabilität des Proteins bekannt war, mit Protease-Inhibitor-Tabletten gearbeitet, ein vergleichender Abbautest zeigte aber nach wie vor vorhandenen Abbau des Proteins. Da auch bei den Inhibitor-Tabletten kein EDTA enthalten war, konnten Metalloproteasen nicht vollständig inhibiert werden. Es läßt sich nicht ausschließen, dass der Abbau des *bappS1*-Proteins auf diese Enzyme zurückzuführen ist. Da das *bappS1*-Fragment allerdings rund um eine definierte Region am Übergang zwischen der N-terminalen und C-terminalen Hälfte der  $\beta$ APP-Ektodomäne gespalten wurde, ist in diesem Fall davon auszugehen, dass der Proteaseabbau in der flexiblen Proteinstruktur begründet liegt. Proteine, die flexible Linkerregionen präsentieren, unterliegen an dieser Stelle oft einem proteolytischen Abbau. Die Tatsache, dass das Protein einen derart flexiblen Bereich enthält, ist auch für eine spätere Kristallisation unvorteilhaft. Es wären also Methoden vorzuziehen, bei denen die Gesamtstruktur des Proteins stabilisiert werden könnte, zum Beispiel über eine Kreuzverlinkung mit einem anderen Protein oder Reagenz, oder aber man könnte den proteolytischen Abbau gezielt nutzen, um stabile kleinere Fragmente der  $\beta$ APP-Ektodomäne zu erhalten, die auch leichter

kristallisieren könnten. Bisher konnten leider nicht die genauen C-Termini der Spaltstücke ermittelt werden, aber hier würde sich ein idealer Ansatzpunkt bieten, um kompakte Domänen zu erhalten, die man über einen kontrollierten Abbau des Vollängenkonstruktes oder aber über eine gezielte Klonierung produzieren könnte.

### 7.3.3 Strukturierung der $\beta$ APP-Ektodomäne

Mehr als 70 % der Aminosäuren der APP-Ektodomäne sind an der Bildung von Sekundärstrukturelementen beteiligt (Gralle et al., 2002). Da es auch Bereiche gibt, die bei mehreren unterschiedlichen Algorithmen zur Sekundärstruktur-Vorhersage keinerlei Struktur aufweisen, ist zu vermuten, dass die APP-Ektodomäne aus mehreren unabhängigen Domänen besteht, die über flexible Linker miteinander verbunden sind. Einer dieser Bereiche umfaßt die Aminosäuren 190-264 und befindet sich innerhalb der sauren Domäne. Diese stark negative Region, bei der 56 % der Reste Glutamate oder Aspartate darstellen, scheint als Abstandhalter zwischen der C- und N-terminalen Hälfte der Ektodomäne zu fungieren und stellt sicher, dass beide Domänen Bewegungsfreiheit in alle Richtungen haben. Diese Theorie konnte durch die Ergebnisse dieser Arbeit untermauert werden, da die Konstrukte der C- und N-terminalen Ektodomänenhälften ein stabiles Verhalten aufzeigten. Dagegen war das Vollängenkonstrukt sehr instabil und wurde innerhalb des beschriebenen Bereiches mehrfach proteolytisch gespalten (vgl. Abb. 5.1). Diese APP-Ektodomänen-Strukturierung würde auch den Einschub einer kompletten Domäne an dieser unstrukturierten Stelle erlauben, wie es bei der KPI-Domäne erforderlich ist, die nur in nicht-neuronalem APP vorkommt. Die Insertionsstelle dieser Domäne befindet sich ebenfalls in diesem Bereich und so würden sich bei der nicht-neuronalen APP-Form keine konformationellen Wandel ergeben, da keine strukturierte Polypeptidkette für den Einschub zerstört werden müsste.

Betreffend das Oligomerisierungs-Verhalten konnten auch einige Zusammenhänge aufgeklärt werden. Die Fragmente, die aus der proteolytischen Spaltung entstanden sind, wurden getrennt voneinander biochemisch untersucht. Es ergab sich sowohl bei den klonierten Konstrukten der beiden Ektodomänenhälften als auch bei den durch die Spaltung generierten Ektodomänen-Fragmenten ein konsistentes Oligomerisierungsverhalten. So wurde sowohl bei dem bappS3-Konstrukt (N-terminale Hälfte der APP-Ektodomäne) ein oligomeres Laufverhalten beobachtet wie auch bei dem N-terminal generierten Spaltfragment des Vollängenkonstruktes. Durch Edman-Abbau konnte bei beiden Proteinen der identische N-Terminus nachgewiesen werden, und eine SDS-PAGE ergab auch vergleichbare Größen. Ein ähnliches Oligomerisierungsverhalten wurde auch bei dem die gesamte Ektodomäne umfassenden bappS1-Konstrukt festgestellt.

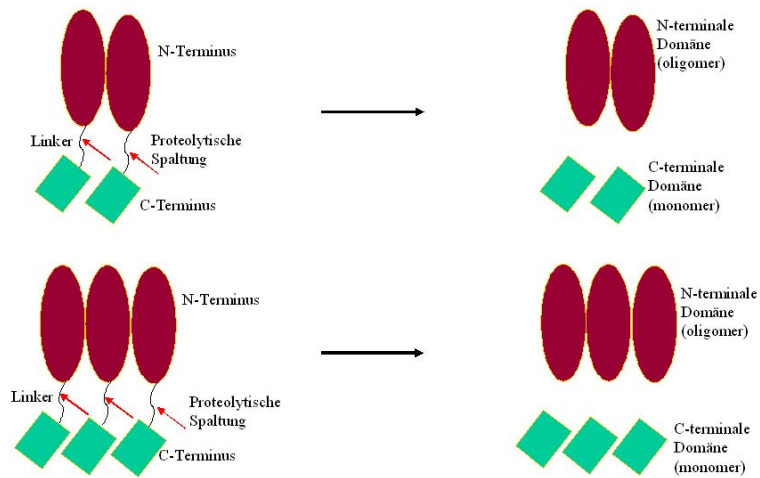
Im Gegensatz dazu war sowohl bei dem klonierten bappS4-Konstrukt (C-terminale Hälfte der APP-Ektodomäne) als auch bei dem durch die proteolytische Spaltung des Vollängenkonstruktes generierten Fragment, dass die C-terminale APP-Ektodomäne umfasste ein monomeres Laufverhalten zu beobachten. Beide Proteine wurden N-terminal ansequenziert und zeigten ähnliche N-Termini (Verschiebungen von einigen Aminosäuren), und eine SDS-PAGE ergab vergleichbare Größen.

So ist festzuhalten, dass die C-terminale Ektodomänenhälfte monomer in Lösung vorkommt, während die N-terminale Ektodomänenhälfte und die gesamte Ektodomäne ein oligomeres Verhalten zeigt. Nach einer proteolytischen Spaltung der gesamten Ektodomäne ergeben sich Fragmente, die wiederum monomer in Lösung vorkommen (C-terminale Hälfte) bzw. oligomeres Verhalten zeigen (N-terminal). Daher sprechen diese Daten dafür, dass der N-Terminus der APP-Ektodomäne für das Oligomerisierungsverhalten verantwortlich gemacht werden kann.

Es bietet sich ein Modell an, bei dem die N-terminale Domäne der APP-Ektodomäne als unabhängige Faltungseinheit mit einer zweiten (und/oder dritten?) N-terminalen APP-Domäne ver-

### 7.3 Vollängenkonstrukt der $\beta$ APP-Ektodomäne (*bappS1*)

bunden ist, wobei beide Moleküle C-terminal über einen flexiblen Linker die CAPPD angehängt haben. Spaltet nun eine Protease den flexiblen Linker, der beide Hälften miteinander verbindet, so bleibt der N-terminale Bereich nach wie vor als Dimer bzw. Trimer verbunden, während die C-terminale CAPPD als Monomer abgespalten wird (vergleiche Abb. 7.3).



**Abbildung 7.3:** Modellvorstellung der APP-Ektodomänenstruktur. Die zwei unabhängigen Faltungseinheiten der N- und C-terminalen Hälfte sind über einen flexiblen Linker miteinander verbunden. Die N-terminale Hälfte tendiert zu Oligomerisierung. Ein proteolytisches Spaltereignis resultiert in einem oligomeren N-terminalen und einem monomeren C-terminalen Fragment.



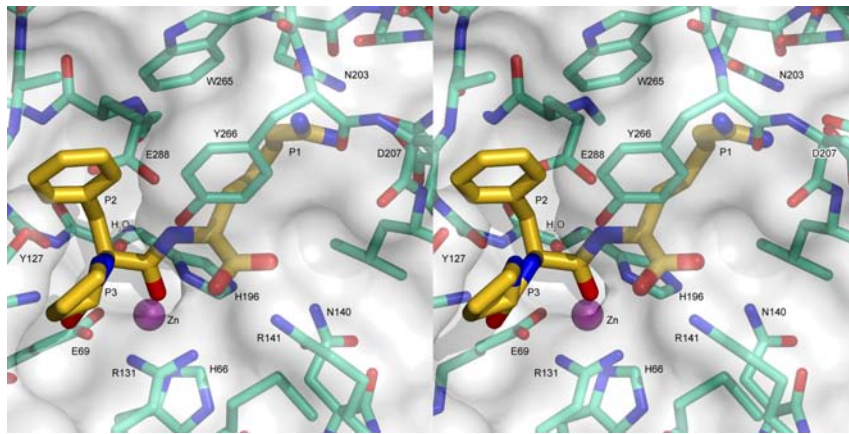


# 8 Diskussion - Carboxypeptidase N (CPN)

## 8.1 Mögliche Substratinteraktion und Katalytischer Mechanismus

Ein Ziel war es, mögliche Enzym-Substrat-Interaktionen zwischen der CPN und einem Peptidsubstrat zu untersuchen. Dazu wurden zunächst die Strukturen des synthetischen CPN-Inhibitors Guanidiniummethylmercaptobornsteinsäure (GEMSA) sowie des CPA-Inhibitors PCI, der keine inhibierende Wirkung auf CPN zeigt, in die CPN1-Struktur gelegt, indem die entsprechenden Enzym-Inhibitor-Komplexe der CPD-2 (Aloy et al., 2001, PDB:1H8L) und CPA (Rees and Lipscomb, 1982b; Reverter et al., 2000, PDB:4CPA) optimal mit der CPN1 überlagert wurden. Dabei wurde deutlich sichtbar, daß zwei der Sauerstoffatome des Sulfations in der CPN1-Struktur und eine der beiden Carboxylatgruppen des Inhibitors GEMSA an einer Stelle positioniert sind, an der die C-terminale Carboxylatgruppe eines gebundenen Substrates zu liegen kommen sollte. Das bedeutet, daß die Wirkungsweise des Inhibitors GEMSA über eine Imitation der P1'-Arginin Guanidinium-Gruppe funktioniert. Basierend auf diesen Strukturen wurden die letzten drei Reste des typischen CPN1-Substrates Bradykinin (Pro7b,Phe8b,Arg9b) in die S2, S1 und S1'-Taschen von CPN1 modelliert. Dazu waren einige Modifikationen in der ursprünglichen CPN1-Struktur nötig. Abgesehen von der Insertion des Zinkions, das positionell aus der Struktur der CPD-2 mit gebundenem GEMSA übernommen wurde, mußte natürlich das Sulfation zusammen mit einigen angrenzenden Wassermolekülen innerhalb der Taschen des aktiven Zentrums entfernt werden. Anschließend wurde ein nucleophiles Wassermolekül, das häufig in Carboxypeptidase-Strukturen vorkommt, an eine Position entsprechend plausibler Abstände zum Zinkion und seinen Bindungspartnern eingepasst. Wie bereits erwähnt, war in der ursprünglichen CPN1-Struktur auch das Histidin196 um ca. 90° gedreht, da nur auf diese Weise eine Interaktion mit den Sauerstoffatomen des Sulfations möglich ist. Eine Bindung des Zinkions erfordert allerdings eine Ausrichtung des Stickstoffatoms im Imidazolring auf das Metallion, weshalb für diese Modellierungsstudien auch das His196 entsprechend gedreht werden mußte. Desweiteren waren einige Drehungen bei Tyr127, Arg131, Tyr266 sowie Lys284 nötig, um die Abstände zu erreichen, die für optimale Interaktionen nötig sind. Daraus ergab sich das in Abbildung 8.1 dargestellte Modell, woraus sich die im Folgenden beschriebenen Interaktionen innerhalb des katalytischen Mechanismus ergeben.

Die P1'-Arg9b Seitenkette des Substrates Bradykinin kann in einer Höhle des aktiven Zentrums von CPN1 positioniert werden ähnlich der argininähnlichen Seitenkette von GEMSA im Komplex mit CPD-2 (Aloy et al., 2001). Dabei muß die Carboxylatgruppe des Bradykinins nicht unbedingt unmittelbar gegenüber von Asp207 angeordnet sein sondern in einer Stellung, die es ihm ermöglicht, mehrere Wasserstoffbrücken sowohl zu diesem Asp207-Carboxylat als auch zu dem benachbarten Tyr266 auszubilden. Eine derart leichte Verschiebung der Guanidylgruppe weg vom Carboxylat des Asp207 könnte zusätzlich durch das rückwärtig liegende Asn188 unterstützt werden, da dieses - im Vergleich zur CPM, bei der an dieser Stelle ein kleineres Ser180 positioniert ist (Reverter et al., 2004) - die S1'-Tasche am Ende verkürzt. Ein P1'-Lysin-Rest könnte das Asp207 eventuell besser erreichen und somit die zu spaltende Peptidbindung besser präsentieren. Dies würde erklären, warum die CPN eine Spaltung von Lysin-Resten der Spaltung von Argininresten leicht vorzieht. An dieser Stelle sei bemerkt, daß auch CPD-2 (Novikova et al., 1999) und CPE (Grimwood et al., 1989; Skidgel and E.G., 1998) einen Asn-Rest an Position 180 besitzen und sich auch experimentell eine leichte Präferenz gegenüber C-terminalen



**Abbildung 8.1:** Stereo-Abbildung des aktiven Zentrums der CPN1 (N-Atome blau, O-Atome rot, C-Atome orange) zusammen mit dem in die S2- (links), S1- (Mitte) und S1'-Tasche (rechts) gemodelten C-terminalen Tripeptid Pro7b-Phe8b-Arg9b des Substrates Bradykinin (C-Atom gelb). Zusätzlich dargestellt sind das für die Katalyse notwendige Zinkion (pinke Kugel) und nucleophile Wassermolekül (rote Kugel). Darüber wurde eine halb-transparente Oberfläche gelegt.

Lysin-Resten statt Arginin-Resten nachweisen lassen konnte (Skidgel et al., 1989; Novikova et al., 1999). Es scheint fast, als würde der Ser- bzw. Asn-Rest auf Position 180 in der S1'-Bindetasche von CPN/E-Familienmitgliedern die P1'-Präferenz gegenüber einem Arginin-Rest oder Lysinrest bestimmen. Die P1-Phe8b-Seitenkette des gebundenen Bradykinins ragt wahrscheinlich in eine hydrophobe Aushöhlung, die umrahmt wird von den Gly198 und Ala199-Seitenketten sowie dem Indol-Teil von Trp265 und der phenolischen Seitenkette von Tyr127. Diese S1-Tasche wäre daher auch gut geeignet, um lange hydrophobe P1-Seitenketten von Bradykinin (Phe) oder EGF (Leu) aufzunehmen. Studien mit verschiedenen humanen CPN1-Substraten haben bereits gezeigt, daß der P1-Substratrest eine große Rolle bei der Erkennung durch das Enzym spielt. Neben diesen Wechselwirkungen wird die teilbare Bradykinin P1-P1'-Peptidbindung innerhalb des aktiven Zentrums von CPN1 fest eingespannt von zahlreichen polaren Interaktionen, die durch Gruppen der Hauptkette vermittelt werden. Auf der C-terminalen Seite der zu spaltenden Peptidbindung sind die P1'-Arg9b-Carboxylatgruppe und das Amidstickstoff mit den entfernten Guanidylgruppen von Arg131 und Arg141 sowie mit dem Hydroxyl des Tyr266 verbunden. Die Fixierung auf der N-terminalen Seite erfolgt dagegen mittels günstiger Wasserstoffbrücken zwischen dem P1-Amidstickstoff zur Tyr266-Hydroxylgruppe und der P2-Carbonylgruppe zur Ammoniumgruppe des entfernter gelegenen Lys293. In dieser CPN1-Struktur befindet sich die Phenolgruppe des Tyr266 bereits nahe der abwärts gerichteten Konformation, wie sie schon des öfteren bei gelösten Strukturen von Carboxypeptidasen mit gebundenem Substrat oder Inhibitor im aktiven Zentrum beobachtet werden konnte (Christianson and Lipscomp, 1989; Garcia-Saez et al., 1997; Reverter et al., 2000; Aloy et al., 2001). Durch diese festen Interaktionen wird die zu spaltende Peptidbindung zwischen Phe8b und Arg9b quer über das aktive Zentrum gestreckt und verdeckt dabei zunächst das „katalytische Wasser“, das stets in nicht-komplexierten Carboxypeptidasen als fünfter Zinkligand zu finden ist, und schiebt dieses schließlich in Richtung der Glu288 Carboxylatgruppe. Aufgrund der Metallbindung sollte dieses Wassermolekül einen niedrigen pK-Wert aufweisen, so daß es bei physiologischem pH-Wert geneigt wäre, deprotoniert zu werden, während das Carboxylat von Glu288, das keine weiteren intramolekularen Wasserstoffbrücken ausbildet, dem Wassermolekül dieses Proton leicht entziehen könnte oder sogar bereits protoniert sein könnte. Dieses „nucleophile“ Hydroxyl/Wassermolekül attackiert sodann die zu spaltende Carbonylgruppe, die ihrerseits während der Formation des tetraedrischen Zwischenzustandes durch Interaktionen mit dem katalytischen Zinkion und der Guanidylgruppe des Arg131

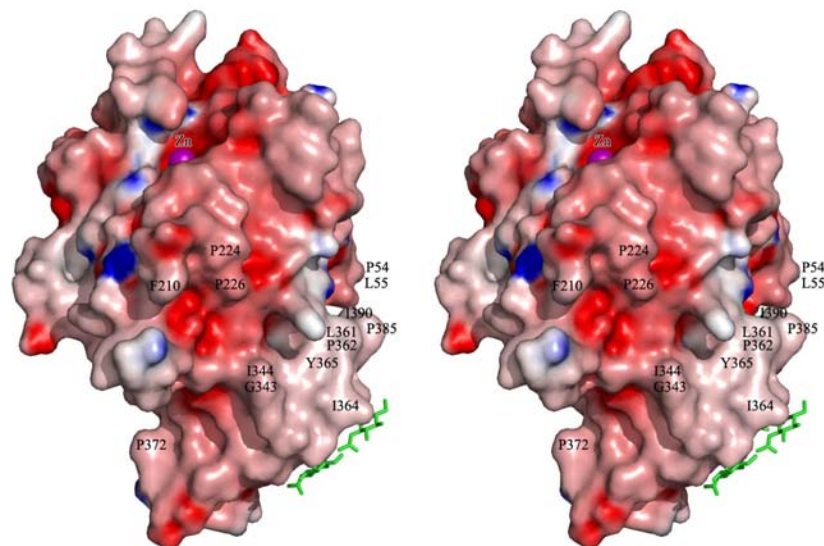
polarisiert wurde. Gleichzeitig wird das Proton der Glu288-Carboxylat-Gruppe, das ursprünglich von dem Wassermolekül abgezogen wurde, während des Zerfalls des tetraedrischen Intermediats und der Freigabe des Bradykinins, an die austretende (P1')-Stickstoffgruppe abgegeben, wodurch sich die Abspaltung der Arg9b Aminosäure ergibt. Natürlich haben alle genannten katalytischen Reste auch Gegenspieler in der CPM (Lys269, Arg127 und Glu264) und in der CPD-2 (Lys277, Arg135, Glu272).

## 8.2 Mögliche Tertiärstruktur der CPN

Im Gesamtlängenkonstrukt der CPN1 würden nach dem letzten in der Kristallstruktur durch Dichte definierten Rest (Ser398) noch ca. 40 Reste folgen. Entsprechend der Sekundärstrukturvorhersage (Jones, 1999, PSIPRED) würde dieses Ende der Polypeptidkette sich zu einer kompakten Einheit, bestehend aus zwei  $\beta$ -Strängen und einer  $\alpha$ -Helix, falten, auch wenn die Vorhersage eine recht geringe Wahrscheinlichkeit hat. Dieses C-terminale Segment enthält eine Vielzahl basischer Reste, manche von ihnen kommen paarweise vor und sind daher sehr anfällig für Endopeptidasen mit trypsin- und furinähnlicher Spezifität. Diese Proteasesensitivität läßt darauf schließen, daß das C-terminale CPN1-Segment keine in sich geschlossene, proteaseresistente Faltung aufweist und auch nicht fest an den Rest des Moleküls geheftet ist. Zwar ist dieses C-terminale Segment der CPN1 von ähnlicher Länge wie das C-terminale membranverankernde Segment der CPM (vgl. Abbildung 6.2), das CPN-Segment muß allerdings andersartig angeordnet sein, da es sonst mit der einzig in der CPN vorkommenden  $\alpha$ 4- $\alpha$ 5-Kehre zusammenstoßen würde, besonders mit der neuen Helix  $\alpha$ 4-5. Die extrem schnelle Spaltung und Entfernung des C-terminalen Segmentes der CPN1 durch Proteasen wie Trypsin, die sowohl in der isolierten Untereinheit als auch in der heterotetrameren Form der CPN (Quagraine et al., 2005) zu beobachten ist, deutet an, daß dieses Fragment wahrscheinlich nach außen exponiert und für Proteasen angreifbar vorliegt. Auch die Beteiligung des C-terminalen Fragmentes an der Interaktion zwischen der katalytischen und regulatorischen Domäne ist auszuschließen. Es ist daher zu vermuten, daß sich dieses locker gefaltete C-terminale Segment der CPN1 abseits der TT-Domäne innerhalb des Solvens-Bereiches ausdehnt. Ebenso ist die glykosylierte Seite der TT-Domäne wahrscheinlich nicht in Interaktionen mit der CPN2 involviert, da Glykosylierungen, ob natürlicher oder artifizieller Art, keinen Einfluß auf Tetramer-Formationen bewirken. Im Tetramer zeigt sich auch die einzigartige  $\beta$ 6- $\alpha$ 6-Kehre gegenüber großen Proteasen wie Plasmin angreifbar. Die Spaltung an dieser Stelle durch Plasmin hat keine Auswirkungen auf die Tetramer-Formation. Desweiteren scheint das aktive Zentrum sowohl bei isolierter CPN1-Untereinheit als auch bei dem CPN-Tetramer für große Substrate zugänglich zu sein (Quagraine et al., 2005). Diese Befunde begrenzen den möglichen Bereich einer Interaktion zwischen CPN1 und CPN2 auf die Grenzfläche zwischen der CP- und TT-Domäne.

Die CPN2-Untereinheit ist ein Mitglied der *leucin-rich repeat* (LRR) Proteinfamilie (Tan et al., 1990), die zu der übergeordneten Familie der Asolenoid Proteine gehört (Kobe and Kajava, 2001). Auch wenn die dreidimensionale Struktur der CPN2-Untereinheit bisher noch nicht bekannt ist, zeigen molekulare Modellierungsstudien (mit SwissModel oder EsyPred3D) des großen, zentralen, 132 Reste umfassenden Teils, der 13 leucinreiche Wiederholungseinheiten (LRR-Domäne) von je 24 Aminosäuren Länge enthält, eine hufeisenähnlichen Form mit einem gebogenen  $\beta$ -Faltblatt, das die innere konkave Oberfläche ähnlich dem plazentalen Ribonuclease-Inhibitor umrahmt (Kobe and Deisenhofer, 1993). Innerhalb der CPN2, umspannen eventuell Kehren die äußere Peripherie, anstelle der  $\alpha$ -Helices im plazentalen Ribonuclease-Inhibitor. Wie in dem festen heterotetrameren Komplex, den der Ribonuclease Inhibitor mit Angiogenin bildet (Papageorgiou et al., 1997, PDB:1A4Y), könnten auch beide bogenförmige CPN2-Untereinheiten Seite an Seite platziert sein und polare sowie elektrostatische Interaktionen untereinander vermitteln, während

jede CPN1-Untereinheit (vergleichbar mit Angiogenin) mittels hydrophober Wechselwirkungen an die äußere Kante einer CPN2-Untereinheit binden könnte. Dies ist konsistent mit der bereits angesprochenen hydrophoben Natur der CPN1-Untereinheit, die offensichtlich wird durch die Abtrennung von der 83 kDa großen CPN2-Untereinheit (Levin et al., 1982; Skidgel, 1995). Ein nahe liegender Bereich der CPN1-Oberfläche, die in eine CPN2-Interaktion involviert ist, stellt ein essentiell hydrophober Oberflächenbereich dar, der sich innerhalb der eingekerbten Grenzfläche zwischen der katalytischen und TT-Domäne befindet (vgl. Abbildung 8.2). Dieser Bereich ist zentriert um das  $\beta$ 12- $\beta$ 13-Segment Leu361-P362-G363-Ile364-Tyr365, wird auf einer Seite flankiert durch das  $\beta$ 10- $\beta$ 11-Segment G343-I344 und  $\alpha$ 6-Segment P224-P226, und auf der anderen Seite durch das  $\beta$ 14- $\beta$ 15-Segment G384-P385-A386 und das  $\beta$ 2- $\beta$ 3-Segment P54-L55. Eventuell umspannt es sogar das Molekül und erstreckt sich bis zur  $\beta$ 13- $\beta$ 14-Kehre (A371-P372-G373), der  $\beta$ 9- $\beta$ 10-Kehre (A335-N336-A337-V338) sowie einem Teil der neuen  $\alpha$ 4/5-Helix (Y149-Y152-Y156). Die meisten dieser Bereiche sind in der CPN hydrophober als in der CPM oder CPD-2, oder aber sie sind Teil von Insertionskehren. Ein Teil dieser beschriebenen Berührungsoberfläche ähnelt der entsprechenden CPM-Oberfläche, die vorgeschlagen wurde, die Verbindung zur Membran zu vermitteln (Reverter et al., 2004). Auf diese Weise würde das aktive Zentrum vom Tetramerzentrum wegweisen und wäre für Peptidsubstrate frei zugänglich. Eine Bindung zu einer oder beiden CPN2-Untereinheiten würde derart das aktive Zentrum auch von gebundener CPN1 für größere Substrate frei lassen sowie eine Spaltung der Arg218-Arg219-Bindung und eine C-terminale Verkürzung ermöglichen.



**Abbildung 8.2:** Stereo-Abbildung der CPN1-Oberfläche. Die Oberfläche wurde entsprechend ihres elektrischen Potentials von negativ (rot,  $-10 \text{ ekT}^{-1}$ ) bis positiv (blau,  $10 \text{ ekT}^{-1}$ ) eingefärbt. Das katalytische Zinkion, dargestellt als pinke Kugel wurde eingefügt, um die Lokalisation des aktiven Zentrums anzuzeigen. Einige hydrophobe Reste wurden markiert, diese formen einen gürtelähnlichen Oberflächenbereich, der die CP-TT-Grenzfläche umspannt und wahrscheinlich die Kontaktfläche für die Interaktionen mit der CPN2-Untereinheit darstellt.

# 9 Abkürzungsverzeichnis

## Symbole und mathematische Zeichen

$2F_{obs}-F_{calc}$	Elektronendichtekarte
$\vec{a}, \vec{b}, \vec{c}, \alpha, \beta, \gamma$	Elementarzellparameter im realen Raum
$\vec{a}^*, \vec{b}^*, \vec{c}^*, \alpha^*, \beta^*, \gamma^*$	Elementarzellparameter im reziproken Raum
$\text{\AA}$	Ångström ( $10^{-10}$ m = 0,1 nm)
B	$= \pi^2 u^2$ , Debye-Waller-Faktor, Temperaturfaktor
$d_{hkl}$	Abstand der Netzebenen hkl
$d_{hkl}^*$	reziproker Netzebenenabstand
$\Delta F_{ano}$	anomale Differenz
$ F_{hkl} $	Strukturfaktoramplitude
$F_{hkl}$	Strukturfaktor
$ F_{calc} $	aus dem Modell berechnete Strukturfaktoramplitude
$ F_{obs} $	gemessene (observierte) Strukturfaktoramplitude
$F_P, F_{PH}, F_H$	Strukturfaktoren des Proteins, des Schweratomderivats, des Schweratoms
$F_{obs}-F_{calc}$	Differenzelektronendichte
hkl ( $\overline{hkl}$ )	Millersche Indices (Friedelpaare)
I	Reflexintensität
$\vec{k}$	Richtungsvektor von Röntgenwellen
$\lambda$	Wellenlänge
$\varphi$	Phase des Strukturfaktors F
$\varphi_{calc}$	berechnete Phase
$P(\varphi)$	Phasenwahrscheinlichkeit
$P(u,v,w)$	Pattersonfunktion
$\vec{r}$	Ortsvektor im realen Raum
$\rho_{el} (\rho_{obs}, \rho_{calc})$	Elektronendichte (gemessen, berechnet)
$\rho(x,y,z)$	Elektronendichteverteilung
R-Faktor	Beschreibung der Qualität einer Proteinstruktur
$R_{free}$	freier R-Faktor, berechnet aus 5 % der Reflexe. Diese werden nicht in die Verfeinerung mit einbezogen.
$R_{merge}$	R-Faktor für den Vergleich von vereinigten Datensätzen
$R_{sym}$	beschreibt die Qualität eines Datensatzes als Funktion der Übereinstimmung, symmetrieverwandter Reflexe
$\sigma$	Standardabweichung
$\vec{s}$	Ortsvektor im reziproken Raum
$\Theta_{hkl}$	Phasenverschiebung bezüglich der Netzebene
$V_{EZ}$	Elementarzellvolumen
$V_M$	Matthews- oder Packungsparameter
x,y,z	Ortskoordinaten im realen Raum

## allg. Abkürzungen

AB	Antibiotikum
Abb.	Abbildung
A $\beta$	Amyloid- $\beta$ -Peptid
AD	„alzheimer's disease“, Alzheimer Krankheit
AICD	intrazelluläre Domäne des APP
Amp	Ampicillin
APP <sub>n</sub>	Amyloid-Vorläuferprotein ( <i>amyloid precursor protein</i> ) der Index n gibt die jeweilige Isoform an, bezeichnet nach der Anzahl der AS.
APL	APP-ähnliches Protein ( <i>C.elegans</i> )
APLP	APP-ähnliches Protein (Säuger)
APPL	APP-ähnliches Protein ( <i>D.melanogaster</i> )
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
$\beta$ A4 <sub>40/42</sub>	Beta-Amyloid Peptid der Index n nennt die Aminosäuren, beginnend mit Asp671 des APP <sub>770</sub>
BACE	$\beta$ -Secretase
bp	Basenpaare
BR-Marker	Broad Range Marker
BW6	Wiggler <i>beamline</i> BW6 des deutschen Elektronen Synchrotrons
CAPPD	zentrale Domäne der APP-Ektodomäne, auch E2
CCD	<i>charge coupled device</i>
CD	Circular Dichroismus
Cm	Chloramphenicol
CP	Carboxypeptidase (Domäne)
CPN1	katalytische Untereinheit der CPN
CPN2	regulatorische Untereinheit der CPN
CuBD	Kupfer-Bindedomäne der APP-Ektodomäne
DESY	Deutsches Elektronen Synchrotron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DS	Down Syndrom
E2	zentrale Domäne der APP-Ektodomäne, auch CAPPD
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N'.N'-tetraacetat
EOAD	früh einsetzende Form der Alzheimer Krankheit ( <i>early onset alzheimer's disease</i> )
<i>et al.</i>	und andere
EtOH	Ethanol
FAD	familiäre/vererbare Form der Alzheimer Krankheit ( <i>familiar alzheimer's disease</i> )
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
GEMSA	Guanidinoethylmercaptobernsteinsäure
GFLD	N-terminale Wachstumsfaktor ähnliche Domäne der APP-Ektodomäne <i>growth factor like domain</i>
HSA (21)	Chromosom (21) des Menschen ( <i>homo sapiens sapiens</i> )
HSPG	Heparansulfatproteoglykane
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid

K	Kelvin
kDa	Kilodalton
KPI	Proteaseinhibitordomäne vom Kunitztyp
LAPP	leukozytäres APP
LB	Luria-Bertani
LCI	CP-Inhibitor aus dem med. Blutegel <i>Hirudo medicinalis</i>
LOAD	spät einsetzende Form der Alzheimer Krankheit ( <i>late onset alzheimer's disease</i> )
LR-Marker	Low Range Marker
M	Molar
mA	Milliampere
MAD	Multiple anomale Dispersion
MCP	Metallo-Carboxypeptidase
mM	Millimolar
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat
MR	Molekularer Ersatz <i>molecular replacement</i>
NCS	nicht-kristallographische Symmetrie
ml	Milliliter
NMR	magnetische Kernresonanzspektroskopie
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei der Wellenlänge x
p.A.	pro Analysis
p3	Peptid, daß bei $\alpha$ - und $\gamma$ -Sekretase-Aktivität prozessiert wird
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCI	Kartoffel-Carboxypeptidase-Inhibitor
PCP	Procarboxypeptidase (CP mit Proregion)
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion
PDB	Proteindatenbank
PEG	Polyethylenglykol
pH	potentia hydrogenii
PS1	Präsenilin 1
PS2	Präsenilin 2
PVFD	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
sAPP	sekretierter N-Terminus des APP-Moleküls
SDS	Natriumdodecylsulfat
$\beta$ -ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
Tab.	Tabelle
TAFI	Thrombin aktivierbarer fibrinolysis Inhibitor
TCI	CP-Inhibitor aus der Zecke ( <i>Rhipicephalus bursa</i> )
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris/HCl	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan (pH mit HCl eingestellt)
TT	Transthyretin-Domäne
Tween 20	Polyoxyethylen-(20)-Sorbitan-Monolaurat
üN	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

## Symbole für die DNA-Basen

Base	Buchstabensymbol
Adenin	A
Cytosin	C
Guanin	G
Thymin	T

## Symbole für die Aminosäuren

Aminosäure	Abkürzung	Buchstabensymbol
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V



# Literaturverzeichnis

- 4), C. C. C. P. N. (1994). *The CCP4 suite: programs for protein crystallography*.
- Aagaard, A., Listwan, P., Cowieson, N., Huber, T., Ravasi, T., Wells, C., Flanagan, J., Kellie, S., Hume, D., Kobe, B., and Martin, J. (2005). An inflammatory role for the mammalian carboxypeptidase inhibitor latexin: relationship to cystatins and the tumor suppressor tigl. *Structure*, 13:309–317.
- Abendschein, D., Serota, H., Plummer, T., Amiraian, K., Strauss, A., Sobel, B., and Jaffe, A. (1987). Conversion of mm creatine kinase isoforms in human plasma by carboxypeptidase n. *J. Lab. Clin. Med.*, 110:798–806.
- Abraham, C., Selkoe, D., and Potter, H. (1988). Immunochemical identification of the serine protease inhibitor alpha 1-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of alzheimer's disease. *Cell*, 52:487–501.
- Abrahams, J. and Leslie, A. (1996). Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial f1 atpase. *Acta Cryst.*, D52:30–42.
- Abramov, A., Canevari, L., and Duchen, M. (2004). Calcium signals induced by amyloid beta peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1742:81–87.
- Allsop, D., Landon, M., and Kidd, M. (1983). The isolation and amino acid composition of senile plaque core protein. *Brain Res.*, 259:348–352.
- Aloy, P., Companys, V., Vendrell, J., Aviles, F., Fricker, L., and Coll, M. (2001). The crystal structure of the inhibitory-complexed carboxypeptidase d domain ii and the modeling of regulatory carboxapeptidases. *J. Biol. Chem.*, 276:16177–16184.
- Altschul, S., Madden, T., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. (1997). Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25:3389–3402.
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige erkrankung der hirnrinde. *Allg. Zeitschrift für Psychiatrie*, 64:146–148.
- Alzheimer, A. (1911). Über eigenartige krankheitsfälle des späteren alters. *Zeitschr. f. die ges. Psychiatr. u. Neurol.*, 4:356–385.
- Amrein, K., Takacs, B., Stieger, M., Molnos, J. and Flint, N., and Burn, P. (1995). Purification and characterization of recombinant human p50<sup>csk</sup> protein-tyrosine kinase from *Escherichia coli* expression system overproducing the bacterial chaperones groes and groel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92:1048–1052.
- Ando, K., Iijima, K., Elliott, J., Kirino, Y., and Suzuki, T. (2001). Phosphorylation-dependent regulation of the interaction of amyloid precursor protein with fe65 affects the production of betaamyloid. *J. Biol. Chem.*, 276:40353–40361.
- Anfinsen, C. and Haber, E. (1961). Studies on the reduction and re-formation of protein disulfidbonds. *J. Biol. Chem.*, 236:1361–1363.

- Arispe, N., Rojas, E., and Pollard, H. (1993). Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90:567–571.
- Arndt, U., Champness, J., Phizackerly, R., and Wonacott, A. (1973). A single-crystal oscillation camera for large unit cells. *J. Appl. Cryst.*, 6:457–463.
- Arolas, J., Popowicz, G., Lorenzo, J., Sommerhoff, C., Huber, R., and Aviles, F. (2005). The three-dimensional structure of tick carboxypeptidase inhibitor in complex with a/b carboxypeptidase reveal a novel double-headed binding mode. *J. Mol. Biol.*, 350:489–498.
- Ashley, J., Packard, M., Ataman, B., and Budnik, V. (2005). Fasciclin ii signals new synapse formation through amyloid precursor protein and the scaffolding protein dx11/mint. *J. Neurosci.*, 25:5943–5955.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., and Struhl, K. (1987). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & sons, New York.
- Aviles, F., Vendrell, J., Guasch, A., Coll, A., and Huber, R. (1993). Advances in metalloprocarboxypeptidases. emerging details on the inhibition mechanism and on the activation process. *Eur. J. Biochem.*, 211:381–389.
- Bachmair, A., Finley, D., and Varshavsky, A. (1986). *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science*, 234:179–186.
- Bajzar, L., Manuel, R., and Nesheim, M. (1995). Purification and characterization of tafi, a thrombinactivable fibrinolysis inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 270:14477–14484.
- Baneyx, F. and Georgiou, G. (1991). Construction and characterization of *Escherichia coli* strains deficient in multiple secreted proteases: Protease iii degrades high molecular weight substrates *In Vivo*. *J. Bacteriol.*, 173:2696–2703.
- Barbosa Pereira, P., Segura-Martin, S., Oliva, B., Ferrer-Orta, C., Aviles, F., and Coll, M. (2002). Human procarboxypeptidase b: three-dimensional structure and implications for thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (tafi). *J. Mol. Biol.*, 321:537–547.
- Barnham, K., McKinstry, W., Multhaup, G., Galatis, D., Morton, C., Curtain, C., Williamson, N., White, A., Hinds, M., Norton, R., Beyreuther, K., Masters, C., Parker, M., and Cappai, R. (2003). Structure of the alzheimer's disease amyloid precursor protein copper binding domain. a regulator of neuronal copper homeostasis. *J. Biol. Chem.*, 278:17401–17407.
- Bauer, J., Strauss, S., Schreiter Gasser, U., Ganter, U., Schlegel, P., Witt, I., Yolk, B., and Berger, M. (1991). Interleikin-6 and alpha-2-macroglobulin indicate an acute-phase state in alzheimer's disease cortices. *FEBS Lett.*, 285:111–114.
- Beglopoulos, V., Sun, X., Saura, C., Lemere, C., Kim, R., and Shen, J. (2004). Reduced beta-amyloid production and increased inflammatory responses in presenilin conditional knock-out mice. *J. Biol. Chem.*, 274:46907–46914.
- Behl, C., Davis, J., Cole, G., and Schubert, D. (1992). Vitamin e protects nerve cells from amyloid beta protein toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 186:944–950.
- Behl, C., Davis, J., Lesley, R., and Schubert, D. (1994). Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell*, 77:817–827.
- Bektas, A., Hughes, J., Warram, J., Krolewski, A., and Doria, A. (2001). Type 2 diabetes locus on 12q15. further mapping and mutation screening of two candidate genes. *Diabetes*, 50:204–208.
- Bertrand, E., Brouillet, E., Caille, I., Bouillot, C., Cole, G., Prochiantz, A., and Allinquant, B. (2001). A short cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis in

- vitro and in vivo. *Mol. Cell Neurosci.*, 18:503–511.
- Bickel, H. (2000). Dementia syndrome and alzheimer disease: an assessment of morbidity and annual incidence in germany. *Gesundheitswesen*, 62:211–218.
- Blessed, G., Tomlinson, B., and Roth, M. (1968). The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of aged subjects. *Brit. J. Psychiat.*, 114:797–811.
- Boffa, M., Reid, T., Joo, E., Nesheim, M., and Koschinsky, M. (1999). Characterization of the gene encoding human tafi (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor plasma procarboxypeptidase b). *Biochemistry*, 38:6547–6558.
- Bokisch, V. and Müller-Eberhardt, H. (1970). Anaphylatoxin inactivator of human plasma: its isolation and characterization as a carboxypeptidase. *J. Clin. Invest.*, 49:2427–2436.
- Borchelt, D., Thinakaran, G., Eckman, C., Lee, M., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C., Kim, G., seekins, S., Yager, D., Slunt, H., Wang, R., seeger, M., Levey, A., Gandy, S., Copeland, N., Jenkins, N., Price, D., and Younkin, S. (1996). Familial alzheimer’s disease-linked presenilin 1 variants elevate ab-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron*, 17:1005–1013.
- Borg, J., Ooi, J., Levy, E., and Margolis, B. (1996). The phosphotyrosine interaction domains of x11 and fe65 bind to distinct sites on the yenyty motif of amyloid precursor protein. *Mol. Cell. Biol.*, 16:6229–6241.
- Borg, J., Straight, S., Kaech, S., de Taddeo-Borg, M., Kroon, D., Karnak, D., Turner, R., Kim, S., and Margolis, B. (1998). Identification of an evolutionarily conserved heterotrimeric complex involved in protein targeting. *J. Biol. Chem.*, 273:31633–31636.
- Botelho, M., Gralle, M., Oliveira, C., Torriani, I., and Ferreira, S. (2003). Folding and stability of the extracellular domain of the human amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.*, 278:34259–34267.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248–254.
- Bragg, W. and Bragg, W. (1913). The reflection of x-rays by crystals. *Proc. Roy. Soc. London A*, 88:428–438.
- Breen, K. (1992). App-collagen interaction is mediated by a heparin bridge mechanism. *Mol. Chem. Neuropathol.*, 16:109–121.
- Bruenger, K. (1992). Free r value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*, 355:472–475.
- Brünger, A., Adams, P., Clore, G., Delano, W., Gross, P., Grosse-kunstleve, R., Jiang, J., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R., L.M., R., Simonson, T., and Warren, G. (1999). Crystallography and nmr system a new software suite for macromolecular and structure determination. *Acta Crystallogr.*, D54:905–921.
- Buchner, J. (1996). Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J.*, 10:10–19.
- Bush, A., Multhaup, G., Moir, R., Williamson, T., Small, D., Rumble, B., Pollwein, P., Beyreuther, K., and Masters, C. (1993). A novel zinc(ii) binding site modulates the function of the beta a4 amyloid protein precursor of alzheimer’s disease. *J. Biol. Chem.*, 268:16109–16112.
- Bush, A., Pettingell, W., Multhaup, G., de Paradis, M., Vonsattel, J., Gusella, J., Beyreuther, K., Masters, C., and Tanzi, R. (1994). Rapid induction of alzheimer a beta amyloid formation

- by zinc. *Science*, 265:1464–1467.
- Butz, J., Okamoto, M., and Sudhof, T. (1998). A tripartite protein complex with the potential to couple synaptic vesicle exocytosis to cell adhesion in brain. *Cell*, 94:773–782.
- Caille, I., Allinquant, B., Dupont, E., Bouillot, C., Langer, A., Muller, U., and Prochiantz, A. (2004). Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development*, 131:2173–2181.
- Camacho, C. and Thirumalai, D. (1993). Kinetics and thermodynamics of folding in model proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90:6369–6372.
- Cao, X. and Sudhof, T. (2001). A transcriptionally active complex of app with fe65 and histone acetyltransferase tip60. *Science*, 293:115–120.
- Carter, C. and Carter, C. (1979). Protein crystallization using incomplete factorial experiments. *J. Biol. Chem.*, 254:12219–12223.
- Casella, L. and Gullotti, M. (1993). In *Bioinorganic Chemistry of Copper*, Karlin KD, Teyklar, Z (eds), chapter Dioxygen activation by biomimetic dinuclear complexes., pages 292–305. New York: Chapman & Hall.
- Chen, W., Goldstein, J., and Brown, M. (1990). Npxy, a sequence often found in cytoplasmatic tails, is required for coated pit mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.*, 265:3116–3123.
- Chirgadze, D., Hepple, J., Byrd, R., Sowdhamini, R., Blundell, T., and Gherardi, E. (1998). Insights into the structure of hepatocyte growth factor/scatter factor (hgf/sf) and implications for receptor activation. *FEBS Lett.*, 430:126–129.
- Cho, J., Kim, D., Chung, S., Ha, N., Oh, B., and Yong choi, K. (2002). Insight into the stereochemistry in the inhibition of carboxypeptidase a with n-(hydroxyaminocarbonyl)phenylalanine: binding modes of an enantiomeric pair of the inhibitor to carboxypeptidase a. *Bioorg. Med. Chem.*, 10:2015–2022.
- Chow, N., Korenberg, J., Chen, X., and Neve, R. (1996). App-bp1, a novel protein that binds to the carboxy-terminal region of the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.*, 271:11339–11346.
- Christianson, D. and Lipscomb, W. (1989). Carboxypeptidase a. *Acc. Chem. Res.*, 22:62–69.
- Christlet, T. and Veluraja, K. (2001). Database analysis of o-glycosylation sites in proteins. *Biophys. J.*, 80:952–960.
- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., Hyslop, P., and Selkoe, D. (1997). Mutant presenilins of alzheimer’s disease increase production of 42-residue amyloid b-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nature Med.*, 3:67–72.
- Ciuculescu, E., Mekmouche, Y., and Faller, P. (2005). Metal-binding properties of the peptide app170-188: a model of the znii-binding site of amyloid precursor protein (app). *Chemistry*, 11:903–909.
- Clark, M., Gagnon, J., Williams, A., and Barclay, A. (1985). Mrc ox-2 antigen: a lymphoid/neuronal membrane glycoprotein with a structure like a single immunoglobulin light chain. *EMBO J.*, 4:113–118.
- Clarris, H., Cappai, R., Heffernan, D., Beyreuther, K., Masters, C., and Small, D. (1997). Identification of heparin-binding domains in the amyloid precursor protein of alzheimer’s disease by deletion mutagenesis and peptide mapping. *J. Neurochem.*, 68:1164–1172.

- Clauser, E., Gardell, S., Craik, C., MacDonald, R., and Rutter, W. (1988). Structural characterization of the rat carboxypeptidase a1 and b genes. comparative analysis of the rat carboxypeptidase gene family. *J. Biol. Chem.*, 263:17837–17845.
- Cobine, P., George, G., Jones, C., Wickramasinghe, W., Solioz, M., and Dameron, C. (2002). Copper transfer from the cu(i) chaperone, copz, to the repressor, zn(ii)copy: metal coordination environments and protein interactions. *JBiochemistry.*, 41:5822–5829.
- Coll, M., Guasch, A., Aviles, F., and Huber, R. (1991). Three-dimensional structure of porcine procarboxypeptidase b: a structural basis of its inactivity. *EMBO*, 10:1–9.
- Coulson, E., Paliga, K., Beyreuther, K., and Masters, C. (2000). What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochem. Int.*, 36:175–184.
- Creighton, T. (1993). *Proteins: Structures and Moleculkar Properties, 2nd edn.* H.Freeman and Company, New York.
- Cudney, B., Patel, S., Weisgrabern, K., Newhouse, Y., and McPherson, A. (1994). Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth. *Acta Crystallog. Sect. D*, 50:414–423.
- Cummings, B. and Cotman, C. (1995). Image analysis of beta-amyloid load in alzheimer’s disease and relation to dementia severity. *Lancet*, 346:1524–1528.
- Cummings, B., Pike, C., Shankle, R., and Cotman, C. (1996).  $\beta$ -amyloid deposition and other measures of neuropathology predict cognitive status in alzheimer’s disease. *Neurobiol. Aging*, 17:921–933.
- Cupers, P., Orlans, I., Craessaerts, K., Annaert, W., and De Strooper, B. (2001). The amyloid precursor protein (app)-cytoplasmic fragment generated by gamma-secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurones in culture. *J. Neurochem.*, 78:1168–1178.
- Daigle, I. and Li, C. (1993). apl-1, a caenorhabditis elegans gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90:12045–12049.
- De Bernandez Clark, E. (1998). Refolding of recombinant proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9:157–163.
- De La Fortelle, E. and Bricogne, G. (1997). Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement in the mir and mad methods. *Methods Enzymol.*, 276:472–494.
- De Strooper, B. and Annaert, W. (2000). Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J. Cell Sci.*, 113:1857–1870.
- De Strooper, B., Craessaerts, K., Dewachter, I., Moechars, D., Greenberg, B., Van Leuven, F., and Van den Berghe, H. (1995). Basolateral secretion of amyloid precursor protein in madin-darby canine kidney cells is disturbed by alterations of intracellular ph and by introducing a mutation associated with familial alzheimer’s disease. *J. Biol. Chem.*, 270:4058–4068.
- De Strooper, B., Van Leuven, F., and Van den Berghe, H. (1991). The amyloid beta protein precursor or protease nexin ii from mouse is closer related to its human homolog than previously reported. *Biochem. Biophys. Acta*, 1129:141–143.
- Debye, P. (1914). Interferenz von röntgenstrahlung und wärmebewegung. *Annal. Phys.*, 43:49–95.
- Dill, K. and Chan, H. (1997). Perspective: From levinthal to pathways to funnels. *Nature struct. Biol.*, 4:10–19.
- Do, Y., Gifford-Moore, D., Beight, D., Rathnachalam, R., Klimkowski, V., and Warshawsky, A. (2005). Inhibition of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor by cysteine derivatives.

- Thromb. Res.*, 116:265–271.
- Dodson, E., Davies, G., Lamzin, V., Murshudov, G., and Wilson, K. (1998). Validation tools: can they indicate the information content of macromolecular crystal structures? *Structure*, 6:685–690.
- Dong, W., Fricker, L., and Day, R. (1999). Carboxypeptidase d is a potential candidate to carry out redundant processing functions of carboxypeptidase e based on comparative distribution studies in the rat central nervous system. *Neurosci.*, 89:1301–1317.
- Drenth, J. (1999). *Principles of protein x-ray crystallography*. Springer Verlag.
- Duara, R., Lopez-Alberola, R., Barker, W., Loewenstein, D., Zatinsky, M., Eisdorfer, C., and Weinberg, G. (1993). A comparison of familial and sporadic alzheimer's disease. *Neurology*, 43:1377–1384.
- Dulubova, I., Ho, A., Huryeva, I., Sudhof, T., and Rizo, J. (2004). Threedimensional structure of an independently folded extracellular domain of human amyloid-beta precursor protein. *Biochemistry*, 43:9583–9588.
- Dyrks, T., Dyrks, E., Hartmann, T., Masters, C., and Beyreuther, K. (1992). Amyloidogenicity of beta a4 and beta a4-bearing amyloid protein precursor fragments by metal-catalyzed oxidation. *J. Biol. Chem.*, 267:18210–18217.
- Dyrks, T., Weidemann, A., Multhaup, G., Salbaum, J., Lemaire, H., Kang, J., Müller-Hill, B., Masters, C., and Beyreuther, K. (1988). Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid a4 precursor of alzheimer's disease. *EMBO J.*, 7:949–957.
- Eikelenboom, P., Hack, C., Rozemuller, J., and Stam, F. (1989). Complement activation in amyloid plaques in alzheimer's dementia. *Virchows Arch. B, Cell Pathol.*, 56:259–262.
- Ember, J., Jagels, M., and Hugli, T. (1998). *Human Complement System in Health and Disease.*, chapter Characterization of complement anaphylatoxins and their biological responses., pages 241–284. Marcel Dekker, New York.
- Engh, R. and Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for x-ray protein structure refinement. *Acta Cryst.*, A47:392–400.
- Erdos, E. (1979). *Bradykinin, Kallidin ans Kallikrein*, chapter Handbook of experimental pharmacology, pages 427–487. Springer, Heidelberg.
- Erdos, E. and Sloane, E. (1962). An enzyme in human blood plasma that inactivates bradykinin and kallidins. *Biochem. Pharmacol.*, 11:562–585.
- Ermeikova, K., Chang, A., Zambrano, N., de Candida, P., Russo, T., and Sudol, M. (1998). Proteins implicated in alzheimer's diease. the role of fe65, a new adapter which binds to beta-amyloid precursor protein. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 446:161–180.
- Ermeikova, K., Zambrano, N., Linn, H., Minopoli, G., Gertler, F., Russo, T., and Sudol, M. (1997). The ww domain of neural protein fe65 interacts with proline-rich motifs in mena, the mammalian homolog of drosophilaenabled. *J. Biol. Chem.*, 272:32869–32877.
- Ewald, P. (1921). Das reziproke gitter in der strukturtheorie. *Z. Kristallogr.*, 56:129–156.
- Faming, Z., Kobe, B., Stewart, C., Rutter, W., and Goldsmith, E. (1991). Structural evolution of an enzyme specificity. the structure of rat carboxypeptidase a2 at 1.9 Å resolution. *J. Biol. Chem.*, 266:24606–24612.
- Fontenele-Neto, J., Kalinina, E., Feng, Y., and Fricker, L. (2005). Identification and distribution of mouse carboxypeptidase a-6. *Mol. Brain Res.*, 137:132–142.
- Fricker, L. (2004). *Handbook of proteolytic enzymes*, chapter Carboxypeptidase E, pages 840–844. Elsevier, London.

- Fricker, L., Plummer, T., and Snyder, S. (1983). Enkephalin convertase: potent, selective and irreversible inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 111:994–1000.
- Fukuyama, R., Wadhvani, K., Galdzicki, Z., Rapoport, S., and Ehrenstein, G. (1994).  $\beta$ -amyloid polypeptide increases calcium-uptake in pc12 cells: A possible mechanism for its cellular toxicity in alzheimer's disease. *Brain Res.*, 667:269–272.
- Garcia-Saez, I., Reverter, D., Vendrell, J., Aviles, F., and Coll, M. (1997). The three-dimensional structure of human procarboxypeptidase a2. deciphering the basis of the inhibition, activation and intrinsic activity of the zymogen. *EMBO J.*, 16:6906–6913.
- Gebhard, W., Schube, M., and Eulitz, M. (1989). cDNA cloning and complete primary structure of the small active subunit of human carboxypeptidase n (kininase 1). *Eur. J. Biochem.*, 178:602–607.
- Giambarella, U., Yamatsuji, T., Okamoto, T., Matsui, T., Ikezu, T., Murayama, Y., Levine, M., Katz, A. G., N., and Nishimoto, I. (1997). G protein betagamma complex-mediated apoptosis by familial alzheimer's disease mutant of app. *EMBO J.*, 16:4897–4907.
- Gilliland, G. and Ladner, J. (1996). Crystallization of biological macromolecules for x-ray diffraction studies. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 6:595–603.
- Glenner, G. (1981). congophilic angiopathy in the pathogenesis of alzheimer's degeneration. *Ann. Pathol.*, 1.
- Glenner, G. and Wong, C. (1984a). Alzheimer's disease and down syndrome: sharing of an unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122:1131–1135.
- Glenner, G. and Wong, C. (1984b). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 120:885–890.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fide, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., and James, L. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial alzheimer's disease. *Nature*, 349:704–706.
- Goldberg, A. and Goff, S. (1987). An increased content of protease la, the lon gene product, increases protein degradation and blocks growth in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 262:4508–4515.
- Golde, T., Estus, S., Usiak, M., and Younkin, S. (1990). Expression of beta amyloid protein precursor mRNAs: recognition of novel alternatively spliced form and quantitation in alzheimer's disease using pcr. *Neuron*, 4:253–267.
- Goldgaber, D., Lerman, M., McBride, O., Saffiotti, U., and Gajdusek, D. (1987). Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of alzheimer's disease. *Science*, 235:877–880.
- Gomez, J. and Freire, E. (1997). *Thermodynamic approach to Molecular Design. In: Structure-based Drug-Design: Thermodynamics, Modeling and Strategy*. Landes Bioscience.
- Gomis-Ruth, F., Companys, V., Qian, Y., Fricker, L., Vendrell, J., and Aviles, F. (1999). Crystal structure of avian carboxypeptidase d domain ii: a prototype for the regulatory metallo-carboxypeptidase subfamily. *EMBO J.*, 18:5817–5826.
- Gomis-Ruth, F., Gomez, M., Bode, W., Huber, R., and Aviles, F. (1995). The three-dimensional structure of the native ternary complex of bovine pancreatic procarboxypeptidase a with proproteinase e and chymotrypsinogen c. *EMBO J.*, 14:4387–4394.
- Goodman, Y., Steiner, M., Steiner, S., and Mattson, M. (1994). Nordihydroguaiaretic acid protects hippocampal neurons against amyloid- $\beta$ -peptide toxicity, and attenuates free radical

- and calcium accumulation. *Brain Res.*, 654:171–176.
- Gralle, M., Botelho, M., De Oliveira, C., Torriani, I., and Ferreira, S. (2002). Solution studies and structural model of the extracellular domain of the human amyloid precursor protein. *Biophys J.*, 83:3513–3524.
- Greenberg, S., Qiu, W., Selkoe, D., Ben-Itzhak, A., and Kosik, K. (1995). Amino-terminal region of the beta-amyloid precursor protein activates mitogen-activated protein kinase. *Neurosci Lett.*, 198:52–56.
- Grimwood, B., Plummer, T., and Tarentino, A. (1988). Characterization of the carboxypeptidase n secreted by hep g2 cells. *J. Biol. Chem.*, 263:14397–14401.
- Grimwood, B., Plummer, T., and Tarentino, A. (1989). Carboxypeptidase h. a regulatory peptide-processing enzyme produced by human hepatoma hep g2 cells. *J. Biol. Chem.*, 264:15662–65667.
- Gu, Y., Misonou, H., Sato, T., Dohmae, N., Takio, K., and Ihara, Y. (2001). Distinct intramembrane cleavage of the beta-amyloid precursor protein family resembling gamma-secretase-like cleavage of notch. *J. Biol. Chem.*, 276:35235–35238.
- Guasch, A., Coll, M., Aviles, F., and Huber, R. (1992). Three-dimensional structure of porcine pancreatic procarboxypeptidase a. a comparison of the a and b zymogens and their determinants for inhibition and activation. *J. Mol. Biol.*, 224:141–57.
- Haass, C., Hung, A., Selkoe, D., and Teplow, D. (1994). Mutations associated with a locus for familial alzheimer’s disease result in alternative processing of amyloid bet-protein precursor. *J. Biol. Chem.*, 269:17741–17748.
- Hadgar, V. and Skidgel, R. (2001). Carboxypeptidase d is up-regulated in raw 264.7 macrophages and stimulates nitric oxide synthesis by cells in arginine-free medium. *Mol. Pharmacol.*, 59:1324–1332.
- Hall, T. (1999). Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41:95–98.
- Hass, G. and Hermodson, M. (1981). Amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from tomato fruit. *Biochemistry*, 20:2256–2260.
- Hass, G., Nau, H., Biemann, K., Grahn, D., Ericsson, L., and Neurath, H. (1975). The amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from potatoes. *Biochemistry*, 14:1334–1342.
- Hendriks, D., Soons, J., Scharpe, S., Wevers, R., van Sande, M., and Holmquist, B. (1988). Identification of the carboxypeptidase responsible for the post-synthetic modification of creatine kinase in human serum. *Clin. Chim. Acta*, 172:253–260.
- Hendriks, L., van Duijn, C., Cras, P., Cruets, M., van Hul, W., van Harskamp, F., Warren, A., McInnis, M., Antonarakis, S., and Martin, J. (1992). Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation on codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nat. Genet.*, 1:218–221.
- Herreman, A., Serneels, L., Annaert, W., Collen, D., Schoonjans, L., and De Strooper, B. (2000). Clustal w: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22:4673–4680.
- Hesse, L., Behr, D., Masters, C., and Multhaup, G. (1994). The  $\beta$ a4 amyloid precursor protein binding to copper. *FEBS Lett.*, 349:109–116.
- Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J., Higgins, D., and Gibson, T. (1994). Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nat.*



*Cell Biol.*, 2:461–462.

- Ho, A. and Sudhof, T. (2004). Binding of f-spondin to amyloid-beta precursor protein: a candidate amyloid-beta precursor protein ligand that modulates amyloid-beta precursor protein cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:2548–2553.
- Holm, L. and Sander, C. (1993). Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J. Mol. Biol.*, 233:123–138.
- Hooper, N. (1994). Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.*, 354:1–6.
- Huffman, D. and O'Halloran, T. (2001). Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 70:677–701.
- Hung, A. and Selkoe, D. (1994). Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein. *EMBO J.*, 13:534–542.
- Hussain, I., Powell, D., Howlett, D., Tew, D., Meek, T., Chapman, C., Gloger, I., Murphy, K., Southan, C., Ryan, D., Smith, T., Simmons, D., Walsh, F., Dingwall, C., and Christie, G. (1999). Identification of a novel aspartic protease (asp2) as beta-secretase. *Mol. Cell Neurosci.*, 14:419–427.
- Hynes, T., Randal, M., Kennedy, L., Eigenbrot, C., and Kossiakoff, A. (1990). X-ray crystal structure of the protease inhibitor domain of alzheimer's amyloid beta-protein precursor. *Biochemistry*, 29:10018–10022.
- Iversen, L., Mortishire-Smith, R., Pollack, S., and Shearman, M. (1995). The toxicity *in vitro* of  $\beta$ -amyloid protein. *Biochem. J.*, 311:1–16.
- Iwatsubo, T., Mann, D., Odaka, A., Suzuki, N., and Ihara, Y. (1995). Amyloid  $\beta$  protein ( $a\beta$ ) deposition:  $A\beta_{42(43)}$  precedes  $a\beta_{40}$  in down syndrome. *Ann. Neurol.*, 37:294–299.
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., and Ihara, Y. (1994). Visualization of  $a\beta_{42(43)}$  and  $a\beta_{40}$  in senile plaques with end-specific  $a\beta$ -monoclonals: Evidence that an initially deposited species is  $a\beta_{42(43)}$ . *Neuron*, 13:45–53.
- Jancarik, J. and Kim, S. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.*, 11:268–272.
- Jarrett, J., Berger, E., and Lansbury, P. (1993). The c-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 695:144–148.
- Jarrett, J. and Lansbury, P. (1992). Amyloid fibril formation requires a chemically discriminating nucleation event: studies of an amyloidogenic sequence from the bacterial protein osmb. *Biochemistry*, 31:12345–12352.
- Jones, D. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.*, 292:195–202.
- Jones, T., Bergdoll, M., and Kjeldgaard, M. (1990). *Crystallographic and Modeling Methods in Molecular Design.*, chapter O: A macromolecular modeling environment., pages 189–195. C. Bugg S. Ealick. Springer-Verlag Press.
- Jung, Y., Kunczt, C., Pearson, R., Dixon, J., and Fricker, L. (1991). Structural characterization of the rat carboxypeptidase e gene. *Mol. Endocrinol.*, 5:1257–1268.
- Kadomatsu, K. and Muramatsu, T. (2004). Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer Lett.*, 204:127–143.
- Kalaria, R., Galloway, P., and Perry, G. (1991). Widespread serum amyloid p immunoreactivity in cortical amyloid deposits and the neurofibrillary pathology of alzheimer's disease and other degenerative disorders. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 17:189–201.
- Kamal, A., Almenar-Queralt, A., LeBlanc, J., Roberts, E., and Goldstein, L. (2001). Kinesin-

- mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires app. *Nature*, 414:643–648.
- Kamal, A., Stokin, G., Yang, Z., Xia, C., and Goldstein, L. (2000). Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-i. *Neuron*, 28:449–459.
- Kan, J. P. (1992). Current and future approaches to therapy of alzheimer’s disease. *Eur. Med. J. Chem.*, 27:565–570.
- Kang, J., Lemaire, H., Unterbeck, A., Salbaum, J., Masters, C., Grzeschik, K., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Müller-Hill, B. (1987). The precursor of alzheimer’s disease amyloid a4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325:733–736.
- Kang, J. and Müller-Hill, B. (1990). Differential splicing of alzheimer’s disease amyloid a4 precursor rna in rat tissues: Prea4(695) mrna is predominantly produced in rat and human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 166:1192–1200.
- Kantardjieff, K. and Rupp, B. (2003). Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, dna and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Sci.*, 12:1865–1871.
- Kayashima, T., Yamasaki, K., Yamada, T., Sakai, H., Miwa, N., and Ohta, T. (2003). The novel imprinted carboxypeptidase a4 gene (cpa4) in the 7q32 imprinting domain. *Hum. Genet.*, 112:220–226.
- Keil, C. (2003). Klonierung, expression und kristallisation von löslichen konstrukten des  $\beta$ -amyloid-precursor-proteins ( $\beta$ app) der alzheimer krankheit. Master’s thesis, Technische Universität München.
- Kibbey, M., Jucker, M., weeks, B., Neve, R., Van Nostrand, W., and Kleinman, H. (1993). Beta amyloid precursor protein binds to the neurite-promoting ikvav site of laminin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:10150–10153.
- Kim, H., Kim, E., Lee, J., Park, C., Kim, S., Seo, J., Chang, K., Yu, E., Jeong, S., Chong, Y., and Suh, Y. (2003). C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3 $\beta$  expression. *FASEB J.*, 17:1951–1953.
- Kimberly, W., Zheng, J., Guenette, S., and Selkoe, D. (2001). The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by fe65 and translocates to the nucleus in a notchlike manner. *J. Biol. Chem.*, 276:40288–40292.
- Kimberly, W., Zheng, J., Town, T., Flavell, R., and Selkoe, D. (2005). Physiological regulation of the beta-amyloid precursor protein signaling domain by c-jun n-terminal kinase jnk3 during neuronal differentiation. *J. Neurosci.*, 25:5533–5543.
- King, G. and Scott Turner, R. (2004). Adaptor protein interactions: modulators of amyloid precursor protein metabolism and alzheimer’s disease risk? *Exp. Neurol.*, 185:208–219.
- Kinoshita, A., Whelan, C., Berezovska, O., and Hyman, B. (2002a). The gamma secretase-generated carboxyl-terminal domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis via tip60 in h4 cells. *J. Biol. Chem.*, 277:28530–28536.
- Kinoshita, A., Whelan, C., Smith, C., Berezovska, O., and Hyman, B. (2002b). Direct visualization of the gamma secretase-generated carboxyl-terminal domain of the amyloid precursor protein: association with fe65 and translocation to the nucleus. *J. Neurochem.*, 82:839–847.
- Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., Shiojiri, S., and Ito, H. (1988). Novel precursor of alzheimer’s disease amyloid protein shows protease inhibitor activity. *Nature*, 331:530–532.
- Kleywegt, G. (1996). Use of non-crystallographic symmetry in protein structure refinement. *Acta*

*Cryst.*, D52:842–857.

- Kleywegt, G. and Bruenger, A. (1996). Checking your imagination: applications of the free r value. *Structure*, 4:897–904.
- Kleywegt, G. and Jones, T. (1995). Where freedom is given, liberties are taken. *Structure*, 3:535–540.
- Kleywegt, G. and Read, R. (1997). Not your average density. *Structure*, 5:1557–1569.
- Kobe, B. and Deisenhofer, J. (1993). Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. *Nature*, 366:751–756.
- Kobe, B. and Kajava, A. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 11:725–732.
- Koo, E. (2002). The beta-amyloid precursor protein (app) and alzheimer's disease: does the tail wag the dog? *Traffic*, 3:763–770.
- Kounnas, M., Moir, R., Rebeck, G., Bush, A., Argraves, W., Tanzi, R., Hyman, B., and Strickland, D. (1995). Ldl receptor-related protein, a multifunctional apoe receptor binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates degradation. *Cell.*, 82:331–340.
- Kovacs, D., Fausett, H., Page, K., Kim, T.-W., Moir, R., Merriam, D., Hollister, R., Hallmark, O., Mancini, R., Felsenstein, K., Hyman, B., Tanzi, R., and Wasco, W. (1996). Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: Neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nature Med.*, 2:224–229.
- Kuroki, K., Eng, F., Ishikawa, T., Turck, C., Harada, F., and D., G. (1995). gp180, a host cell glycoprotein that binds duck hepatitis b virus particles, is encoded by a member of the carboxypeptidase gene family. *J. Biol. Chem.*, 270:15022–15028.
- König, G., Mönning, U., Czech, C., Prior, R., Banati, R., Schreiter-Gasser, U., Bauer, J., Masters, C., and Beyreuther, K. (1992). Identification and differential expression of a novel alternative splice isoform of the beta a4 amyloid precursor protein (app) mrna in leukocytes and brain microglial cells. *J. Biol. Chem.*, 267:10804–10809.
- La Ferla, F. (2002). Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, 3:862–872.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., and Fahrenholz, F. (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96:3922–3927.
- Landschulz, W., Johnson, P., and McKnight, S. (1988). The leucine zipper: A hypothetical structure common to a new class of dna binding proteins. *Science*, 240:1759–1764.
- Lanier, L., Gate, M., Witke, W., Menzies, A., Wehman, A., Macklis, J., Kwiatkowski, D., Soriano, P., and Gertler, F. (1999). Mena is required for neurulation and commissure formation. *Neuron*, 22:313–325.
- Laskowski, R., MacArthur, M., Moss, D., and Thornton, J. (1993). Rocheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, 26:283–291.
- Lazarov, O., Morfini, G., Lee, E., Farah, M., Szodorai, A., DeBoer, S., Koliatsos, V., Kins, S., Lee, V., Wong, P., Price, D., Brady, S., and Sisodia, S. (2005). Axonal transport, amyloid precursor protein, kinesin-1 and the processing apparatus: revisited. *J. Neurosci.*, 25:2386–2395.
- Lee, M., Jin, Y., and Kim, D. (1999). 2-benzyl-2-methylsuccinic acid as inhibitor for carboxypeptidase a. synthesis and evaluation. *Bioorg. Med. Chem.*, 7:1755–1760.

- Leissring, M., Murphy, M., Mead, T., Akbari, Y., Sugarman, M., Jannatipour, M., Anliker, B., Muller, U., Saftig, P., De Strooper, B., Wolfe, M., Golde, T., and LaFerla, F. (2002). A physiologic signaling role for the gamma-secretase-derived intracellular fragment of app. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:4697–4702.
- Lemere, C., Blusztajn, J., Yamaguchi, H., Wisniewski, T., Saido, T., and Selkoe, D. (1996). Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and apo e in down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiol. Disease*, 3:16–32.
- Leslie, A. (1991). *Proceedings of the CCP4 Study Weekend.*, chapter Isomorphous Replacement and Anomalous Scattering., pages 9–22. Warrington: Daresbury Laboratory.
- Levin, Y., Skidgel, R., and Erdos, R. (1982). Isolation and characterization of the subunits of human plasma carboxypeptidase n (kininase i). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:4618–4622.
- Levy, E., Carman, M., Fernandez-Madrid, I., Power, M., Lieberburg, I., Van Duinen, S., Bots, G., Luyendijk, W., and Frangione, B. (1990). Mutation of the alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, dutch type. *Science*, 248:1124–1126.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D., Oshima, J., Pettingell, W., Yu, C., Jondro, P., Schmidt, S., and Wang, K. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial alzheimer's disease locus. *Science*, 269:973–977.
- Leyssen, M., Ayaz, D., Hebert, S., Reeve, S., De Strooper, B., and Hassan, B. (2005). Amyloid precursor protein promotes post-developmental neurite aborization in the *Drosophila* brain. *EMBO J.*, 24:2944–2955.
- Li, H., Roch, J., Sundsmo, M., Otero, D., Sisodia, S., Thomas, R., and Saitoh, T. (1997). Defective neurite extension is caused by a mutation in amyloid beta/a4 (a beta) protein precursor found in familial alzheimer's disease. *J. Neurobiol.*, 32:469–480.
- Li, J., Rehli, M., Timblin, B., Tan, F., Krause, S., and Skidgel, R. (2002). Structure of the human carboxypeptidase m gene. identification of a proximal gc-rich promoter and a unique distal promoter that consists of repetitive elements. *Gene*, 284:189–202.
- Lin, T. and Timasheff, S. (1996). On the role of surface tension in the stabilization of globular proteins. *Protein Sci.*, 5:372–381.
- Liu, Q., Yu, L., Gao, J., Fu, Q., Zhang, J., and Zhang, P. (2000). Cloning, tissue expression pattern and genomic organization of latexin, a human homologue of rat carboxypeptidase a inhibitor. *Mol. Biol. Rep.*, 27:241–246.
- Lorent, K., Overbergh, L., Moechars, D., De Strooper, B., Van Leuven, F., and Van den Berghe, H. (1995). Expression in mouse embryos and adult mouse brain of the members of the amyloid precursor protein family, of the alpha-2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and of its ligands apolipoprotein e, lipoprotein-lipase, alpha-2-macroglobulin and the 40,000 molecular weight receptor-associated protein. *Neuroscience*, 65:1009–1025.
- Lorenzo, A. and Yankner, B. (1994). b-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:12243–12247.
- Lorenzo, A., Yuan, M., Zhang, Z., Paganetti, P., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Mautino, J., Vigo, F., Sommer, B., and Yankner, B. (2000). Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in slzheimer's disease. *Nat. Neurosci.*, 3:460–464.
- Lu, D., Shaked, G., Masliah, E., Bredesen, D., and Koo, E. (2003). Amyloid beta protein toxicity mediated by the formation of amyloid-beta protein precursor complexes. *Ann. Neurol.*, 54:781–789.

- Lyckmann, A., Confaloni, A., Thinakaran, G., Sisodia, S., and Moya, K. (1998). Post-translational processing and turnover kinetics of presynaptically targeted amyloid precursor superfamily protein in the central nervous system. *J. Biol. Chem.*, 273:11100–11106.
- Maiorov, V. and Crippen, G. (1994). Significance of root-mean square deviation in comparing threedimensional structures of globular proteins. *J. Mol. Biol.*, 235:625–634.
- Mann, D. (1989). Cerebral amyloidosis, ageing and alzheimer's disease; a contribution from studies on down's syndrome. *Neurobiol. Aging*, 10:397–399.
- Markossian, K. and Kurganov, B. (2003). Copper chaperones, intracellular copper trafficking proteins. function, structure, and mechanism of action. *Biochemistry (Moscow)*, 68:827–837.
- Marston, F. (1986). The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *E.coli*. *J. Biochem.*, 240:1–12.
- Masters, C., Multhaup, G., Simms, G., Pottgiesser, J., Martins, R., and Beyreuther, K. (1985). Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J.*, 4:2757–2763.
- Matsuda, S., Matsuda, Y., and D'Adamio, L. (2003). Amyloid beta protein precursor (abetaapp), but not abetaapp-like protein 2, is bridged to the kinesin-light chain by the scaffold protein jnk-interacting protein 1. *J. Biol. Chem.*, 278:38601–38606.
- Matthews, K., Mueller-Ortiz, S., and Wetsel, R. (2003). Carboxypeptidase n: a pleiotropic regulator of inflammation. *Mol. Imm.*, 40:785–793.
- Matthews, K. and Wetsel, R. (2001). Characterization of mouse carboxypeptidase n small active subunit gene structure. *J. Immunol.*, 166:6196–6202.
- Mattson, M., Barger, S., Furukawa, K., Bruce, A., Wyss-Coray, T., and Mucke, L. (1997). Cellular signaling roles of tgf beta, tnf alpha and beta app in brain injury responses and alzheimer's disease. *Brain Res. Rev.*, 23:47–61.
- Mattson, M., Tomaselli, K., and Rydel, R. (1993). Calcium-destabilizing and neurodegenerative effect of aggregated beta-amyloid peptide are attenuated by basic fgf. *Brain Res.*, 621:35–49.
- Maynard, C., Bush, A., Masters, C., Cappai, R., and Li, Q. (2005). Metals and amyloid-beta in alzheimer's disease. *Int. J. Exp. Pathol.*, 86:147–159.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., D., P., and Stadlan, E. (1984). Clinical diagnosis of alzheimer's disease: report of the nincds-arda work group under the auspices of department of health and human services task force on alzheimer's disease. *Neurology*, 34:939–944.
- McLoughlin, D., Irving, N., Brownlee, J., Brion, J., Leroy, K., and Miller, C. (1999). Mint2/x11-like colocalizes with the alzheimer's disease amyloid precursor protein and is associated with neuritic plaques in alzheimer's disease. *Eur. J. Neurosci.*, 11:1988–1994.
- McPherson, A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur. J. Biochem.*, 189:1–23.
- McRee, D. (1992). *Practical Protein Crystallography*. Academic Press, San Diego.
- Meda, L., Cassatella, M., Szendrei, G., Otvos, Jr., L., Baron, P., Villalba, M., Ferrari, D., and Rossi, F. (1995). Activation of microglial cells by  $\beta$ -amyloid protein and interferon-gamma. *Nature*, 374:647–650.
- Merdes, G., Soba, P., Loewer, A., Bilic, M., Beyreuther, K., and Paro, R. (2004). Interference of human and *Drosophila* app and app-like proteins with pns development in *Drosophila*. *EMBO J.*, 23:4082–4095.
- Michelutti, L., Falter, H., Certossi, S., Marcotte, B., and Mazzuchin, A. (1987). Isolation and

- purification of creatine kinase conversion factor from human serum and its identification as carboxypeptidase n. *Clin. Biochem.*, 20:21–29.
- Milligan, C. (2000). Caspase cleavage of app results in a cytotoxic proteolytic peptide. *Nat. Med.*, 6:385–386.
- Milward, E., Papadopoulos, R., Fuller, S., Moir, R., Small, D., Beyreuther, K., and Masters, C. (1992). The amyloid protein precursor of alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. *Neuron*, 9:129–137.
- Mirzabekov, T., Lin, M., Yuan, W., Marshall, P., Carman, M., Tomaselli, K., Lieberburg, I., and Kagan, B. (1994). Channel formation in planar lipid bilayers by a neurotoxic fragment of the beta-amyloid peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 202:1142–1148.
- Moeller, C., Swindell, E., Kispert, A., and Eichele, G. (2003). Carboxypeptidase z (cpz) modulates wnt signaling and regulates the development of skeletal elements in the chicken. *Development*, 130:5103–5111.
- Mohammadi, M., Olsen, S., and Ibrahimi, O. (2005). Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokin. Growth Factor Rev.*, 16:107–137.
- Moncada, S. and Higgs, E. (1995). Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *Faseb. J.*, 9:1319–1330.
- Moore, C., Diehl, T., Selkoe, D., and Wolfe, M. (2000). Toward the characterization and identification of gamma-secretases using transition-state analogue inhibitors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 920:197–205.
- Morgan, C., Colombres, M., Nunez, M., and Inestrosa, N. (2004). Structure and function of amyloid in alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.*, 74:323–349.
- Mullan, M. (1992). Familial alzheimer's disease: second gene locus located. *BMJ*, 305:1108–1109.
- Multhaup, G., Mechler, H., and Masters, C. (1995). Characterization of the high affinity heparin binding site of the alzheimer's disease beta a4 amyloid precursor protein (app) and its enhancement by zinc(ii). *J. Mol. Recognit.*, 8:247–257.
- Multhaup, G., Ruppert, T., Schlicksupp, A., Hesse, L., Bill, E., Pipkorn, R., Masters, C., and Beyreuther, K. (1998). Copper-binding amyloid precursor protein undergoes a site-specific fragmentation in the reduction of hydrogen peroxide. *Biochemistry*, 37:7224–7230.
- Multhaup, G., Schlicksupp, A., Hesse, L., Behr, D., Ruppert, T., Masters, C., and Beyreuther, K. (1996). The amyloid precursor protein of alzheimer's disease in the reduction of copper(ii) to copper(i). *Science*, 271:1406–1409.
- Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Otomo, E., and Ikeda, K. (1991). Apolipoprotein e immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangle in alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in creutzfeldt-jakob disease. *Brain Res.*, 541:163–166.
- Narindrasorasak, S., Lowery, D., Altman, R., Gonzalez De Whitt, P., Greenberg, B., and Kisilevsky, R. (1992). Characterization of high affinity binding between laminin and alzheimer's disease amyloid precursor proteins. *Lab. Invest.*, 67:643–652.
- Neve, R. and Robakis, N. (1998). Alzheimer's disease: a re-examination of the amyloid hypothesis. *Trends Neurosci.*, 21:15–19.
- Nicholls, A., Sharp, K., and Honig, B. (1991). Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins*, 11:281–296.
- Ninomiya, H., Roch, J., Sundsmo, M., Otero, D., and Saitoh, T. (1993). Amino acid sequence terms represents the active domain of amyloid beta/a4 protein precursor that promotes fibroblast growth. *J. Cell. Biol.*, 121:879–886.

- Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Murayama, Y., and Ogata, E. (1993). Alzheimer amyloid precursor complexes with brain gtp-binding protein g(o). *Nature*, 362:75–79.
- Nitsch, R., Deng, M., Growdon, J., and Wurtman, R. (1996). Serotonin 5-ht2a and 5-ht2e receptors stimulate amyloid precursor protein ectodomain secretion. *J. Biol. Chem.*, 271:4188–4194.
- Normant, E., Martres, M., Schwartz, J., and Gros, C. (1995). Purification, cDNA cloning, functional expression and characterization of a 26-kDa endogenous mammalian carboxypeptidase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:12225–12229.
- Novikova, E., Eng, F., Yan, L., Qian, Y., and Fricker, L. (1999). Characterization of the enzymatic properties of the first and second domains of metallo-carboxypeptidase D. *J. Biol. Chem.*, 274:28887–28892.
- Novikova, E., Reznik, S., Varlamov, O., and Fricker, L. (2000). Carboxypeptidase Z is present in the regulated secretory pathway and extracellular matrix in cultured cells and in human tissues. *J. Biol. Chem.*, 275:4865–4870.
- Ohsawa, I., Takamura, C., and Kohsaka, S. (1997). The amino-terminal region of amyloid precursor protein is responsible for neurite outgrowth in rat neocortical explant culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 236:59–65.
- Ohsawa, I., Takamura, C., and Kohsaka, S. (2001). Fibulin-1 binds the amino-terminal head of beta-amyloid precursor protein and modulates its physiological function. *J. Neurochem.*, 76:1411–1420.
- Ohsawa, I., Takamura, C., Morimoto, T., Ishiguro, M., and Kohsaka, S. (1999). Amino-terminal region of secreted form of amyloid precursor protein stimulates proliferation of neural stem cells. *Eur. J. Neurosci.*, 1:1907–1913.
- Onuchic, J., Luthey-Schulten, Z., and Wolynes, P. (1997). Theory of protein folding: The energy landscape perspective. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 48:545–600.
- Oshima, G., Kato, J., and Erdos, E. (1975). Plasma carboxypeptidase N, subunits and characteristics. *Arch. Biochem. Biophys.*, 170:132–138.
- Otwinowski, Z. (1991). *Proceedings of the CCP4 Study Weekend.*, chapter Isomorphous Replacement and Anomalous Scattering., pages 80–86. Warrington: Daresbury Laboratory.
- Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997). Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in Enzymol.*, 276:307–326.
- Paliga, K., Peraus, G., Kreger, S., Durrwang, U., Hesse, L., Multhaup, G., Masters, C., Beyreuther, K., and Weidemann, A. (1997). Human amyloid precursor-like protein 1—cDNA cloning, ecto-expression in COS-7 cells and identification of soluble forms of the cerebrospinal fluid. *Eur. J. Biochem.*, 250:354–363.
- Pallares, I., Bonet, R., Garcia-Castellanos, R., Ventura, S., Aviles, F., and Vendrell, J. (2005). Structure of human carboxypeptidase A4 with its endogenous protein inhibitor, latexin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:3978–3983.
- Pangalos, M., Efthimiopoulos, S., Shioi, J., and Robakis, N. (1995). The chondroitin sulfate attachment site of appican is formed by splicing out exon 15 of the amyloid precursor gene. *J. Biol. Chem.*, 270:10388–10391.
- Pangalos, M., Shioi, J., Efthimiopoulos, S., Wu, A., and Robakis, N. (1996). Characterization of appican, the chondroitin sulfate proteoglycan form of the Alzheimer amyloid precursor protein. *Neurodegeneration*, 5:445–451.

- Papageorgiou, A., Shapiro, R., and Acharya, K. (1997). Molecular recognition of human angiogenin by placental ribonuclease inhibitor—an x-ray crystallographic study at 2.0 Å resolution. *EMBO J.*, 16:5162–5177.
- Pardossi-Piquard, R., Petit, A., Kawarai, T., Sunyach, C., Alves da Costa, C., Vincent, B., Ring, S., D’Adamio, L., Shen, J., Muller, U., St George Hyslop, P., and Checler, F. (2005). Presenilin-dependent transcriptional control of the abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaapp and aplp. *Neuron*, 46:541–554.
- Park, J., Kim, D., Kim, S., Woo, J., and Ryu, S. (2001). Sulfamide-based inhibitors for carboxypeptidase a. novel type transition state analogue inhibitors for zinc proteases. *J. Med. Chem.*, 45:5295–5302.
- Parkinson, D. (1990). Two soluble forms of bovine carboxypeptidase h have different nh2-terminal sequences. *J. Biol. Chem.*, 265:17101–17105.
- Parsell, D. and Sauer, R. (1989). The structural stability of a protein is an important determinant of its proteolytic susceptibility in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 264:7590–7595.
- Passer, B., Pellegrini, L., Russo, C., Siegel, R., Lenardo, M., Schettini, G., Bachmann, M., Tabaton, M., and D’Adamio, L. (2000). Generation of an apoptotic intracellular peptide by gamma-secretase cleavage of alzheimer’s amyloid beta protein precursor. *J. Alzheimers Dis.*, 2:1289–301.
- Phillips, M. and Rutter, W. (1996). Role of the prodomain in folding and secretion of rat pancreatic carboxypeptidase a1. *Biochemistry*, 35:6771–6776.
- Pike, C., Burdick, D., Walencewicz, A., Glabe, C., and Cotman, C. (1993). Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J. Neurosci.*, 13:1676–1687.
- Plummer, T.H.Jr. und Hurwitz, M. (1978). Human plasma carboxypeptidase n. isolation and characterization. *J. Biol. Chem.*, 253:3907–3912.
- Ponte, P., Gonzalez De Whitt, P., Schilling, J., Miller, J., Hsu, D., Greenberg, B., Davis, K., Wallace, W., Lieberburg, I., and Fuller, F. (1988). A new a4 amyloid mrna contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. *Nature*, 331:525–527.
- Qian, Y., Varlamov, O., and Fricker, L. (1999). Glu300 of rat carboxypeptidase e is essential for enzymatic activity but not substrate binding or routing to the regulated secretory pathway. *J. Biol. Chem.*, 274:11582–11586.
- Qiu, W., Ferreira, A., Miller, C., Koo, E., and Selkoe, D. (1995). Cell surface  $\beta$ -amyloid precursor protein stimulates neurite outgrowth of hippocampal neurons in an isoform-dependent manner. *J. Neurosci.*, 15:2157–2167.
- Quagraine, M., Tan, F., Tamei, H., Erdős, E., and Skidgel, R. (2005). Plasmin alters the activity and quaternary structure of human plasma carboxypeptidase n. *Biochem. J.*, 388:81–91.
- Radford, S. (2000). Protein folding: progress made and promises ahead. *Trends Biochem. Sci.*, 25:611–618.
- Ramachandran, G.N. amd Sasisekharan, V. (1968). Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Prot. Chem.*, 23:283–437.
- Ramelot, T., Gentile, L., and Nicholson, L. (2000). Transient structure of the amyloid precursor protein cytoplasmic tail indicates preordering of structure for binding to cytosolic factors. *Biochemistry*, 39:2714–2725.
- Rebeck, G., Moir, R., Mui, S., Strickland, D., and Tanzi, R.E. andHyman, B. (2001). Association of membrane-bound amyloid precursor protein app with the apolipoprotein e receptor lrp.



*Brain Res. Mol. Brain. Res.*, 87:238–245.

- Redlitz, A., Tan, A., Eaton, D., and Plow, E. (1995). Plasma carboxypeptidases as regulators of the plasminogen system. *J. Clin. Invest.*, 96:2534–2538.
- Rees, D., Lewis, M., and Lipscomb, W. (1983). Refined crystal structure of carboxypeptidase a at 1.54 *mathringA* resolution. *J. Mol. Biol.*, 168:367–387.
- Rees, D. and Lipscomb, W. (1982a). Refined crystal structure of the potato inhibitor complex of carboxypeptidase a at 2.5 *mathringA* resolution. *J. Mol. Biol.*, 160:475–498.
- Rees, D. and Lipscomb, W. (1982b). Refined crystal structure of the potato inhibitor complex of carboxypeptidase a at 2.5 *mathringA* resolution. *J. Mol. Biol.*, 160:475–498.
- Rehm, T., Huber, R., and Holak, T. (2002). Application of nmr in structural proteomics: screening for proteins amenable to structural analysis. *Structure (Camb.)*, 10:1613–1618.
- Reinhard, C., Hebert, S., and De Strooper, B. (2005). The amyloid- $\beta$  precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J.*, 24:3996–4006.
- Reverter, D., Fernandez-catalan, C., Baumgartner, R., Pfander, R., Huber, R., and Bode, W. (2000). Structure of a novel leech carboxypeptidase inhibitor determined free in solution and in complex with human carboxypeptidase a2. *Nat. Struct. Biol.*, 7:322–328.
- Reverter, D., Maskos, K., Tan, F., Skidgel, R., and Bode, W. (2004). Crystal structure of human carboxypeptidase m, a membrane-bound enzyme that regulates peptide hormone activity. *J. Mol. Biol.*, 338:257–269.
- Reynolds, D., Stevens, R., Gurley, D., Lane, W., Austen, K., and Serafin, W. (1989). Isolation and molecular cloning of mast cell carboxypeptidase a. a novel member of the carboxypeptidase gene family. *J. Biol. Chem.*, 264:20094–20099.
- Riley, D., Tan, F., Miletich, D., and Skidgel, R. (1998). Chromosomal localization of the genes for human carboxypeptidase d (cpd) and the active 50-kda subunit of human carboxypeptidase n (cpn1). *Genomics*, 50:105–108.
- Rodgers, D. (1994). Cryocrystallography. *Structure*, 2:1135–1140.
- Rogaev, E., Sherrington, R., Rogaeva, E., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., and Tsuda, T. (1995). Familial alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*, 376:775–778.
- Roher, A., Ball, M., Bhave, S., and Wakade, A. (1991). Beta-amyloid from alzheimer disease brains inhibits sprouting and survival of sympathetic neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 174:572–579.
- Roncarati, R., Sestan, N., Scheinfeld, M., Berechid, B., Lopez, P., Meucci, O., McGlade, J., Rakic, P., and D'Adamio, L. (2002). The gammasecretase-generated intracellular domain of beta-amyloid precursor protein binds numb and inhibits notch signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:7102–7107.
- Rosen, D., Martin-Morris, L., Luo, L., and White, K. (1989). A drosophila gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 86:2478–2482.
- Rossjohn, J., Cappai, R., McKinstry, W., Feil, S., Henry, A., Galatis, D., Hesse, L., Multhaup, G., Beyreuther, K., Masters, C., and Parker, M. (1999). Crystal structure of the n-terminal growth factor-like domain of alzheimer's amyloid precursor protein. *Nature struct. Biol.*, 6:327–331.
- Roth, M., Tomlinson, B., and Blessed, G. (1966). Correlation between scores for dementia and

- counts of senile plaques in the cerebral grey of elderly subjects. *Nature*, 209:109–110.
- Rottner, K., Behrendt, B., Small, J., and Wehland, J. (1999). Vaspdynamics during lamellipodia protrusion. *Nat. Cell Biol.*, 1:321–322.
- Rozemuller, J., Stam, F., and Eikelenboom, P. (1990). Acute phase proteins are present in amorphous plaques in the cerebral but not in the cerebellar cortex of patients with alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, 119:75–78.
- Russo, C., Dolcini, V., Salis, S., Venezia, V., Violani, E., Carlo, P., Zambrano, N., Russo, T., and Schettini, G. (2002). Signal transduction through tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal fragments of app via an enhanced interaction with shc/grb2 adaptor proteins in reactive astrocytes of alzheimer's disease brain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 973:323–333.
- Russo, T., Faraonio, R., Minopoli, G., De Candida, P., de Renzzis, S., and Zambrano, N. (1998). Fe 65 and the protein network centered around the cytosolic domain of the alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *FEBS Lett.*, 434:1–7.
- Sabo, S., Ikin, A., Buxbaum, J., and Greengard, P. (2001). The alzheimer amyloid precursor protein (app) and fe65, an app-binding protein, regulate cell-movement. *J. Cell Biol.*, 153:1403–1414.
- Sabo, S., Lanier, L., Ikin, A., Khorkova, O., Saharabudhe, S., Greengard, P., and Buxbaum, J. (1999). Regulation of beta-amyloid secretion by fe65, an amyloid protein precursor-binding protein. *J. Biol. Chem.*, 274:7952–7957.
- Sachdev, D. and Chirgwin, J. (1998). Solubility of proteins isolated from inclusion bodies is enhanced by fusion to maltose-binding protein or thioredoxin. *Protein Expr. Purif.*, 12:122–132.
- Salbaum, J., Weidemann, A., Lemaire, H., Masters, C., and Beyreuther, K. (1988). The promoter of alzheimer's disease amyloid a4 precursor gene. *EMBO J.*, 7:2807–2813.
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. *Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratories Press.*
- Sandbrink, R., Masters, C., and Beyreuther, K. (1994). Beta a4-amyloid protein precursor mrna isoforms without exon 15 are ubiquitously expressed in rat tissues including brain, but not in neurons. *J. Biol. Chem.*, 269:1510–1517.
- Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condron, M., Teplow, D., and Haass, C. (2001). Presenilin-dependent gammasecretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the s3 cleavage of notch. *EMBO Rep.*, 2:835–841.
- Schein, C. and Noteborn, M. (1988). Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by low growth temperature. *BioTechnology*, 6:291–294.
- Scheinfeld, M., Matsuda, S., and D'Adamio, L. (2003). Nk-interacting protein-1 promotes transcription of a beta protein precursor but not a beta precursor-like proteins, mechanistically different than fe65. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:1729–1734.
- Schellenberg, G., Payami, H., Wijsman, E., Orr, H., Goddard, K., Anderson, L., Nemens, E., White, J., Alonso, M., and Ball, M. (1993). Chromosome 14 and late-onset familial alzheimer disease (fad). *Am. J. Hum. Genet.*, 53:619–628.
- Scheuermann, S., Hamsch, B., Hesse, L., Stumm, J., Schmidt, C., Beher, D., Bayer, T., Beyreuther, K., and Multhaup, G. (2001). Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.*, 276:33923–33929.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jenen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T., Hardy, J.,

- Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D., and Younkin, S. (1996). Secreted amyloid  $\beta$ -protein bsimilar to that in the senile plaques of alzheimer's disease is increased *in vivo* by the presenilin 1 and 2 and app mutations linked to familial alzheimer's disease. *Nature Med.*, 2:864–870.
- Schneider, T. and Sheldrick, G. (2002). Substructure solution with shelxd. *Acta Cryst.*, D58:1772–1779.
- Schubert, D., LaCorbiere, M., Saitoh, T., and Cole, G. (1989). Characterization of an amyloid beta precursor protein that binds heparin and contains tyrosine sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:2066–2069.
- Schubert, D., LaCorbiere, M., Saitoh, T., and Cole, G. (2004). Characterization of an amyloid beta precursor protein that binds heparin and contains tyrosine sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:2066–2069.
- Schwartz, L. and Bradford, T. (1989). Regulation of tryptase from human lung mast cells by heparin. stabilization of the active tetramer. *J. Biol. Chem.*, 261:7372–7379.
- Selkoe, D. (1999). Translating cell biology into therapeutic advances in alzheimer's disease. *Nature Struct. Biol.*, 399:23–31.
- Selkoe, D., Podlisny, M., Joachim, C., Vickers, E., Lee, G., Fritz, L., and Oltersdorf, T. (1988). Beta-amyloid precursor protein of alzheimer disease occurs as 110- to 135 kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:7341–7345.
- Serpell, L. (2000). Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochim. Biophys. Acta*, 1502:16–30.
- Shearman, M., Hawtin, S., , and Tailor, V. (1995). The intracellular component of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (mtt) reduction is specifically inhibited by beta-amyloid peptides. *J. Neurochem.*, 65:218–227.
- Shearman, M., Ragan, C., and Iversen, L. (1994). Inhibition of pc12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91:1470–1474.
- Sherrington, R., Rogaev, E., Liang, Y., Rogaeva, E., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., and Holman, K. (1995). Clonig of a gene bearing missense mutations in early-onset familial alzheimer's disease. *Nature*, 375:754–760.
- Shortle, D. (1996). The denatured state (the other half of the folding equation) and its role in protein stability. *FASEB J.*, 10:27–34.
- Sidyelyeva, G. and Fricker, L. (2002). Characterization of drosophila carboxypeptidase d. *J. Biol. Chem.*, 277:49613–49620.
- Simchowicz, T. (1911). Histologische studien über die senile demenz. *Histol. Histopathol. Arb. (Nissl-Alzh)*, 4:267–444.
- Sinha, S., Anderson, J., Barbour, R., Basi, G., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H., Frigon, N., and Hong, J. (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature*, 402:537–540.
- Sinha, S., Dovey, H., Seubert, P., Ward, P., Blacher, R., Blaber, M., Bradshaw, R., Arici, M., Mobley, W., and Lieberburg, I. (1990). The protease inhibitory properties of the alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.*, 265:8983–8985.
- Skidgel, R. (1995). Human carboxypeptidase n: lysine carboxypeptidase. *Methods Enzymol.*,

248:653–663.

- Skidgel, R. (1996). *Zinc Metalloprotease in Health and Disease.*, chapter Structure and function of mammalian zinc carboxypeptidase., pages 241–283. Taylor & Francis, London.
- Skidgel, R. (2004). *Handbook of proteolytic enzymes*, chapter Carboxypeptidase M, pages 851–854. Elsevier, London.
- Skidgel, R., Davis, R., and Tan, F. (1989). Human carboxypeptidase m. purification and characterization of a membrane-bound carboxypeptidase that cleaves peptide hormones. *J. Biol. Chem.*, 264:2236–2241.
- Skidgel, R. and E.G., E. (1998). Cellular carboxypeptidases. *Immunol. Rev.*, 161:129–141.
- Skidgel, R. and Erdos, E. (2004). *Handbook of proteolytic enzymes*, chapter Carboxypeptidase E, pages 837–840. Elsevier, London.
- Slunt, H., Thinakaran, G., Von Koch, C., Lo, A., Tanzi, R., and Sisodia, S. (1994). Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (app). *J. Biol. Chem.*, 269:2637–2644.
- Small, D., Clarris, H., Williamson, T., Reed, G., Key, B., Mok, S., Beyreuther, K., Masters, C., and Nurcombe, V. (1999). Neurite-outgrowth regulating functions of the amyloid protein precursor of alzheimer’s disease. *J. Alzheimers Dis.*, 1:275–285.
- Small, D., Nurcombe, V., Reed, G., Clarris, H., Moir, R., Beyreuther, K., and Masters, C. (1994). A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of alzheimer’s disease is involved in the regulation of neuritic outgrowth. *J. Neurosci.*, 14:2117–2127.
- Smith, R., Higuchi, D., and Broze, G. (1990). Platelet coagulation factor xia-inhibitor, a form of alzheimer amyloid precursor protein. *Science*, 248:1126–1128.
- Soba, P., Eggert, S., Wagner, K., Zentgraf, H., Siehl, K., Kreger, S., Lower, A., Langer, A., Merdes, G., Paro, R., and Masters, C. (2005). Homo- and heterodimerization of app family members promotes intracellular adhesion. *EMBO J.*, 24:3624–3634.
- Song, L. and Fricker, L. (1996). Tissue distribution and characterization of soluble and membrane-bound forms of metallocarboxypeptidase d. *J. Biol. Chem.*, 271:28884–28889.
- Sprecher, C., Grant, F., Grimm, G., O’Hara, P., Norris, F., Norris, K., and Foster, D. (1993). Molecular cloning of the cdna for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family. *Biochemistry*, 32:4481–4486.
- Springman, E., Dikov, M., and Serafin, W. (1995). Mast cell procarboxypeptidase a. molecular modeling and biochemical characterization of its processing within secretory granules. *J. Biol. Chem.*, 270:1300–1307.
- St George-Hyslop, P.H., Tanzi, R., Polinsky, R., Haines, J., Nee, L., Watkins, P., Myers, R., Feldman, R., Pollen, D., and Drachman, D. (1987). The genetic defect causing familial alzheimer’s disease maps on chromosome 21. *Science*, 235:885–890.
- Steiner, M. and Haass, C. (2000). Intramembrane proteolysis by presenilins. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 1:217–224.
- Strittmatter, W., Weisgraber, K., Huang, D., Dong, L., Salvesen, G., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A., Goldgaber, D., and Roses, A. (1993). Binding of human apolipoprotein e to synthetic amyloid beta peptide: isoform specific effects and implications for late-onset alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:8098–8102.
- Suzuki, N., Cheung, T., Cai, X., Odaka, A., Otvos, L., Eckman, C., Golde, T., and Younkin, S. (1994). An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta app717) mutants. *Science*, 264:1336–1340.

- Takahashi, M., Dore, S., Ferris, C., Tomita, T., Sawa, A., Wolosker, H., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Kim, S., Thinakaran, G., Sisodia, S., and Snyder, S. (2000). Amyloid precursor proteins inhibit heme oxygenase activity and augment neurotoxicity in alzheimer's disease. *Neuron*, 28:461–473.
- Tamaoka, A., Odaka, A., Ishibashi, Y., Usami, M., Sahara, N., Suzuki, N., Nukina, N., Mizusawa, H., Shoji, S., Kanazawa, I., and Mori, H. (1994). App717 missense mutation affects the ratio of amyloid  $\beta$ - protein species ( $a\beta$ 1-42/43 and  $a\beta$ 1-40) in familial alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.*, 269:32721–32724.
- Tan, F., Rehli, M., Krause, S., and Skidgel, R. (1997). Sequence of human carboxypeptidase d reveals it to be a member of the regulatory carboxypeptidase family with three tandem active site domains. *Biochem. J.*, 327:81–87.
- Tan, F., Weerasinghe, D., Skidgel, R., Tamei, H., Kaul, R., Roninson, I., Schilling, J., and Erdos, E. (1990). The deduced protein sequence of the human carboxypeptidase n high molecular weight subunit reveals the presence of leucin-rich tandem repeats. *J. Biol. Chem.*, 265:13–19.
- Tanzi, R., Gusella, J., Watkins, P., Bruns, G., St George Hyslop, P., Van Keuren, M.L., Patterson, D., Pagan, S., Kurnit, D., and Neve, R. (1987). Amyloid beta protein gene: cdna, mrna distribution, and genetic linkage near the alzheimer locus. *Science*, 235:880–884.
- Tanzi, R., McClatchey, A., Lamperti, E., Villa Komaroff, L., Gusella, J., and Neve, R. (1988). Proteinase inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mrna associated with alzheimer's disease. *Nature*, 331:528–530.
- Tanzi, R., St George Hyslop, P.H., and Gusella, J. (1989). Molecular genetics approaches to alzheimer's disease. *Trends Neurosci.*, 12:152–158.
- Tarr, P., Roncarati, R., Pelicci, G., Pelicci, P., and D'Adamio, L. (2002). Tyrosine phosphorylation of the beta-amyloid precursor protein cytoplasmic tail promotes interaction with shc. *J. Biol. Chem.*, 277:16798–16804.
- Taru, H., Iijima, K., Hase, M., Kirino, Y., Yagi, Y., and Suzuki, T. (2002). Interaction of alzheimer's beta-amyloid precursor family proteins with scaffold proteins of the jnk signaling cascade. *J. Biol. Chem.*, 277:20070–20078.
- Timblin, B., Rehli, M., and Skidgel, R. (2002). Structural characterization of the human carboxypeptidase d gene and its promoter. *Int. Immunopharmacol.*, 2:1907–1917.
- Tobias, J., Shrader, T., Rocap, G., and Varshavsky, A. (1991). The n-end rule in bacteria. *Science*, 254:1374–1377.
- Tomlinson, B., Bledde, G., and Roth, M. (1970). Observations on the brains of demented old people. *J. Neurol. Sci.*, 11:205–242.
- Trommsdorff, M., Borg, J., Margolis, B., and Herz, J. (1998). Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein e receptors and the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.*, 273:33556–33560.
- Turk, D. (1992). *Weiterentwicklung eines Programmes für Molekülgrafik und Elektronendichte-Manipulation und seine Anwendung auf verschiedene Protein-Struktur-Aufklärungen*. PhD thesis, Technische Universität München.
- Turner, P., O'Connor, K., Tate, W., and Abraham, W. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog. Neurobiol.*, 70:1–32.
- Van Broeckhoven, C., Hann, J., Bakker, E., Hardy, J., Van Hul, W., Weher, A., Vegter-Van der Vlis, M., and Roos, R. (1990). Amyloid beta protein precursor gene and hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (dutch). *Science*, 248:1120–1122.

- Varlamov, O., Eng, F., Novikova, E., and Fricker, L. (1999). Localization of metallocarboxypeptidase d in att-20 cells: Potential role in prohormone processing. *J. Biol. Chem.*, 274:14759–14767.
- Vassar, R., Bennett, B., Babu-Khan, S., Mendiaz, E., Denis, P., Teplow, D., Ross, S., mAmarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M., Biere, A., Curran, E., Burgess, T., Louis, J., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., and Citron, M. (1999). Beta-secretase cleavage of alzheimer’s amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease bace. *Science*, 286:735–41.
- Vendrell, J. and Aviles, F. (1999). *Proteases:New Perspectives.*, chapter Carboxypeptidases, pages 1–12. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland.
- Vendrell, J., Aviles, F., and Fricker, L. (2004). *Handbook of Metalloproteins*, chapter Metallocarboxypeptidases, pages 176–89. Wiley & Sons, Ltd, Chichester.
- Vendrell, J., Querol, E., and Aviles, F. (2000). Metallocarboxypeptidases and their protein inhibitors. structure, function and biomedical properties. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1477:284–298.
- Ventura, S., Villegas, V., Sterner, J., Larson, J., Vendrell, J., and Hershberger, C. (1999). Mapping the pro-region of carboxypeptidase b by protein-engineering. cloning, overexpression and mutagenesis of the porcine proenzyme. *J. Biol. Chem.*, 28:19925–19933.
- von Rotz, R., Kohli, B., Bosset, J., Meier, M., Suzuki, T., Nitsch, R., and Konietzko, U. (2004). The app intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J. Cell Sci.*, 117:4435–4448.
- Walsh, D., Fadeeva, J., LaVoie, M., Paliga, K., Eggert, S., Kimberly, W., Wasco, W., and Selkoe, D. (2003). Gamma-secretase cleavage and binding to fe65 regulate the nuclear translocation of the intracellular c-terminal domain (icd) of the app family of proteins. *Biochemistry*, 42:6664–6673.
- Wang, Y. and Ha, Y. (2004). The x-ray structure of an antiparallel dimer of the human amyloid precursor protein e2 domain. *Mol. Cell*, 15:343–353.
- Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J., Tanzi, R., and Solomon, F. (1992). Identification of a mouse brain cdna that encodes a protein related to the alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89:10758–10762.
- Wasco, W., Gurubhagavatula, S., Paradis, M., Romano, D., Sisodia, S., Hyman, B., Neve, R., and Tanzi, R. (1993). Isolation and characterization of aplp2 encoding a homologue of the alzheimer associated amyloid beta protein precursor. *Nature Genet.*, 5:95–100.
- Weeks, C. and Miller, R. (1999). The design and implementation of snb v2.0. *J. Appl. Cryst.*, 32:120–124.
- Wei, S., Feng, Y., Kalinina, E., and Fricker, L. (2003). Neuropeptide-processing carboxypeptidases. *Life Sci.*, 73:655–662.
- Wei, S., Segura, S., Vendrell, J., Aviles, F., Lanoue, E., and Day, R. (2002). Identification and characterization of three members of the human metallocarboxypeptidase gene family. *J. Biol. Chem.*, 277:14954–14964.
- Weidemann, A., Eggert, S., Reinhard, F., Vogel, M., Paliga, K., Baier, G., Masters, C., Beyreuther, K., and Evin, G. (2002). A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with notch processing. *Biochemistry*, 41:2825–2835.
- Weidemann, A., Konig, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J., Masters, C., and Beyreuther, K. (1989). Identification, biogenesis and localization of precursors of alzheimer’s disease a4

- amyloid protein. *Cell*, 57:115–126.
- Weidemann, A., Paliga, K., Dürrwang, U., Czech, C., Evin, G., Masters, C., and Beyreuther, C. (1997). Formation of stable complexes between two alzheimer's disease gene products: Presenilin-2 and  $\beta$ -amyloid precursor protein. *Nature Med.*, 3:328–332.
- White, A., Zheng, H., Galatis, D., Maher, F., Hesse, L., Multhaup, G., Beyreuther, K., Masters, C., and Cappai, R. (1998). Survival of cultured neurons from amyloid precursor protein knock-out mice against alzheimer's amyloid-beta toxicity and oxidative stress. *Neurosci.*, 18:6207–6217.
- Wisniewski, H. and Terry, R. (1973). Morphology of the aging brain, human and animal. *Prog. Brain Res.*, 40:167–186.
- Wisniewski, H. and Weigel, J. (1993). Migration of perivascular cells into the neurophil and their involvement in beta-amyloid plaque formation. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 85:586–595.
- Wisniewski, K., H.M., W., and Wen, G. (1985). Occurrence of neuropathological changes and dementia of alzheimer's disease in down's syndrome. *Ann. Neurol.*, 17:22–27.
- Wisniewski, T., Ghiso, J., and Frangione, B. (1991). Peptides homologous to the amyloid protein of alzheimer's disease containing a glutamine for glutamic acid substitution have accelerated amyloid fibril formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 179:1247–1254.
- Wolynes, P., Onuchic, J., and Thirumalai, D. (1995). Navigating the folding routes. *Science*, 267:1619–1620.
- Xin, X., Varlamov, O., Day, R., Dong, W., Bridgett, M., and Leiter, E. (1997). Cloning and sequence analysis of cDNA encoding rat carboxypeptidase d. *DNA Cell Biol.*, 16:897–909.
- Yamada, T., Sasaki, H., Furuya, H., Miyata, T., Goto, I., and Sakaki, Y. (1987). Complementary dna for the mouse homolog of the human amyloid beta protein precursor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 149:665–671.
- Yamaguchi, H., Nakazato, Y., Shoji, M., Takatama, M., and Hirai, S. (1991). Ultrastructure of diffuse plaques in senile dementia of the alzheimer type: comparison with primitive plaques. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 82:13–20.
- Yamaguchi, H., Sugihara, S., Ogawa, A., Saido, T., and Ihara, Y. (1998). Diffuse plaques associated with astroglial amyloid beta protein, possibly showing a disappearing stage of senile plaques. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 95:217–222.
- Yamatsuji, T., Matsui, T., Okamoto, T., Komatsuzaki, K., Takeda, S., Fukumoto, H., Iwatsubo, T., Suzuki, N., Asami-Odaka, A., Ireland, S., Kinane, T., Giambarella, U., and Nishimoto, I. (1996). G-protein mediated neuronal dns fragmentation induced by familial alzheimer's disease-associated mutants of app. *Science*, 272:1349–52.
- Yan, R., Bienkowski, M., Shuck, M., Miao, H., Tory, M., Pauley, A., Brashier, J., Stratman, N., Mathews, W., Buhl, A., Carter, D., Tomasselli, A., Parodi, L., Henrikson, R., and Gurney, M. (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature*, 402:533–537.
- Yankner, B., Duffy, L., and Kirschner, D. (1990). Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachikinin neuropeptides. *Science*, 250:279–282.
- Yu, C., Kim, S., Ikeuchi, T., Xu, H., Gasparini, L., Wang, R., and Sisodia, S. (2001). Characterization of a presenilin-mediated amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment gamma. evidence for distinct mechanisms involved in gamma-secretase processing of the app and notch1 transmembrane domains. *J. Biol. Chem.*, 276:43756–43760.
- Zambrano, N., Minopoli, G., de Candida, P., and Russo, T. (1998). The fe65 adaptor protein

- interacts through its pdi1 domain with the transcription factor cp2/lzf/lbp1. *J. Biol. Chem.*, 273:20128–20133.
- Zhang, Z., Lee, C., Mandiyan, V., Borg, J., Margolis, B., Schlessinger, J., and Kuriyan, J. (1997). Sequence-specific recognition of the internalization motif of the Alzheimer's amyloid precursor protein by the x11 p120 domain. *EMBO J.*, 16:6141–6150.
- Zhao, X., Valantzas, J., Vyas, S., and Duffy, L. (1993). Comparative toxicity of amyloid beta-peptide in neuroblastoma cell lines: effects of albumin and physalgin. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 106:165–170.
- Zheng, P., Eastman, J., Vande Pol, S., and Pimplikar, S. (1998). Pat1, a microtubule-interacting protein, recognizes the basolateral sorting signal of amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95:14745–14750.