

Strukturelle Untersuchungen zur Funktion
der Acetyl-CoA-Synthetase 1
aus *Candidatus Korarchaeum cryptofilum*
und
Charakterisierung der Struktur
der
Toll/Interleukin-1-Rezeptor-homologen
Domäne aus
Hydra magnipapillata TRR-2

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Renato Horst-Joachim Weiße

Kiel, 2016

Referent: Professor Dr. Axel J. Scheidig
Koreferent: Professor Dr. Joachim Grötzinger

Tag der Verteidigung: 03.06.2016
Zum Druck genehmigt: 03.06.2016

gez. Professor Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich bis zum heutigen Tage weder an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel noch an einer anderen Hochschule ein Promotionsverfahren endgültig nicht bestanden habe oder mich in einem entsprechenden Verfahren befinde. Ich erkläre, dass die Abhandlung nach Inhalt und Form die eigene Arbeit ist und dass ich die Inanspruchnahme fremder Hilfen aufgeführt habe sowie, dass ich die wörtlich oder inhaltlich aus anderen Quellen entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich erkläre, dass diese Arbeit weder ganz noch zum Teil schon einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen hat. Ich erkläre, dass die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist.

Kiel, den

Ein Teil dieser Arbeit ist veröffentlicht.

Renato H.-J. Weiße, Annette Faust, Marcel Schmidt, Peter Schönheit and Axel J. Scheidig (2016). „Structure of NDP-forming Acetyl-CoA synthetase ACD1 reveals a large rearrangement for phosphoryl transfer“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(5), S. E519–528.

Danksagung

Für das Gelingen der Arbeit bin ich einigen Menschen Dank schuldig.

Ich danke den jetzigen und vormaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Strukturbiologie und des ZBM/BiMo der Christian-Albrechts-Universität Kiel. Allen voran Axel und Annette. Mein Dank gilt aber auch Sebastian, Christian, Uli, Leslye und Chrissy für die vielfältige Hilfe, Gespräche und verbrachte Zeit.

Ich danke meinen Bachelorstudenten Mathias, Anna, Tina und Kathrin.

Ich danke meiner Frau und meinen Kindern für die Zusprache und Geduld.

Inhaltsverzeichnis

Kurzdarstellungen/Abstracts	XIX
I. Einleitung	1
1. Einleitung	3
1.1. Energie	3
1.1.1. Acyl-Coenzym A-Synthetasen (NDP-bildend)	4
1.1.2. Acetyl-Coenzym A-Synthetasen	6
1.1.3. Aufgabenstellung	10
1.2. Immunität - Verteidigung der Energie	11
1.2.1. Toll-ähnliche Rezeptoren im Immunsystem	12
1.2.2. Proteine mit TIR-Domänen sind weit verbreitet	14
1.2.3. <i>Hydra magnipapillata</i> als Modellsystem für Signalerkennung und -weiterleitung und deren Evolution	17
1.2.4. Aufgabenstellung	18
1.3. Proteinkristallisation	19
1.3.1. Kristallographisches Phasenproblem	20
1.3.2. Methoden der Phasierung	22
II. Strukturelle Untersuchungen zur Funktion der Acetyl-CoA-Synthetase 1 aus <i>Candidatus Korarchaeum cryptofilum</i>	29
2. Ergebnisse	31
2.1. Expression und Proteinreinigung	31
2.2. Expression Selenomethionin-markierten Proteins	33
2.3. Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse	34
2.3.1. Kristallform I	35

Inhaltsverzeichnis

2.3.2.	Kristallform II	35
2.3.3.	Röntgenstrukturanalyse	37
2.3.4.	Einbringen von Schweratomen	37
2.3.5.	Auswertung der Daten	39
2.4.	Strukturlösung und Verfeinerung	43
2.4.1.	Ermittlung geeigneter Suchmodelle für den Molekularen Ersatz	43
2.4.2.	Positionierung der α -Untereinheiten	43
2.4.3.	Positionierung der β -Untereinheiten	45
2.4.4.	Verfeinerung und Verbesserung des initialen Modells	46
2.4.5.	Verfeinerung der Strukturen der <i>ckcACD1</i> mit verschiedenen Substraten	47
2.5.	Der Aufbau des <i>Candidatus Korarchaeum cryptofilum</i> ACD1-Komplexes	58
2.5.1.	Aufbau der α -Untereinheit	60
2.5.2.	Aufbau der β -Untereinheit	60
2.5.3.	Intramolekulare Interaktionsflächen	62
2.5.4.	Nur die Subdomänen des <i>ckcACD1</i> -Komplexes sind ähnlich zu anderen Proteinen	63
2.6.	<i>ckcACD1</i> bindet seine Substrate vergleichbar zu anderen Mitgliedern der Superfamilie	65
2.6.1.	Coenzym A und Acetyl-Coenzym A	65
2.6.2.	Phosphationen	68
2.6.3.	Phosphoryliertes His254 α	70
2.6.4.	Adenosindiphosphat	73
2.6.5.	Adenosintriphosphat	76
2.7.	<i>ckcACD1</i> überbrückt eine Lücke von 51 Å während des enzymatischen Zyklus	77
2.8.	Die α -Untereinheiten besitzen eine zusätzliche Bindungsstelle für Di- und Trinukleotide	80
2.9.	Versuche zur Stabilisierung von Reaktionsintermediaten	81
2.10.	Sequenzvergleiche mit anderen ACDs zeigen hohe Homologie	83
3.	Diskussion	91
3.1.	Expression und Reinigung der <i>Candidatus Korarchaeum cryptofilum</i> ACD1	91
3.2.	Kristallisation und Strukturlösung der <i>Candidatus Korarchaeum cryptofilum</i> ACD1	92

3.3.	Aufbau der <i>Candidatus Korarchaeum cryptofilum</i> ACD1	94
3.3.1.	Die Domänen des <i>ckc</i> ACD1-Komplex haben Ähnlichkeiten zu anderen ACDs	94
3.3.2.	<i>ckc</i> ACD1 ist ein ungewöhnlicher $\alpha_2\beta_2$ -Komplex	95
3.4.	Strukturelle Einsichten in die Funktionsweise der <i>ckc</i> ACD1	96
3.4.1.	Substratspezifität und Mechanismus des Reaktionszentrums <i>site I</i>	96
3.4.2.	Transport des aktivierten Phosphats zwischen den Reaktionszen- tren <i>site I</i> und <i>site II</i>	106
3.4.3.	Substratspezifität und Mechanismus des Reaktionszentrums <i>site</i> <i>II</i>	109
3.5.	Der <i>ckc</i> ACD1-Komplex ist prototypisch für andere ACDs	114
3.6.	Schlussfolgerung und Ausblick	118

**III. Charakterisierung der Struktur der TIR-Domäne aus *Hydra magni-
papillata* TRR 2** **123**

4. Ergebnisse **125**

4.1.	Herstellen des Expressionskonstruktes, heterologe Expression und Rei- nigung der <i>hy</i> TRR2 TIR-Domäne	125
4.2.	Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse	128
4.2.1.	Kristallform I	128
4.2.2.	Kristallform II	130
4.3.	Strukturlösung und Verfeinerung	130
4.3.1.	Positionierung und Verfeinerung des molekularen Modells	130
4.3.2.	Verbesserung des Modells anhand höher aufgelöster Daten der Kristallform II	133
4.4.	Struktureller Aufbau der TRR-2 TIR-Domäne	134
4.4.1.	Zwischen den Kristallformen gibt es nur geringe strukturelle Un- terschiede	139
4.4.2.	Beweglichkeit der <i>hy</i> TRR-2 TIR-Domäne im Kristall	141
4.5.	<i>hy</i> TIR2 zeigt hohe strukturelle Ähnlichkeit zu anderen TIR-Domänen	144
4.6.	Analyse der Kristallpackung	146
4.6.1.	In beiden Kristallformen findet sich ein identischer Kristallkontakt	146
4.6.2.	Die BB-Schleife interagiert in beiden Kristallformen mit einem benachbarten symmetrieverwandten Molekül	148

4.7. Aminosäuren der <i>hy</i> TIR2– <i>hy</i> TIR2-Kontaktfläche sind evolutionär konserviert	150
5. Diskussion	155
5.1. Kristallisation und Strukturlösung durch Molekularen Ersatz	155
5.2. Einfluss der Affinitätssequenz auf die Kristallpackung	156
5.3. Die TIR-Domäne aus <i>Hydra magnipapillata</i> Toll-Rezeptor-Verwandter 2 als Modellprotein	157
5.4. Untersuchung der homotypen TIR–TIR-Wechselwirkungen	160
5.4.1. Bekannte TIR–TIR-Wechselwirkungen	160
5.4.2. Ein potentielles TIR–TIR-Dimer in den Kristallstrukturen der TIR-Domäne von <i>Hydra magnipapillata</i> TRR-2	163
5.5. Zusammenfassung und Schlußfolgerung	167
IV. Experimentelle Methoden	171
6. Allgemeine Methoden	173
6.1. Molekular- und mikrobiologische Methoden	173
6.1.1. Bakterienstämme	173
6.1.2. Nährmedien und Selektion	174
6.1.3. Kultivierung der Bakterien	174
6.2. Analytische Methoden	175
6.2.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	175
6.2.2. Bestimmung der Konzentration von DNS und Protein in Lösung	176
6.2.3. Dynamische Lichtstreuung	177
6.3. Kristallisation und röntgenographische Experimente	177
6.3.1. Kristallisation	177
6.3.2. Gefrieren von Kristallen	178
6.3.3. Diffraktionsexperimente	178
6.3.4. Integration und Skalierung der Daten	179
6.4. Strukturlösung und Verfeinerung	179
6.4.1. Molekularer Ersatz – Suchmodell	179
6.4.2. Molekularer Ersatz – Positionierung	180
6.4.3. Verfeinerung des Modells	180
6.4.4. Überprüfen der Kofaktoren	181

6.5.	Bioinformatische Werkzeuge	182
6.5.1.	Finden von Sequenzen	182
6.5.2.	Sequenz- und Strukturabgleich	182
6.5.3.	Zuweisen von Sekundärstrukturelementen	182
6.5.4.	Erzeugung von Molekülgrafiken	182
7.	Expression, Reinigung, Kristallisation und Strukturlösung der <i>ckcACD1</i>	185
7.1.	Plasmide	185
7.2.	Expression von <i>ckcACD1</i>	185
7.2.1.	Expression von nativem Protein	185
7.2.2.	Expression von Se-Methionin markiertem Protein	186
7.2.3.	Dialyse	186
7.3.	Lyse und Reinigung der <i>ckcACD1</i>	187
7.3.1.	Lyse	187
7.3.2.	Hitzefällung	187
7.3.3.	Rekonstitution des aktiven Enzyms	188
7.3.4.	Gelfiltration I	188
7.3.5.	Hitzereinigung	189
7.3.6.	Gelfiltration II	189
7.3.7.	Vorbereitung zur Kristallisation	189
7.4.	Kristallisation der <i>ckcACD1</i>	190
7.5.	Diffractionsexperimente	191
7.5.1.	Beschreibung der Bewegung von Domänen	192
8.	Expression, Reinigung, Kristallisation und Strukturlösung der <i>hyTRR2</i> TIR-Domäne	195
8.1.	Plasmide	195
8.2.	Herstellen des Expressionskonstruktes	195
8.2.1.	Ethanol-fällung	196
8.2.2.	Polymerasekettenreaktion	196
8.2.3.	Restriktionsverdau	197
8.2.4.	Ligation	197
8.2.5.	Transformation des Ligationsansatzes in <i>E. coli</i>	197
8.2.6.	Isolierung von plasmidischer DNS aus <i>E. coli</i>	198
8.2.7.	Sequenzierung	198
8.2.8.	Transformation in <i>E. coli</i> zur Expression	198
8.2.9.	Herstellen einer Glycerindauerkultur	199

Inhaltsverzeichnis

8.3. Expression der <i>hy</i> TRR2 TIR-Domäne	199
8.4. Reinigung der <i>hy</i> TRR2 TIR-Domäne	199
8.4.1. Immobilisierte Nickel-Affinitätschromatographie	201
8.4.2. Dialyse	201
8.4.3. Gelfiltration	201
8.5. Kristallisation	202
8.6. Diffraktionsexperimente	202
Literatur	205
A. Anhang	237
A.1. Abkürzungen	238
A.2. Lebenslauf	241

Abbildungsverzeichnis

1.1. ACDs sind an der Degradation von Zuckern und Aminosäuren beteiligt	7
1.2. Domänenvermischung bei Acetyl-Coenzym A-Synthetasen und Succinyl-Coenzym A-Synthetasen	8
1.3. Generelle Darstellung der biologischen Funktion von TIR-Domänen	15
1.4. Phasierung mittels isomorphem Ersatz und anomaler Dispersion	23
2.1. Finaler Reinigungsschritt der <i>Candidatus Korarchaeum cryptofilum</i> ACD1 über Gelfiltration	33
2.2. Expressionstest in Minimalmedium	34
2.3. Kristalle der Kristallform I	36
2.4. Kristalle der Kristallform II	38
2.5. Röntgenfluoreszenzsignal des Quecksilbers im Kristall	39
2.6. Nicht-kristallographische Symmetrie in Kristallform II	44
2.7. Ramachandran-Plot von <i>ckcACD1-A</i>	49
2.8. Ramachandran-Plot von <i>ckcACD1-B</i>	50
2.9. Ramachandran-Plot von <i>ckcACD1-C</i>	51
2.10. Ramachandran-Plot von <i>ckcACD1-D</i>	52
2.11. Ramachandran-Plot von <i>ckcACD1-E</i>	53
2.12. Ramachandran-Plot von <i>ckcACD1-F</i>	54
2.13. Ramachandran-Plot von <i>ckcACD1-G</i>	55
2.14. Ramachandran-Plot von <i>ckcACD1-H</i>	56
2.15. Ramachandran-Plot von <i>ckcACD1-I</i>	57
2.16. Darstellung der verfeinerten Kristallstruktur <i>ckcACD1-B</i>	59
2.17. Schematische Darstellung der durch die <i>ckcACD1</i> katalysierten Reaktion	66
2.18. Bindungsmodus von Coenzym A und Acetyl-Coenzym A	69
2.19. Phosphatbindung und Phosphorylierung von His254 α	71
2.20. Nukleotidbindung durch die <i>ATP grasp</i> -Domäne	74

Abbildungsverzeichnis

2.21. Öffnungsbewegung der <i>ATP grasp</i> -Domäne verursacht eine Änderung in der Bindung von ADP	76
2.22. Bewegung des Phosphohistidinsegmentes zwischen den Untereinheiten der <i>ckcACD1</i>	78
2.23. Phosphohistidinsegment (nicht-phosphoryliert) ausgerichtet zur Nukleotidbindestelle	79
2.24. Bindung von ADP durch die α -Untereinheiten	82
2.25. Sequenzbasierte Überlagerung verschiedener Acetyl-Coenzym A-Synthetasen mit der α -Untereinheit der <i>ckcACD1</i>	85
2.26. Sequenzbasierte Überlagerung verschiedener Acetyl-Coenzym A-Synthetasen mit der α -Untereinheit der <i>ckcACD1</i>	88
3.1. Die Substratspezifität wird durch den Aufbau der Substrattasche bestimmt	100
3.2. Vergleich der Reaktionszentren <i>site I</i> von <i>ecSCS</i> und von <i>ckcACD1</i> . . .	104
3.3. Phosphorylyse von Acetyl-Coenzym A und Phosphorylierung von His254 α	107
3.4. Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der Energieerzeugung	113
3.5. Oberflächenkonservierung der Untereinheiten des <i>ckcACD1</i> -Komplexes .	117
4.1. Reinigung von <i>hyTIR2</i> über Nickelionenaffinitätschromatographie	126
4.2. Reinigung von <i>hyTIR2</i> über Gelfiltration	127
4.3. Übersicht der Reinigung von <i>hyTIR2</i>	127
4.4. Kristalle der <i>Hydra magnipapillata</i> TRR-2 TIR-Domäne und ih	129
4.5. Überlagerung der Elektronendichte mit der anomalen Dichtekarte	134
4.6. Φ, Ψ -Plot zur Validierung der Struktur der <i>hyTRR-2</i> TIR-Domäne bei- der Kristallformen	136
4.7. Sekundärstruktur der TIR-Domäne aus <i>Hydra magnipapillata</i> TRR-2 . .	137
4.8. Topologischer Überblick über die Kristallstruktur der <i>Hydra magnipa- pillata</i> TRR 2 TIR-Domäne	138
4.9. Besonderheiten der TIR-Domäne von <i>Hydra magnipapillata</i> TRR-2 . . .	140
4.10. Strukturelle Überlagerung von <i>hyTIR2</i> zweier Kristallformen	140
4.11. <i>B</i> -Faktoren von <i>hyTIR2</i> der beiden Kristallformen	142
4.12. Ein in beiden Kristallformen identischer Kristallkontakt ist durch Elek- tronendichte genau definiert	149
4.13. Identischer Kristallkontakt in Kristallform I und II	150
4.14. Sequenzüberlagerung von TIR-Domänen verschiedener Toll-ähnlicher Re- zeptoren	153

4.15. Sequenzüberlagerung von TIR-Domänen verschiedener MyD88-ähnlicher Adapterproteine	154
5.1. Strukturbasierte Überlagerung von <i>hy</i> TIR2 mit TIR-Domänen verschiedener Toll-ähnlicher Rezeptoren	159
5.2. Vergleich der Strukturen homologer TIR-Domänen	161
5.3. Wechselwirkungen der BB-Schleife von <i>hy</i> TIR2, TLR-6 und TLR-10	166

Tabellenverzeichnis

2.1. Optimierte initiale Kristallisationsbedingung der <i>ckcACD1</i>	34
2.2. Statistiken der Prozessierung der Diffraktionsdaten verschiedener Kristalle der <i>ckcACD1</i> (Teil 1)	40
2.3. Statistiken der Prozessierung der Diffraktionsdaten verschiedener Kristalle der <i>ckcACD1</i> (Teil 2)	41
2.4. Statistiken der Prozessierung der Diffraktionsdaten verschiedener Kristalle der <i>ckcACD1</i> (Teil 3)	42
2.5. Statistiken der Verfeinerung von <i>ckcACD1</i> -A	49
2.6. Statistiken der Verfeinerung von <i>ckcACD1</i> -B	50
2.7. Statistiken der Verfeinerung von <i>ckcACD1</i> -C	51
2.8. Statistiken der Verfeinerung von <i>ckcACD1</i> -D	52
2.9. Statistiken der Verfeinerung von <i>ckcACD1</i> -E	53
2.10. Statistiken der Verfeinerung von <i>ckcACD1</i> -F	54
2.11. Statistiken der Verfeinerung von <i>ckcACD1</i> -G	55
2.12. Statistiken der Verfeinerung von <i>ckcACD1</i> -H	56
2.13. Statistiken der Verfeinerung von <i>ckcACD1</i> -I	57
2.14. Berechnete Kontaktflächen der <i>Ca. Korarcheum cryptofilum</i> ACD1	58
2.15. Öffnungswinkel der β -Untereinheit in den Kristallstrukturen der <i>ckcACD1</i>	62
2.16. Strukturelle Überlagerung der <i>ckcACD1</i> mit der Proteindatenbank	64
4.1. Statistiken der Prozessierung der Diffraktionsdaten und der <i>hyTRR 2</i> TIR-Domäne	131
4.2. Verwendete Suchmodelle zur Phasierung der <i>hyTRR-2</i> TIR-Domäne	133
4.3. Statistiken der Verfeinerung der <i>hyTRR 2</i> TIR-Domäne	135
4.4. Ergebnis der strukturellen Überlagerung der TIR-Domäne aus <i>Hydra magnipapillata</i> TRR-2 mit der Proteindatenbank PDB	145
4.5. Analyse der Kristallpackung der Kristallformen I und II	147

Tabellenverzeichnis

6.1. Benutzte <i>E. coli</i> Stämme	173
7.1. In dieser Arbeit verwendeten Plasmide – <i>ckcACD1</i>	185
7.2. Kristallisationsexperimente zur Derivatisierung der <i>ckcACD1</i>	192
7.3. Parameter der Datenmessung	193
8.1. In dieser Arbeit verwendeten Plasmide – <i>hyTRR2</i> TIR-Domäne	195
8.2. In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide	196
8.3. Statistiken zur Datensammlung der Strukturbestimmung der <i>Hydra ma-</i> <i>gnipapillata</i> TRR-2 TIR-Domäne	203

Kurzdarstellungen

Strukturelle Untersuchungen zur Funktion der Acetyl-CoA-Synthetase 1 aus *Candidatus Korarchaeum cryptofilum*

Dinukleotid-bildende Acetyl-Coenzym A-Synthetasen (ACDs) sind Vertreter der Superfamilie der dinukleotid-bildenden Acyl-Coenzym A-Synthetasen und sind maßgeblich an der Energiegewinnung bei der Peptid- und Zuckerfermentation in Acetat-bildenden Archaeen beteiligt. ACDs setzen Coenzym A-Thioester zur korrespondierenden Säure und Coenzym A um, wobei die chemische Energie der Thioesterbindung durch Bildung von Trinukleotiden über den Mechanismus der Substratkettenphosphorylierung erhalten wird. In dieser Arbeit wurde die Struktur der *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* Acetyl-Coenzym A-Synthetase Isoform 1 (*ckcACD1*) mittels Einkristallstrukturanalyse geklärt. Der heterotetramere $\alpha_2\beta_2$ -Komplex unterscheidet sich deutlich vom strukturellen Aufbau von bereits strukturell untersuchten Mitgliedern der Superfamilie. Eine bioinformatische Analyse der Organisation der Untereinheiten deutet darauf hin, dass der beobachtete Proteinkomplex aufgrund der hohen Homologie von ACDs archaellen, bakteriellen und eukaryotischen Ursprungs für ACDs charakteristisch ist. Die Ausrichtung der Untereinheiten ist darüber hinaus mit der Diversität der Subdomänenkonnektivität (Domänenvermischung) in der Familie der ACDs vereinbar. Anhand einer Kristallstruktur von *ckcACD1* im Komplex mit Acetyl-Coenzym A konnte die potentielle Bindetasche von Coenzym A-Thioestern identifiziert werden. Analyse dieser Bindetasche zeigte, dass vermutlich Ausrichtung und Komposition der umgebenden Schleifen die Substratpräferenz bestimmen. Bindungsstudien mit verschiedenen Nukleotidsubstraten und -substratanaloga zeigten weiterhin, dass der Abstand zwischen den Bindestellen der Liganden mit etwa 57 Å außergewöhnlich groß ist. Für den erforderlichen Transport der aktivierten Phosphatgruppe zwischen der auf der α -Untereinheit gelegenen Reaktionszentrum *site I* (Coenzym A und Thioester) und der auf der β -Domäne befindlichen Reaktionszentrum *site II* (Nukleotide) wird eine Umlagerung innerhalb des Proteins benötigt. Mit einer in den Kristallstrukturen beobachtete konformationellen Umgestaltung der Aminosäuren Gly242 α bis Val262 α , genannt Phosphohistidinsegment, konnten erste experimentelle Beweise für die bislang postulierte Umlagerung erhalten werden. Anhand der Geometrie der Wechselwirkung des Phosphohistidinseg-

menten mit der β -Untereinheit kann zudem der zusätzliche Reaktionsschritt bei den ACDs erklärt werden.

Charakterisierung der Struktur der Toll/Interleukin-1-Rezeptor-homologen Domäne aus *Hydra magnipapillata* TRR-2

Proteine mit Toll/Interleukin-1-Rezeptor-homologen Domänen (TIR-Domänen) sind wesentlich an der Weiterleitung des Immunsignals beteiligt, wobei die TIR-Domäne selbst die Plattform intermolekularer Wechselwirkung darstellt. Der Frischwasserpoly *Hydra* ist ein Modellorganismus der Evolution des Immunsystems. *Hydra* besitzt die kleinsten bekannten TIR-Domänen. Kenntnis des strukturellen Aufbaus könnte daher Hinweise auf konservierte Interaktionsmuster liefern. Die TIR-Domäne des Toll-Rezeptor-Verwandten 2 aus *Hydra magnipapillata* wurde im Rahmen dieser Arbeit kristallisiert und deren Struktur anhand zweier Kristallformen ermittelt. *Hydra* TIR weist eine Flavodoxin-ähnliche Faltung und hohe strukturelle Verwandtschaft zu bekannten TIR-Domänen auf. In der asymmetrischen Einheit des Kristallgitters wird jeweils ein Molekül beobachtet. Das Interaktionsmuster in den Kristallgittern ist in beiden Kristallformen bis auf eine identische Interaktionsfläche unterschiedlich. Interessanterweise ist an der gemeinsamen Wechselwirkung die BB-Schleife beteiligt, die in der TIR-Domänen-basierten Signalweiterleitung eine zentrale Rolle spielt. Der Interaktionsmodus unterscheidet sich von bereits beobachteten TIR–TIR-Wechselwirkungen.

Abstracts

Structural investigations into the function of acetyl-CoA synthetase 1 from *Candidatus Korarchaeum cryptofilum*

Dinucleotide-forming acetyl-coenzyme A synthetases (ACDs) belong to the superfamily of dinucleotide-forming acyl-coenzyme A synthetases and are significantly involved in the energy production during peptide and sugar fermentation in acetate-forming

archaea. Representatives of this enzyme family are also found in a few bacterial and eucaryotic species. ACDs convert coenzyme A thioester to the corresponding acid and coenzyme A, the chemical energy of the thioester bond saved through forming trinucleotides via the mechanism of substrate level phosphorylation. In this work the structure of *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* acetyl-Coenzym A synthetase isoform 1 (*ckcACD1*) was determined using X-ray crystallography. The heterotetrameric $\alpha_2\beta_2$ complex differs significantly from known structures of members of the superfamily. Bioinformatic analysis of the subunit organisation indicates stability of the observed complex, which furthermore might be characteristic for ACDs considering the high homology of proteins from archaeal, bacterial and animal origin. Beside this, the arrangement of the subunits is compatible with the diversity of subdomain connectivity (domain shuffling) found in the family of ACDs. Based on the crystal structure of the *ckcACD1* in complex with acetyl-coenzyme A the potential binding pocket of coenzyme A thioesters could be identified. Analysis of the binding pocket shows, that orientation and composition of the surrounding loops are determinants of substrate preference. Binding studies of nucleotide substrates and substrate analogs show that the distance between the ligand binding sites is with 57 Å extraordinary large. The transport of the activated phosphate group between site I (coenzyme A and its thioesters) situated on the subunit α and site II (nucleotides) located at subunit β requires rearrangements within the enzyme. With the observation of conformational reorganisation of the amino acids Gly242 α to Val262 α , named phosphohistidine segment, in one crystal structure, first experimental evidence for this so far postulated rearrangement was gathered. Based on the geometry of the interaction of the phosphohistidine segment with the subunit β the additional reaction step facilitated by ACDs could be explained.

Characterisation of the structure of the Toll/Interleukin-1 receptor homologous domain from *Hydra magnipapillata* TRR-2

Proteins with Toll/Interleukin-1-receptor homologous domains (TIR domains) are pivotal for transduction of the immune signal, the TIR domain providing the platform for intermolecular interactions. The fresh water polyp *Hydra* is a model organism for the evolution of the immune system. *Hydra* contains the smallest known TIR domains and knowledge of structural arrangement might provide clues about conserved

interaction modes. Hence, the TIR domain of Toll-receptor-related 2 was crystallised and its structure was determined based on two crystal forms. *Hydra* TIR features a flavodoxin-like fold and shows high structural homology to known TIR domains. In the crystal lattice only one molecule per asymmetric unit is observed. The pattern of intermolecular interactions in the crystal lattices is different in both forms except for one interface. Engaged in the intermolecular contact is the BB loop, which is known to play a central role in TIR domain mediated signal transduction. However, the interaction mode differs from already observed TIR–TIR interactions.

Teil I.

Einleitung

1. Einleitung

Zusätzlich zu den gekennzeichneten Zitaten wurden folgende Lehrbücher als Quellen verwendet: Lehninger Principles of Biochemistry (Nelson und Cox, 2008), Principles of Protein X-Ray Crystallography (Drenth, 1999) und Biomolecular Crystallography (Rupp, 2010).

1.1. Energie

Alle lebenden Organismen sind in der Lage ihrer Umgebung Stoffe zu entziehen, die sie für ihr Überleben benötigen. Hierbei spielt keine Rolle, ob sich dieser Organismus rein autotroph oder heterotroph ernährt. In beiden Fällen werden die aufgenommenen Nährstoffe in andere für den Organismus wichtige Bestandteile umgeformt. Der Aufbau komplexerer Moleküle erfordert allerdings meist den Einsatz einer Energiequelle. Im Laufe der Evolution hat sich ein universelles „Energimolekül“ entwickelt. Dieses ist Adenosintriphosphat (ATP). An das Grundgerüst Adenosin, ein über eine 5'- β -glykosidische Bindung mit dem Zucker Ribose verbundenes Adenin, wird an die 1'-Hydroxygruppe der Ribose über eine Säureesterbindung ein Phosphat verknüpft (Adenosinmonophosphat, AMP). Es können weiterhin bis zu zwei weitere Phosphatgruppen über je eine Phosphoanhydritbindung angekoppelt werden (Adenosindiphosphat, ADP bzw. -triphosphat, ATP). Energie gewinnt eine Zelle hauptsächlich aus dem Aufbrechen der hochenergetischen Phosphoanhydritbindung des ADPs und des ATPs. Bereitgestellt wird ATP im Falle eines sich heterotroph ernährenden Lebewesens durch die katabole Umwandlung der aufgenommenen Nahrung oder im Falle eines Autotrophs durch den Aufbau aus einfachen anorganischen Komponenten. Die dazu benötigte Energie wird durch die Letzteren beispielsweise dem Licht entzogen (Photoautotrophie)

1. Einleitung

oder aus der Durchführung chemischer Reaktionen einfacher anorganischer Moleküle gewonnen (Chemoautotrophie).

Wird ein Molekül von der Zelle nicht mehr benötigt, wird versucht dessen gespeicherte chemische Energie in Form von ATP zu konservieren. Hierzu hat die Zelle effiziente Wiederverwertungsmechanismen entwickelt. Prinzipiell kann der Citratzyklus als primäre Plattform des anabolen bzw. katabolen zellulären Stoffwechsels von Zuckern, Aminosäuren und Fetten in allen Domänen des Lebens angesehen werden. Energie in Form von ATP (bzw. Guanosintriphosphat, GTP) wird im Zitratzyklus durch die Succinyl-Coenzym A-Synthetase der Zelle bereitgestellt. Die Hydrolyse der Thioesterbindung des Succinyl-Coenzym A liefert die Energie zur Anknüpfung eines zusätzlichen Phosphats an die β -Phosphats eines durch das Enzym gebundenem Dinukleotids (ADP bzw. GDP). Succinyl-Coenzym A-Synthetase (SCS) gehört zur Superfamilie der dinukleotid-abhängigen Acyl-Coenzym A-Synthetasen (Sánchez *et al.*, 2000). Zur gleichen Superfamilie können ebenso die ATP-Citrat-Synthetasen, Malyl-Coenzym A-Synthetasen und Citryl-Coenzym A-Synthetasen gezählt werden (Sánchez *et al.*, 2000; Aoshima *et al.*, 2004).

1.1.1. Acyl-Coenzym A-Synthetasen (NDP-bildend)

Diese ubiquitär vorhandene Superfamilie setzt reversibel Nukleosiddiphosphat (NDP) und Phosphat (P_i) mit Acyl-Coenzym A-Estern zu den korrespondierenden Säuren und den entsprechenden Triphosphaten um.



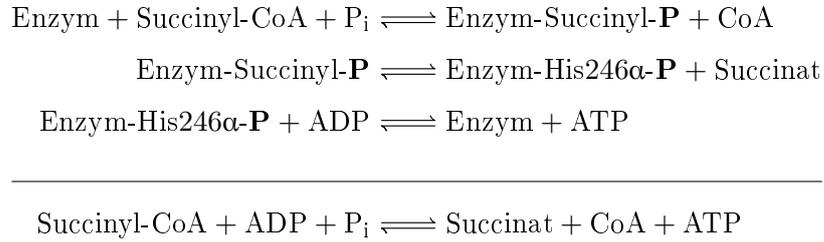
Strukturell und biochemisch charakterisiert sind die Succinyl-Coenzym A-Synthetasen (SCS) aus den Bakterien *Escherichia coli* (Wolodko *et al.*, 1994; Fraser *et al.*, 1999; Joyce *et al.*, 2000) und *Thermus aquaticus* (Joyce *et al.*, 2007; Joyce *et al.*, 2012) sowie die GTP-spezifische Succinyl-Coenzym A-Synthetase aus dem Schwein (Fraser *et al.*, 2006). Alle drei katalysieren die die Bildung von Succinat und ATP bzw. GTP aus Succinyl-Coenzym A, ADP bzw. GDP und anorganischem Phosphat über den Mechanismus der Substratlevelphosphorylierung. Die Struktur einer verkürzten Form der

humanen ATP-Citrat-Lyase (ACLY) wurde ebenfalls veröffentlicht (Sun *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2011). ACLY dahingegen katalysiert die Aktivierung von Citrat zu Acetyl-Coenzym A und Oxalacetat durch Hydrolyse von ATP zu ADP und Phosphat (Srere und Lipmann, 1953; Srere, 1961).

Die bakteriellen SCS sind Heterotetramere der Komposition $\alpha_2\beta_2$, die SCS des Schweins existiert als Heterodimer in der Form $\alpha\beta$. Aufgebaut ist die humane ACLY als Homotetramer (Singh *et al.*, 1976), kristallisiert werden konnte jedoch nur ein proteolytisch gekürztes Fragment (Sun *et al.*, 2010). Überlagert man die Strukturen der verschiedenen SCS und der ACLY zeigt sich eine identische Anordnung der einzelnen Untereinheiten. Nummeriert werden diese typischerweise bezüglich der Anordnung der *E. coli* SCS mit den Zahlen 1 bis 5 (Fraser *et al.*, 1999). Aufgebaut sind die α -Untereinheiten aus zwei Domänen mit jeweils typischer Rossmannfaltung (Rao und Rossmann, 1973). Die N-terminal gelegene Unterdomäne bindet Coenzym A bzw. dessen Thioester über eine konservierte Nukleotidbindestelle (Subdomäne 1). Auf der daran anschließenden Domäne (Subdomäne 2) findet sich ein in allen nukleosiddiphosphat-bildenden Acyl-Coenzym A-Synthetasen konserviertes und katalytisch essentielles Histidin (Sánchez *et al.*, 2000). Dieses wird im Laufe der enzymatischen Reaktion phosphoryliert (Kreil und Boyer, 1964; Mitchell *et al.*, 1964; Mårdh *et al.*, 1971; Majumdar *et al.*, 1991; Fraser *et al.*, 2002; Kanao *et al.*, 2002; Bräsen *et al.*, 2008). Das enzymgebundene Phosphat wird anschließend auf ein durch die β -Untereinheit gebundenes Nukleosiddiphosphat übertragen. Notwendig ist hierzu eine Umlagerung der Phosphohistidinschleife, die eine Entfernung von etwa 28 Å überbrücken muss. Die molekularen Grundlagen dieser Übertragung sind bis jetzt jedoch nicht bekannt. Strukturell entspricht die β -Domäne einer sogenannten ATP-Greifer-Faltung (*ATP grasp*) (Murzin, 1996; Galperin und Koonin, 1997). Diese besteht aus zwei Unterdomänen (Subdomäne 3 und 4), jeweils verantwortlich für die Interaktion mit dem Nukleosid oder mit der Phosphohistidinschleife (bezeichnet *site II*). Auf der β -Domäne C-terminal gelegen ist Subdomäne 5, die zusammen mit den Subdomänen 1 und 2 die Bindestelle für die Coenzym A-Ester bildet (bezeichnet *site I*).

1. Einleitung

Für die *E. coli* SCS wird ein dreistufiger Mechanismus vorgeschlagen (Majumdar *et al.*, 1991; Fraser *et al.*, 2002):



Vor Kurzem wurde aus kinetischen Daten ein Mechanismus der am Citratcyclus beteiligten Succinyl-Coenzym A-Synthetase aus dem Myokard des Schweineherzens postuliert (Li *et al.*, 2013). Die vollständige Übertragbarkeit des kompletten Mechanismus auf andere Succinyl-CoA-Synthetasen wird von dieser Studie allerdings in Frage gestellt. Jedoch spiegelt dieser Reaktionsweg im Großen und Ganzen den vorgeschlagenen Mechanismus der *E. coli* SCS wieder.

1.1.2. Acetyl-Coenzym A-Synthetasen

Bereits im Jahr 1975 wurde erstmals in einem Abstract über eine ADP-abhängige Acetat-Thiokinase im parasitischen Einzeller *Tritrichomonas foetus* spekuliert (Lindmark und Müller, 1975). Kurz darauf wurde erstmals in detaillierter Form die ACD aus dem eukaryotischen Einzeller *Entamoeba histolytica* beschrieben (Reeves *et al.*, 1977). Im Laufe der folgenden Jahre wurden weiterhin die biochemischen Parameter der ACDs aus den Archaeen *Archaeoglobus fulgidus* (Labes und Schönheit, 2001; Musfeldt und Schönheit, 2002), *Methanococcus jannaschii* (Muskfeldt und Schönheit, 2002), *Thermococcus kodakarensis* (Shikata *et al.*, 2007; Awano *et al.*, 2014), *Haloarcula marismortui* und *Pyrobaculum aerophilum* (Bräsen und Schönheit, 2004b), *Halococcus saccharolyticus*, *Haloferax volcanii* und *Halorubrum saccharovororum* (Bräsen und Schönheit, 2001), *Pyrococcus furiosus* (Mai und Adams, 1996; Musfeldt *et al.*, 1999; Schäfer und Schönheit, 1991; Glasemacher *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 2014) und *Pyrobaculum islandicum* (Hu und Holden, 2006) sowie dem Bakterium *Chloroflexus aurantiacus* (Schmidt und

Schönheit, 2013) und dem Einzeller *Gardia lamblia* (Sánchez und Müller, 1996; Sánchez *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 2000) bestimmt.

Die Funktion der ACDs scheint in einigen Organismen prinzipiell klar zu sein. Am Besten verstanden ist die Situation der ACDs in *Pyrococcus furiosus* und *Thermococcus kodakarensis*. Bereits vor einiger Zeit wurde mit der Charakterisierung einzelner Isoenzyme *P. furiosus* begonnen (Mai und Adams, 1996; Glasemacher *et al.*, 1997; Hutchins *et al.*, 2001). Anhand der umfassenden Studien der verschiedenen Isoformen der ACDs in beiden Archaeen (Shikata *et al.*, 2007; Awano *et al.*, 2014; Scott *et al.*, 2014) wurde vorgeschlagen, die Enzyme bezüglich ihrer Substratspezifität in fünf Gruppen einzuordnen (Awano *et al.*, 2014). Es wird angenommen, dass diejenigen Isoenzyme, die ähnlich der *P. furiosus* ACD1 bevorzugt kurzkettige aliphatische CoA-Thioester umsetzen, hauptsächlich an der Zuckerfermentation beteiligt sind, wohingegen diejenigen, die beispielsweise Aryl-Thioester verstoffwechseln, im Prozess der Degradation von Aminosäuren fungieren (Mai und Adams, 1996; Glasemacher *et al.*, 1997; Hutchins *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2014). Zusammengefasst ist dies in Abbildung 1.1.

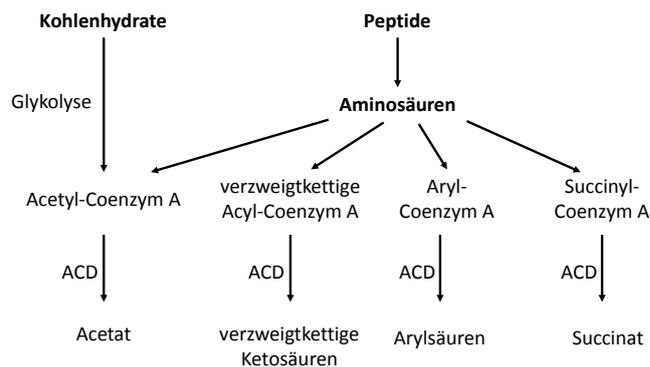


Abb. 1.1.: ACDs sind an der Degradation von Zuckern und Aminosäuren beteiligt. Vereinfachte Darstellung der Funktionen von Acetyl-Coenzym A-Synthetasen (ACDs) in der Zelle (nach Mai und Adams (1996)).

Domänenvermischung

Eine der interessantesten Eigenschaften der Superfamilie der Acyl-Coenzym A-Synthetasen ist die außergewöhnliche Vielfalt in der Anordnung ihrer Subdomänen. So besitzen Acyl-Coenzym A-Synthetasen verschiedener Mikroorganismen bezüglich der

1. Einleitung

funktionellen Domänen die gleiche allgemeine Zusammensetzung, die Anordnung der Subdomänen unterscheidet sich je nach Protein jedoch teilweise gravierend. So existieren ACDs, die aus zwei Untereinheiten gebildet werden, aber auch solche, die aus einem Polypeptidstrang bestehen. In Sánchez *et al.* (2000) wurde bereits das Phänomen der Domänenvermischung (*domain shuffling*) beschrieben (Sánchez *et al.*, 2000). Diese Diversität ist schematisch in Abbildung 1.2 wiedergegeben.

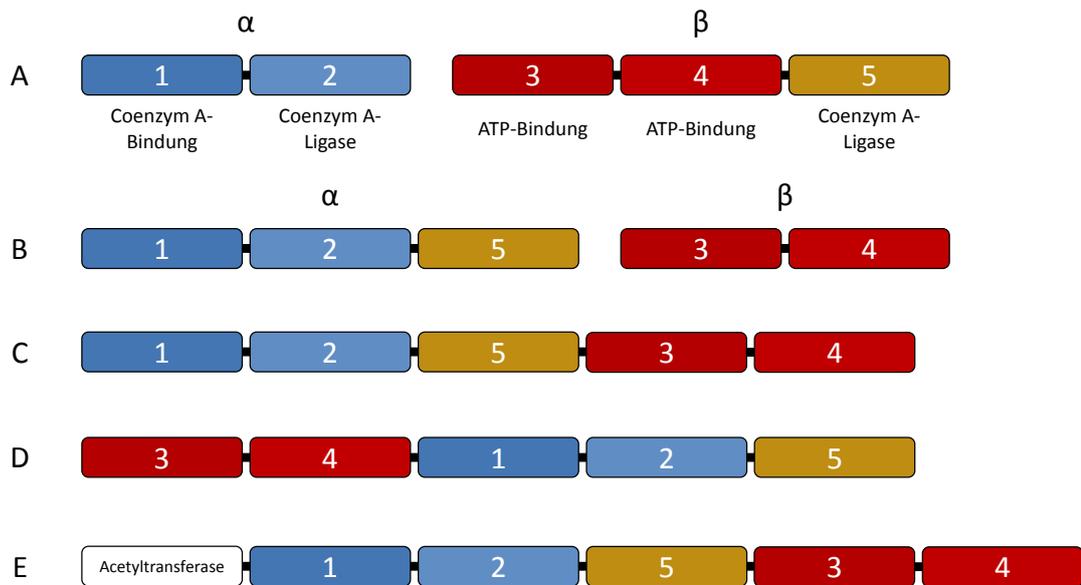
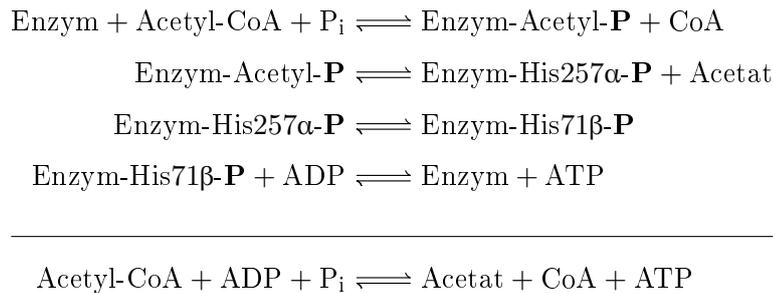


Abb. 1.2.: Domänenvermischung bei Acetyl-Coenzym A-Synthetasen und Succinyl-Coenzym A-Synthetasen. Der Aufbau der einzelnen Domänen α und β der *E. coli* Succinyl-Coenzym A-Synthetase (SCS) kann als Fusion verschiedener Subdomänen angesehen werden. Diese werden der Reihe nach durchnummeriert (Fraser *et al.*, 1999). Abweichend von der *E. coli* SCS finden sich ACDs unterschiedlicher Domänenstruktur. A) *E. coli* Succinyl-CoA-Synthetase, B) *P. furiosus* ACD1-ACD5, C) *K. cryptofilum* ACD1, C) *A. fulgidus* AF_1211 und *M. jannaschii* MJ0590, D) *A. fulgidus* AF_1938, E) *A. fulgidus* AF_1511.

ACDs funktionieren nach einem vierstufigen Reaktionsmechanismus

Die Übertragbarkeit der einzelnen Teilschritte des bereits im Text beschriebenen Reaktionsmechanismus für die Succinyl-Coenzym A-Synthetasen wurde anhand der ACD1 aus *Pyrococcus furiosus* gezeigt (Bräsen *et al.*, 2008). Aufgebaut ist das Enzym als $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer (Mai und Adams, 1996). So finden die ersten beiden Teilreaktionen, die Phosphorylyse des Coenzym A-Thioesters und die Bildung eines hochenergetischen Phosphohistidinintermediats, an der α -Domäne statt (Bräsen *et al.*, 2008). Ein in allen

Mitgliedern der dinukleotid-abhängigen Acyl-Coenzym A-Synthetasen hochkonservierter Histidinrest (His257 α in der *P. furiosus* ACD1) wird dabei phosphoryliert (Bräsen *et al.*, 2008). Situier ist die Bindungsstelle für Coenzym A-Thioester (Reaktionszentrum *site I*) auf der α -Domäne der *pf*ACD1. Die Bindung der Nukleotide und deren Phosphorylierung geschieht durch die β -Domäne dieses Enzyms (*site II*). In sowohl den SCS als vermutlich auch der ATP-Citrat-Synthase sind beide Reaktionsstellen weit voneinander entfernt (etwa 35 Å im Fall der *E. coli* SCS), so dass im Fall der SCS ein „*swinging loop*“-Mechanismus vorgeschlagen wurde (Bailey *et al.*, 1999; Fraser *et al.*, 2000). Hierbei „schwingt“ die Phosphohistidinschleife von *site I* zu *site II* und zurück. Bisher konnte dieser Mechanismus experimentell noch nicht nachgewiesen werden. Der Sequenzvergleich der Mitglieder der Superfamilie der Acyl-CoA-Synthetasen zeigt, dass die Familie der ACDs ein weiteres außerordentlich hoch konservierten Histidinrest in der ATP-Greiferdomäne besitzt (Bräsen *et al.*, 2008). Für die *pf*ACD1 konnte gezeigt werden, dass das entsprechende His71 β im Laufe der enzymatischen Reaktion phosphoryliert wird und ein Austausch gegen Alanin die Aktivität des Enzyms komplett unterbindet (Bräsen *et al.*, 2008). Es wird daher ein vierstufiger Reaktionsmechanismus vermutet, der im Gegensatz zur *E. coli* SCS die Übertragung der Phosphatgruppe vom His257 α auf das His71 β beinhaltet. Phospho-His71 β überträgt seine Phosphorylgruppe dann auf das gebundene Dinukleotid, woraufhin das entstandene Trinukleotid das Enzym verlässt. Dieser Umweg der *pf*ACD1 resultiert möglicherweise aus der sterischen Konsequenz der im Vergleich zur *ec*SCS um drei Aminosäuren kürzeren schwingenden Schleife (Bräsen *et al.*, 2008).



1. Einleitung

1.1.3. Aufgabenstellung

Dinukleotid-abhängige Acetyl-Coenzym A-Synthetasen katalysieren die Umsetzung von CoA-Thioestern, Phosphat und ADP bzw. GDP zu CoA und ATP bzw. GTP in Richtung der Energieerzeugung (Produktion von ATP/GTP) oder Säureaktivierung (Produktion von CoA-Thioestern). Mitglieder dieser Proteinfamilie finden sich in allen Domänen des Lebens (Sánchez *et al.*, 2000; Schmidt und Schönheit, 2013). Trotz des hohen Verwandtschaftsgrades der SCSs, den am Besten untersuchten Vertretern der Acyl-CoA-Synthetasen, und ACDs zeigen letztere deutliche Unterschiede in Substratspezifität, im Reaktionsmechanismus und Domänenstruktur (Sánchez *et al.*, 2000; Bräsen *et al.*, 2008). So kann die *E. coli* SCS ausschließlich kurzkettige CoA-Thioester und Succinyl-Coenzym A effektiv metabolisieren (Hildebrand und Spector, 1969). Im Gegensatz dazu zeigen Mitglieder der ACD-Familie Aktivität bezüglich einer großen Bandbreite an Coenzym A-Thioestern (Shikata *et al.*, 2007; Awano *et al.*, 2014; Scott *et al.*, 2014). Des Weiteren funktionieren ACDs nach einem einzigartigen vierstufigen Mechanismus (Bräsen *et al.*, 2008).

Anhand eines auf der Struktur der *ecSCS* erstellten Homologiemodells der *pfACD1* wurde versucht, einige dieser Eigenarten zu erklären (Bräsen *et al.*, 2008). Jedoch können damit prinzipiell nicht alle Fragen beantwortet werden. Insbesondere der Einfluss des Domänenvermischung auf die Anordnung der Subdomänen in Mehrketten- oder Einzelketten-ACDs bleibt unbekannt. So fragen sich die Autoren in Sánchez *et al.* (2000) bereits, wie die Einzelketten-ACD aus *Giardia lamblia* eine SCS-ähnliche Anordnung annehmen kann. In einem von Bräsen *et al.* (2008) präsentierten Modell der *pfACD1* müssen teilweise über 60 Å zwischen den Termini überwunden werden, um ein $\alpha\beta$ -Fusionsprotein zu bilden. Bisher wurden keine Vertreter der Familie der ACDs strukturell charakterisiert. Versuche zur Kristallisation der *pfACD1* waren erfolgreich, jedoch konnte die Kristallstruktur aufgrund einer ungewöhnlichen Art von Kristallverzwillingung nicht gelöst werden (Lehtio *et al.*, 2005).

Dr. Marcel Schmidt studierte im Rahmen seiner Dissertation an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel ACDs unterschiedlicher Organismen (Schmidt, 2013). Insbesondere Isoform 1 einer ACD aus dem Archaeum *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* (*ckcACD1*) wies hohe Aktivität und Thermostabilität auf, so dass dieses Enzym für weiterführende strukturelle Studien ausgewählt wurde. Das Enzym besteht aus

1.2. Immunität - Verteidigung der Energie

zwei α - (jeweils die Subdomänen 1-2-5, Uniprot-Zugriffsnummer B1L3C9) und zwei β -Untereinheiten (mit den Subdomänen 3-4, Uniprot-Zugriffsnummer B1L7P8) und bildet ein Heterotetramer mit der Zusammensetzung $\alpha_2\beta_2$ (Schmidt, 2013). Höchste Aktivität hat die *ckcACD1* mit Acetyl-Coenzym A, mit geringerer Rate setzt es zudem Propyl- und Butyl-Coenzym A um (Schmidt, 2013). Bezogen auf das Substratspektrum kann die *ckcACD1* in die Klasse I der ACDs eingeordnet werden. Interessant ist weiterhin der Ursprungsorganismus der *ckcACD1*. Das Archaeum *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* weist Eigenschaften der beiden großen Phyla Crenarchaeota und Euryarchaeota der Domäne der Archaeen auf, hat sich aber schon frühzeitig in der Entwicklungsgeschichte davon getrennt entwickelt (Elkins *et al.*, 2008). *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* gehören womöglich einem eigenem Phylum *Korarchaeota* an.

In dieser Dissertation sollte die *ckcACD1* im Komplex mit verschiedenen Substraten und Substratanaloga kristallisiert und deren Struktur geklärt werden. Aus den Bindemodi verschiedener Cofaktoren können Einsichten in die Funktionsweise des Enzyms abgeleitet werden. Unterschiede im Reaktionsmechanismus innerhalb der Superfamilie der Acyl-Coenzym A-Synthetasen können so möglicherweise auf einer rationalen Basis erklärt werden. Weiterhin könnten so Einblicke in die Funktionsweise eines Organismus sehr früh aus der Entwicklungsgeschichte der Erde gewonnen werden. Hyperthermophile sind die sich am langsamsten entwickelnden Lebewesen in der Domäne der Bakterien und Archaeen (Woese *et al.*, 1990; Olsen *et al.*, 1994), daher kann das Verständnis der Biochemie der Hyperthermophilen der Schlüssel zum Verständnis der Evolution des Metabolismus der Mesophilen sein (Woese *et al.*, 1990).

1.2. Immunität - Verteidigung der Energie

Im Laufe der Evolution haben sich alle Organismen an ökologische Nischen angepasst. Dies umfasst ebenfalls die Situation der Besiedelung größerer Lebewesen durch kleinere Organismen. Dieser selektive Druck führte zur Entwicklung von Mechanismen zur Abwehr des schädlichen Einflusses durch pathogene Mikroorganismen. Die Erkennung von Pathogenen erfolgt beispielsweise über Rezeptoren, die ein breites Spektrum an unveränderlichen mikrobiellen molekularen Strukturen (*microbial-associated molecular*

1. Einleitung

patterns MAMPs) erkennen. Diese mustererkennenden Rezeptoren detektieren hierbei Strukturen, die meist essentiell mit der Lebensfähigkeit des Pathogens verknüpft sind und daher bei einer großen Gruppe von Mikroorganismen vorkommen und strukturell sehr ähnliche aufgebaut sind (Medzhitov und Janeway, 1997). Nach Erkennung dieser Gefahrensignale reagiert die Zelle mit der Ausschüttung verschiedener Effektormoleküle, beispielsweise antimikrobieller Peptide, reaktiver Sauerstoff- oder Stickstoffspezies (Buchmann, 2014). Ziel ist die Eliminierung des Pathogens. Dieser evolutionär alte Mechanismus der Bekämpfung von Pathogenen wird angeborenes Immunsystem genannt. Niedere Lebewesen sind allein auf diese Art der Verteidigung angewiesen. Höhere Organismen wiederum weisen zusätzlich ein adaptives Immunsystem auf. Dieses erkennt zusätzlich pathogen-spezifische Strukturen und ist in der Lage ein Gedächtnis dafür auszubilden. Bei einer wiederholten Infektion mit einem bestimmten Keim kann dieser schneller aus dem Wirtsorganismus beseitigt werden. Medzhitov und Janeway (1997) begründen die Entwicklung eines zusätzlichen Immunsystems mit unterschiedlicher evolutionärer Selektion (Medzhitov und Janeway, 1997). So haben kurzlebige Organismen mit zeitiger (und einmaliger) Fortpflanzung eine geringere Notwendigkeit für adaptive Immunität, wohingegen langlebige Lebewesen, die sich spät und mehrfach reproduzieren, eher von einem erworbenem Immunsystem profitieren (Medzhitov und Janeway, 1997).

1.2.1. Toll-ähnliche Rezeptoren im Immunsystem

Mit der Entdeckung des Typ-I-Membranproteins Toll in *Drosophila melanogaster* (Lemaitre *et al.*, 1996) und dessen Homologen (Toll-ähnliche) im Menschen (Medzhitov *et al.*, 1997) wurde der Grundstein zum Verständnis der direkten Aktivierung des angeborenen Immunsystems gelegt (Kopp und Medzhitov, 1999). Davor wurde bereits aufgrund der Ähnlichkeit der Immunerkennung in Säugetieren und *D. melanogaster* auf ein evolutionär altes Prinzip spekuliert (Hultmark, 1994). Toll-ähnliche und Tollverwandte Rezeptoren (TLR bzw. TRR) scheinen in fast allen mehrzelligen Tieren vorzukommen (Leulier und Lemaitre, 2008).

Der Aufbau dieser Rezeptoren ist daher auch nahezu gleich. Der extrazelluläre Teil des Proteins ist geprägt von Leucin-reichen Wiederholungen (*leucin-rich repeats* LRR), verantwortlich für die Bindung von Liganden (MAMPs) und die Ausbildung von Wech-

selwirkungen zu anderen Toll-ähnlichen Rezeptoren oder Adapterproteinen. Die Form der LRR-Domäne ähnelt einem Hufeisen. Die konkave Fläche ist geprägt durch eine β -Faltblattstruktur, wobei die einzelnen Stränge über eine kurze Schleife miteinander verbunden sind. Die Bindung von Gefahrensignalen erfolgt meist über diese konkave Fläche (Botos *et al.*, 2011). Es folgt daraufhin entweder die Anlagerung eines anderen Toll-ähnlichen Rezeptors oder die Umlagerung eines bereits vorgeformten TLR-Dimers. Dieser Vorgang bewirkt die räumliche Annäherung der intrazellulären Toll/Interleukin-1-Rezeptor-homologen Domäne (TIR-Domäne), die wiederum durch Ausbildung homotyper TIR-TIR-Wechselwirkungen die Plattform zur Rekrutierung weiterer Adapterproteine bildet (Song und Lee, 2012; Narayanan und Park, 2015; Guven-Maiorov *et al.*, 2015). Alle TIR-Domänen weisen eine Flavodoxin-ähnliche Faltung auf (Ve *et al.*, 2015), die in evolutionär hochkonservierter Form vorliegt (Pålsson-McDermott und O'Neill, 2007). Im Menschen sind fünf Adapterproteine mit TIR-Domänen bekannt: MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*), MAL (*MyD88 adaptor-like protein*), TRIF (*TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN β*), TRAM (*TRIF-related adaptormolecule*) und SARM (*sterile α and armadillo-motif containing protein*). Zur Vereinfachung wird im Folgenden nur der Fall für die Anlagerung von MyD88 betrachtet. Dies geschieht durch Wechselwirkung der TIR-Domänen der TLR und der TIR-Domäne des MyD88 und führt zur Ausbildung eines TIR-Signalosoms (Guvén-Maiorov *et al.*, 2015). Über homotype Wechselwirkungen ihrer DEATH-Domänen assoziieren MyD88 sowie die Kinasen IRAK4 und IRAK1 oder IRAK2 (IRAK, *IL1-R-associated kinase*) zu einem großen Komplex, dem Myddosom (Lin *et al.*, 2010). Kürzlich wurde die Struktur des TIR-Signalosoms und Myddosoms modelliert (Guvén-Maiorov *et al.*, 2015). Es erfolgt die Aktivierung der Kinasen durch Autophosphorylierung von IRAK4, die wiederum IRAK1 und IRAK2 durch Phosphorylierung aktiviert (Ferrao *et al.*, 2012). TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*) wird zur Membran befördert und wechselwirkt über ein TRAF6-Bindungsmotiv mit den aktivierten IRAK1/2, was zur Polyubiquitinierung derselben führt und damit zwei Kinasekomplexe, TAK1- (*TGF β -activated kinase 1*) und IKK- (*I κ B kinase*) Komplex, rekrutiert (Ferrao *et al.*, 2012). Letzterer ist verantwortlich für die Phosphorylierung von I κ B (*inhibitor of κ B*), das sich daraufhin von NF κ B (*nuclear factor κ B*) löst und zur Degradierung im Proteasom ubiquitiniert wird (Ferrao *et al.*, 2012). NF κ B wird in den Kern transloziert und bewirkt die Expression entzündungsfördernder Botenstoffe oder antimikrobieller Substanzen (Kyriakis und Avruch, 2001).

1. Einleitung

Das Verständnis der Erkennung mikrobiell-assoziiertes molekularer Muster durch Toll-ähnliche Rezeptoren, der Weiterleitung des Gefahrensignals in den Zellkern und der Aktivierung der Immunantwort ist im Laufe der letzten Dekade stark gewachsen. Dies bezieht sich ebenfalls auf die Verfügbarkeit von strukturellen Daten über die extra- und intrazellulären Domänen. In manchen Fällen sind die Ektodomänen zur besseren Kristallisierbarkeit mit Schleimaal-LRR fusioniert (Jin und Lee, 2008). Dazu gehören beispielsweise der TLR-1/TLR-2-Komplex aus der Maus (Jin *et al.*, 2007), TLR-2 aus der Maus (Kim *et al.*, 2007), der murine TLR-2/TLR-6-Komplex (Kim *et al.*, 2007), der humane und murine TLR-4/MD-2-Komplex (Kim *et al.*, 2007) sowie TLR-5 aus dem Zebrafisch (Yoon *et al.*, 2012) und der *Drosophila melanogaster* Toll-Rezeptor (Gangloff *et al.*, 2013). Ohne größere Modifikationen der Leucin-reichen Domäne wurden die extrazellulären Abschnitte des murinen TLR-2 (Koymans *et al.*, 2015), des humanen (Choe *et al.*, 2005; Bell *et al.*, 2005) und murinen (Liu *et al.*, 2008) Toll-ähnlichen Rezeptor 3, des humanen TLR-8 (Tanji *et al.*, 2013; Beesu *et al.*, 2015), des TLR-9 aus dem Pferd, Rind und Maus (Ohto *et al.*, 2015) und des murinen TLR-13 (Song *et al.*, 2015) strukturell charakterisiert. Es wurde weiterhin die Komplexstruktur des Toll-Spätzle-Komplexes bestimmt (Lewis *et al.*, 2013; Parthier *et al.*, 2014). Das LRR-Domänen besitzende Protein RP105 (*radioprotective* 105 kDa), welches an der Regulation des Toll-ähnlichen Rezeptors 4 beteiligt ist, konnte aus der Maus und dem Menschen strukturell charakterisiert werden (Yoon *et al.*, 2011; Ohto *et al.*, 2011). Über Einzelpartikelrekonstruktion wurde die Struktur von TLR-5 ohne seinen Liganden Flagellin, einem essentiellen Bestandteil bakterieller Flagellen, aus elektronenmikroskopischen Daten bestimmt (Zhou *et al.*, 2012). Es wurden ebenfalls die Strukturen der intrazellulären Toll/Interleukin-Rezeptor homologen Domänen der Toll-ähnlichen Rezeptoren 1 und 2 (Xu *et al.*, 2000), 6 (Jang und Park, 2014) und 10 (Nyman *et al.*, 2008) veröffentlicht. Auch die TIR-Domänen der meisten Adapterproteine sind strukturell charakterisiert (Ve *et al.*, 2015). Kürzlich wurde zudem eine Studie veröffentlicht, in der das dynamische Verhalten der Transmembranhelix von TLR-2 untersucht wurde (Mineev *et al.*, 2014).

1.2.2. Proteine mit TIR-Domänen sind weit verbreitet

Toll/Interleukin-1-Rezeptor-homologe Domänen (TIR-Domänen) wurden anfangs als der cytoplasmatische Teil von Toll-ähnlichen Rezeptoren und Interleukin-1-Rezeptoren

beschrieben (Gay und Keith, 1991). Jedoch finden sich Proteine mit TIR-Domänen nicht nur in Tieren, sondern auch in Pflanzen und Bakterien. In Archaeen, Viren und Pilzen wurde bisher keine Vertreter gefunden. TIR-Domänen sind Schnittstellen für die Ausbildung von Protein–Protein-Interaktionen, oftmals über Ausbildung homotyper Wechselwirkungen zwischen TIR-Domänen. In jüngster Zeit wurden einige TIR-Domänen mit bakteriellem, tierischem und pflanzlichem Ursprung strukturell charakterisiert. Alle sind α/β -Proteine mit einer typischen Flavodoxinfaltung. TIR-Domänen unterschiedlicher Proteine weisen typischerweise eine geringe Sequenzidentität auf, besitzen trotzdem signifikante dreidimensionelle Ähnlichkeit zueinander (Ve *et al.*, 2015). Möglicherweise resultiert dies aus dem Vorhandensein unterschiedlicher Protein–Protein-Interaktionmuster (Ve *et al.*, 2012). Prinzipiell haben Proteine mit TIR-Domänen in den Vertretern der unterschiedlichen Reiche andere Funktionen. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 1.3 schematisiert.

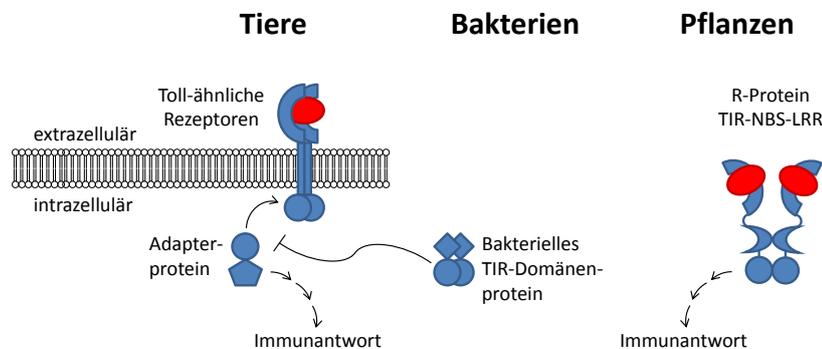


Abb. 1.3.: Generelle Darstellung der biologischen Funktion von TIR-Domänen.

Proteine mit Toll/Interleukin 1-Rezeptor-homologen Domänen sind in höheren Lebewesen essentiell am Immunsystem beteiligt. Der zugrundeliegende Mechanismus ist jedoch bei Tier und Pflanze unterschiedlich.

Bei Tieren ergibt sich folgendes Bild. Nachfolgend der Erkennung eines Gefahrensignals durch Toll-ähnliche Rezeptoren erfolgt eine Dimerisierung ihrer TIR-Domänen. Dieser Schritt bildet die Grundlage für die Rekrutierung weiterer TIR-Domänen enthaltender Adapterproteine (Fekonja *et al.*, 2012). Die auf diesem Wege in Gang gesetzte Signalkaskade führt letztendlich zur Ausschüttung entzündungsfördernder Botenstoffe als auch antimikrobieller Substanzen.

1. Einleitung

Die pflanzlichen Immunabwehr muss in zwei Teilbereiche untergliedert werden. Die Erkennung mikrobieller Besiedlung der Pflanzenoberfläche erfolgt durch das Detektieren konservierter mikrobieller Muster mit Hilfe mustererkennender Rezeptoren. Diese grundlegende Art der Pflanzenimmunität wird als *PAMP-triggered immunity* (PTI) bezeichnet. Diese kann jedoch von einigen Schädlingen durch Sekretion von Effektormolekülen unterdrückt werden. Werden von der Pflanzenzelle solche Effektoren erkannt, erfolgt meist eine hypersensitive Reaktion (HR), d.h. ein Absterben des infizierten Pflanzenteils durch programmierten Zelltod, so dass eine weitere Ausbreitung des Schädlings durch Unterbrechung seiner Nährstoffversorgung verhindert wird. Diese Effektor-angefasste Immunität (*effector-triggered immunity*, ETI) beruht auf sogenannten Resistenzproteinen (R-Proteine). Bis jetzt sind fünf verschiedene Klassen der R-Proteine bekannt (Sanseverino und Ercolano, 2012). Nur eine dieser Klassen funktioniert über die Verwendung von TIR-Domänen (TIR-NBS-LRR, TNLs). Für die Aktivierung der ETI durch TNLs sind in allen Fällen Selbstassoziation von TIR-Domänen bzw. homotype TIR–TIR-Interaktionen notwendig (Swiderski *et al.*, 2009; Krasileva *et al.*, 2010; Bernoux *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2014).

Interessanterweise finden sich sowohl in pathogenen als auch in nicht-pathogenen Bakterien Proteine mit TIR-Domänen (Spear *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011). Möglicherweise fungieren TIR-Domänen auch hier als universelle Plattform für Protein–Protein-Wechselwirkungen. Für TIR-enthaltende Proteine (TIR-Domänen-Proteine) aus *Salmonella enterica* (Newman *et al.*, 2006), *Escherichia coli* (Cirl *et al.*, 2008), *Brucella abortus* (Cirl *et al.*, 2008; Radhakrishnan *et al.*, 2009), *Enterococcus faecalis* (Kraemer *et al.*, 2014) und *Brucella melitensis* (Salcedo *et al.*, 2008; Snyder *et al.*, 2013; Alaidarous *et al.*, 2014) konnte gezeigt werden, dass diese den TLR-Signalweg negativ beeinflussen. Im Fall von *Brucella melitensis* TcpB/BtpA/Btp1 wurde nachgewiesen, dass dieses mit den Adapterproteinen MAL und MyD88 sowie dem Rezeptor TLR-4 wechselwirkt und daher spezifisch den TLR-4–MAL-Weg stören kann (Snyder *et al.*, 2013; Alaidarous *et al.*, 2014). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das Protein in die Wirtszelle transloziert wird und an der Virulenz beteiligt ist (Salcedo *et al.*, 2013). Das TIR-Domänenprotein aus *Yersinia pestis* (YpTdp) interagiert ebenfalls direkt mit dem humanen Adapterprotein MyD88 (Rana *et al.*, 2011). Im Mausmodell für Beulenpest konnte jedoch nur einen geringen Einfluss von YpTdp auf die Virulenz von *Y. pestis* nachgewiesen werden (Spear *et al.*, 2012).

1.2.3. *Hydra magnipapillata* als Modellsystem für Signalerkennung und -weiterleitung und deren Evolution

Der Frischwasserpolytyp *Hydra magnipapillata* war und ist ein vielseitiger Modellorganismus in der Forschung (Galliot, 2012). Der einfache zelluläre Aufbau des Polypen und seine im Vergleich weniger komplexen molekularen Mechanismen sowie die evolutionäre Verwandtschaft zum Menschen machen diesen Organismus zum exzellenten Untersuchungsobjekt im Bereich der Embryogenese und Neurogenese, der Symbiose, des Alterns, der evolutionären Entwicklung und Regeneration, aber auch des angeborenen Immunsystems (Galliot, 2012). *Hydra magnipapillata* besitzt keine typischen Toll-ähnlichen Rezeptoren (Bosch *et al.*, 2009). Es finden sich allerdings zwei Klassen von Typ-I-Membranproteinen, die jeweils eines der klassischen Merkmale eines TLR aufweisen. So bestehen die extrazellulären Teile von *hyLRR-1* und *hyLRR-2* (*Hydra magnipapillata* *Leucine-rich repeats* 1 und 2) aus Leucin-reichen Wiederholungen, woran sich eine Transmembranhelix anschließt (Bosch *et al.*, 2009). C-terminal befindet sich dahingegen keine TIR-Domäne. Diese ist intrazellulär an den Proteinen *hyTRR-1* und *hyTRR-2* (*Toll receptor related* 1 und 2) lokalisiert (Bosch *et al.*, 2009). In Kombination können TRR-1 und LRR-2 die Anwesenheit von Flagellin erkennen (Bosch *et al.*, 2009). Diese Zweiteilung scheint eine *Hydra*-spezifische Entwicklung zu sein, da die Seeanemone *Nematostella vectensis*, die ebenfalls zum Stamm der Nesseltiere gehört, klassische TLR besitzt (Hemmrich *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2007). In *Hydra* finden sich ebenfalls das Adapterprotein MyD88 und die grundlegenden Bestandteile des Toll-Rezeptor-Systems sowie der Transkriptionsfaktor NF- κ B (Hemmrich *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2007; Lange *et al.*, 2011). Prinzipiell besitzt *Hydra* somit ein zu höheren Organismen vergleichbares Repertoire zur Abwehr von Pathogenen. Neuere Forschung deutet darauf hin, dass *Hydra* seine Besiedelung mit Mikroorganismen gezielt steuert (Franzenburg *et al.*, 2012; Bosch, 2014). Auch im Menschen scheint das der Fall. So können Kommensale die Immunantwort auf Besiedelung mit pathogenen Bakterien verstärken (Wanke *et al.*, 2011). Es finden sich im Menschen zudem Zusammenhänge zwischen TLR-Expression, Besiedelung mit Mikroorganismen und beispielsweise erhöhter Fettleibigkeit (Pekkala *et al.*, 2015). Das Verständnis der Regulation, Signalweiterleitung und Immunantwort von *Hydra* kann möglicherweise auch die Sicht auf das Immunsystem höherer Lebewesen, wie dem Menschen, beeinflussen.

1. Einleitung

1.2.4. Aufgabenstellung

An dieser Stelle sollen nochmals die Grenzen der bisherigen Forschung verdeutlicht werden. So beinhalten die erwähnten Kristallstrukturen entweder die Ekto- oder die Endodomäne. Es findet sich nur eine Publikation, in der die elektronenmikroskopische Struktur des gesamten Toll-ähnlichen Rezeptors 5 beschrieben wird (Zhou *et al.*, 2012). Während die Rekonstruktion der Elektronendichte deutlich eine dimere Anordnung der Ektodomänen zeigt, ist nur eine der intrazellulären TIR-Domänen beobachtbar (Zhou *et al.*, 2012). Möglicherweise ergibt sich ein anderes Bild nach Bindung des Liganden Flagellin. Ob sich die Anordnung der aktivierten TIR-Domänen auf diese Weise beobachten lässt, bleibt trotzdem fraglich. Es wird vermutet, dass das initiale TIR-TIR-Dimer erst durch Wechselwirkung mit einem Adaptermolekül stabilisiert wird (Toshchakov *et al.*, 2011). Im Menschen sind prinzipiell fünf TIR-Domänen enthaltende Adaptermoleküle bekannt (Song und Lee, 2012). Das zu untersuchende System wird dementsprechend komplex und möglicherweise nicht mehr handhabbar.

Der Mechanismus der Erkennung von Pathogenen bzw. der Weiterleitung des Gefahrsignals ist jedoch evolutionär konserviert und ähnelt sich in vielzelligen Organismen (Buchmann, 2014). So finden sich auch in *Hydra* die meisten Bestandteile des konservierten Toll-Signalweges (Hemrich *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2007; Bosch *et al.*, 2009; Lange *et al.*, 2011). Der Signalweg ist durch die geringere Anzahl an Bestandteilen weniger komplex und gegebenenfalls für Untersuchungen leichter zugänglich. *Hydra* ist evolutionär mit dem Menschen verknüpft (Technau *et al.*, 2005). Somit könnte *Hydra* möglicherweise einen größeren Beitrag zum Verständnis des angeborenen Immunsystems im Menschen beitragen. So kann unsere Auffassung der molekularen Mechanismen an einem einfachen Modell überprüft und letztendlich vervollständigt werden.

Obwohl in den letzten Jahren sehr viel zur evolutionären Herkunft des auf Toll-ähnlichen Rezeptoren basierenden Immunsystems publiziert wurde (Wu *et al.*, 2011; Mikami *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2012; Roach *et al.*, 2013), machen diese Veröffentlichungen jedoch auch deutlich, dass auf diesem Gebiet nachwievor zu wenig experimentelle Daten zur Verfügung stehen. Erwähnte Studien bestehen hauptsächlich aus dem Vergleich von Primärsequenzen von TIR- und LRR-Domänen aus unterschiedlichen Organismen. Sequenzinformationen lassen sich heutzutage mit vergleichsweise geringem Aufwand ermitteln. Strukturelle Informationen über Toll-ähnliche und Toll-verwandte sind jedoch

rar gesät und können daher für eine umfassende Analyse evolutionärer Verwandtschaften nicht herangezogen werden. Die Charakterisierung des *Hydra magnipapillata* Systems Toll-verwandter Rezeptoren kann nicht nur wertvolle Einblicke in die Evolution des angeborenen Immunsystems liefern.

In dieser Arbeit sollte daher die intrazelluläre TIR-Domäne des Toll-verwandten Rezeptors TRR-2 aus *Hydra magnipapillata* heterolog exprimiert und kristallisiert werden. Aus dem Vergleich der Kristallstruktur mit anderen TIR-Domänen könnten Hinweise auf die evolutionäre Konservierung von homotypen TIR-TIR-Interaktionsmodi gewonnen werden.

1.3. Proteinkristallisation

Zur Aufklärung von Molekülstrukturen mittels Röntgendiffraktion werden davon Kristalle des aufzuklärenden Moleküls benötigt, deren Diffraktionsmuster bei Bestrahlung mit Röntgenstrahlen zur Ermittlung des dreidimensionalen Aufbaus herangezogen werden kann (Friedrich *et al.*, 1912). Diese Methode wird für alle Arten chemischer Verbindungen eingesetzt, angefangen von typischen anorganischen Verbindungen, wie Salzen oder Mineralien (Bragg *et al.*, 1921b; Bragg *et al.*, 1921a; Bragg *et al.*, 1922), bis hin zu Molekülen der organischen Chemie (Dickinson und Raymond, 1923) und natürlich vorkommender, biologischer Systeme, wie Vitaminen, RNS, DNS und Proteinen (Carlisle und Crowfoot, 1945; Brink *et al.*, 1954; Hodgekin *et al.*, 1955; Kendrew *et al.*, 1958). Während die meisten Produkte der Chemie relativ klein sind und sich aufgrund der geringen Anzahl an „aktiven“ Gruppen leicht kristallisieren lassen, gestaltet sich die Produktion von Kristallen von biologischen Makromolekülen ungleich schwieriger. Diese sind meist sehr viel größer und haben aufgrund ihres modularen Aufbaus (RNS und DNS aus Ribonukleotiden bzw. Desoxyribonukleotiden, Proteine aus Aminosäuren) sehr viele gleichartige Akzeptoren bzw. Donoren für Wechselwirkungen zur Verfügung. Des Weiteren sind Moleküle mit steigender Größe meist flexibler. Die Ausbildung eines Kristallgitters setzt die Anordnung der Moleküle im Gitter auf die gleiche Art und Weise voraus (translationale Symmetrie). Hohe intrinsische Beweglichkeit des Moleküls kann dessen Kristallisation vollständig verhindern.

1. Einleitung

Aus dem Diffraktionsexperiment werden diskrete Beugungsreflexe erhalten, aus deren Position und Intensität I der Betrag des Strukturformfaktors \mathbf{F} berechnet werden kann.

$$I_{h,k,l} = |\mathbf{F}_{h,k,l}|^2 \cdot L \cdot P \cdot A \quad (1.1)$$

Der Aufbau des Experiments und die Geometrie des Detektors beeinflusst die Intensität der erhaltenen Reflexe. Dies wird durch Einbeziehung des Lorentz-Faktors L ausgeglichen. Weitere Korrekturfaktoren sind der Polarisationsfaktor P sowie die Absorptionskorrektur A . Ersterer zieht in Betracht, dass Elektronen in Abhängigkeit des Winkels zwischen ihrer Eigenvibration und der Richtung des Röntgenlichts unterschiedlich stark streuen (Thomson-Streuung). Sind die Vektoren parallel, dann ist der Streubetrag des Elektrons maximal; stehen die Vektoren senkrecht aufeinander, streut das Elektron nicht. Um den Einfluss von Lichtschwächung durch nicht-elastische Streuung des Röntgenlichts (Compton-Streuung) mit der Materie im Kristall und der Luft zu betrachten, wird der Faktor A als Absorptionskorrektur eingesetzt.

1.3.1. Kristallographisches Phasenproblem

Der komplexe Strukturformfaktor $\mathbf{F}_{h,k,l}$ zur Beschreibung der Beugung an Elektronen kann folgendermaßen dargestellt werden.

$$\mathbf{F}_{h,k,l} = \sum_j^{\text{Atome}} f_j \cdot \exp(2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)) \quad (1.2)$$

Mit dieser Gleichung lässt sich erkennen, dass die Position x_j, y_j, z_j eines jedes Atom j im Kristallgitter zum Strukturformfaktor (und damit zur Intensität jedes Reflexes) beiträgt. Das Element des Atoms schlägt sich im atomaren Streufaktor f_j nieder. Mit dieser Gleichung kann über eine Fourier-Transformation die Funktion der Elektronendichteverteilung $\rho_{x,y,z}$ berechnet werden. Diese lautet wie folgt

$$\rho_{x,y,z} = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \mathbf{F}_{h,k,l} \cdot \exp(-2\pi i(hx + ky + lz)) \quad (1.3)$$

Hierbei ist V das Volumen der Einheitszelle. Sind die Strukturfaktoren der einzelnen Reflexe h, k, l bekannt, kann die Elektronendichte ρ an jedem Punkt x, y, z der Elementarzelle berechnet werden.

Jedoch wird ein Problem der Röntgenkristallographie mit einer anderen Darstellung der Gleichung 1.2 zur Berechnung des Strukturfaktors \mathbf{F} deutlich.

$$\mathbf{F}_{h,k,l} = |\mathbf{F}_{h,k,l}| \cdot \exp(-2\pi i \cdot \alpha) \quad (1.4)$$

Wie eingangs erwähnt ist ausschließlich der Betrag $|\mathbf{F}_{h,k,l}|$ experimentell zugänglich. Die Phase α kann nicht unmittelbar erhalten werden und muss erst über verschiedene Methoden der Phasierung ermittelt werden. In Anbetracht der Tatsache, dass die Korrektheit der Phase für das Lösen einer Struktur wichtiger ist, als die gemessenen Amplituden, kann dies zurecht als das Phasenproblem der Kristallographie bezeichnet werden. Eine andere Form der Gleichung 1.3 unter Berücksichtigung der Formel 1.4 lautet

$$\rho_{x,y,z} = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |\mathbf{F}_{h,k,l}| \cdot \exp(-2\pi i(hx + ky + lz - \alpha_{h,k,l})) \quad (1.5)$$

1. Einleitung

1.3.2. Methoden der Phasierung

Isomorpher Ersatz

Die Methode des isomorphen Ersatzes gehört zu den experimentellen Phasierungsmethoden. Im Jahr 1954 veröffentlichte Green *et al.*, dass Hämoglobin über freie Sulfhydrylgruppen para-Quecksilberbenzoat und Silberionen bindet (Green *et al.*, 1954). Das so derivatisierte Protein konnte kristallisiert werden. Nach Ermittlung der Position der Schweratome wurden teilweise die Vorzeichen bestimmter Phasenwerte berechnet. Diese Arbeit war grundlegend für die daraufhin folgende Klärung der Strukturen von Myoglobin (Kendrew *et al.*, 1958), Hämoglobin (Perutz *et al.*, 1960) und Lysozym (Blake *et al.*, 1962) durch Inkorporation von Hg-, Au-, Ag-, Pd- und I-Verbindungen in das Kristallgitter.

Problematisch ist jedoch die Herstellung isomorpher Kristalle. Nur wenn die Zellparameter weniger als etwa 1% voneinander abweichen, wird die Differenz der Reflexintensitäten eines nativen Kristalls I_P und eines Derivatkristalls I_{PS} durch den Einfluss der gebundenen Schweratome verursacht und kann zur Lokalisation der Schweratomsstruktur herangezogen werden. Aus Gleichung 1.5 erkennt man die Beziehung zwischen der Position eines Atoms und der Phase. Da die Substruktur bekannt ist, kann daraus ein Teil der Phaseninformation abgeleitet und zur Rekonstruktion der Elektronendichte verwendet werden.

Mit der Verwendung nur eines Derivatkristalls ergibt sich allerdings eine Phasenzweideutigkeit (siehe Abbildung 1.4b), die durch Einsatz weiterer isomorpher Schweratomderivate geklärt werden kann (siehe dazu die rot gestrichelte Linie in den Abbildungen 1.4a und 1.4b). Man spricht dann von multiplem isomorphen Ersatz (MIR). Des Weiteren kann die Zweideutigkeit auch durch Kopplung mit anderen Methoden, wie z. B. anomale Dispersion als SIRAS (*single isomorphous replacement and anomalous scattering*) oder durch Einsatz von molekularem Ersatz, aufgelöst werden kann.

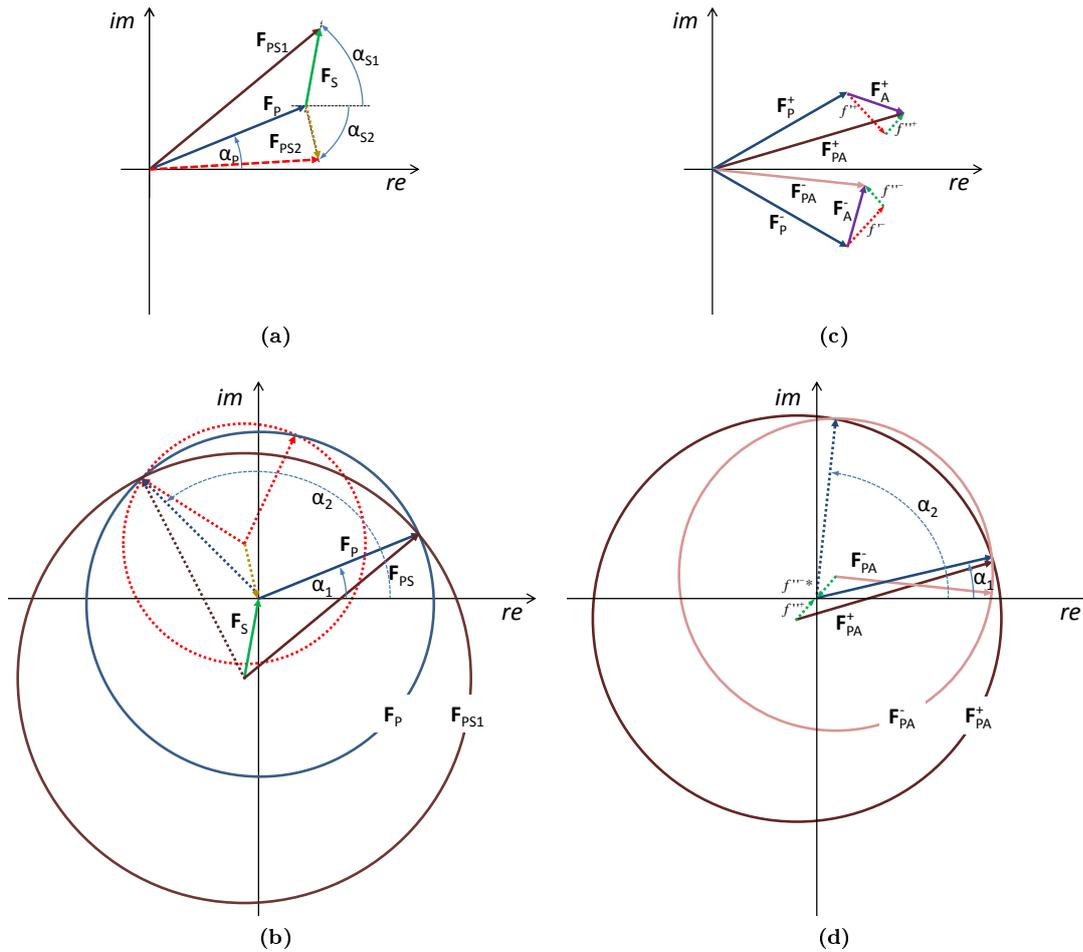


Abb. 1.4.: Phasierung mittels isomorphen Ersatzes und anomaler Dispersion. Harkerdiagramme im Fall von (a) isomorphen Ersatz und (b) anomaler Dispersion. (a) Bindung eines Schweratoms (S1) an ein Protein im Kristallgitter führt zur Phasenverschiebung α_{S1} eines Reflexes h, k, l und verursacht eine Änderung des Strukturfaktors \mathbf{F}_P (natives Protein) zu \mathbf{F}_{PS1} (mit S1 derivatisiertes Protein). Ein an unterschiedlicher Stelle lokalisiertes anderes Schweratom S2 führt zur Verschiebung α_{S2} . Daraus resultiert ein unterschiedlicher Strukturfaktor \mathbf{F}_{PS2} . (b) Phasierung mittels isomorphen Ersatz. Sind die Positionen der Schweratome S1 bekannt, lässt sich deren Streubeitrag \mathbf{F}_S berechnen. Aus den Strukturfaktoren \mathbf{F}_P des nativen Proteins und \mathbf{F}_{PS1} eines Schweratomderivats können zwei Winkel α_1 und α_2 auf die dargestellte Art erhalten werden. Es kann nicht entschieden werden, welcher Winkel eine korrekte Lösung darstellt. Erst ein zweites Derivat \mathbf{F}_{PS2} kann diese Phasenzweideutigkeit auflösen und erlaubt die Ermittlung des richtigen Phasenwinkels (hier α_2). (c) Inelastische Streuung führt zur Phasenverschiebung eines Reflexes h, k, l und seines Bijvoet-Partners $\bar{h}, \bar{k}, \bar{l}$. Aufgrund des imaginären Anteils if'' zum Streubeitrag \mathbf{F}_{PA} unterscheiden sich die resultierenden Strukturfaktoren \mathbf{F}_{PA}^+ und \mathbf{F}_{PA}^- voneinander. (d) Phasierung mittels anomaler Dispersion. Voraussetzung ist die Kenntnis der Substruktur der anomalen Streuer und der somit ermittelten Streubeiträge \mathbf{F}_A^+ und \mathbf{F}_A^- . Aus der graphischen Konstruktion ergeben sich ebenfalls zwei Phasenwinkel α_1 und α_2 . Welcher Wert die korrekte Lösung bedeutet, kann auch hier nicht gesagt werden.

1. Einleitung

Anomale Dispersion

In einem „normalen“ Diffraktionsexperiment kommt es zu einer gleichmäßigen Phasenverschiebung durch alle im Kristall enthaltenen Atome. Die Reflexe des Beugungsbildes gehorchen der Friedels-Regel. Diese besagt, dass die Intensität $I_{h,k,l}$ des Reflexes mit den Indizes h, k, l und die Intensität $I_{\bar{h},\bar{k},\bar{l}}$ des symmetrieverwandten Reflexes $-h, -k, -l$ gleich sind. Wird die Wellenlänge des Röntgenlichtes allerdings so gewählt, dass diese sich der Absorptionskante eines in Kristall enthaltenen Elements nähert, kann nicht mehr der idealisierte Fall der gleichen Phasenänderung angenommen werden. Aufgrund von resonanten Effekten der Photonen mit der Elektronenhülle kommt es zur anomalen Diffraction. Diese sorgt für eine Änderung im atomaren Streufaktor f um einen wellenlängenabhängigen reellen Beitrag f' und einen, ebenfalls wellenlängenabhängigen, imaginären Beitrag if'' .

$$f = f_0 + f'(\lambda) + if''(\lambda) \quad (1.6)$$

Daraus folgt, dass die Regel von Friedel für den anomalen Streuer nicht gilt ($I_{h,k,l} \neq I_{\bar{h},\bar{k},\bar{l}}$). In der Abbildung 1.4c werden die Konsequenzen auf die Intensitäten der Reflexe $I_{h,k,l}$ und $I_{\bar{h},\bar{k},\bar{l}}$ dargestellt. Aus den Differenzen kann, ähnlich der Phasierung durch isomorphen Ersatz, ein Satz aus zwei unterschiedlichen Phasenwerten gewonnen werden (siehe Abbildung 1.4d). Im Gegensatz zum isomorphen Ersatz kann hier Dichtemodifikation zur Unterscheidung von richtiger und falscher Phase benutzt werden. Im ersteren Fall sollte die Methode zur Verbesserung der Elektronendichtekarte führen, im zweiten Fall wird die Dichte komplett aus Rauschen bestehen. Gütekriterien hierfür sind beispielsweise der Korrelationskoeffizient CC oder die Kartenasymmetrie (*skew*), eine statistische Größe, die die Abweichung der Elektronendichteverteilung von einer Gauss-Verteilung darstellt. Zur Klärung der Zweideutigkeit kann sich eine weitere Eigenschaft der anomalen Streuung zunutze gemacht werden. Die Faktoren f' und f'' haben bei unterschiedlichen Wellenlängen Extremstellen. Durch Wahl der Wellenlänge können die Unterschiede im anomalen Signal zur Ermittlung der korrekten Phase herangezogen werden. Ein gravierender Nachteil dieser Methode ist das geringe anomale Signal, das im Normalfall nur wenige Prozent des absoluten Signals ausmacht.

Molekularer Ersatz

Wie Gleichung 1.5 zur Berechnung der Elektronendichte an einem Punkt x, y, z verwendet wird, ist es ebenfalls möglich diese zur Ermittlung der Phasenwerte eines Reflexes h, k, l mit bekannter dreidimensionaler Struktur (d. h. der Verteilung der Elektronen) heranzuziehen. Ist eine Struktur eines Proteins homologer Sequenz bekannt, kann diese Struktur zur Ermittlung erster Phaseninformationen herangezogen werden. Dies erfordert die Ausrichtung des Suchmodells in der Einheitszelle des Kristalls. Diese Methode wird molekularer Ersatz genannt und geht auf die Arbeiten von Rossmann und Blow im Jahre 1962 zurück (Rossmann und Blow, 1962).

Platzierung des Suchmodells in der Elementarzelle erfolgt üblicherweise in zwei Schritten. Zuerst wird die rotatorische Orientierung des Suchmodells bezüglich des gesuchten Moleküls in der Elementarzelle ermittelt, danach folgt die Überlagerung beider durch Translation.

Die Ermittlung der korrekten Rotation wird mit Hilfe einer Selbst-Pattersonkarte durchgeführt. Benötigt werden hierzu die intramolekularen Vektorbeziehungen. Diese sind für jedes Molekül einzigartig, ähneln sich aber bei homologen Proteinen. Die korrekte Ausrichtung wird durch eine Überlagerung der Pattersonfunktionen des gesuchten Moleküls und des Suchmodells ausgedrückt.

$$Rot(\alpha, \beta, \gamma) = \int_U P(\mathbf{u}) \cdot P_r(\mathbf{u}_r) d\mathbf{u} \quad (1.7)$$

Dabei ist U das Volumen des Pattersonraums, $P(\mathbf{u})$ und $P_r(\mathbf{u}_r)$ sind die Selbst-Pattersonfunktionen abgeleitet aus den Diffraktionsdaten bzw. dem Suchmodell. Für den Fall der korrekten Orientierung mit den Winkeln α, β, γ beschreibt die Funktion Rot ein Maximum. Heutzutage wird hauptsächlich die *fast rotation function* verwendet (Crowther, 1972).

1. Einleitung

Nach der rotatorischen Ausrichtung wird das Molekül im realen Raum so verschoben, dass die Übereinstimmung der berechneten Strukturfaktoramplituden F_{calc} mit den beobachteten Werten F_{obs} maximal wird. Hierzu kommen entweder eine R -Funktion oder der allgemeine lineare Korrelationskoeffizient C zum Einsatz.

$$R = \frac{\sum_{hkl} ||F_{obs}| - k |F_{calc}||}{\sum_{hkl} |F_{obs}|} \quad (1.8)$$

$$C = \frac{\sum_{hkl} \left(|F_{obs}|^2 - \overline{|F_{obs}|^2} \right) \cdot \left(|F_{calc}|^2 - \overline{|F_{calc}|^2} \right)}{\left[\sum_{hkl} \left(|F_{obs}|^2 - \overline{|F_{obs}|^2} \right)^2 \sum_{hkl} \left(|F_{calc}|^2 - \overline{|F_{calc}|^2} \right)^2 \right]^{1/2}} \quad (1.9)$$

Sind mehr als ein Molekül in der asymmetrischen Einheit, so ergibt die Suche nach einer geeigneten Rotationsmatrix mehrere Lösungen. Zu jeder Lösung muss eine Translationsfunktion berechnet werden.

Direkte Methoden

Da Strukturfaktoren nicht unabhängig voneinander, sondern durch die Struktur miteinander verbunden sind, existieren zwischen manchen Reflexen mathematische Zusammenhänge. Ausgenutzt wird dies beispielsweise durch die *Shake-and-Bake*-Prozedur (DeTitta *et al.*, 1994; Weeks *et al.*, 1994; Hauptman, 1997a; Hauptman, 1997b). Obwohl die Voraussetzungen für eine erfolgreiche *ab initio*-Phasierung relativ strikt sind, so sollte die Auflösung der Daten besser als 1,2 Å und die Anzahl der Nicht-Wasserstoffatome auf etwa 1000 begrenzt sein, konnten beispielsweise die Strukturen des Er-1 Pheromons (Anderson *et al.*, 1996) und Vancomycin (Loll *et al.*, 1997) geklärt werden. Mit steigender Anzahl an zu suchenden Atomen werden allerdings die Anforderungen an die Rechnerkapazität überproportional größer. In einem interessanten und zeitgenössischen Ansatz versuchen die Autoren von Jorda *et al.* (2014) den Spieltrieb der

hoch-computerisierten Gesellschaft zu Nutze zu machen und die Phasierung von Makromolekülen zu „*crowdsourcen*“.

Teil II.

Strukturelle Untersuchungen zur
Funktion
der Acetyl-CoA-Synthetase 1
aus *Candidatus Korarchaeum
cryptofilum*

2. Ergebnisse

2.1. Expression und Proteinreinigung

Die Herstellung der *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* Acetyl-CoA Synthetase Isoform 1 (*ckcACD1*) erfolgte durch heterologe Expression der einzelnen Untereinheiten in Bakterien der Art *Escherichia coli* im Stamm BL21 (DE3) CodonPlus RIL. Hierzu wurden die α - und β -Untereinheiten jeweils separat produziert und das aktive Enzym durch einfaches Vermischen der Untereinheiten rekonstituiert.

Erste Kristallisationsexperimente wurden mit gereinigter *ckcACD1* der Arbeitsgruppe Prof. Schönheit durchgeführt (Schmidt, 2013). Die Untersuchung der Proteinprobe mittels dynamischer Lichtstreuung zeigte jedoch eine zusätzliche Proteinspezies geringerer Größe. Im dazugehörigen SDS-Gel war dahingegen keine Verunreinigung in dieser Größenordnung sichtbar. Es war daher anzunehmen, dass es sich hierbei um freie β -Untereinheit handelte. Da die Probenhomogenität bei der Kristallisation eine kritische Größe darstellt und über Erfolg und Misserfolg entscheiden kann, wurde das von der AG Schönheit übernommene Protokoll zur Rekonstitution und Reinigung der *ckcACD1* angepasst. Jedoch wurden nur wenige Änderungen vorgenommen und die in Kapitel 7.3 gezeigte Reinigungsprozedur ist somit kein wesentlicher Bestandteil der Leistungen dieser Doktorarbeit.

Bei der Durchführung der Reinigung der *ckcACD1* wurde nach Hitzefällung eine übermäßig starke Absorption zwischen 230 nm und 280 nm und eine unerwartet hohe Viskosität der Proteinlösung festgestellt. Beides konnte auch durch Dialyse (MWCO 14 kDa) nicht entfernt werden. Eine Bestimmung der Proteinkonzentration durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm war deswegen nicht möglich. Die rela-

2. Ergebnisse

tive Proteinmenge der Hitzeextrakte wurde daher über SDS-PAGE bestimmt. Zum Zweck der Rekonstitution des *ckcACD1*-Heterotetramers wurden die Lösungen der α - und β -Untereinheit so vermischt, dass ein Überschuß der β -Untereinheit vorlag. Es sollte zudem das Protein vor Reinigung über Gelfiltration konzentriert werden. Jedoch wurde dieser Schritt durch die Viskosität der Lösung massiv erschwert. Die anschließend durchgeführte Größenausschlußchromatographie zeigte ebenfalls eine ungewöhnlich starke Absorption im Elutionsprofil. Bereits mit dem Ausschlußvolumen wurde eine starke Absorption bei den untersuchten Wellenlängen 260 nm und 280 nm detektiert, die während des gesamten Lauf erhalten blieb. Die proteinhaltigen Fraktionen mussten mittels SDS-PAGE ermittelt werden. Reines Protein wurde durch mehrfache Wiederholung der Trennung über Gelfiltration erhalten. Die Verunreinigung konnten so schrittweise aus der Lösung entfernt werden.

Mit der Annahme, dass insbesondere längerkettige Oligonukleotide zur Hintergrundabsorption und Viskosität beitrugen, wurde bei der nächsten Reinigung des Proteins versucht, die DNS-Fragmente durch DNase zu verdauen. Auf diesem Weg sollte die Viskosität der Lösung und die Anzahl der Trennungsschritte über Größenausschluß verringert werden. Der Verdau erfolgte bei 6 °C über Nacht. Es zeigte sich jedoch, dass die Konzentrierung der Probe trotzdem ähnlich zeitaufwendig war. Ein anderes Bild bot jedoch die Gelfiltration. Der Verdau resultierte augenscheinlich in einer Verkleinerung der mittleren Kettenlänge der Oligonukleotide, da diese erst ab einem späteren Zeitpunkt von der Säule eluierten. Zur kompletten Entfernung der DNS aus der Proteinlösung mussten ebenfalls mehrere Schritte der Größenausschlußchromatographie durchgeführt werden. Jedoch wurde eine geringere Anzahl an Reinigungsschritten benötigt.

Aus jeweils einem Liter LB-Medium wurden so etwa 13 mg an reinem Protein erhalten. Diese Angabe bezieht sich auf das rekonstituierte $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer. Hierzu wurden die theoretischen Extinktionskoeffizienten für die Wellenlänge $\lambda=280$ nm ($\epsilon_{280\text{ nm}}$) der beiden Untereinheiten berechnet. Diese betragen für die α -Untereinheit $41\,830\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, für die β -Untereinheiten $7\,450\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Für die photometrische Ermittlung der Konzentration der *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* ACD1 in Lösung wurden beide Werte addiert. Zur Verwendung in den nachfolgenden Kristallisationsversuchen wurde eine Lösung gereinigter *ckcACD1* der Konzentration von 12,8 mg/ml verwendet.

2.2. Expression Selenomethionin-markierten Proteins

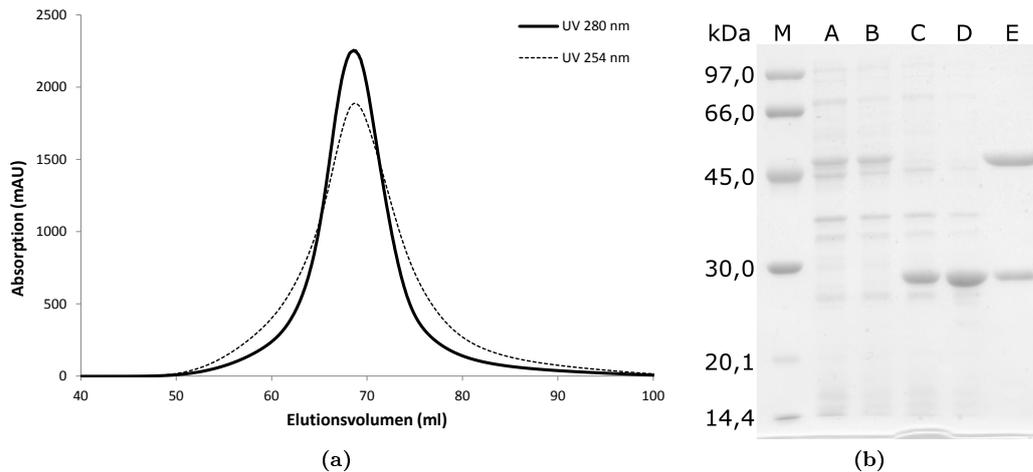


Abb. 2.1.: Finaler Reinigungsschritt der *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* ACD1 über Gelfiltration. (a) Elutionsprofil des letzten Schritts der Reinigungsprozedur der *ckcACD1*. (b) Überblick des Reinigungsfortschritts der *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* Acetyl-Coenzym A-Synthetase 1. Für eine SDS-PAGE-Analyse wurden folgende Proben aufgetragen: A Zellen vor Induktion (α -Untereinheit), B Zellen bei Ernte (α -Untereinheit), C Zellen vor Induktion (β -Untereinheit), D Zellen bei Ernte (β -Untereinheit), E Gereinigter *ckcACD1*-Komplex. Während der denaturierenden Elektrophorese werden die Untereinheiten voneinander getrennt. Der *ckcACD1*-Komplex erscheint deshalb als Doppelbande der α - und β -Untereinheiten mit einer Masse von 49,3 kDa bzw. 25,6 kDa.

2.2. Expression Selenomethionin-markierten Proteins

Sollte Selenomethionin-markierte Acetyl-Coenzym A-Synthetase 1 hergestellt werden, erfolgte die Expression in Minimalmedium unter Zugabe von 25 mM Selenomethionin. Obwohl das proteinogene Methionin (S-Met) und das mit Selen markierte Methionin (Se-Met) auf atomarer Ebene sehr ähnlich sind, kann die Substitution von S-Met durch Se-Met bei der Expression zu Problemen führen. Der Einbau von Se-Met in die endogenen Proteine von *E. coli* kann deren Effizienz reduzieren, was im Extremfall sogar die Überlebensfähigkeit des ganzen Organismus herabsetzt. Es kann auch vorkommen, dass das Zielprotein schlechter oder auch gar nicht in der Wirtszelle exprimiert wird, wenn aufgrund des größeren Atomradius des Selens eine fehlerhafte Faltung des Proteins stattfindet. Jedoch wurde eine deutliche Expression von sowohl S-Met- als auch der Se-Met-ACD1 erhalten (siehe Abbildung 2.2). Es wurde zur Vermeidung der Oxidation des Selens in die verwendeten Puffer 20 mM DTT zugesetzt. Die Reinigung des markierten Proteins folgte dem etabliertem Protokoll für das native Protein, wobei die erhaltenen Elutionsprofile dem nativen Protein entsprachen.

2. Ergebnisse

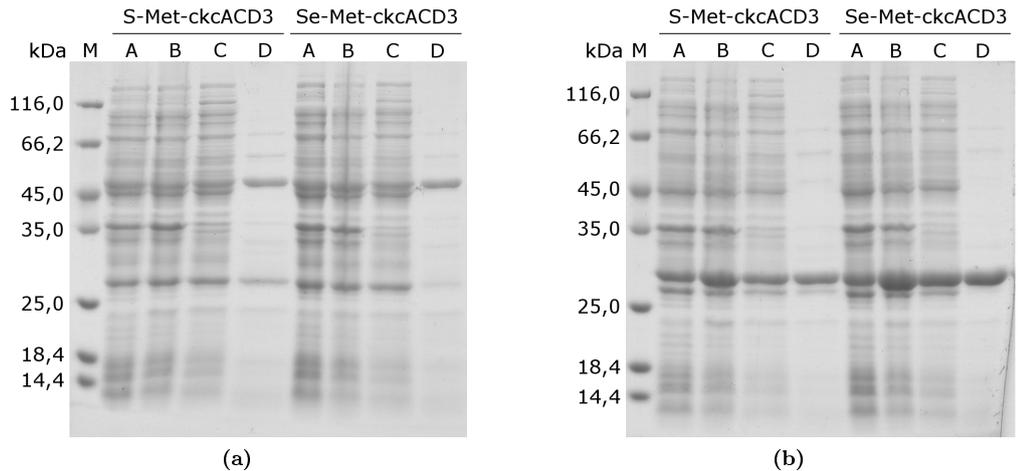


Abb. 2.2.: Bestimmung der Expressionseffizienz in Minimalmedium (a) α -Untereinheit der *ckcACD1* (molekulare Masse 49,3 kDa) (b) β -Untereinheit der *ckcACD1* (molekulare Masse 25,6 kDa). Auf eine SDS-PAGE wurden die folgenden Proben aufgetragen: A Zellen vor Induktion, B Zellen bei Ernte, C Rohzelleextrakt, D Rohzelleextrakt nach Hitzefällung.

Tab. 2.1.: Optimierte initiale Kristallisationsbedingung der *ckcACD1*.

Kristallform	Puffer & pH-Bereich	Fällungsmittel
I ^a	Acetat-Puffer pH 4,0–5,0	17–20 % (w/v) PEG 10 000
I ^a	Citrat-Puffer pH 4,4	7 % (w/v) PEG 6 000
II ^a	Tris/HCl pH 8,3–8,7	14–22 % (w/v) PEG 6 000
II ^b	Tris/HCl pH 8,3–8,7	14–16 % (w/v) PEG 6 000

Die Kristallisationstemperatur betrug bei (a) 18 °C, im Fall von (b) 6 °C.

2.3. Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse

Im Rahmen der Hochdurchsatzkristallisation HT-X (EMBL, Hamburg) der Protein Production Platform (P-Cube) wurden 384 Kristallisationsbedingungen getestet. Es wurden bereits in den ersten Kristallisationsansätzen zwei verschiedene Kristallformen erhalten. Die erste zeigte ein quadratisch-bipyramidales Aussehen. Die zweite Kristallform wies einen nadeligen Habitus auf. Diese nadelige Form wurde in sehr vielen Bedingungen beobachtet. Oftmals waren die Kristalle dendritisch verwachsen. Die Bedingungen wurden hinsichtlich des pH-Wertes sowie des verwendeten Fällungsmittels optimiert. Hierbei wurden die Form, die Größe und der Grad der Verwachsung als Kriterium herangezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

2.3.1. Kristallform I

Kristalle der Kristallform I erschienen über Nacht und waren nach zwei Tagen ausgewachsen. Da nicht abzuschätzen war, wie sich das Tränken der Kristalle in Gefrierschutzlösung auf diese auswirkt, wurden einige Kristalle direkt in flüssigem Stickstoff gefroren, andere in Gefrierschutzlösung getaucht und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Die Kristalle der Kristallform I wurden an BL14.1 (BESSY II, Berlin) röntgenographisch untersucht. Die inneren Reflexe hatten eine hohe Intensität, jedoch brach das Signal bereits bei niedriger Auflösung abrupt ab. Unabhängig von der Behandlung mit Gefrierschutz oder ihrer Größe streuten die Kristalle bis etwa 20 Å. Ursache dafür ist vermutlich eine fehlerhafte Fernordnung innerhalb der Kristalle. Das Aussehen der Kristalle könnte allerdings auch ein Hinweis auf Verzwilligung des Kristalls sein (Abbildung 2.3a). Es wurde versucht die Kristallpackung durch Zusatz von verschiedenen Additiven zu verbessern. Die so erhaltenen Kristalle streuten aber ebenfalls nicht. Es wurde daher mit dieser Kristallform nicht weitergearbeitet. Kurz vor Abschluß der Arbeit wurden in einem Tropfen eines ein Jahr alten Kristallisationsansatzes zwei Kristalle entdeckt, wovon einer zur Messung an der Heimanlage verwendet werden konnte. Dieser Kristall (Abb. 2.3d) streute Röntgenlicht bis zu einer Auflösung von etwa 8 Å. Die dazugehörige, kubische Raumgruppe wurde als P23 mit den Zellkonstanten $a = b = c = 229,8 \text{ Å}$ bestimmt. Mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 80 % entspricht dies drei *ckc*ACD1-Heterotetrameren (Masse ca. 150 kDa) pro Einheitszelle. Der Wassergehalt beträgt in diesen Fall etwa 45 % mit einem Matthews-Parameter von $2,25 \text{ Å}^3/\text{Da}$ (Matthews, 1968).

2.3.2. Kristallform II

Erste Kristallisationsansätze wurden bei Raumtemperatur (18 °C) durchgeführt. Bereits Minuten nach Zusammenpipettieren von Protein- und Fällungsmittellösung konnten Kristalle der Kristallform II beobachtet werden. Nach etwa einem Tag waren die Kristalle ausgewachsen. Die initiale Bedingung befand sich allerdings in einem Bereich des Phasendiagramms in dem sich sofort viele Kristallisationskeime bildeten und so war die Anzahl an kleinen Kristallen sehr hoch. Einzelne, größere Kristalle konnten durch Ansetzen länglicher Tropfen erhalten werden. Hierzu wurde ein hantelförmiger Tropfen aus der Proteinlösung auf das Deckgläschen pipettiert. In ein Ende der Han-

2. Ergebnisse

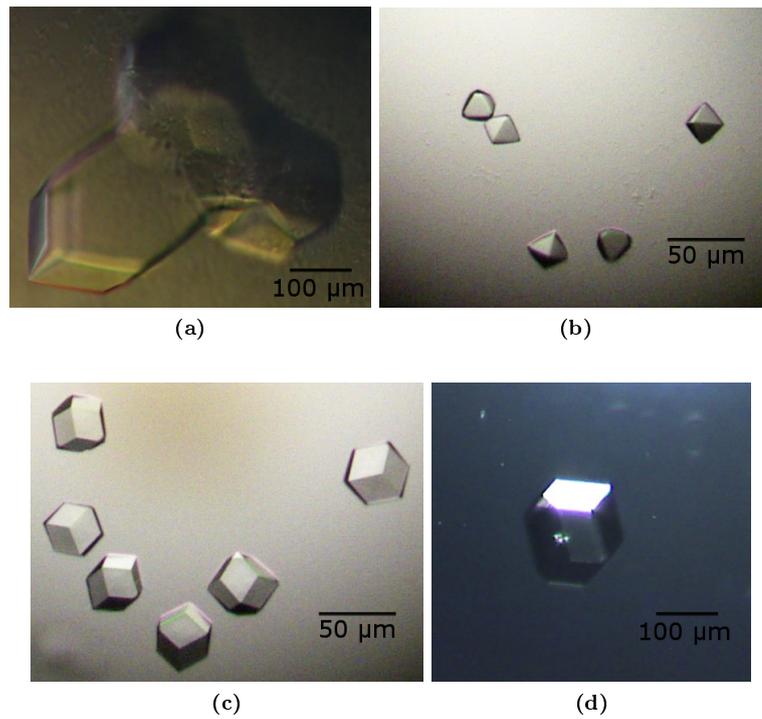


Abb. 2.3.: Kristalle der Kristallform I. Der verwachsene Kristall (a) entstand in 100 mM AcOH/NaOH (pH 4,8) und 17 % PEG 10 000. Dargestellt unter (b) und (d) sind Kristalle, die aus 100 mM Citrat/NaOH (pH 4,4), 7 % PEG 6 000 und (a) 10 mM CoCl_2 bzw. (b) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kristallisierten. Die Lösung in (d) enthielt zusätzlich 30 % EtOH. Der Kristall erschien allerdings nach einer Kristallisationszeit von einem Jahr. Es ist daher anzunehmen, dass das Ethanol bereits aus der Lösung verdunstet ist.

tel wurde das Fällungsmittel gegeben, wobei ein Verhältnis Protein zu Fällungsmittel von 1,75-2:1 eingehalten wurde. So wurde ein Konzentrationsgradient erzeugt, der zu einer langsamen Erhöhung der Fällungsmittelkonzentration und so zu einer geringeren Keimzahl führte. Bei der Kristallisation bei 6 °C wurden zusätzlich runde Kristallisationstropfen angesetzt. Einkristalle wurden teilweise entweder in den normalen oder den länglichen Tropfen erhalten. Nach zwei Tagen waren die Kristalle ausgewachsen.

2.3.3. Röntgenstrukturanalyse

2.3.4. Einbringen von Schweratomen

In dieser Arbeit wurden Versuche zur Phasierung der *ckcACD1* über isomorphen Schweratomersatz durchgeführt. Hierbei kamen zwei unterschiedliche Methoden zum Einsatz.

Bei der ersten Methode wurde das Protein intrinsisch markiert. Dies geschah durch Expression des Zielproteins in Medium angereichert mit Selenomethionin. Die Produktion von endogenem S-Methionin wird dadurch unterdrückt und Se-Met an dessen Stelle in das Protein eingebaut. Kristalle der Kristallform II aus modifizierter *ckcACD1* wuchsen unter Bedingungen ähnlich dem nativen Protein. Allerdings waren die Kristalle meist etwas kleiner und zum Teil stärker verwachsen (Abbildung 2.4b).

Bei der zweiten Methode wurde versucht, Schweratomionen (Sm, Yb, Hg, Au, Br, I) durch Tränkungsexperimente in die vorhandene Kristallstruktur zu inkorporieren (siehe Kapitel 7.4). Diese Kristalle zeigten jedoch nur geringes Streuvermögen. Um zu überprüfen, ob die verwendeten Schwermetalle Sm, Hg bzw. Au im Proteinkristall gebunden waren, wurden Röntgenfluoreszenzmessungen an der Beamline BL14.1 am Berliner Synchrotron BESSY II für diese Elemente durchgeführt. Es zeigte sich ausschließlich im mit HgCl_2 getränkten Kristall ein schwaches Fluoreszenzsignal (siehe Abbildung 2.5). Um zu vermeiden, dass die verwendeten Kristalle durch das Tränken beschädigt werden, wurde direkt zum Kristallisationstropfen HgCl_2 zugesetzt (Co-Kristallisation). Kristallwachstum und -habitus waren mit dem nicht-derivatisierten Protein vergleichbar (siehe Abbildung 2.4c).

2. Ergebnisse

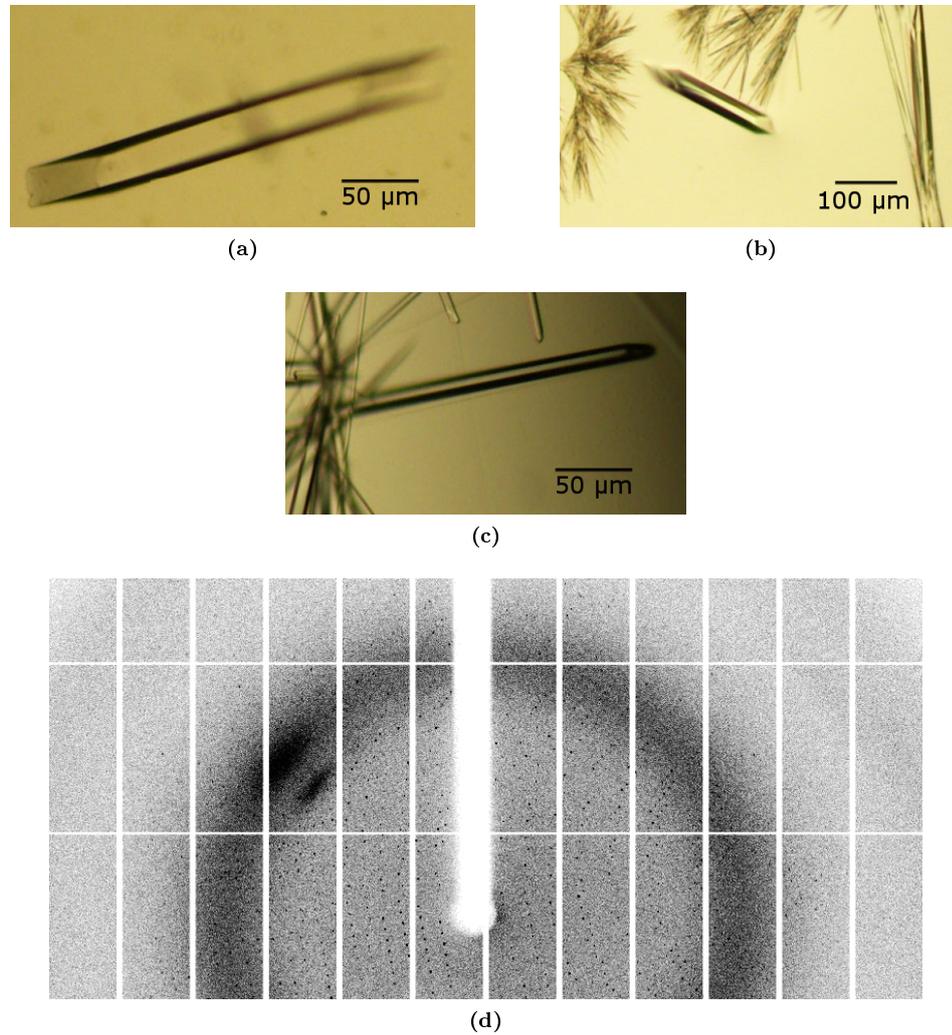


Abb. 2.4.: Kristalle der Kristallform II. (a) Kristall gewachsen aus 100 mM Tris/HCl pH 8,3 und 16 % (v/v) PEG 6 000. (b) Se-Methionin markierter *ckcACD1*-Kristall, gewachsen aus 100 mM Tris/HCl pH 8,3, 10 mM CaCl_2 , 22 % (v/v) PEG 6 000. (c) Ein Kristall entstanden bei der Co-Kristallisation mit Quecksilber. Die Bedingung enthielt 100 mM Tris/HCl pH 8,3, 30 mM CaCl_2 , 14 % (v/v) PEG 6 000 und 2 mM HgCl_2 . (d) Diffraktionsbild eines *ckcACD1*-Kristalls. Zur besseren Darstellung wurde der Kontrast des Bildes angepasst. Die obere Kante entspricht einer Auflösung von etwa 2,7 Å.

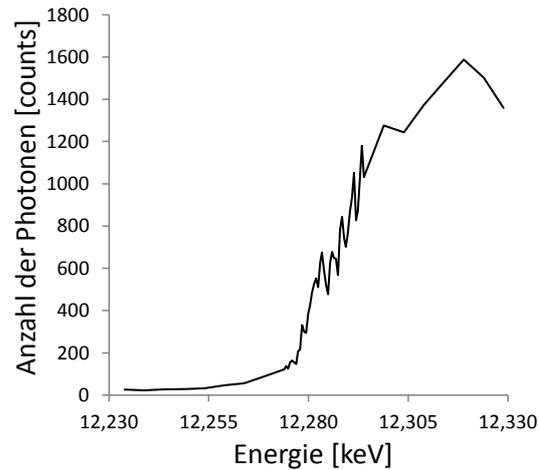


Abb. 2.5.: Röntgenfluoreszenzsignal des Quecksilbers im Kristall. Ein Kristall wurde für 5 Minuten mit HgCl_2 -haltiger Lösung inkubiert. Nicht gebundenes Quecksilber wurde durch 30 sekündiges Waschen in Gefrierschutzlösung entfernt. Durch die Prozedur des Tränkens wurde der Kristall jedoch so geschädigt, dass davon kein Datensatz aufgenommen werden konnte.

2.3.5. Auswertung der Daten

Es folgte die Auswertung der Daten der Kristallform II mit dem Programm XDS (Kabsch, 2010). Bei der Integration wurde automatisch die orthorhombische Punktgruppe 222 mit den ungefähren Zellparametern $a = 100 \text{ \AA}$, $b = 112 \text{ \AA}$, $c = 128 \text{ \AA}$ herangezogen. Die Daten wurden mit POINTLESS (CCP4, 1994; Winn *et al.*, 2011) bezüglich potentieller Schraubenachsen untersucht und die Raumgruppe auf $P2_12_12_1$ festgelegt. Die Daten wurden mit diesen Parametern neu prozessiert. Alle untersuchten Kristalle der Kristallform II gehörten zur Raumgruppe $P2_12_12_1$ und hatten ähnliche Zellparameter. Die dazugehörigen Kristallparameter und Datenstatistiken sind in den Tabellen 2.2, 2.3 und 2.4 angegeben.

Tab. 2.2.: Statistiken der Prozessierung der Diffraktionsdaten verschiedener Kristalle der *ckcACD1* (Teil 1).

Name	<i>ckcACD1-A</i>	<i>ckcACD1-B</i>	<i>ckcACD1-C</i>
Kristallisation			
	Tiis/HCl, pH 8,3 PEG 6000 CaCl ₂	Tiis/HCl, pH 8,3 PEG 6000 CaCl ₂	Tiis/HCl, pH 8,3 PEG 6000 MgCl ₂
	100 mM 16% (w/v) 10,0 mM	100 mM 14% (w/v) 30,0 mM	100 mM 18% (w/v) 30 mM
Kristallparameter			
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zelldimensionen (Å)	a=102,5, b=112,2, c=124,9	a=99,6, b=114,4, c=127,0	a=100,2, b=111,9, c=127,6
Prozessierungsparameter			
Auflösungsgrenze (Å) ¹	83,46 - 1,95 (1,98 - 1,95)	127,04 - 1,90 (1,93 - 1,90)	48,84 - 2,40 (2,47 - 2,40)
Vollständigkeit (%) ¹	99,8 (99,7)	97,8 (58,1)	99,9 (98,8)
Zahl der einzigartigen Reflexe ¹	105 037 (5 118)	112 092 (3 230)	56 770 (4 557)
Durchschnittliche Redundanz ¹	6,5 (6,6)	6,3 (2,7)	12,5 (12,5)
I/σ(I) ¹	6,7 (0,6)	8,1 (0,3)	9,9 (0,8)
R _{meas} (%) ^{1, 2}	26,8 (344,9)	19,7 (529,6)	28,1 (331,8)
R _{pim} (%) ^{1, 3}	10,4 (132,7)	7,8 (301,8)	7,9 (92,6)
CC _{1/2} ¹	0,992 (0,169)	0,996 (0,103)	0,995 (0,229)
Anomale Vollständigkeit (%) ¹	-	95,9 (40,4)	99,8 (98,1)
Anomale Redundanz ¹	-	3,2 (1,6)	6,5 (6,4)
<i>RCR</i> _{anom}	-	1,049	1,183
CC _{anom}	-	0,049	0,167
<i>B</i> -Faktor, nach Wilson-Plot (Å ²) ⁴	25,5	24,9	40,2

¹ Werte in Klammern: äußerste Auflösungsstufe.

² Redundanz-unabhängiger *R*-Faktor. $R_{meas} = \sum_{hkl} \left[\frac{N}{N-1} \right]^{\frac{1}{2}} \frac{\sum_{i=1}^N |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{i=1}^N I_i(hkl)}$, mit $I_i(hkl)$ als die Intensität der *i*-ten Messung der Reflexe mit den Miller'schen Indizes *h*, *k*, *l* und $\langle I_i(hkl) \rangle$ als der mittleren Intensität aller Messungen von $I(hkl)$. *N* gibt die Redundanz der gemessenen Reflexionen an (Diederichs und Karpplus, 1997b; Diederichs und Karpplus, 1997a; Weiss, 2001).

³ Präzisions-anzeiger der *R*-Faktor. $R_{pim} = \sum_{hkl} \left[\frac{N-1}{N} \right]^{\frac{1}{2}} \frac{\sum_{i=1}^N |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{i=1}^N I_i(hkl)}$, mit $I_i(hkl)$ als die Intensität der *i*-ten Messung der Reflexe mit den Miller'schen Indizes *h*, *k*, *l* und $\langle I_i(hkl) \rangle$ als der mittleren Intensität aller Messungen von $I(hkl)$. *N* gibt die Redundanz der gemessenen Reflexionen an (Diederichs und Karpplus, 1997b; Diederichs und Karpplus, 1997a; Weiss, 2001).

⁴ Berechnet nach (Popov und Bourenkov, 2003).

Tab. 2.3.: Statistiken der Prozessierung der Diffractionsdaten verschiedener Kristalle der *ckcACD1* (Teil 2).

Name	<i>ckcACD1-D</i>	<i>ckcACD1-E</i>	<i>ckcACD1-F</i>
Kristallisation			
	Tris/HCl, pH 8,3 PEG 6000	Tris/HCl, pH 8,3 PEG 6000 Na ₂ HPO ₄ NaOAc	Tris/HCl, pH 8,5 PEG 6000 MgCl ₂
	100mM 16 % (w/v)	100mM 14 % (w/v) 10,0mM 5,0mM	100mM 14 % (w/v) 6,3mM
Kristallparameter			
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zelldimensionen (Å)	a=106,5, b=111,0, c=126,7	a=106,4, b=111,7, c=126,0	a=105,8, b=111,2, c=125,8
Prozessierungsparameter			
Auflösungsgrenze (Å) ¹	49,21 - 2,10 (2,14 - 2,10)	83,57 - 2,46 (2,53 - 2,46)	125,81 - 2,20 (2,25 - 2,20)
Vollständigkeit (%) ¹	97,6 (77,9)	98,1 (77,3)	97,3 (57,0)
Zahl der einzigartigen Reflexe ¹	86108 (3595)	54078 (3442)	73935 (2617)
Durchschnittliche Redundanz ¹	6,4 (4,4)	10,9 (6,8)	7,7 (3,1)
$I/\sigma(I)$ ¹	10,1 (1,1)	9,7 (0,6)	6,4 (0,4)
R_{meas} (%) ^{1, 2}	18,2 (140,2)	23,3 (367,9)	25,6 (251,8)
R_{pim} (%) ^{1, 3}	7,1 (63,3)	6,9 (129,8)	9,1 (123,2)
$CC_{1/2}$ ¹	0,995 (0,422)	0,996 (0,231)	0,990 (0,105)
Anomale Vollständigkeit (%) ¹	-	-	-
Anomale Redundanz ¹	-	-	-
RCR_{anom}	-	-	-
CC_{anom}	-	-	-
B -Faktor, nach Wilson-Plot (Å ²) ⁴	20,4	45,3	30,8

¹ Werte in Klammern: äußerste Auflösungsschale.² Redundanz-unabhängiger R -Faktor. $R_{\text{meas}} = \sum_{hkl} \frac{I_i(hkl) - \langle I_i(hkl) \rangle}{\sum_{hkl} I_i(hkl)}$, mit $I_i(hkl)$ als die Intensität der i -ten Messung der Reflexe mit den Miller'schen Indizes h, k, l und $\langle I_i(hkl) \rangle >$ als der mittleren Intensität aller Messungen von $I(hkl)$. N gibt die Redundanz der gemessenen Reflexionen an (Diederichs und Karplus, 1997b; Diederichs und Karplus, 1997a; Weiss, 2001).³ Präzisions-anzeigender R -Faktor. $R_{\text{pim}} = \sum_{hkl} \frac{I_i(hkl) - \langle I_i(hkl) \rangle}{\sum_{hkl} I_i(hkl)}$, mit $I_i(hkl)$ als die Intensität der i -ten Messung der Reflexe mit den Miller'schen Indizes h, k, l und $\langle I_i(hkl) \rangle >$ als der mittleren Intensität aller Messungen von $I(hkl)$. N gibt die Redundanz der gemessenen Reflexionen an (Diederichs und Karplus, 1997b; Diederichs und Karplus, 1997a; Weiss, 2001).⁴ Berechnet nach (Popov und Bourenkov, 2003).

Tab. 2.4.: Statistiken der Prozessierung der Diffraktionsdaten verschiedener Kristalle der *ckcACD1* (Teil 3).

Name	<i>ckcACD1-G</i>	<i>ckcACD1-H</i>	<i>ckcACD1-I</i>
Kristallisation			
	Tiis/HCl, pH 8,7 PEG 6000	Tiis/HCl, pH 8,5 PEG 6000 MgCl ₂	Tiis/HCl, pH 8,3 PEG 6000 Na ₂ HPO ₄ NaOAc
	100 mM 14% (w/v)	100 mM 18% (w/v) 30,0 mM	100 mM 16% (w/v) 10,0 mM 5,0 mM
Kristallparameter			
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zelldimensionen (Å)	a=106,1, b=110,6, c=125,7	a=105,3, b=109,9, c=126,8	a=106,1, b=110,7, c=126,0
Prozessierungsparameter			
Auflösungsgrenze (Å) ¹	110,61 - 1,90 (1,93 - 1,90)	83,03 - 2,10 (2,14 - 2,10)	126,03 - 1,99 (2,03 - 1,99)
Vollständigkeit (%) ¹	100,0 (99,5)	99,5 (99,1)	99,6 (93,1)
Zahl der einzigartigen Reflexe ¹	116 787 (5 673)	85 835 (4 477)	101 504 (4 632)
Durchschnittliche Redundanz ¹	13,0 (9,8)	6,7 (6,9)	6,6 (5,9)
$I/\sigma(I)$ ¹	9,4 (0,5)	7,5 (0,8)	8,4 (0,5)
R_{meas} (%) ^{1, 2}	17,2 (485,7)	21,9 (241,4)	15,3 (354,4)
R_{pim} (%) ^{1, 3}	4,8 (151,7)	8,4 (90,9)	5,9 (140,1)
$CC_{1/2}$ ¹	0,998 (0,159)	0,993 (0,312)	0,998 (0,124)
Anomale Vollständigkeit (%) ¹	-	-	-
Anomale Redundanz ¹	-	-	-
RCR_{anom}	-	-	-
CC_{anom}	-	-	-
B -Faktor, nach Wilson-Plot (Å ²) ⁴	37,1	26,2	37,2

¹ Werte in Klammern: äußerste Auflösungsschale.

² Redundanz-unabhängiger R -Faktor. $R_{\text{meas}} = \sum_{hkl} \frac{|I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_{i=1}^N I_i(hkl)}$, mit $I_i(hkl)$ als die Intensität der i -ten Messung der Reflexe mit den Miller'schen Indizes h, k, l und $\langle I_i(hkl) \rangle >$ als der mittleren Intensität aller Messungen von $I(hkl)$. N gibt die Redundanz der gemessenen Reflexionen an (Diederichs und Karpus, 1997b; Diederichs und Karpus, 1997a; Weiss, 2001).

³ Präzisions-anzeiger R -Faktor. $R_{\text{pim}} = \sum_{hkl} \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|$, mit $I_i(hkl)$ als die Intensität der i -ten Messung der Reflexe mit den Miller'schen Indizes h, k, l und $\langle I_i(hkl) \rangle >$ als der mittleren Intensität aller Messungen von $I(hkl)$. N gibt die Redundanz der gemessenen Reflexionen an (Diederichs und Karpus, 1997b; Diederichs und Karpus, 1997a; Weiss, 2001).

⁴ Berechnet nach (Popov und Bouvenkov, 2003).

2.4. Strukturlösung und Verfeinerung

2.4.1. Ermittlung geeigneter Suchmodelle für den Molekularen Ersatz

Neben den experimentell zugänglichen Streuwerten braucht man zur Ermittlung der Struktur faktoren die dazugehörigen Phasen. Ein Ansatz der Phasenbestimmung ist die Anwendung der Methode des Molekularen Ersatzes. Die dazu benötigten homologen Strukturmodelle wurden mit dem Programm FFAS (Jaroszewski *et al.*, 2000; Rychlewski *et al.*, 2000; Jaroszewski *et al.*, 2005; Jaroszewski *et al.*, 2011) anhand der Primärsequenz beider Untereinheiten der *ckcACD1* ermittelt. Basierend auf Sequenzidentitäten von 42 % und 48 % wurden die α - und β -Untereinheiten einer möglichen ACD aus *Pyrococcus horikoshii* (PDB-Einträge 2CSU bzw. 1WR2, keine Publikation) als potentielle Suchmodelle identifiziert. Der hohe Grad an Sequenzähnlichkeit sollte ebenfalls auf große strukturelle Ähnlichkeit hindeuten.

Mit den gegebenen Zellparametern und Kristallsymmetrie sind in der asymmetrischen Einheit zwei α - und zwei β -Untereinheiten (zwei $\alpha\beta$ -Protomere) am wahrscheinlichsten. Dies entspräche einem Matthews-Koeffizienten von $2,4 \text{ \AA}^3/\text{Da}$, korrespondierend einem Lösungsmittelgehalt im Kristall von etwa 49 % (Matthews, 1968; Kantardjieff und Rupp, 2003). Eine berechnete Patterson-Selbstrotationsfunktion weist zudem auf eine zweizählige nicht-kristallographische Rotationssymmetrie hin (siehe Abbildung 2.6a). Die erwarteten zwei $\alpha\beta$ -Protomere sollten über eine Rotation um 180° ineinander überführbar sein. Nicht-kristallographische Translationssymmetrie wurde hingegen nicht beobachtet.

2.4.2. Positionierung der α -Untereinheiten

Die α -Untereinheit macht etwa $1/3$ des *ckcACD1*-Komplexes aus. Deren Streubeitrag zu den erhaltenen Diffraktionsdaten sollte dementsprechend groß sein und die korrekte Lösung sich mit gutem Kontrast von falschen Ergebnissen abheben. Es wurde daher mit der Positionierung der zu erwarteten zwei α -Untereinheiten begonnen.

2. Ergebnisse

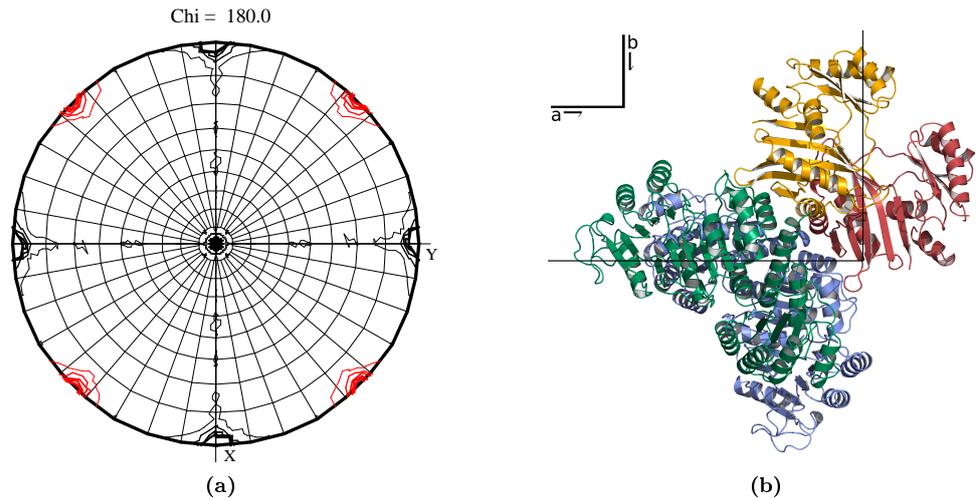


Abb. 2.6.: Nicht-kristallographische Symmetrie in Kristallform II. (a) Berechnet wurde die Selbstrotationsfunktion (SRF) anhand der Daten zur Struktur *ckcACD1*-B mit dem Programm MOLREP (Vagin und Teplyakov, 1997). Der verwendete Suchradius betrug $48,7 \text{ \AA}$. Dieser Wert entspricht der Hälfte des durch dynamische Lichtstreuung ermittelten hydrodynamischen Radius des *ckcACD1*-Komplexes. Korrespondierend dazu wurden Daten bis zu einer maximalen Auflösung von $2,80 \text{ \AA}$ verwendet. Dargestellt ist der Ausschnitt für $\chi = 180^\circ$, entsprechend zweizähliger Rotationsachsen. Neben den durch kristallographische Symmetrie verursachten schwarz dargestellten Signalspitzen ($\Theta; \varphi; \chi$) bei $(0; 0; 180)$, $(-90; 0; 180)$, $(90; 0; 180)$, $(0; -90; 180)$ sowie $(0; 90; 180)$ sind bei $(90; 45; 180)$, $(90; -45; 180)$, $(-90; 45; 180)$ und $(-90; -45; 180)$ vier durch nicht-kristallographische Symmetrie (NCS) verursachte Signale zu beobachten. Diese sind rot markiert. Anhand der SRF kann die Ausrichtung der zweizähligen Achse der NCS im Kristall ermittelt werden. Die Achse sollte dabei parallel zur a-b-Ebene, aber 45° zu den Achsen a bzw. b liegen. (b) Ausrichtung des *ckcACD1*-Komplexes im Kristall. Die Blickrichtung ist entlang der c-Achse auf die a-b-Ebene. In blau und grün sind die α -, in gelb und rot die β -Untereinheiten eingefärbt. Die zweizählige nicht-kristallographische Achse zwischen den α - bzw. β -Untereinheiten ist deutlich sichtbar und ist etwa 45° zu den Achsen a bzw. b ausgerichtet.

Grundlage für ein mit dem Programm SWISS-MODELL (Arnold *et al.*, 2006; Kiefer *et al.*, 2009; Guex *et al.*, 2009) erstelltes Homologiemodell der α -Untereinheit der *ckcACD1* war eine der Untereinheiten des dimeren α -Komplexes einer putativen Acetyl-CoA-Synthetase aus *Pyrococcus horikoshii* (PDB-Eintrag 2CSU). Einige möglicherweise flexible Bereiche des Ersatzmodells wurden vor Durchführung des Molekularen Ersatzes und der Phasierung entfernt.

Die Positionierung des Homologiemodells für die α -Untereinheit erfolgte mit dem Programm MOLREP (Vagin und Teplyakov, 1997). Zur Ermittlung der Ausrichtung der erwarteten zwei Exemplare wurde der Vorgang zweimal durchgeführt. Aus zwei Lösungen der Rotations- und Translationssuche wurde ein klares Dimer erhalten. Dieses ähnelte dem bereits bekannten Dimer aus der Kristallstruktur der potentiellen α -Untereinheit der ACD aus *Pyrococcus horikoshii* (PDB-Eintrag 2CSU). Nach Verfeinerung mit dem Programm REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997; Murshudov *et al.*, 2011) wurden mit $R_{\text{work}} = 0,49$ ($R_{\text{free}} = 0,51$) jedoch sehr hohe R -Faktoren erhalten. Der *figure-of-merit* (FOM), ein Maß für den Phasenfehler, war mit 0,35 dementsprechend niedrig. Um die Richtigkeit des Ergebnisses zu überprüfen, wurde die erhaltene Dichte visuell inspiziert. Bereits zu diesem Zeitpunkt konnte man einige der fehlenden Bereiche der Proteinkette erahnen. Eine endgültige Aussage über den Erfolg der Phasierung konnte allerdings nicht getroffen werden, weil die Elektronendichtekarte zu stark verrauscht war. Das Bauen von fehlenden Resten war zu diesem Zeitpunkt allenfalls schwer möglich. Es wurde daher mit der Positionierung der β -Untereinheiten fortgefahren.

2.4.3. Positionierung der β -Untereinheiten

Es wurde versucht die fehlenden β -Untereinheiten zum bestehenden Modell hinzuzufügen. Dies gestaltete sich als nicht trivial. Mit dem Programm MOLREP (Vagin und Teplyakov, 1997) konnte nur ein Molekül mit gutem Kontrast platziert werden. Die Position der zweiten Untereinheit konnte nicht bestimmt werden. Auch durch Verwendung von anderen Suchmodellen, generiert durch SWISS-MODEL (Arnold *et al.*, 2006; Kiefer *et al.*, 2009; Guex *et al.*, 2009), SCWRL (Krivov *et al.*, 2009) oder der Einsatz von Polyalaninmodellen, erbrachten keine definitive Lösung. Beide verwendete Programme MOLREP (Vagin und Teplyakov, 1997) und PHASER (McCoy *et al.*, 2007) zeigten das gleiche Phänomen. Die translatorische Komponente der zweiten

2. Ergebnisse

β -Untereinheit war nahezu gleich, jedoch waren die Moleküle jeweils unterschiedlich rotiert. Beide Programme positionierten die Untereinheiten in den gleichen freien Raum der Einheitszelle.

Es wurde daher ein erweiterter Suchansatz verfolgt. Sowohl die Diffraktionsdaten, als auch die beobachtete dimere Anordnung der α -Untereinheiten, deuten auf eine C2-Molekülsymmetrie hin. Die Moleküle der α -Untereinheiten können durch Rotation um 180° ineinander überführt werden. Es ist anzunehmen, dass die β -Untereinheiten ebenfalls über eine zweizählige Drehachse verbunden sein sollten. Aus diesem Grund wurde die Transformationsmatrix beider α -Untereinheiten ermittelt und auf die bereits positionierte β -Untereinheit angewendet. Das entstandene komplette Molekülmodell der *ckcACD1* wurde mit dem Programm PHENIX.AUTOBUILD (Terwilliger, 2004a; Terwilliger, 2004b; Zwart *et al.*, 2005; Terwilliger *et al.*, 2008; Afonine *et al.*, 2012) neu gebaut und automatisch verfeinert. Hierbei wurden keine zusätzlichen Reste hinzugefügt oder entfernt (Modus *rebuild-in-place*). Das so erhaltene Modell wies mit $R_{\text{work}} = 0,31$ und $R_{\text{free}} = 0,36$ erstmals verhältnismäßig niedrige R -Faktoren auf.

2.4.4. Verfeinerung und Verbesserung des initialen Modells

Einige Bereiche der Proteinmodelle wurden vor Verwendung als Suchmodell im Molekularem Ersatz entfernt. Sobald diese in der Elektronendichtekarte sichtbar wurden, erfolgte das manuelle Einfügen der Reste mittels dem Programm COOT (Emsley und Cowtan, 2004; Emsley *et al.*, 2010) und anschließender Verfeinerung des Modells mit dem Programm REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997; Murshudov *et al.*, 2011). Dadurch sanken die R -Faktoren auf $R_{\text{work}} = 0,26$ ($R_{\text{free}} = 0,31$) mit einem FOM-Wert von 0,78. Aufgrund der maximalen Auflösung der ersten Diffraktionsdaten von $2,8 \text{ \AA}$ war es in manchen Bereichen schwierig die Proteinkette in die Elektronendichtekarte zu bauen. Zusätzlich können die durch die Benutzung eines ungenauen und nicht vollständigen Suchmodells eingeführten Phasenfehler (*model bias*) insbesondere in diesem frühen Stadium der Strukturlösung zu einer nicht interpretierbarer Elektronendichtekarte führen. Es wurden daher Möglichkeiten der Reduktion von Phasenfehlern durchgeführt. So wurde prinzipiell beim automatischen Modellbau mit der *prime & switch*-Methode modifizierte Elektronendichtekarten verwendet (Terwilliger, 2004b). Weiterhin wurden *model bias* durch die Verwendung von *composite simulated annealing*

omit-Karten reduziert. Mit Hilfe höher aufgelöster Streudaten eines weiteren Kristalls konnte die Struktur der *ckcACD1* weiter verbessert werden. Einige vorhandene Lücken in den Molekülketten wurden geschlossen und die Bindungstasche von Coenzym A identifiziert. Es zeigte sich jedoch, dass der Bereich der β -Untereinheit (Aminosäuren Leu39 β –Ala114 β) schlecht definiert war. Die in diesem Bereich befindliche potentielle Bindungsstelle für ADP- bzw. ATP schien zudem nicht durch Substrat besetzt zu sein. Im Rahmen der Arbeit wurden Datensätze mit anomalem Streusignal aufgenommen. Dies umfasste Daten eines Kristalls, der durch Co-Kristallisation der *ckcACD1* mit HgCl₂ erhalten wurde, als auch einen Datensatz eines Proteinkristalls mit intrinsischer Markierung mit Selenomethionin. In beiden Fällen reichte die anomale Signalstärke nicht für eine *ab initio*-Phasierung. Trotzdem konnte diese Daten für die Reduktion von Phasenfehlern herangezogen werden. Die Struktur der *ckcACD1* wurde mit dem MRSAD-Protokoll des Programms PHENIX.AUTOSOL (Terwilliger, 1994; Terwilliger, 2000; Terwilliger, 2002a; Terwilliger, 2002b; Terwilliger, 2003b; Terwilliger, 2003a; Grosse-Kunstleve und Adams, 2003; McCoy *et al.*, 2004; Terwilliger *et al.*, 2009; Terwilliger *et al.*, 2013) neu gebaut. Dabei werden die durch den Molekularen Ersatz erhaltenen Phasen zur Bestimmung der Substruktur der anomalen Streuer herangezogen. Die so erzeugte experimentelle Elektronendichtekarte beruht auf verbesserten Phasen und die damit gebaute Struktur beinhaltet weniger Fehler durch *model bias*.

2.4.5. Verfeinerung der Strukturen der *ckcACD1* mit verschiedenen Substraten

Zur Klärung des zugrundeliegenden Mechanismus der *ckcACD1* wurde das Enzym in verschiedenen Zuständen und mit unterschiedlichen Substraten kristallisiert. Durch geringfügig verschiedene Kristallisations- und Gefriervorgänge entstehen Heterogenitäten der Kristalleigenschaften, die sich beispielsweise durch kleine Unterschiede in der Position des *ckcACD1*-Komplex innerhalb der Einheitszelle ausdrücken können. Durch zweimaliges Durchführen von Starrer-Körper-Verfeinerung (*rigid body refinement*) wurden daher zuerst die Änderungen der Position des kompletten *ckcACD1* und der einzelnen Untereinheiten ausgeglichen. Es folgte anschließend eine Gellée-Körper-Verfeinerung (Murshudov *et al.*, 2011). Bei dieser Form der Verfeinerung (*restraint refinement*) werden zusätzlich Beschränkungen (*restraints*) von Atomabständen durch den Raum eingeführt, so dass kleine Veränderungen in der Konformation des Proteins besser aus-

2. Ergebnisse

geglichen werden können. Üblicherweise wurde das Protein anschließend automatisch neu gebaut. Nicht automatisch gebaute Bereiche wurden manuell eingefügt. Falls die Elektronendichte es zuließ, wurden Substratmoleküle in die Struktur eingepasst. In den untersuchten Kristallen zeigten sich oftmals hochflexible Bereiche, deren Elektronendichte nicht oder schlecht interpretiert werden konnte. Diese Teile des Proteins wurden nicht in das Modell aufgenommen. Eine Zusammenfassung der Verfeinerungsstatistiken findet sich in den Tabellen auf den folgenden Seiten.

Tab. 2.5.: Statistiken der Verfeinerung von *ckcACD1-A*.

Kristall	<i>ckcACD1-A</i>
PDB-Eintrag	4XYL
Verfeinerung	
R_{cryst} (%) ¹ / R_{free} (%) ^{1,3}	20,64 / 24,64
CC* ² / CC _{cryst} ² / CC _{free} ^{2,3}	0,998 / 0,955 / 0,938
Ramachandran-Plot (%) ⁴	97,95 / 1,90 / 0,15
Cruickshank DPI (Å) ⁵	0,218
<i>Abweichungen von Idealwerten (RMSD)</i> ⁶	
Bindungslängen (Å)	0,005
Bindungswinkel (°)	0,940
<i>Isotrope Temperaturfaktoren (Å²)</i> ⁷	
Mittlerer B-Faktor	36,7 (10 886)
Rückgrat	35,5 (5 508)
Seitenketten	38,3 (4 916)
Solvens	32,5 (364)
CoA	33,6 (96)

¹ $R_{\text{cryst}} = \frac{\sum (|F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}|)}{\sum |F_{\text{obs}}|}$, mit F_{obs} und F_{calc} als gemessene bzw. kalkulierte Strukturfaktor-Amplituden.

² Berechnet mit CALCULATE CC* des PHENIX-Programmpaketis nach (Karplus und Diederichs, 2012).

³ R_{free} und CC_{free} werden entsprechend R_{cryst} bzw. CC_{cryst} berechnet, verwenden aber die 5,1 % der vom Verfeinerungsprozess ausgenommenen Reflexe (Brünger, 1992; Tickle *et al.*, 2000).

⁴ Berechnet mit MOLPROBITY (Chen *et al.*, 2010): bevorzugt / erlaubt / verboten.

⁵ *Diffraction-component precision index* (Cruickshank, 1999) berechnet mit Scheck (Vaguine *et al.*, 1999) nach dem Ansatz von Murshudov (Murshudov und Dodson, 1997).

⁶ Abweichungen bezüglich der Standardgeometrie der Bibliothek von Engh und Huber (Engh und Huber, 1991)

⁷ In Klammern: Anzahl der Atome.

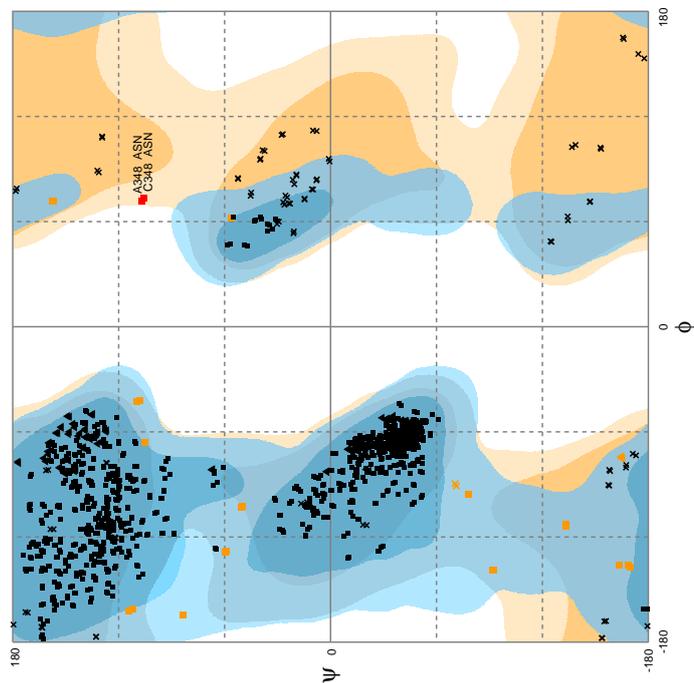


Abb. 2.7.: Ramachandran-Plot von *ckcACD1-A*. Zwei Ausreißer (jeweils die Aminosäure Asn348a) werden beobachtet. Beide Aminosäuren sind in der Elektronendichte jedoch eindeutig definiert.

Tab. 2.6.: Statistiken der Verfeinerung von *ckcACD1-B*.

Kristall	<i>ckcACD1-B</i>
PDB-Eintrag	4XYM
Verfeinerung	
R_{cryst} (%) ¹ / R_{free} (%) ^{1,3}	19,53 / 23,71
$CC^*_{\text{cryst}^2}$ / $CC^*_{\text{cryst}^2}$ / $CC^*_{\text{free}^2}$ / $CC^*_{\text{free}^2}$	0,999 / 0,961 / 0,952
Ramachandran-Plot (%) ⁴	97,82 / 2,04 / 0,15
Crickshank DPI (Å) ⁵	0,200
<i>Abweichungen von Idealkwerten (RMSD)</i> ⁶	
Bindungslängen (Å)	0,007
Bindungswinkel (°)	1,056
<i>Isotope Temperaturfaktoren (Å²)</i> ⁷	
Mittlerer <i>B</i> -Faktor	39,5 (11 074)
Rückgrat	37,7 (5 532)
Seitenketten	41,6 (4 939)
Solvens	41,6 (436)
CoA	40,2 (96)
Ca-AMPCP	40,5 (56)
Hg	52,5 (8)

- ¹ $R_{\text{cryst}} = \frac{\sum (|F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}|)}{\sum |F_{\text{obs}}|}$, mit F_{obs} und F_{calc} als gemessene bzw. kalkulierte Strukturfaktor-Amplituden.
- ² Berechnet mit CALCULATE CC* des PHENIX-Programmpakets nach (Karpus und Diederichs, 2012).
- ³ R_{free} und CC^*_{free} werden entsprechend R_{cryst} bzw. CC^*_{cryst} berechnet, verwenden aber die 5,1% der vom Verfeinerungsprozess ausgenommenen Reflexe (Brünger, 1992; Tickle *et al.*, 2000).
- ⁴ Berechnet mit MOLPROBITY (Chen *et al.*, 2010): bevorzugt / erlaubt / verboten.
- ⁵ *Diffraction-component precision index* (Crickshank, 1999) berechnet mit Scheck (Vaguine *et al.*, 1999) nach dem Ansatz von Murshudov (Murshudov und Dodson, 1997).
- ⁶ Abweichungen bezüglich der Standardgeometrie der Bibliothek von Engh und Huber (Engh und Huber, 1991)
- ⁷ In Klammern: Anzahl der Atome.

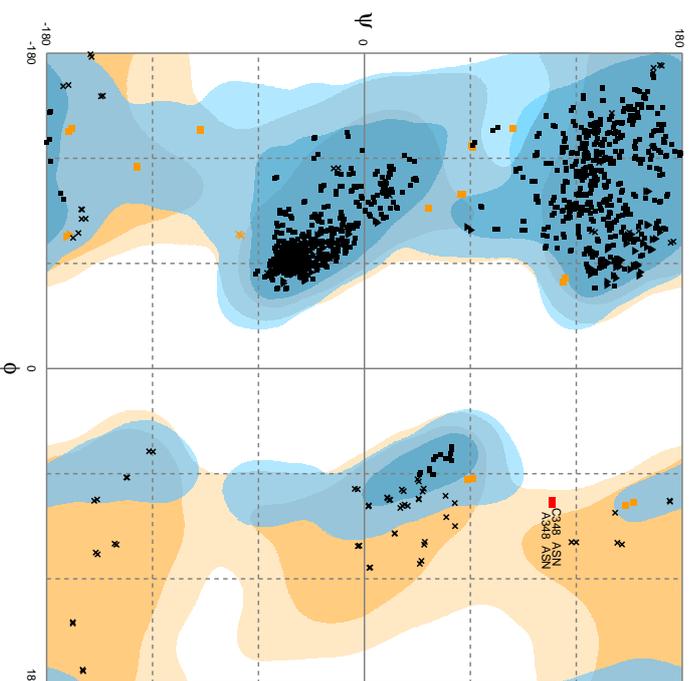


Abb. 2.8.: Ramachandran-Plot von *ckcACD1-B*. Zwei Ausreißer (jeweils die Aminosäure Asn348a) werden beobachtet. Beide Aminosäuren sind in der Elektronendichte jedoch eindeutig definiert.

Tab. 2.7.: Statistiken der Verfeinerung von *ckcACD1-C*.

Kristall	<i>ckcACD1-C</i>
PDB-Eintrag	4XZ3
Verfeinerung	
R_{cryst} (%) ¹ / R_{free} (%) ^{1, 3}	19,65 / 24,44
CC^{*2} / CC_{cryst} / CC_{free} ^{2, 3}	0,999 / 0,960 / 0,944
Ramachandran-Plot (%) ⁴	96,60 / 3,25 / 0,15
Cruickshank DPI (Å) ⁵	0,357
<i>Abweichungen von Idealwerten (RMSD)</i> ⁶	
Bindungslängen (Å)	0,004
Bindungswinkel (°)	0,763
<i>Isotrope Temperaturfaktoren (Å²)</i> ⁷	
Mittlerer B-Faktor	60,70 (10 550)
Rückgrat	56,9 (5 461)
Seitenketten	62,9 (4 826)
Solvens	45,0 (56)
CoA	62,1 (96)
Mg·AMPPCP	100,0 (64)
Mg·AMPPCP*	83,0 (46)

¹ $R_{\text{cryst}} = \frac{\sum(|F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}|)}{\sum|F_{\text{obs}}|}$, mit F_{obs} und F_{calc} als gemessene bzw.

kalkulierte Strukturfaktor-Amplituden.

² Berechnet mit CALCULATE CC* des PHENIX-Programmpakets nach (Karplus und Diederichs, 2012).

³ R_{free} und CC_{free} werden entsprechend R_{cryst} bzw. CC_{cryst} berechnet, verwenden aber die 5,1 % der vom Verfeinerungsprozess ausgenommenen Reflexe (Brünger, 1992; Tickle *et al.*, 2000).

⁴ Berechnet mit MOLPROBITY (Chen *et al.*, 2010): bevorzugt / erlaubt / verboten.

⁵ *Diffraction-component precision index* (Cruickshank, 1999) berechnet mit Scheck (Vaguine *et al.*, 1999) nach dem Ansatz von Murshudov (Murshudov und Dodson, 1997).

⁶ Abweichungen bezüglich der Standardgeometrie der Bibliothek von Eng und Huber (Eng und Huber, 1991)

⁷ In Klammern: Anzahl der Atome. Mit einem * markierte Nucleotide sind an die α -Untereinheit gebunden.

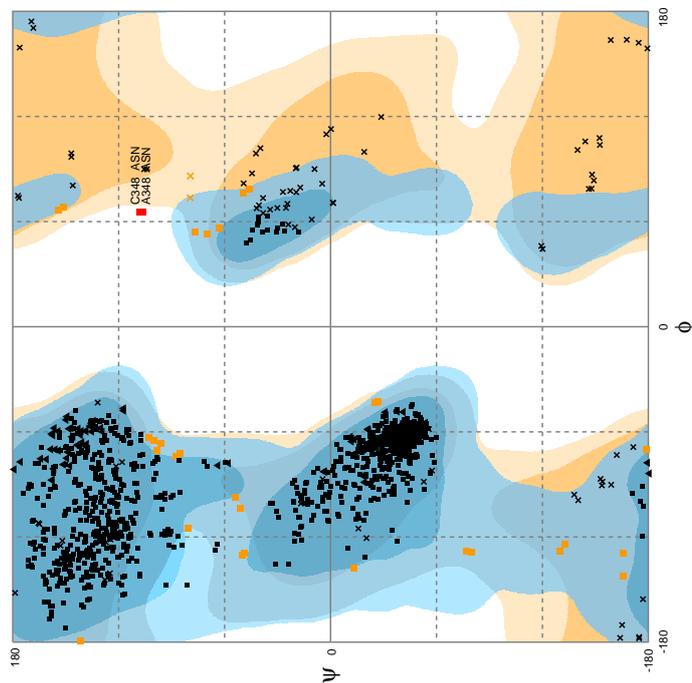


Abb. 2.9.: Ramachandran-Plot von *ckcACD1-C*. Zwei Ausreißer (jeweils die Aminosäure Asn348a) werden beobachtet. Beide Aminosäuren sind in der Elektronendichte jedoch eindeutig definiert.

Tab. 2.8.: Statistiken der Verfeinerung von *ckcACDI-D*.

Kristall	<i>ckcACDI-D</i>
PDB-Eintrag	4Y8V
Verfeinerung	
R_{cryst} (%) ¹ / R_{free} (%) ^{1,3}	18,44 / 22,55
$\text{CC}^*_{\text{cryst}^2}$ / $\text{CC}^*_{\text{cryst}^2}$ / $\text{CC}^*_{\text{free}^2}$ / $\text{CC}^*_{\text{free}^2}$	0,999 / 0,967 / 0,945
Ramachandran-Plot (%) ⁴	98,26 / 2,56 / 0,15
Crucshank DPI (Å) ⁵	0,240
<i>Abweichungen von Idealkwerten (RMSD)</i> ⁶	
Bindungslängen (Å)	0,004
Bindungswinkel (°)	0,921
<i>Isotrope Temperaturfaktoren (Å²)</i> ⁷	
Mittlerer <i>B</i> -Faktor	33,6 (111318)
Rückgrat	31,7 (5544)
Seitenketten	35,4 (4956)
Solvens	31,1 (519)
Mg·ADP	55,5 (56)
Mg·ADP*	53,4 (56)

- 1 $R_{\text{cryst}} = \frac{\sum(|F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}|)}{\sum|F_{\text{obs}}|}$, mit F_{obs} und F_{calc} als gemessene bzw. kalkulierte Strukturfaktor-Amplituden.
- 2 Berechnet mit CALCULATE CC* des PHENIX-Programmpaketes nach (Karplus und Diederichs, 2012).
- 3 R_{free} und $\text{CC}^*_{\text{free}}$ werden entsprechend R_{cryst} bzw. $\text{CC}^*_{\text{cryst}}$ berechnet, verwenden aber die 5,1% der vom Verfeinerungsprozess ausgenommen Reflexe (Brünger, 1992; Tickle *et al.*, 2000).
- 4 Berechnet mit MOLPROBITY (Chen *et al.*, 2010): bevorzugt / erlaubt / verboten.
- 5 *Diffraction-component precision index* (Crucshank, 1999) berechnet mit Scheck (Vagine *et al.*, 1999) nach dem Ansatz von Murshudov (Murshudov und Dodson, 1997).
- 6 Abweichungen bezüglich der Standardgeometrie der Bibliothek von Engh und Huber (Engh und Huber, 1991)
- 7 In Klammern: Anzahl der Atome. Mit einem * markierte Nucleotide sind an die α -Untereinheit gebunden.

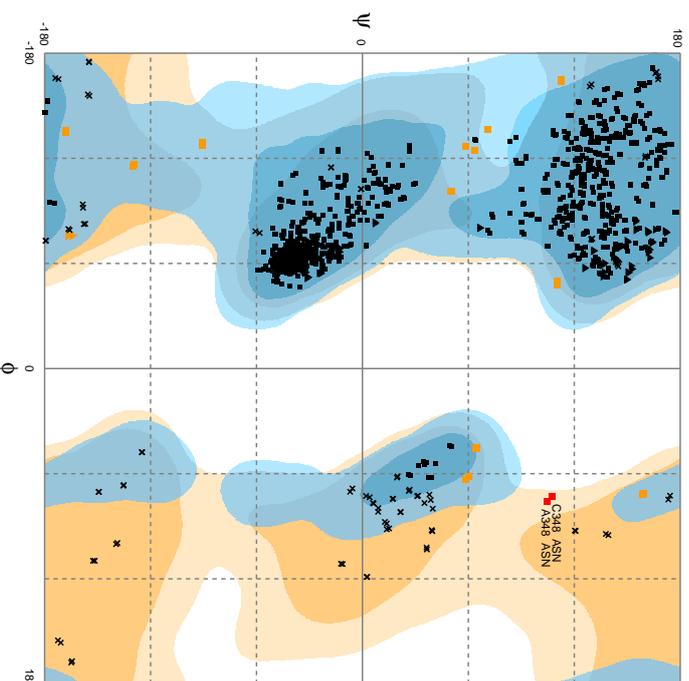


Abb. 2.10.: Ramachandran-Plot von *ckcACDI-D*. Zwei Ausreißer (jeweils die Aminosäure Asn348a) werden beobachtet. Beide Aminosäuren sind in der Elektronendichte jedoch eindeutig definiert.

Tab. 2.9.: Statistiken der Verfeinerung von *ckcACD1-E*.

Kristall PDB-Eintrag	<i>ckcACD1-E</i> 4YAK
Verfeinerung	
$R_{\text{cryst}} (\%)^1 / R_{\text{free}} (\%)^{1,3}$	19,36 / 23,82
$CC^{*2} / CC_{\text{cryst}}^2 / CC_{\text{free}}^{2,3}$	0,999 / 0,973 / 0,948
Ramachandran-Plot (%) ⁴	97,30 / 2,56 / 0,15
Cruickshank DPI (Å) ⁵	0,369
<i>Abweichungen von Idealwerten (RMSD)</i> ⁶	
Bindungslängen (Å)	0,006
Bindungswinkel (°)	0,880
<i>Isotrope Temperaturfaktoren (Å²)</i> ⁷	
Mittlerer B-Faktor	64,2 (10 559)
Rückgrat	62,5 (5 516)
Seitenketten	66,2 (4 926)
Solvens	50,5 (18)
CoA	58,8 (48)
Ac-CoA	63,0 (51)

¹ $R_{\text{cryst}} = \frac{\sum (|F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}|)}{\sum |F_{\text{obs}}|}$, mit F_{obs} und F_{calc} als gemessene bzw.

kalkulierte Strukturfaktor-Amplituden.

² Berechnet mit CALCULATE CC* des PHENIX-Programmpaketes nach (Karplus und Diederichs, 2012).

³ R_{free} und CC_{free} werden entsprechend R_{cryst} bzw. CC_{cryst} berechnet, verwenden aber die 5,1 % der vom Verfeinerungsprozess ausgenommenen Reflexe (Brünger, 1992; Tickle *et al.*, 2000).

⁴ Berechnet mit MOLPROBITY (Chen *et al.*, 2010): bevorzugt / erlaubt / verboten.

⁵ *Diffraction-component precision index* (Cruickshank, 1999) berechnet mit Scheck (Vaguine *et al.*, 1999) nach dem Ansatz von Murshudov (Murshudov und Dodson, 1997).

⁶ Abweichungen bezüglich der Standardgeometrie der Bibliothek von Eng und Huber (Eng und Huber, 1991)

⁷ In Klammern: Anzahl der Atome.

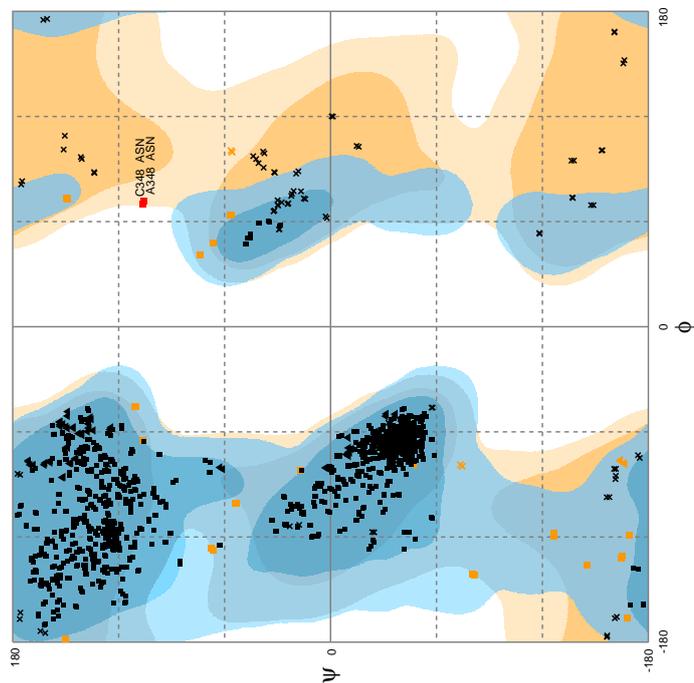


Abb. 2.11.: Ramachandran-Plot von *ckcACD1-E*. Zwei Ausreißer (jeweils die Aminosäure Asn348a) werden beobachtet. Beide Aminosäuren sind in der Elektronendichte jedoch eindeutig definiert.

Tab. 2.10.: Statistiken der Verfeinerung von *ckcACD1-F*.

Kristall	<i>ckcACD1-F</i>
PDB-Eintrag	4YAJ
Verfeinerung	
R_{cryst} (%) ¹ / R_{free} (%) ^{1,3}	21,45 / 24,13
CC^*2 / $CC_{\text{cryst}}2$ / $CC_{\text{free}}2$, ³	0,998 / 0,961 / 0,939
Ramachandran-Plot (%) ⁴	97,02 / 2,56 / 0,15
Crickshank DPI (Å) ⁵	0,283
<i>Abweichungen von Idealwerten (RMSD)</i> ⁶	
Bindungslängen (Å)	0,003
Bindungswinkel (°)	0,771
<i>Isotrope Temperaturfaktoren (Å²)</i> ⁷	
Mittlerer B-Faktor	43,9 (10 359)
Rückgrat	42,7 (5 432)
Seitenketten	45,7 (4 754)
Solvens	35,1 (1 71)

- ¹ $R_{\text{cryst}} = \frac{\sum(\|F_{\text{obs}}\| - k\|F_{\text{calc}}\|)}{\sum\|F_{\text{obs}}\|}$, mit F_{obs} und F_{calc} als gemessene bzw. kalkulierte Strukturfaktor-Amplituden.
- ² Berechnet mit CALCULATE CC* des PHENIX-Programmpaketes nach (Karplus und Diederichs, 2012).
- ³ R_{free} und CC_{free} werden entsprechend R_{cryst} bzw. CC_{cryst} berechnet, verwenden aber die 5,1% der vom Verfeinerungsprozess ausgenommenen Reflexe (Brünger, 1992; Tickle *et al.*, 2000).
- ⁴ Berechnet mit MOLPROBITY (Chen *et al.*, 2010): bevorzugt / erlaubt / verboten.
- ⁵ *Diffraction-component precision index* (Crickshank, 1999) berechnet mit StCHECK (Vagin *et al.*, 1999) nach dem Ansatz von Murshudov (Murshudov und Dodson, 1997).
- ⁶ Abweichungen bezüglich der Standardgeometrie der Bibliothek von Engh und Huber (Engh und Huber, 1991)
- ⁷ In Klammern: Anzahl der Atome.

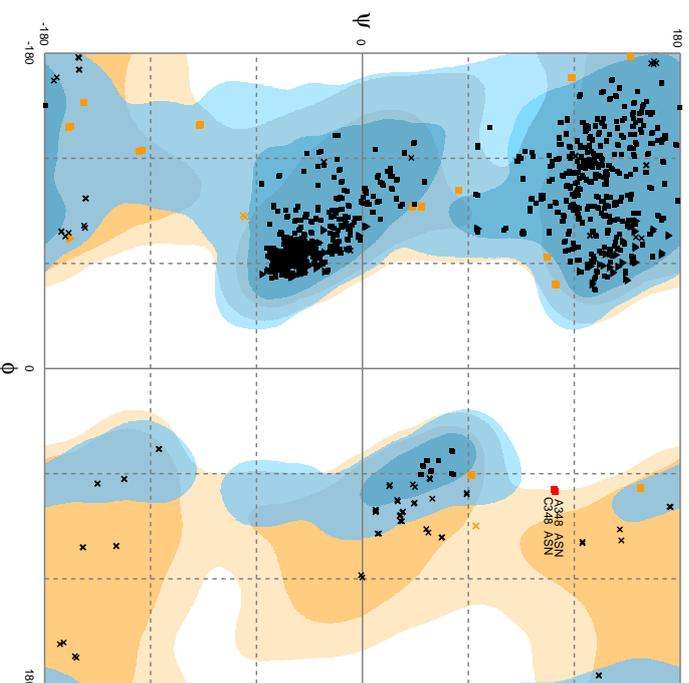


Abb. 2.12.: Ramachandran-Plot von *ckcACD1-F*. Zwei Ausreißer (jeweils die Aminosäure Asn348a) werden beobachtet. Beide Aminosäuren sind in der Elektronendichte jedoch eindeutig definiert.

Tab. 2.11.: Statistiken der Verfeinerung von *ckcACD1-G*.

Kristall	<i>ckcACD1-G</i>
PDB-Eintrag	4YB8
Verfeinerung	
$R_{\text{cryst}} (\%)$ ¹ / $R_{\text{free}} (\%)$ ^{1, 3}	18,16 / 22,05
CC^*2 / CC_{cryst} ² / CC_{free} ^{2, 3}	0,999 / 0,975 / 0,966
Ramachandran-Plot (%) ⁴	97,75 / 2,10 / 0,15
Cruickshank DPI (Å) ⁵	0,179
<i>Abweichungen von Idealwerten (RMSD)</i> ⁶	
Bindungslängen (Å)	0,012
Bindungswinkel (°)	1,201
<i>Isotrope Temperaturfaktoren (Å²)</i> ⁷	
Mittlerer B-Faktor	47,9 (10 782)
Rückgrat	46,0 (5 544)
Seitenketten	50,1 (4 876)
Solvens	42,2 (293)
Mg-ADP	78,0 (56)
Phosphat	52,6 (10)

¹ $R_{\text{cryst}} = \frac{\sum (|F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}|)}{\sum |F_{\text{obs}}|}$, mit F_{obs} und F_{calc} als gemessene bzw.

kalkulierte Strukturfaktor-Amplituden.

² Berechnet mit CALCULATE CC* des PHENIX-Programmpaketis nach (Karplus und Diederichs, 2012).

³ R_{free} und CC_{free} werden entsprechend R_{cryst} bzw. CC_{cryst} berechnet, verwenden aber die 5,1 % der vom Verfeinerungsprozess ausgenommenen Reflexe (Brünger, 1992; Tickle *et al.*, 2000).

⁴ Berechnet mit MOLPROBITY (Chen *et al.*, 2010): bevorzugt / erlaubt / verboten.

⁵ *Diffraction-component precision index* (Cruickshank, 1999) berechnet mit Scheck (Vaguine *et al.*, 1999) nach dem Ansatz von Murshudov (Murshudov und Dodson, 1997).

⁶ Abweichungen bezüglich der Standardgeometrie der Bibliothek von Engh und Huber (Engh und Huber, 1991)

⁷ In Klammern: Anzahl der Atome.

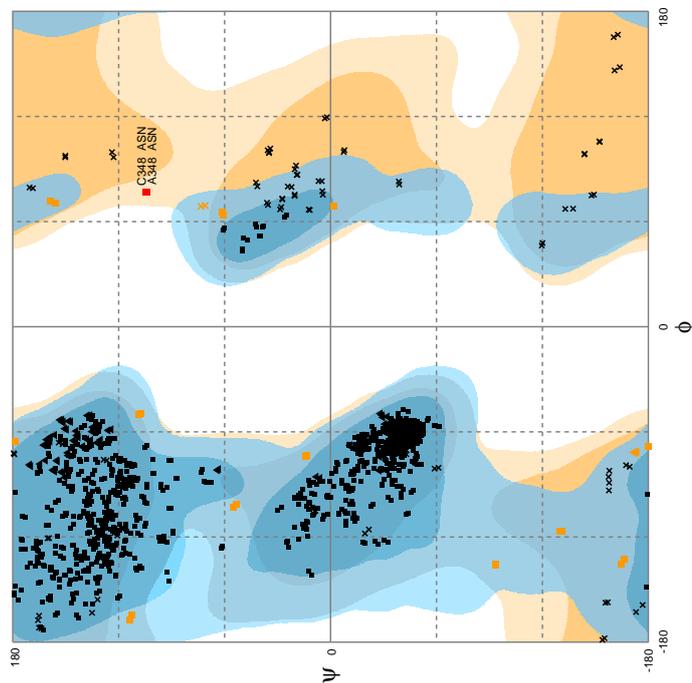


Abb. 2.13.: Ramachandran-Plot von *ckcACD1-G*. Zwei Ausreißer (jeweils die Aminosäure Asn348a) werden beobachtet. Beide Aminosäuren sind in der Elektronendichte jedoch eindeutig definiert.

Tab. 2.12.: Statistiken der Verfeinerung von *ckcACD1-H*.

Kristall	<i>ckcACD1-H</i>
PDB-Eintrag	4YBZ
Verfeinerung	
R_{cryst} (%) ¹ / R_{free} (%) ^{1,3}	21,58 / 25,34
CC^*2 / $CC_{\text{cryst}}2$ / $CC_{\text{free}}2$, ³	0,998 / 0,939 / 0,909
Ramachandran-Plot (%) ⁴	97,75 / 2,11 / 0,15
Crucshank DPI (Å) ⁵	0,268
Abweichungen von Idealwerten (RMSD)⁶	
Bindungslängen (Å)	0,004
Bindungswinkel (°)	0,970
<i>Isotrope</i> Temperaturfaktoren (Å ²) ⁷	
Mittlerer <i>B</i> -Faktor	41,8 (10 972)
Rückgrat	40,2 (5 532)
Seitenketten	43,6 (4 950)
Solvens	40,5 (461)
ADP	68,8 (27)

- ¹ $R_{\text{cryst}} = \frac{\sum(|F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}|)}{\sum|F_{\text{obs}}|}$, mit F_{obs} und F_{calc} als gemessene bzw. kalkulierte Strukturfaktor-Amplituden.
- ² Berechnet mit CALCULATE CC* des PHENIX-Programmpaketes nach (Karplus und Diederichs, 2012).
- ³ R_{free} und CC_{free} werden entsprechend R_{cryst} bzw. CC_{cryst} berechnet, verwenden aber die 5,1% der vom Verfeinerungsprozess ausgenommenen Reflexe (Brünger, 1992; Tickle *et al.*, 2000).
- ⁴ Berechnet mit MOLPROBITY (Chen *et al.*, 2010): bevorzugt / erlaubt / verboten.
- ⁵ *Diffraction-component precision index* (Crucshank, 1999) berechnet mit Scheck (Vagine *et al.*, 1999) nach dem Ansatz von Murshudov (Murshudov und Dodson, 1997).
- ⁶ Abweichungen bezüglich der Standardgeometrie der Bibliothek von Engh und Huber (Engh und Huber, 1991)
- ⁷ In Klammern: Anzahl der Atome.

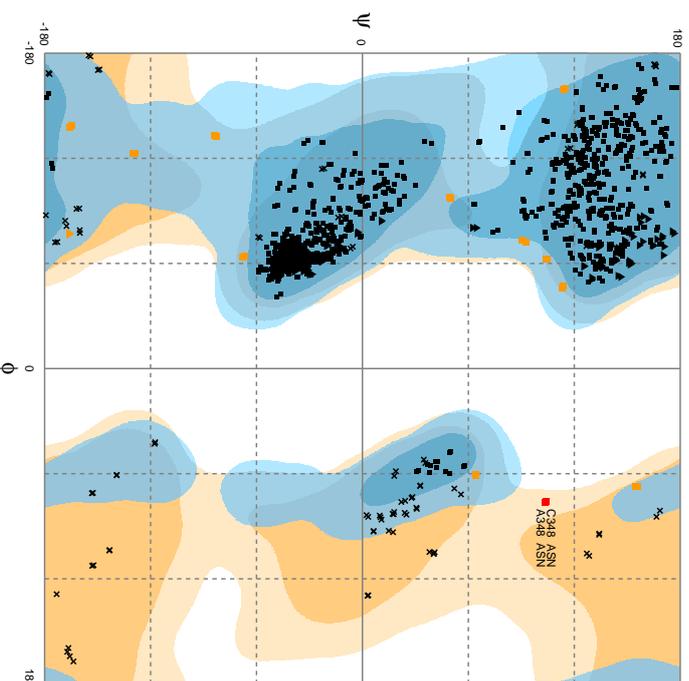


Abb. 2.14.: Ramachandran-Plot von *ckcACD1-H*. Zwei Ausreißer (jeweils die Aminosäure Asn348a) werden beobachtet. Beide Aminosäuren sind in der Elektronendichte jedoch eindeutig definiert.

Tab. 2.13.: Statistiken der Verfeinerung von *ckcACD1-I*.

Kristall	<i>ckcACD1-I</i>
PDB-Eintrag	5HBR
Verfeinerung	
$R_{\text{cryst}} (\%)^1 / R_{\text{free}} (\%)^{1,3}$	17,84 / 22,22
$CC^*2 / CC_{\text{cryst}}^2 / CC_{\text{free}}^{2,3}$	0,999 / 0,975 / 0,956
Ramachandran-Plot (%) ⁴	97,68 / 2,18 / 0,15
Cruickshank DPI (Å) ⁵	0,205
<i>Abweichungen von Idealwerten (RMSD)</i> ⁶	
Bindungslängen (Å)	0,008
Bindungswinkel (°)	1,047
<i>Isotrope Temperaturfaktoren (Å²)</i> ⁷	
Mittlerer B-Faktor	52,2 (10 944)
Rückgrat	50,1 (5 544)
Seitenketten	55,0 (4 951)
Solvens	46,2 (340)
CoA	49,9 (96)
Phosphat	54,3 (10)

¹ $R_{\text{cryst}} = \frac{\sum(|F_{\text{obs}}| - k|F_{\text{calc}}|)}{\sum|F_{\text{obs}}|}$, mit F_{obs} und F_{calc} als gemessene bzw.

kalkulierte Strukturfaktor-Amplituden.

² Berechnet mit CALCULATE CC* des PHENIX-Programmpaketis nach (Karplus und Diederichs, 2012).

³ R_{free} und CC_{free} werden entsprechend R_{cryst} bzw. CC_{cryst} berechnet, verwenden aber die 5,1 % der vom Verfeinerungsprozess ausgenommenen Reflexe (Brünger, 1992; Tickle *et al.*, 2000).

⁴ Berechnet mit MOLPROBITY (Chen *et al.*, 2010): bevorzugt / erlaubt / verboten.

⁵ *Diffraction-component precision index* (Cruickshank, 1999) berechnet mit Scheck (Vaguine *et al.*, 1999) nach dem Ansatz von Murshudov (Murshudov und Dodson, 1997).

⁶ Abweichungen bezüglich der Standardgeometrie der Bibliothek von Engh und Huber (Engh und Huber, 1991)

⁷ In Klammern: Anzahl der Atome.

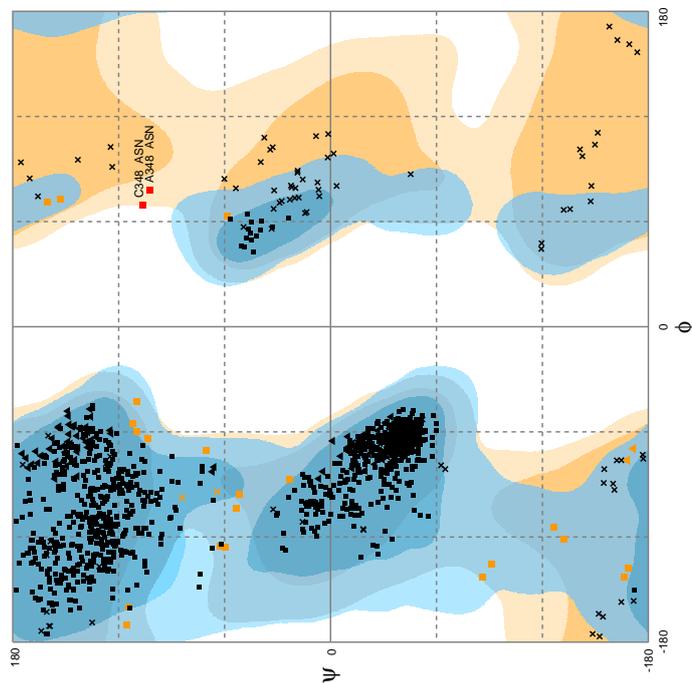


Abb. 2.15.: Ramachandran-Plot von *ckcACD1-I*. Zwei Ausreißer (jeweils die Aminosäure Asn348a) werden beobachtet. Beide Aminosäuren sind in der Elektronendichte jedoch eindeutig definiert.

2. Ergebnisse

Tab. 2.14.: Berechnete Kontaktflächen der *Ca. Korarchaeum cryptofilum* ACD1. Mit dem Programm PISA (Krissinel und Henrick, 2007) wurde auf Grundlage der Proteinstruktur des Kristalls *ckcACD1-B* die Berechnung der Kontaktfläche durchgeführt. Zuvor wurden sowohl die Hg- als auch die Cl-Atome entfernt.

Interface-Nr.	Struktur 1		Struktur 2		Kontaktfläche [\AA^2]	CSS*	$\Delta^i G^\dagger$ [kcal/mol]
	Kette	Reste	Kette	Reste			
1	A	70	C	69	2 030,5	0,850	-33,4
2	A	24	B	18	784,5	0,269	-6,5
3	C	22	D	17	769,5	0,269	-7,5
4	B	15	D	14	537,1	0,074	-8,4

* Der *Complexation Significance Score* CSS gibt die Signifikanz einer bestimmten Interaktionsfläche für die Ausbildung des Gesamtkomplexes an. Der Wertebereich ist zwischen 0 und 1. Je höher der Wert, desto größer die Beteiligung an der Stabilität des Komplexes.

† Durch die Ausbildung einer Kontaktfläche kommt es zur Verdrängung der Hydrathülle und damit einhergehend Gewinn freier Solvationsenergie $\Delta^i G$. Nicht mit eingerechnet wurden die Effekte von Wasserstoff- und Salzbrücken. Je kleiner der Wert, desto hydrophober sind die Grenzflächen und kommen mit höherer Wahrscheinlichkeit nicht durch Kristallkontakte zustande.

2.5. Der Aufbau des *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* ACD1-Komplexes

Der *ckcACD1*-Komplex besteht aus jeweils zwei α - und zwei β -Untereinheiten. Jeweils eine α - und β -Untereinheit ($\alpha\beta$ -Protomer) sind in einer nicht-kristallographischen zweizähligen Rotationssymmetrie angeordnet (siehe Abbildung 2.16). Berührungspunkte finden sich zwischen den beiden α -, den α - und β - sowie den beiden β -Untereinheiten. Eine objektive Analyse zur Stabilität der oligomeren Anordnung wurde mit dem Programm PISA (Krissinel und Henrick, 2007) durchgeführt (siehe Tabelle 2.14). Mit etwa 2000\AA^2 ist die Interaktionsfläche zwischen den α -Untereinheiten am größten und sollte damit sehr stabil sein. Die Kontaktflächen zwischen den α - und β - bzw. den β - und β -Untereinheiten sind mit $740\text{-}770 \text{\AA}^2$ und 540\AA^2 deutlich geringer. Für den vollständigen *ckcACD1*-Komplex ergibt sich ein positiver Wert für die freie Dissoziationsenergie ΔG^{diss} von $9,3 \text{ kcal/mol}$. ΔG^{diss} ist ein Maß für die Kraft, die aufgebracht werden muss, um einen Komplex voneinander zu trennen (Krissinel und Henrick, 2007). Die präsentierte Komplexstruktur der *ckcACD1* wird somit als stabil bewertet.

2.5. Der Aufbau des *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* ACD1-Komplexes

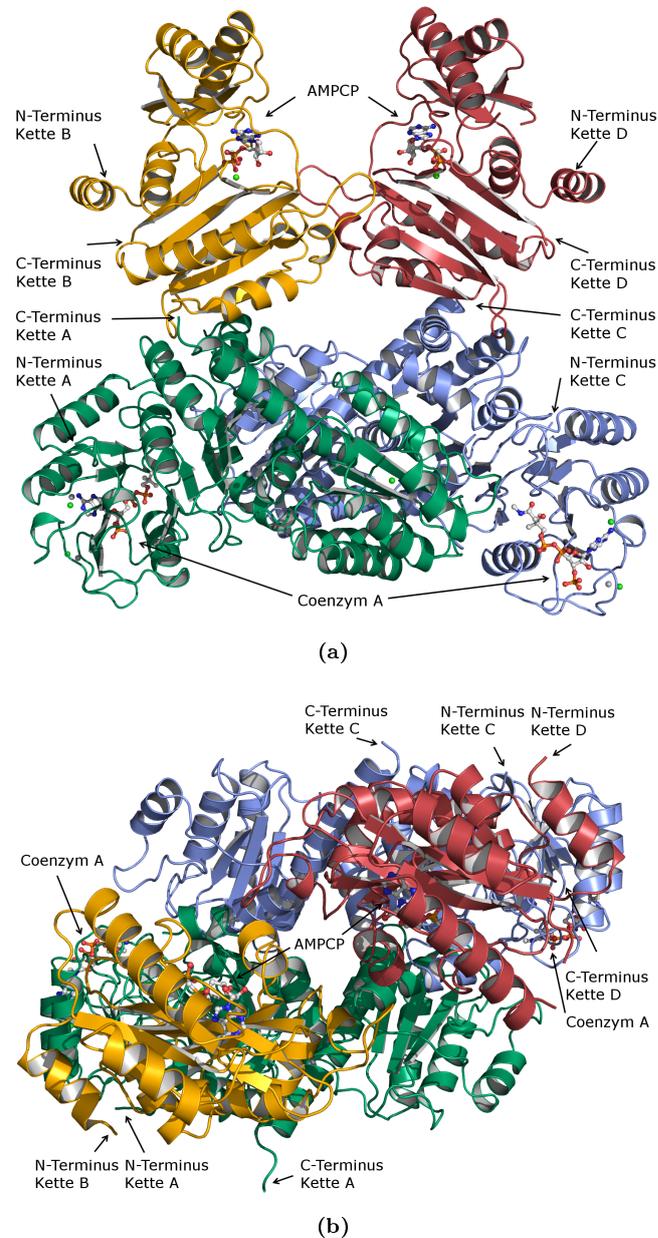


Abb. 2.16.: Darstellung der verfeinerten Kristallstruktur *ckcACD1-B*. Grün und blau sind die α -Untereinheiten dargestellt (Ketten A bzw. C), die β -Untereinheiten sind rot bzw. gelb gefärbt (Ketten B bzw. D). Im Kristall befindliche Ca^{2+} - und Hg^{2+} -Ionen werden als grüne bzw. graue Sphären gezeigt. (a) Seitliche Ansicht des *ckcACD1*-Komplexes. (b) Aufsicht auf den *ckcACD1*-Komplex. Blickrichtung ist entlang der zweizähligen nicht-kristallographischen Rotationsachse.

2. Ergebnisse

2.5.1. Aufbau der α -Untereinheit

Die α -Untereinheit besteht aus drei Unterdomänen (in Analogie zur *E. coli* SCS als Subdomänen 1, 2 und 5 bezeichnet). Eine N-terminal gelegene CoA-Bindedomäne mit Rossmann-Faltung (Aminosäuren Asn2 α bis Phe131 α) sorgt für die Bindung von Coenzym A bzw. der Coenzym A-Thioester (Subdomäne 1). Aufgebaut ist diese aus einem fünfsträngigen parallelen Faltblatt, deren Enden hauptsächlich durch Helices miteinander verbunden werden. Zwischen den Strängen β 2 und β 5 befindet sich hingegen ein kurzes zweisträngiges antiparalleles Faltblatt (Stränge β 3 und β 4) verknüpft über eine β -Schleife. Die zugrundeliegenden Bindungsmodi von Coenzym A und Acetyl-Coenzym A werden in Kapitel 2.6.1 näher beschrieben. Angeschlossen daran finden sich zwei Domänen mit Flavodoxin-ähnlicher Faltung. Erstere (Subdomäne 2) besteht aus den Aminosäuren Gly132 α bis Asn293 α und dessen Grundstruktur wird aus einem siebensträngiges Faltblatt gebildet. Abweichend zu einer typischen Flavodoxinfaltung enthält das zentrale Faltblatt zusätzliche antiparallele Stränge. Das katalytisch essentielle Histidin His254 α befindet sich in einem Bereich mit einem überdurchschnittlichen Anteil an Aminosäuren mit kleinen Seitenketten (Gly242 α bis Gly261 α). In den in dieser Arbeit erhaltenen Kristallstrukturen zeigt sich dieser Bereich als sehr flexibel. Die C-terminal (Aminosäuren Arg300 α bis Arg464 α) gelegene Subdomäne 5 wird aus einem fünf- bzw. sechssträngigem Faltblatt aufgebaut. Der sechste, zum übrigen Faltblatt antiparallel angeordnete, Strang ist jedoch in manchen Fällen so stark verzerrt, dass dieser bei der Sekundärstrukturanalyse nicht immer als solcher erkannt wird. Er besteht aus den Aminosäuren Ser355 α bis Phe356 α . Mit Diederwinkeln Φ und Ψ von 78° und 108° befinden sich die Aminosäuren Asn348 sich in beiden α -Untereinheiten im verbotenen Bereich des Ramachandran-Plots (Ramachandran *et al.*, 1963). In allen Fällen ist die Elektronendichte jedoch eindeutig und lässt keine andere Interpretation zu.

2.5.2. Aufbau der β -Untereinheit

Bezogen auf die Nomenklatur von SCS und ACDs kann die β -Untereinheit als durch zwei Subdomänen aufgebaut angesehen werden (Sánchez *et al.*, 2000). Alternativ dazu kann der Aufbau der β -Untereinheit als *ATP grasp*-Faltung aufgefasst werden. Aufgebaut werden Vertreter dieser Proteinklasse normalerweise aus drei Subdomänen A, B,

2.5. Der Aufbau des *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* ACD1-Komplexes

und C (Fawaz *et al.*, 2011). Im Fall der *ckcACD1* besteht die Subdomäne A (Aminosäuren Met1 β bis Pro33 β) allerdings nur aus zwei Helices, die stark mit der Subdomäne C (Gly117 β bis Arg230 β) interagieren. In Anbetracht ihrer ähnlichen Temperaturfaktoren können die Subdomänen A und C als eine Einheit angesehen werden (Subdomäne 4). Typischerweise bilden die Subdomänen A und C die Grundlage zur Bindung des Substrates (Reaktionszentrum *site II*) (Fawaz *et al.*, 2011). Im Fall der ACDs ist das Substrat eine phosphorylierte Histidinspezies, wie es in den darauffolgenden Kapiteln beschrieben wird. Die Reste Thr35 β bis Phe113 β lassen sich zur B-Subdomäne zuordnen (Subdomäne 3). Ein viersträngiges antiparalleles Faltblatt bildet dessen Grundstruktur, wobei die einzelnen Stränge entweder durch Schleifen oder α -helikalen Bereichen verbunden werden. Hier finden sich ebenfalls die Aminosäuren der sogenannten T-Schleife (Gln65 β –Gly73 β), der für die Bindung der Phosphatgruppen eines Nukleotids verantwortlich ist. Die T-Schleife beinhaltet ebenfalls das in den meisten archaelen und bakteriellen ACDs konservierte HK(S/T)(D/E)-Motiv (siehe dazu auch die Sequenzvergleiche in Sánchez *et al.*, 2000). Die Subdomäne C bildet ebenfalls ein antiparalleles Faltblatt, dessen sechs Stränge hauptsächlich über Helices verknüpft werden. Davon abweichend findet sich zwischen den Strängen β 9 und β 10 nur eine kurze Schleife. Die Nukleotidbindung wird durch Interaktion der Subdomänen 3 und 4 gebildet.

Von *ATP grasp*-Enzymen ist bekannt, dass diese eine Öffnungs- und Schließbewegung durchführen, um die Bindung von Nukleotiden zu gewährleisten (offen) und um die Orientierung von katalytisch wichtigen Aminosäuren zu bewerkstelligen (geschlossen) (Polekhina *et al.*, 1999). In den erhaltenen Kristallstrukturen wurde die *ckcACD1*-Komplex in verschiedenen Zuständen erhalten (siehe Tabelle 2.15). Die geschlossenste Form wurde in Kristallstruktur *ckcACD1*-B (Komplexstruktur mit Ca·AMPCP) erhalten und mit einem Öffnungswinkel von über 24° wurde die Kristallstruktur *ckcACD1*-I als die bislang am weitesten geöffnete Form kristallisiert. Vereinfacht lässt sich die Öffnungsbewegung als simple Rotation beschreiben, wobei die Rotationsachse sich als zwischen den Aminosäuren Thr35 β -Asn36 β und Glu112 β -Gly117 β befindlich vorgestellt werden kann. Aufgrund der fehlenden bzw. der vom Rauschen nicht unterscheidbaren Elektronendichte konnten oftmals Bereiche nicht gebaut oder Aminosäureseitenketten platziert werden und fehlen daher in den entsprechenden finalen Modellen.

2. Ergebnisse

Tab. 2.15.: Öffnungswinkel der β -Untereinheit in den Kristallstrukturen der *ckcACD1*.

Name	Kette B	Kette D
<i>ckcACD1-A</i>	16,6 °	9,3 °
<i>ckcACD1-B</i>	0,0 ° ^a	1,5 °
<i>ckcACD1-C</i>	10,8 °	9,3 °
<i>ckcACD1-D</i>	9,3 °	4,3 °
<i>ckcACD1-E</i>	18,2 °	12,2 °
<i>ckcACD1-F</i>	23,8 °	13,7 °
<i>ckcACD1-G</i>	10,2 °	4,6 °
<i>ckcACD1-H</i>	12,7 °	7,7 °
<i>ckcACD1-I</i>	24,6 °	10,2 °

^a Die als geschlossene Form der β -Untereinheit definierte Kette B der Kristallstruktur *ckcACD1-B* wurde als Referenz verwendet. Diese wurde daher auf einen Öffnungswinkel von 0,0 ° festgelegt. Verglichen wurde die Ausrichtung der Aminosäuren Thr35 β –Phe113 β (Subdomäne B) zu den Aminosäuren Ser3 β –Pro33 β und Gly117 β –Arg230 β (Subdomänen A und C).

2.5.3. Intramolekulare Interaktionsflächen

Der *ckcACD1*-Komplex besteht aus jeweils zwei α - und zwei β -Untereinheiten, die auf verschiedene Art miteinander in Wechselwirkung treten. So sorgen Teile der Helices $\alpha 7$, $\alpha 9$ und $\alpha 16$ der α -Untereinheiten für die Interaktion mit C- und N-terminalen Abschnitten der Stränge $\beta 6$ und $\beta 7$, der dazwischen liegenden Schleife und dem N-terminalen Teil der Helix $\alpha 6$ der β -Untereinheiten. Dabei wird eine hydrophobe Tasche ausgebildet. Eine hydrophober Kern entsteht ebenfalls an der Kontaktfläche der beiden β -Untereinheiten. Hier stehen die hydrophoben Reste der 3_{10} -Helix $n2$ mit denen der α -Helix $\alpha 5$ in Kontakt. Weiterhin beteiligt sich Phe177 β an der hydrophoben Kontaktfläche. Interessanterweise verläuft die intramolekulare Rotationsachse des *ckcACD1*-Komplexes durch die β - β -Kontaktfläche, so dass die beschriebenen Interaktionen zweimal beobachtet werden. Alle an den Interaktionsflächen beteiligten Aminosäuren sind im Kapitel 2.5.4 in den Abbildungen 2.25 und 2.26 dargestellt.

2.5.4. Nur die Subdomänen des *ckcACD1*-Komplexes sind ähnlich zu anderen Proteinen

Der Vergleich des vollständigen *ckcACD1*-Komplex (Kristallstruktur *ckcACD1*-B) mit bekannten Strukturen der Proteindatenbank mittels dem Programm DALI (Holm und Rosenstrom, 2010) erbrachte keine Ergebnisse. Jedoch zeigten die einzelnen Untereinheiten Homologie zu bereits strukturell charakterisierten Proteinen. Das Ergebnis ist in Tabelle 2.16 zusammengefasst. Insbesondere die für den molekularen Ersatz als Suchmodell verwendeten Strukturen der putativen Acetyl-Coenzym A-Synthetase aus *P. horikoshii* weisen nur geringe strukturelle Abweichungen auf. Prinzipiell sind auch die zur Superfamilie gehörenden Succinyl-Coenzym A-Synthetasen strukturell sehr ähnlich. Allerdings konnte hier nur eine strukturelle Überlagerung einzelner Subdomänen erfolgen. Geringste strukturelle Abweichung findet sich zu den archaealen Succinyl-Coenzym A-Synthetasen (SCS) des Euryarchaeoten *Methanocaldococcus jannaschii* und des Crenarchaeoten *Aeropyrum pernix*. Es wurden jedoch ausschließlich die α -Untereinheiten kristallisiert und ohne dazugehörige Publikation veröffentlicht. Sowohl strukturell als auch biochemisch charakterisiert sind die SCS aus *Thermus aquaticus* (Joyce *et al.*, 2012) und *Escherichia coli* (Fraser *et al.*, 1999; Joyce *et al.*, 2000; Fraser *et al.*, 2002) sowie der GTP-spezifische SCS aus dem Schweineherzen (Fraser *et al.*, 2000). Interessanterweise ist die Sequenzidentität in den meisten Fällen kleiner als 25%. Mit niedriger Homologie zur *ckcACD1* wurden weiterhin die humane ATP-Citrat-Lyase ACLY (Sun *et al.*, 2011) und eine vorhergesagte Acyl-Coenzym A-Synthetase aus *E. coli* (ohne Publikation) erkannt. Visuelle Inspektion der Überlagerung zeigte jedoch, dass nicht die kompletten Proteine für die Überlagerungsprozedur herangezogen wurden. Daher wurde das Programm GESAMT (Krissinel, 2012) für bessere Ergebnisse der Superpositionierung verwendet. Hohe strukturelle Verwandtschaft der Coenzym A-Bindedomäne (Subdomäne 1) findet sich zu verschiedenen (putativen) Coenzym A-Bindeproteinen. Ein Vergleich der Coenzym A-Bindemodi zwischen *ckcACD1* und diesen Proteinen zeigt ebenfalls außerordentlich gute Übereinstimmung. Geringe strukturelle Übereinstimmung der β -Untereinheit der *ckcACD1* zu verschiedenen Kinasen wurde ebenfalls gefunden. Zusammengefasst ist dies in Tabelle 2.16.

2. Ergebnisse

Tab. 2.16.: Strukturelle Überlagerung der *ckcACD1* mit der Proteindatenbank.

Beschreibung	Subdomänen- struktur ^a	<i>RMSD</i> [Å] (Anzahl Ca)	PDB- Einträge
Putative dinukleotid-bildende Acetyl-Coenzym A-Synthetasen			
<i>P. horikoshii</i> ACD α -Untereinheit	1-2-5	2,2 (430)*	2CSU
dimere phACD1 α -Untereinheit		2,9 (832)*	
<i>P. horikoshii</i> ACD β -Untereinheit	3-4	1,3 (226) [†]	1WR2
Succinyl-Coenzym A-Synthetasen			
<i>M. jannaschii</i> α -Untereinheit	1-2	2,5 (259)*	2YV1
<i>A. pernix</i> α -Untereinheit	1-2	2,5 (257)*	2YV2
<i>E. coli</i> (Fraser <i>et al.</i> , 1999; Joyce <i>et al.</i> , 2000; Fraser <i>et al.</i> , 2002)	α 1-2, β 3-4-5	2,4 (374)*	1SCU, 2SCU,
	β 3-4-5	2,5 (198) [†]	1CQJ, 1CQI, 1JKJ
<i>T. aquaticus</i> (Joyce <i>et al.</i> , 2012)	α 1-2, β 3-4-5	2,2 (198)*	3UFX
	β 3-4-5	2,5 (198) [†]	1EUD,
<i>S. scrofa</i> (Fraser <i>et al.</i> , 2000; Fraser <i>et al.</i> , 2006; Huang <i>et al.</i> , 2015)	α 1-2, β 3-4-5	2,7 (394)*	1EUC, 2FP4,
	β 3-4-5	2,8 (198) [†]	2FPG, 2FPI, 2FPP, 4XX0
weitere Acyl-Coenzym A-Synthetasen			
<i>H. sapiens</i> ATP-Citrat-Lyase (Sun <i>et al.</i> , 2010; Sun <i>et al.</i> , 2011)	3-4-5-1-2-AS	2,8 (374)*	3MWE, 3PFF
putative <i>E. coli</i> Acyl-Coenzym A- Synthetase	1-2-5	3,9 (530)*	3DMY
		3,3 (295)*	
Identifizierte Coenzym A-Bindeproteine			
Hypothetisches Proteins PH1109 aus <i>P. horikoshii</i> (PDB-Eintrag 2D59)(Hiyama <i>et al.</i> , 2006), Pfu-723267-001 aus <i>P. furiosus</i> (PDB-Eintrag 1Y81)(keine Publikation), TT1466 aus <i>T. thermophiles</i> (PDB-Eintrag 1IUK)(Wada <i>et al.</i> , 2003)			
Identifizierte ATP <i>grasp</i>-Proteine mit struktureller Ähnlichkeit			
<i>E. coli</i> Carbamoylphosphate-Synthetase (PDB-Eintrag 1KEE)(Miles <i>et al.</i> , 2002), <i>T. maritima</i> Phosphoribosylamin-Glycin-Ligase (PDB-Eintrag 1VKZ)(ohne Publikation), <i>S. aureus</i> Biotin-Carboxylase (PDB-Eintrag 2VPQ)(Mochalkin <i>et al.</i> , 2008), die Synapsine aus Ratte und Rind (PDB-Einträge 1PK8 und 1AUX)(Brautigam <i>et al.</i> , 2004; Esser <i>et al.</i> , 1998) sowie dem Menschen (PDB-Eintrag 2P0A)(ohne Publikation), Vancomycin-Resistenz-vermittelndes Protein VanA (PDB-Eintrag 3SE7)(D'Costa <i>et al.</i> , 2011), <i>X. oryzae pathovar oryzae</i> D-Alanin-D-Alanin-Ligase A (PDB-Eintrag 3RFC)(ohne Publikation), <i>L. mesenteroides</i> D-Alanin:D-Lactat-Ligase (LMDDL2) (PDB-Eintrag 1EHI)(Kuzin <i>et al.</i> , 2000), <i>E. coli</i> Glycinamid-Ribonucleotid-Transformylase (PDB-Eintrag 1EZ1)(Thoden <i>et al.</i> , 2000a)			
Identifizierte Kinasen mit struktureller Ähnlichkeit			
<i>H. sapiens</i> Inositol-1,3,4-Trisphosphat-5/6-Kinase (PDB-Eintrag 2Q7D)(Chamberlain <i>et al.</i> , 2007) und Diphosphoinositol-Pentakisphosphat-Kinase 2 (PDB-Eintrag 3T9C)(Wang <i>et al.</i> , 2012)			
* Überlagerung mit der α -Untereinheit; [†] Überlagerung mit der β -Untereinheit			

2.6. *ckcACD1* bindet seine Substrate vergleichbar zu anderen Mitgliedern der Superfamilie

Mit der Kristallisation der *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* ACD1 wurde der erste Schritt in Richtung der Charakterisierung der enzymatischen Grundlage der Acetyl-Coenzym A-Synthetasen (NDP-bildend) zurück gelegt. Es wurde versucht, einzelne Abschnitte des vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus (in Kurzform in Abbildung 2.17 dargestellt) strukturell zu untersuchen. Dazu wurden Substratmoleküle durch Kokristallisation in das Protein eingebracht oder es wurden bereits vorgeformte Kristalle mit den einzubringenden Substanzen inkubiert (Tränkungsversuche). Um phosphoryliertes Protein zu erhalten, wurde dieses vor der Kristallisation mit Acetyl-Coenzym A und Phosphat oder Adenosintriphosphat zur Reaktion gebracht. Die Bindungsstellen bzw. Orte des Reaktionsgeschehens werden in Analogie zur *E. coli* Succinyl-Coenzym A-Synthetase bezeichnet (Fraser *et al.*, 2002). Die Bindungstasche von Coenzym A und das Reaktionszentrum der Phosphorylierung von His254 α durch die α -Untereinheit wird daher als Reaktionszentrum *site I*, die Bindungsstelle der Phosphohistidinschleife und der Nukleotide durch die β -Untereinheit als Reaktionszentrum *site II* benannt. Da das Protein als $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer aufgebaut ist, finden sich in einem Molekül jeweils zwei gleiche α - bzw. β -Untereinheiten. Bindungsstellen werden jedoch oftmals durch benachbarte Untereinheiten gebildet. Um diese voneinander unterscheiden zu können, soll die folgende Konvention genutzt werden: gekennzeichnet wird die korrespondierende Untereinheit mit einem Apostroph. So beschreibt beispielsweise His254 α das Histidin His254 α der einen α -Untereinheit und His254 α' die entsprechende Aminosäure der zweiten α -Untereinheit.

2.6.1. Coenzym A und Acetyl-Coenzym A

Coenzym A wird in einer stark ausgestreckten Form ausschließlich durch Subdomäne 1 gebunden (Kristallstrukturen *ckcACD1-A*, *ckcACD1-B*, *ckcACD1-C*, *ckcACD1-E*, *ckcACD1-I*). Hierbei zeigt die Sulfhydrylgruppe in Richtung der Stelle der Histidinphosphorylierung (Reaktionszentrum *site I*). Die Adeningruppe interagiert hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen mit der Proteinkette, eine weitere Ausrichtung des Purins erfolgt durch Wechselwirkungen mit zwei Wassermolekülen (siehe Abbildung

2. Ergebnisse

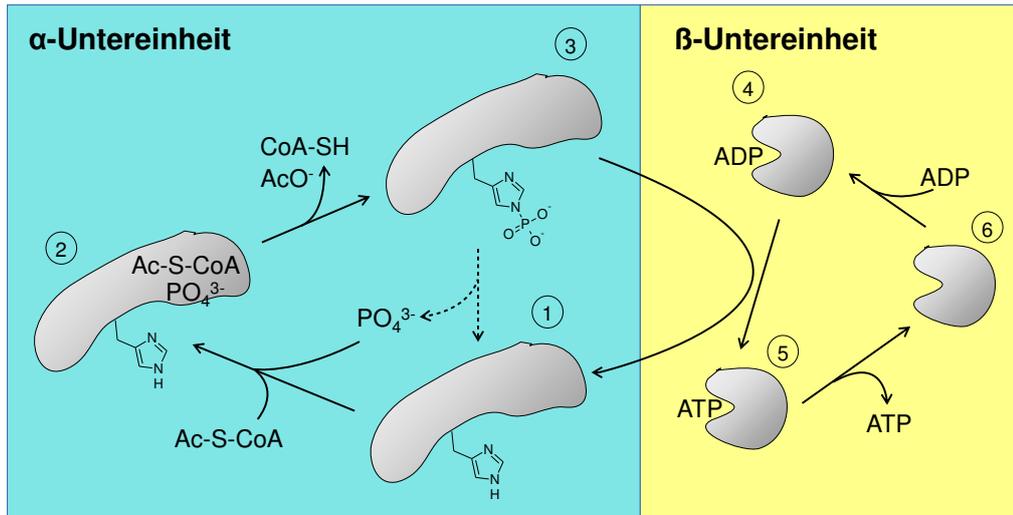


Abb. 2.17.: Schematische Darstellung der durch die *ckcACD1* katalysierten Reaktion. Ausgehend vom Apo-Protein (1) erfolgt die Bindung jeweils der Substratmoleküle Acetyl-Coenzym A (Ac-S-CoA) und Phosphat (PO_4^{3-}) (1→2). Unter Abspaltung von Acetationen (AcO^-) erfolgt die Phosphorylierung des His_{254} der α -Untereinheit (2→3). Es kommt zur Übertragung der Phosphorylgruppe auf die β -Untereinheit, wobei dieses auf ein Dinukleotid (beispielsweise ADP) übertragen wird (4→5). Das gebildete Trinukleotid (dementsprechend ATP) wird als Energieäquivalent für die Zelle zur Verfügung gestellt (5→6). Befindet sich jedoch kein Dinukleotid in der Bindetasche der β -Untereinheit könnte die Amidatbindung des Phosphohistidin auch durch Hydrolyse gespalten werden (3→1). In diesem Schritt wird demzufolge keine Energie frei. Die hier dargestellten Reaktionspfeile deuten die bevorzugte Reaktionsrichtung der *ckcACD1* an. Ablaufen kann die Reaktion jedoch auch in Gegenrichtung. Umgesetzt wird dann ATP, HS-CoA sowie AcO^- zu ADP und Ac-S-CoA.

2.6. *ckcACD1* bindet seine Substrate vergleichbar zu anderen Mitgliedern der Superfamilie

2.18d). Ein Wassermolekül verbrückt den Carbonylsauerstoff der Aminosäure Lys79 α mit der C6-Aminogruppe des Heterozyklus, das andere Wasser steht in Kontakt mit dem Carbonylsauerstoff des Pro59 α und dem N1 des Adenins. Beide Reste sind in anderen ACDs nicht konserviert. Da deren Beteiligung an der Bindung des Adenins nur über das Proteinrückgrad erfolgt und die Seitenketten nicht dazu beitragen, ist dieser Sachverhalt jedoch wenig erstaunlich. Die Ribosegruppe zeigt in der Kristallstruktur keine direkten Wechselwirkungen mit dem Protein oder umgebenden Wassermolekülen. Dessen Konformation C2'-*endo* (²E) wird jedoch durch eine starke Wasserstoffbrücke (Abstand 2,6 Å der beiden Sauerstoffatome) zwischen dem 2'-Hydroxyl und einem Sauerstoff der 3'-Phosphatgruppe stabilisiert. Letzteres wird über mehrere H-Brücken fixiert. So interagieren die Hydroxylgruppe der Seitenkette von Ser19 α , das N6 von Asn46 α sowie die ζ -Aminofunktion von Lys24 α direkt mit den zwei verbleibenden Sauerstoffen. Des Weiteren finden sich noch einige Wassermoleküle, die ebenfalls an der Ausrichtung dieser Phosphatgruppe beteiligt sind. Insbesondere die Aminosäuren Ser19 α und Asn46 α sind in der Sequenz anderer ACDs stark konserviert, so das anzunehmen ist, dass dieser Bindungsmodus strukturell konserviert ist. Der Seitenkette der Aminosäure Lys24 α kommt jedoch eine Doppelrolle zu. Deren Aminofunktion steht ebenfalls in Wechselwirkung mit einem Sauerstoff der α -Phosphatgruppe. Im Gegensatz dazu wird das β -Phosphat nur indirekt über zwei Wasser gebunden, die Wasserstoffbrücken zur Hydroxylgruppe des Ser74 α sowie dessen Carbonylsauerstoff, zum Amin der Amidbindung des Gly26 α sowie Ile25 α und zum Carbonylsauerstoff der Aminosäuren Gly17 α ausbilden. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der Wechselwirkung der Pantoinsäure. Nur der Carbonylsauerstoff bildet eine Wasserstoffbrücke zum Stickstoff des Proteinrückgrads der Aminosäure Ser100 α aus. Auch hier wirkt ein Wassermolekül als Vermittler zwischen dem Protein und Ligand. Durch H-Brücken zum Carbonylsauerstoff des Ser100 α und zum Stickstoff des Amids der Aminosäure Ser77 α sowie eine schwache Wechselwirkung mit dessen Hydroxylgruppe bildet dieses einen stabilen Anker für die α -Hydroxylgruppe der Pantoinsäure. Eine sehr schwache Interaktion des O γ der Aminosäure Ser100 α mit dem Amid zwischen Pantoinsäure und Cysteamin und Wasserstoffbrücken der Carbonylfunktionen der Amidbindungen der Aminosäuren Ile98 α und Ile130 α sorgen für die Ausrichtung des Cysteamins. Stabilisiert wird es weiterhin durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Phe144 α . Wechselwirkungen der Thiolgruppe mit dem Protein wurden in allen erhaltenen Kristallen nicht beobachtet. Überlagert man die Struktur des Apoproteins *ckcACD1-F* mit denen mit gebundenem Coenzym A zeigen sich nur kleine Unterschiede in der Umgebung der Bindetasche. Mit der Bindung des Substrats nähert sich die β 2- β 3-Schleife der α -Untereinheit

2. Ergebnisse

dem Substrat und bringt damit insbesondere die Aminosäure Pro47 α um 0,8 Å näher an die Adeningruppe. Zusammen mit der β 1- α 2-Schleife, die ebenfalls ausgelenkt wird, sorgt diese Bewegung für die stärkere Fixierung des Coenzym. So wird ebenfalls die Seitenkette der Aminosäure Lys24 α in Position zur Interaktion mit der α - und β -Phosphatgruppe gebracht. Die SCS aus dem Schwein *ssSCS* hat an korrespondierender Stelle ebenfalls ein Lysinrest Lys26 α , wobei hier die Seitenkette nicht an der Interaktion mit Coenzym A beteiligt ist (Huang *et al.*, 2015). Bei der *ecSCS* findet sich ein Serinrest Ser18 α .

In der Kristallstruktur *ckcACD1-E* wurde zusätzliche Elektronendichte im Bereich der Thiolgruppe eines der zwei durch die *ckcACD1* gebundenen Coenzym A-Moleküle beobachtet, die aufgrund zu geringer interatomere Abstände nicht durch koordinierte Wassermoleküle o. ä. erklärt werden konnte. Dem Kristallisationstropfen war Acetyl-Coenzym A zugesetzt, so wurde eine kovalent gebundene Acetylgruppe in die Dichte eingepasst. Dargestellt ist dies in Abbildung 2.18b. Aufgrund seiner planaren Struktur kann jedoch nicht eindeutig die Ausrichtung der Methyl- bzw. Carbonylgruppe bestimmt werden. Es wurde daher die nähere chemische Umgebung untersucht. Letztendlich wurde die Methylgruppe in Richtung eines durch die Seitenketten der Aminosäuren Phe131 α , Phe144 α , Ala162 α , Ile165 α , Met355 α und Thr384 α ' erzeugten hydrophoben Bereichs angeordnet. Die Acetylgruppe kommt co-planar zur Peptidbindung zwischen den Aminosäuren Gly161 α und Ala162 α mit einem Abstand von etwa 4 Å zum liegen (siehe Abbildung 2.18e). Dies ist im Bereich typischer π - π -Wechselwirkungen (Deane *et al.*, 1999).

2.6.2. Phosphationen

Es wurden Tränkungsexperimente von Kristallen der *ckcACD1* mit Phosphationen durchgeführt. Dazu wurden die Kristalle in Gefrierschutzlösung, die zusätzlich mit Dinatriumhydrogenphosphat versetzt war, inkubiert. Es konnten Diffraktionsdaten bis zu einer Auflösung von etwa 2 Å aufgenommen werden (Kristallstrukturen *ckcACD1-G* und *ckcACD1-I*). In den Elektronendichten konnten die Bindungsstellen von Phosphationen identifiziert werden. Diese befinden sich an den Kontaktflächen beider α -Untereinheiten im Bereich der Aminotermini der Helices α 5 und α 11'. Dort sorgt das positive Helix-Dipolmoment für die Stabilisierung der negativen Ladung der Phospha-

2.6. *ckcACD1* bindet seine Substrate vergleichbar zu anderen Mitgliedern der Superfamilie

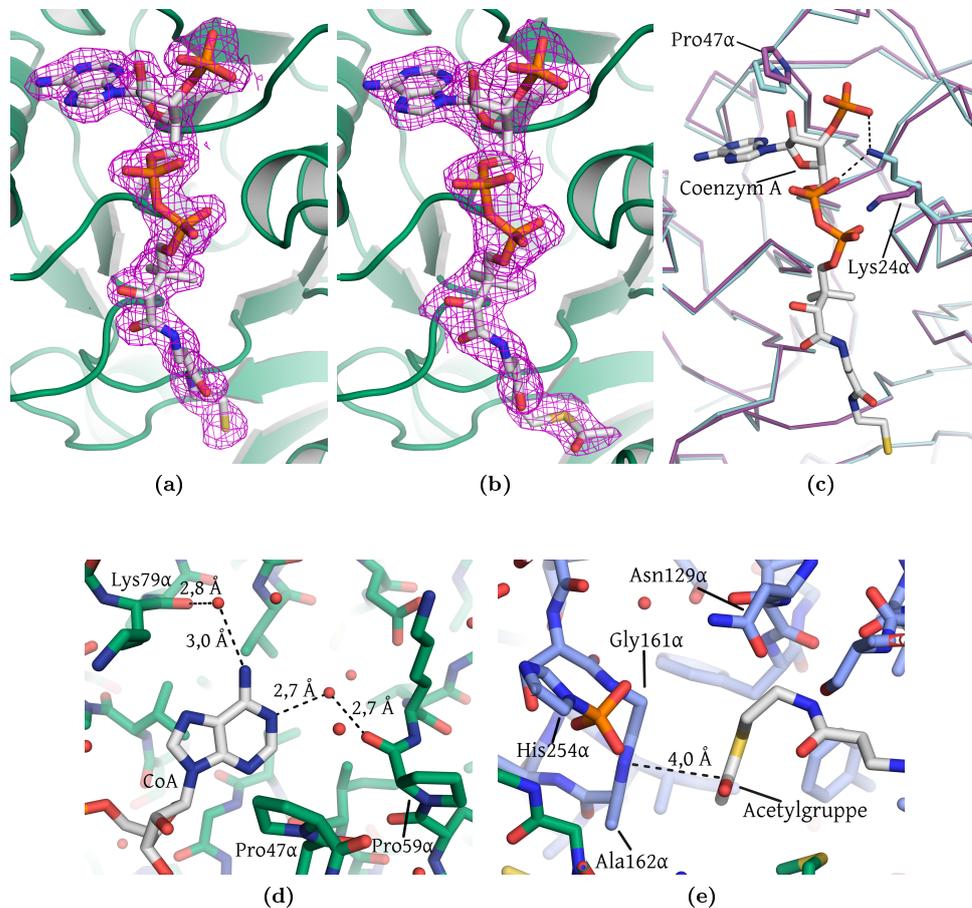


Abb. 2.18.: Bindungsmodus von Coenzym A und Acetyl-Coenzym A. Darstellung von ($2F_o - F_c$, SAomit, α_c , SAomit) *simulated annealing omit*-Karte (Konturierung σ -Niveau 1,0) der Kofaktoren (a) Coenzym A in der Struktur *ckcACD1*-A und (b) Acetyl-Coenzym A in der Struktur *ckcACD1*-E. c) Strukturelle Unterschiede der Coenzym A-Bindedomäne nach Substratbindung. Violett dargestellt ist das Apoenzym (*ckcACD1*-F), in blau gefärbt ist die *ckcACD1* mit gebundenem Coenzym A (*ckcACD1*-A). Insgesamt ist nur ein geringer struktureller Unterschied in den Untereinheit sichtbar. Eine deutliche Bewegung erfahren allerdings Pro47 α und Lys24 α . Während Ersteres durch den hydrophoben Charakter der Nucleobase des Coenzym A herangezogen wird, tritt letzteres über seine ϵ -Aminogruppe mit Sauerstoffen der 5'- α - und 5'- β -Phosphate in Wechselwirkung. d) Orientierung der Adenosingruppe von Coenzym A erfolgt durch die vermittelnde Interaktion von Wassermolekülen (rote Sphären) mit den Hauptkettencarbonylgruppen der Aminosäuren Pro59 α bzw. Lys79 α . e) Ausrichtung der Acetylgruppe von Acetyl-Coenzym A (Kristallstruktur *ckcACD1*-E). Mit einer gestrichelten Linie ist zudem der Abstand von 4,0 Å des Carbonylkohlenstoffs der Acetylgruppe zum Carbonylnitrogen der Peptidbindung zwischen Gly161 α und Ala162 α gezeigt.

2. Ergebnisse

tionen. Beide Helices sollen im Einklang mit der Literatur im Folgenden als *power helices* bezeichnet werden (Wolodko *et al.*, 1994). Mehrere Wasserstoffbrücken zu den Aminofunktion der Peptidbindungen der Aminosäuren Gly161 α und Ala162 α sowie Gly308 α' und Gly309 α' sind für die Koordinierung der Ionen verantwortlich. Es findet sich ebenfalls eine starke Wasserstoffbrücke (2,6 Å) zur Hydroxylgruppe der Seitenkette der Aminosäure Ser160 α . Das Phosphation koordiniert zusammen mit der Carboxylgruppe der Aminosäure Asp351 α' vermutlich ein Natriumion (*ckcACD1-G*) bzw. ein Magnesiumion (*ckcACD1-I*). Beide Metallionen besitzen eine verzerrte quadratisch-pyramidale Koordinationsphäre. In die Elektronendichte der der Struktur *ckcACD1-G* konnten allerdings nur drei Wassermoleküle platziert werden. Die vierte Koordinationsstelle erscheint nicht bzw. sehr schwach besetzt zu sein. Eine *simulated annealing omit*-Elektronendichtekarte deutet darauf hin, dass möglicherweise ein Wassermolekül an der freien Stelle gebunden wird. Ein weiteres Metallion wird zwischen dem Phosphation und dem N ϵ der Imidazoleseitenkette des His254 α komplexiert. Die positive Ladung des Ions wird elektrostatisch durch die Carboxylatseitenkette des Glu213 α stabilisiert. Auch in der *ecSCS* und der GTP-spezifischen *ssSCS* wird Phosphat in einer vergleichbaren Position gebunden (Joyce *et al.*, 2000; Fraser *et al.*, 2000). Die N-Termini zweier äquivalenter Helices kompensieren auch hier die negative Ladung der Anionen. Es finden sich jedoch keine zusätzlich durch Phosphat gebundenen Metallionen.

2.6.3. Phosphoryliertes His254 α

Gereinigtes *ckcACD1* wurde in einen Magnesium-reduzierten Reaktionspuffer überführt. Diese Lösung wurde mit 1 mM Acetyl-Coenzym A, 10 mM Na₂HPO₄ und 5 mM NaOAc versetzt und für eine Minute bei 75 °C inkubiert. Das phosphorylierte Protein wurde direkt im Anschluß zur Kristallisation angesetzt. Diffraktionsdaten bis zu einer maximalen Auflösung von 2,8 Å wurden von einem Kristall gesammelt (Kristallstruktur *ckcACD1-E*). In die daraus berechnete Elektronendichtekarte konnte der komplette Bereich der oftmals ungeordneten Phosphohistidinschleife (Aminosäuren Gly242 α bis Val262 α) der *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* ACD1 gebaut werden. Im Bereich der Aminosäure His254 α wurde darüberhinaus positive Differenzelektronendichte beobachtet. Interpretiert wurde dies als ein am ϵ -Stickstoff der Imidazoleseitenkette befindlicher Phosphatrest. Der Phosphohistidinrest soll im Folgenden gemäß der No-

2.6. *ckcACD1* bindet seine Substrate vergleichbar zu anderen Mitgliedern der Superfamilie

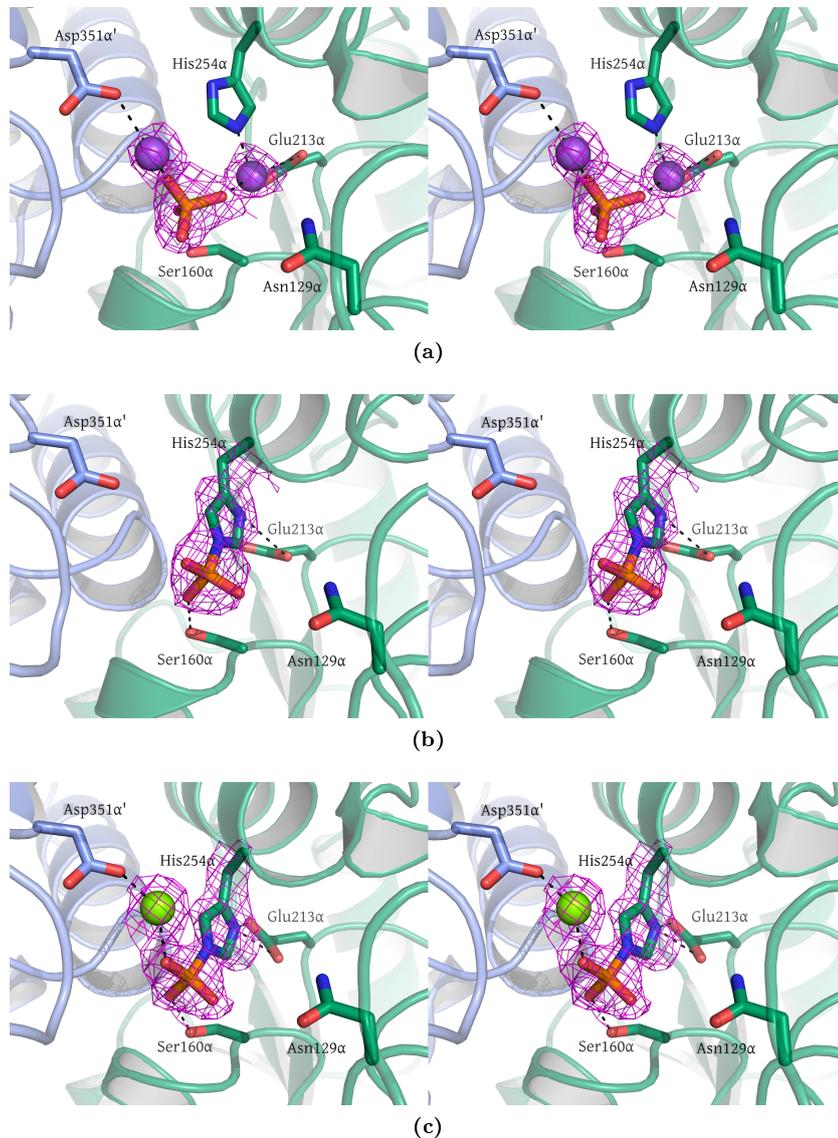


Abb. 2.19.: Phosphatbindung und Phosphorylierung von His254α. (a) Die Bindung von Phosphationen PO_4^{3-} durch beide α -Untereinheiten (grün bzw. blau eingefärbt) in *wall eye*-Stereo in der Kristallstruktur *ckcACD1*-G. Phosphorylierte *ckcACD1* wurde durch Reaktion mit Ac-CoA und Phosphat (b) sowie ATP (c) erhalten. Gezeigt sind *wall eye*-Stereoabbildungen der Bindungsmodi von τ - PO_3 -His254α durch die α -Untereinheiten der *ckcACD1*. Einzelne Aminosäuren sind als Stäbe dargestellt, hierbei haben die Kohlenstoffatome die Farbe der Untereinheiten (grün bzw. blau). Folgendes Farbschema wurde weiterhin verwendet: Stickstoff blau, Sauerstoff rot, Phosphor orange, Magnesiumionen hellgrün und Natriumionen lila. In magenta wurde *simulated annealing omit*-Elektronendichte mit einer Konturierung von 1σ abgebildet.

2. Ergebnisse

menklatur der IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) als Tele-Phosphohistidin bzw. τ -Phosphohistidin bezeichnet werden.

Stabilisiert wird die Konformation des phosphorylierten Imidazoleseitenkette des His254 α durch eine Wasserstoffbrücke (Abstand 2,7 Å) zur Carboxylgruppe der Seitenkette des Glu213 α , das dadurch eine ideale Geometrie für die Phosphorylierungsreaktion ermöglicht. Die Phosphorylgruppe befindet sich weiterhin am N-terminalen Ende zweier α -Helices, $\alpha 5$ bzw. $\alpha 11'$. Hierbei wechselwirkt das positive Dipolmoment der Helices mit der negativen Ladung der Sauerstoffatome der Phosphatgruppe. Neben den elektrostatischen Effekten lassen sich noch schwache Wasserstoffbrücken zum O γ des Ser160 α und den Hauptkettenstickstoffen des Gly161 α sowie Gly308 α' beobachten. Der Abstand des Phosphors des Phosphohistidins zum Schwefel von Coenzym A beträgt 7,0 Å.

In einem weiteren Versuch wurde 10 mM ATP dem Protein zugesetzt und diese Lösung für zwei Minuten bei 75 °C zur Reaktion gebracht. Ansätze zur Kristallisations wurden bei einer Temperatur von 5 °C durchgeführt. Einer der erhaltenen Proteinkristalle streute das Röntgenlicht bis zu einer Auflösung von maximal 2,1 Å. Mit dem Datensatz konnte ebenfalls ein Model der *ckcACD1* mit phosphoryliertem His254 α gebaut werden (Kristallstruktur *ckcACD1-H*). Auch hier ist die Carboxylgruppe des Glu213 α für die Abstraktion des am N δ befindlichen Protons der Imidazoleseitenkette des His254 α durch eine Wasserstoffbrücke verantwortlich. Es findet sich ebenfalls eine starke Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe des Ser160 α . Zusätzlich wird durch eines der Sauerstoffatome der Phosphorylgruppe ein Mg²⁺-Ion komplexiert. Interessanterweise steht das Metallion nicht direkt mit der Carboxylgruppe der Seitenkette des Asp351 α' in Verbindung. Der Kontakt wird vielmehr über ein Wassermolekül vermittelt. Gleichzeitig bewirkt dieser Komplex eine weitere Annäherung der Phosphorylgruppe an das Reaktionszentrum *site I* und führt zur Stabilisierung der Phosphorylgruppe durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu den Aminogruppen der Peptidbindungen zwischen den Aminosäuren Ser160 α -Gly161 α , Gly161 α -Ala162 α , Gly307 α' -Gly308 α' und 308 α' -Gly309 α' . Insbesondere die Aminosäuren Ser160 α und Asp351 α' sind in der Superfamilie der Acyl-Coenzym A-Synthetasen hochkonserviert. In einigen Fällen ist Ser160 α gegen Threonin ausgetauscht (Sánchez *et al.*, 2000), eine Aminosäure mit vergleichbaren Eigenschaften der Seitenkette.

2.6.4. Adenosindiphosphat

Bindung eines ADP-Analogs in der geschlossenen *ATP grasp*-Domäne

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit Kristallstrukturen der *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* ACD1 mit Adenosindinukleotiden erhalten. Deren Bindungsstelle in der *ATP grasp*-Domäne wies jedoch auch nach Bindung des Nukleotids eine hohe Flexibilität auf und war daher in der Elektronendichte oftmals schlecht definiert. Mit der Struktur *ckcACD1*-B wurde die *ATP grasp*-Domäne der *ckcACD1* in einer geschlossenen Form mit gebundenem Adenosin-5'- α,β - μ -methylendiphosphat (AMPCP) erhalten. AMPCP ist ein nicht-hydrolysierbares ADP-Analog, das eine Methylengruppe anstelle der Phosphoanhydritbindung zwischen α - und β -Phosphat besitzt. Die nachfolgende Beschreibung bezieht sich auf diese Kristallstruktur.

AMPCP wird von der β -Untereinheit in einer Tasche, gebildet von den Subdomänen B und C (bezüglich der Nomenklatur der *ATP grasp*-Domäne) bzw. Subdomänen 3 und 4 (bezüglich der Nomenklatur der *E. coli* SCS), gebunden (siehe Abbildung 2.20). Der Nukleosidteil wird durch hydrophobe Wechselwirkungen der Aminosäuren Val58 β , Val77 β , Phe113 β und Val223 β eingebettet, weiterhin finden sich verschiedene Wasserstoffbrückenbindungen zwischen AMPCP und der β -Untereinheit. So akzeptiert das N1 des Adenyls eine Wasserstoffbrücke zum Stickstoff der Hauptkette des Restes Ala114 β . Gleichzeitig interagiert N6 über Wasserstoffbrücken mit dem O ϵ von Gln111 β und des Carbonylsauerstoffs von Rest Glu112 β mit der β -Untereinheit der *ckcACD1*.

Die Seitenkette der in den meisten ACDs konservierten Aminosäure Lys60 β sorgt für die Ausrichtung des Nukleotids durch Wechselwirkung mit dem N7-Atom des Adenins, gleichzeitig befindet sie sich in einer Wasserstoffbrücke zum Sauerstoff O2A des α -Phosphats. Diese duale Rolle für den äquivalenten Rest Lys46 β wird ebenso in der Struktur der *ecSCS* im Komplex mit ADP beobachtet. Die Phosphatgruppen interagieren ebenso mit den Seitenketten der Aminosäuren Lys69 β und Ser70 β sowie der Aminofunktion des Proteinrückgrades des Ser70 β . Die aufgezählten Aminosäuren zählen zum Fingerabdruckmotiv der *ATP grasp*-Domäne (Fawaz *et al.*, 2011).

2. Ergebnisse

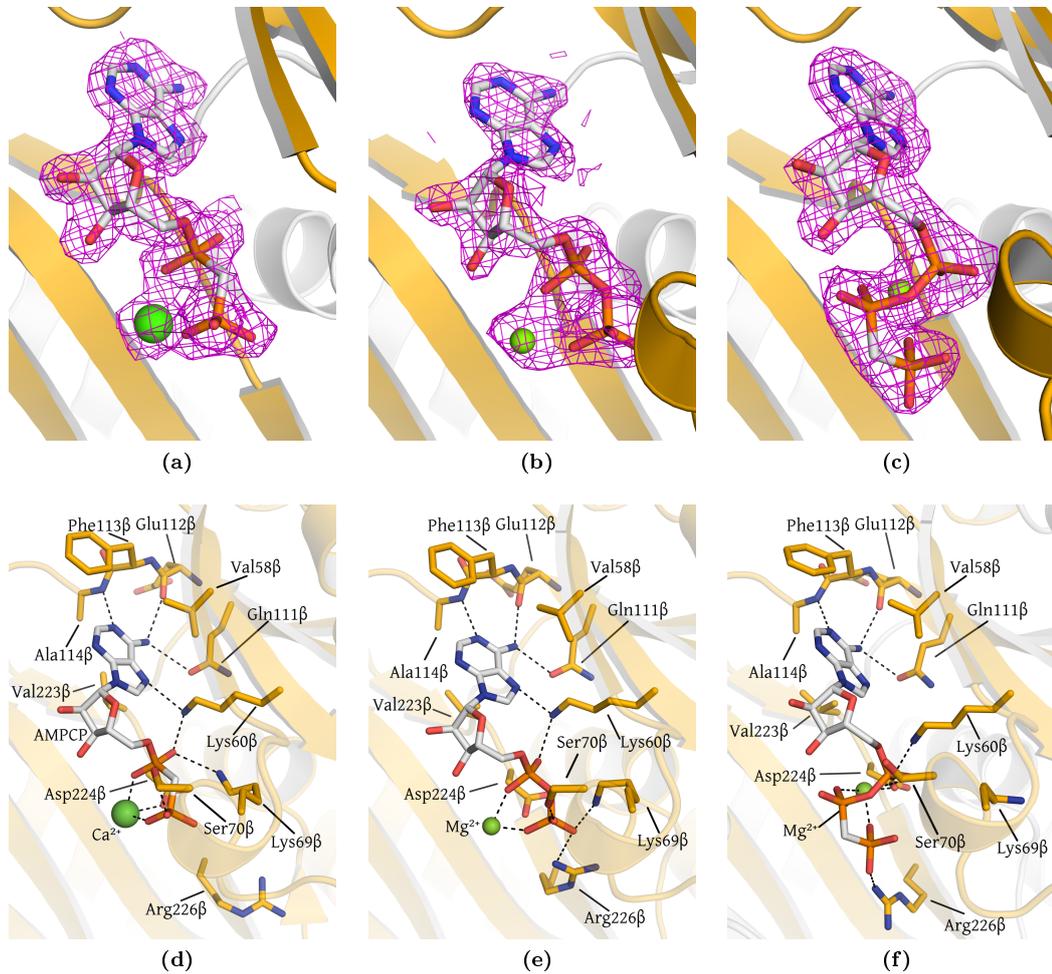


Abb. 2.20.: Nukleotidbindung durch die *ATP grasp*-Domäne. Gitterdarstellung von *simulated annealing omit*-Elektronendichte (Konturierungslevel $1,0\sigma$) und des Interaktionsmusters mit der β -Untereinheit des *ckcACD1*-Komplexes des nicht-hydrolysierbaren ADP-Analogs AMPCP in Kristallstruktur *ckcACD1-B* (a) bzw. (d), des ADP in Kristallstruktur *ckcACD1-D* (b) bzw. (e) und des nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogs AMPCP in Kristallstruktur *ckcACD1-C* (c) bzw. (f). Zur Klarheit wurden in Abbildung (d) die Reste Val66 β -Val72 β der T-Schleife nicht gezeigt.

2.6. *ckcACD1* bindet seine Substrate vergleichbar zu anderen Mitgliedern der Superfamilie

Über jeweils ein Sauerstoffatom der α - und der β -Phosphatgruppe komplexiert AMPCP zudem ein Ca^{2+} -Ion. Das pentagonal-bipyramidal koordinierte Kation akzeptiert weiterhin Elektronenpaare der Carboxylgruppe des Asp224 β , des Hauptkettencarbonyls der Aminosäure Asn211 β und drei Wassermolekülen. Die Bindungslängen der Sauerstoffatome der Phosphatgruppen zum Ca^{2+} betragen 2,3 Å und sind damit kürzer als die Bindungen zu den weiteren Liganden, die sich im Bereich zwischen 2,5 Å und 2,6 Å befinden. Der C3'-Pucker (${}^3\text{T}_2$ -Pucker) des Riboserings wird nicht durch direkte Wechselwirkungen mit dem Protein aufrecht erhalten, sondern durch eine Wasserstoffbrücke zwischen O3' der Ribose und einem Wasser der äquatorialen Koordinationsphäre des durch AMPCP komplexierten Ca^{2+} -Kations sowie einer schwachen H-Brücke des O2' zum O ϵ der Aminosäure Glu119 β .

Bindung von ADP in geöffneten Formen der *ATP grasp*-Domäne

Mit den Kristallstrukturen *ckcACD1-D*, *ckcACD1-G* und *ckcACD1-H* konnten weitere Einblicke in die Dynamik der Dinukleotidbindung gewonnen werden. In diesen Strukturen komplexiert *ckcACD1* über die β -Untereinheiten ADP, jedoch weisen diese einem Öffnungswinkel der *ATP grasp*-Domäne zwischen 4° und 13° auf (vgl. Tabelle 2.15). Mit der Bewegung verändert sich auch die Umgebung der Bindestelle des Nukleotids. Mit größerem Öffnungswinkel zeigt sich eine deutliche Verschiebung des ADP-Moleküls. Hierbei erscheint es, als würde das Dinukleotid aus der Bindungstasche gezogen (siehe Abbildung 2.21b). Ursächlich sind vermutlich die starken Wechselwirkungen der Phosphatgruppen mit der T-Schleife (siehe Abbildung 2.21a). Interessanterweise bleiben die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Wechselwirkungen des Dinukleotids mit der geschlossenen β -Untereinheit trotzdem nahezu identisch. Es findet sich außerdem zusätzlich eine Wasserstoffbrücke von der Aminofunktion der Seitenkette des Lys69 β zum Sauerstoff der Phosphoranhydritbindung zwischen dem α - und β -Phosphat des ADPs. Diese Wechselwirkung ist im Ca -AMPCP-Komplex nicht vorhanden, da die an der gleichen Stelle befindliche Methylengruppe keine Wasserstoffbrücke akzeptieren kann. Mit der Öffnungsbewegung der Subdomäne B entfernen sich die Phosphatreste von der als fix zu betrachtenden Subdomäne C. Das durch ADP komplexierte Magnesiumion verbleibt am Dinukleotid. Daraus resultiert zusätzlich der Verlust der Koordination des Magnesiums durch die Carboxylgruppe des Asp224 β und der Carbonylgruppe der Peptidbindung der Aminosäure Asn211 β .

2. Ergebnisse

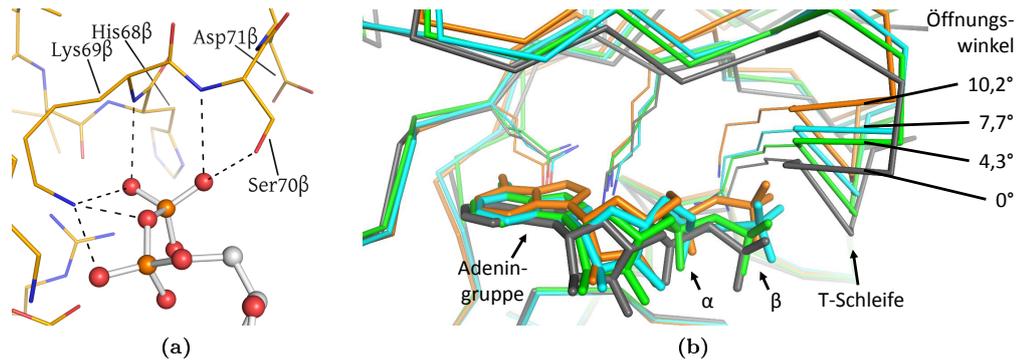


Abb. 2.21.: Öffnungsbewegung der *ATP grasp*-Domäne verursacht eine Änderung in der Bindung von ADP. (a) Die β -Phosphatgruppe von ADP interagiert mit den Resten der T-Schleife (Lys60 β -Val75 β). Mit gestrichelten Linien wurden Wasserstoffbrückenbindungen eingezeichnet, die eine sehr starke Bindung an des β -Phosphats an das Protein ermöglichen. Gezeigt wurde die Kristallstruktur *ckcACD1-D*. (b) Durch die Bewegung der Liddomäne erfolgt eine Änderung des Bindungsmodus von ADP. Dargestellt ist eine Überlagerung der *ATP grasp*-Domänen der Kristallstrukturen *ckcACD1-B* (grau), *ckcACD1-D* (grün), *ckcACD1-H* (blau) und *ckcACD1-G* (orange).

2.6.5. Adenosintriphosphat

Versuche zur Co-Kristallisation der *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* ACD1 mit ATP waren nicht erfolgreich. Es zeigte sich zwar im Bereich der für die *ATP grasp*-Domäne beschriebenen Nukleotidbindestelle zusätzliche Elektronendichte, die jedoch nicht für die sichere Platzierung eines ATP-Moleküls genutzt werden konnte.

Dafür gelang es eine Kristallstruktur *ckcACD1-C* mit Adenosin-5'- β,γ,μ -methylentriphosphat (AMPPCP) zu erhalten. In diesem Kristall wurde zusätzlich eine Umlagerung des Phosphohistidin-tragenden Bereichs beobachtet. Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass die Interaktion von AMPPCP mit der *ATP grasp*-Domäne der *ckcACD1* dadurch beeinflusst wird. Verglichen mit den im vorherigen Kapitel beschriebenen Bindungsmodi der Dinukleotide ist der Interaktionsmodus des Nukleosids von AMPPCP mit dem von ADP bzw. AMPCP nahezu identisch. Jedoch sind sowohl das Adenin als auch die Ribose um etwa 1-2 Å aus der Bindetasche verschoben. Weiterhin ist Lys60 β bei gebundenem AMPPCP nicht mehr im Abstand für eine Wasserstoffbrücke zum Stickstoff N7 der Nukleobase. Auch das β -Phosphat ist in Richtung des umgebenden Solvents herausgedreht, was mit einer Änderung des Dihedralwinkels C5'-O5'-PA-O3A um etwa 130° einhergeht. Abschließend beträgt der Winkel zwischen den in die aufgespannte Ebene hereinragenden Sauerstoffatomen nahezu 90°. Zwischen den in die aufgespannte Ebene hereinragenden Sauerstoffatomen

2.7. *ckcACD1* überbrückt eine Lücke von 51 Å während des enzymatischen Zyklus

der Phosphatgruppen und Asp224 β wird ein Mg²⁺-Ion gebunden. Das γ -Phosphat interagiert ebenfalls mit der Guanidylgruppe der Aminosäure Arg226 β .

2.7. *ckcACD1* überbrückt eine Lücke von 51 Å während des enzymatischen Zyklus

Nach der Phosphorylierung des His254 α am Reaktionszentrum *site I* muss dieser Rest zur Übertragung der Phosphatgruppe in räumliche Nähe des durch die β -Untereinheit gebundene Dinukleotids gebracht werden. Die Entfernung zwischen den Phosphatgruppen (d. h. τ -Phospho-His254 α und ADP) beträgt etwa 47 Å. Ein Transfer der Phosphatgruppe zwischen der α - und β -Untereinheit erfordert daher eine bedeutende Umlagerung innerhalb des Proteins. Im Fall der *E. coli* SCS wurde bereits ein „*swinging loop*“-Mechanismus postuliert (Joyce *et al.*, 2000), der bisher strukturell nicht beschrieben werden konnte. Mit dieser Arbeit kann erstmals eine entsprechende Umlagerung experimentell gezeigt werden.

In der Kristallstruktur *ckcACD1-C* kann die Interaktion dieser Schleife mit der β -Untereinheit beobachtet werden. Das N ϵ der Seitenkette des His254 α nähert sich bis auf 4,3 Å dem γ -Phosphat des durch das Protein gebundene ATP-Analog AMPPCP. Während dieser Umlagerung vollzieht sich auch eine Umformung der Sekundärstruktur, so dass nicht von einem *swinging loop* gesprochen werden sollte. Es wird daher im Folgenden der Terminus „Phosphohistidinsegment“ verwendet. Das Phosphohistidinsegment in Richtung Reaktionszentrum *site I* ist aufgebaut aus einer α -Helix bestehend aus den Aminosäuren Glu245 α bis Gly260 α (Helix $\alpha 8$), die die Seitenkette der Aminosäure His254 α zur Coenzym A-Bindestelle orientiert (Reaktionszentrum *site I*). Die Aminosäuren Gly256 α bis Gly260 α agieren als flexible Schleife, die die Helix $\alpha 8$ mit der darauffolgenden Helix $\alpha 9$ verbinden. Während der Umklappenbewegung verliert das Phosphohistidinsegment den Großteil seiner helikalen Struktur. Helix $\alpha 8$ entfaltet sich teilweise und die Aminosäuren Thr244 α bis Ala255 α ordnen in einer ausgestreckten Weise an, so dass sich deren Abstand zwischen Thr244 α und Ala255 α um etwa 10 Å vergrößert. Gleichmaßen bilden die Aminosäuren His254 α bis Ile258 α eine kurze Helix $\alpha 8^*$. Hierbei soll die Bezeichnung „*“ für die umgeformte Helix $\alpha 8$ stehen. Durch die Umlagerung des Phosphohistidinsegmentes bewegt sich das τ -Stickstoffatom etwa 37 Å

2. Ergebnisse

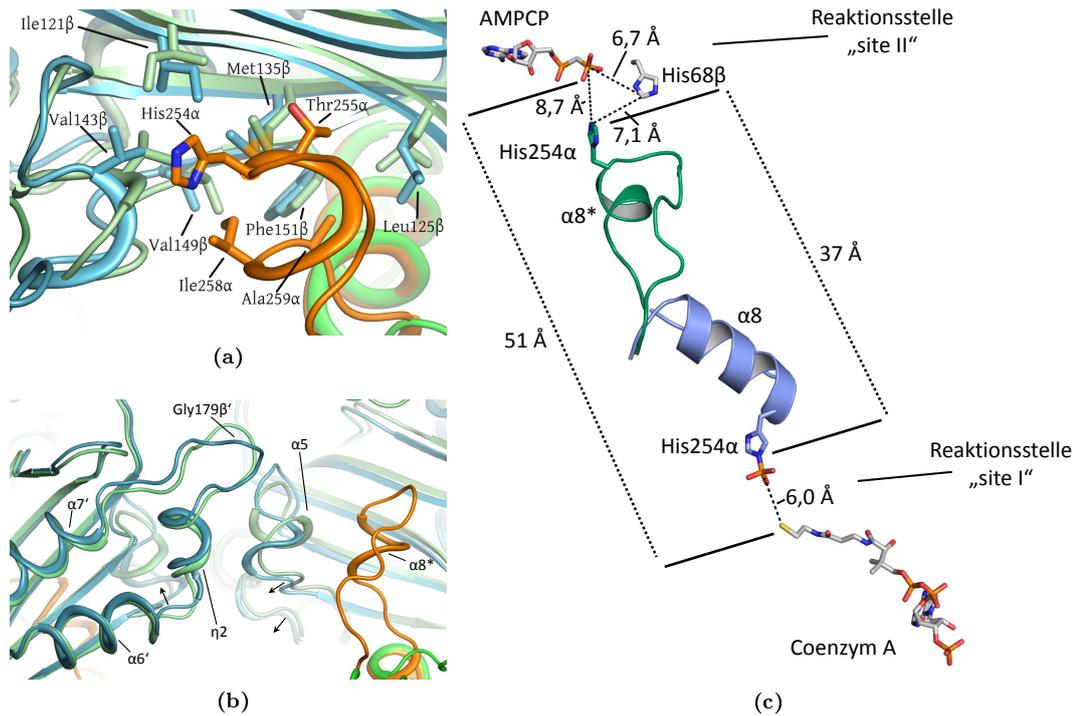


Abb. 2.22.: Bewegung des Phosphohistidinsegmentes zwischen den Untereinheiten der *ckcACD1*. (a) Interaktion des Phosphohistidinsegmentes (orange) mit der β -Untereinheit verursacht konformationelle Veränderungen der benachbarten Aminosäuren. Dargestellt sind die Kristallstrukturen *ckcACD1*-B (grün) und *ckcACD1*-C (orange und blau). Einige Reste der Lid-Domäne wurden zur Klarheit nicht gezeigt. (b) Umordnung der hydrophoben Kontaktfläche führt zur Veränderungen in der Ausrichtung der Helix $\alpha 5$ und zur Neuorientierung der Reste zwischen den Helices $\alpha 6'$ und $\alpha 7'$. Die gezeigten Pfeile zeigen zudem weitere Bewegungen innerhalb der *ATP grasp*-Domäne an. (c) Zur Ermittlung der Abstände wurden die Kristallstrukturen *ckcACD1*-A (Coenzym A), *ckcACD1*-H (Phosphohistidin His254 α , blau), *ckcACD1*-C (Phosphohistidinsegment in Richtung β -Untereinheit, grün) und *ckcACD1*-B (geschlossene *ATP grasp*-Domäne und AMPCP) überlagert.

zwischen der Bindestelle an Reaktionszentrum *site I* und an Reaktionszentrum *site II* (siehe Abbildung 2.22c). Mitsamt der Wechselwirkung des Phosphohistidinsegmentes mit der β -Untereinheit finden gleichzeitig maßgebliche Veränderungen in den Konformationen nahegelegener Aminosäuren statt. Die Ausbildung eines hydrophoben Kerns, bestehend aus den Resten Ile258 α , Ala259 α , Ile121 β , Met135 β , Val143 β , Val149 β und Phe151 β verursacht eine teilweise Entfaltung und Umordnung der Helix $\alpha 5$ (Aminosäuren Gly140 β bis Phe146 β) und führt gleichermaßen zur Neuordnung der hydrophoben Kontaktfläche zwischen beiden β -Untereinheiten. Es erfolgt zudem eine Bewegung der Aminosäuren zwischen den Helices $\alpha 6'$ und $\alpha 7'$. Die größte Änderung in der Position erfährt Gly179 β' mit einer Auslenkung von 5,9 Å.

2.7. *ckcACD1* überbrückt eine Lücke von 51 Å während des enzymatischen Zyklus

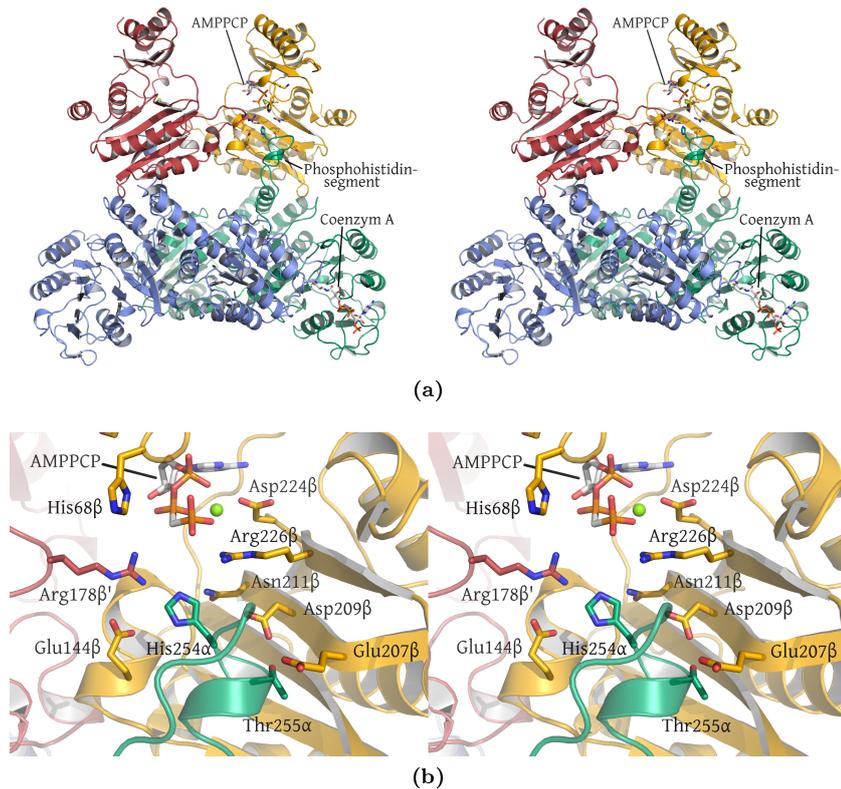


Abb. 2.23.: Phosphohistidinsegment (nicht-phosphoryliert) ausgerichtet zur Nukleotidbindestelle. Farblich sind die α -Untereinheiten blau bzw. grün, die β -Untereinheiten rot bzw. gelb dargestellt. (a) Der komplette *ckcACD1*-Komplex mit nicht-phosphoryliertem Phosphohistidinsegment in Abgabeposition. Durch die Umlagerung kommt die Imidazolseitenkette des His254 α in räumliche Nähe der Nukleotidbindestelle. (b) Detaillierte Aufsicht auf die Schnittstelle zwischen Phosphohistidinsegment und der β -Untereinheit.

Über verschiedene Wechselwirkungen zur β -Untereinheit wird die beobachtete Konformation der Schleife stabilisiert. So akzeptiert die Carboxylgruppe des Glu207 β eine sehr starke, ionische Wasserstoffbrücke (Abstand 2,3 Å) zum O γ des Ser253 α . Gleiches trifft auf Thr255 α zu. Die Hydroxylgruppe der Seitenkette steht mit einer Distanz von 2,5 Å in einer starken Wasserstoffbrücke mit der Carboxylfunktion der Aminosäure Asp209 α . Gleichermäßen spendet die OH-Gruppe des Thr255 α ein Proton für eine schwache H-Brücke (Abstand 3,1 Å) zum Carbonylsauerstoff der Peptidbindung des Met308 β . Die Imidazolseitenkette wird durch die Interaktion mit der Carboxylgruppe des Restes Asp209 β fixiert. Diese Wechselwirkung ist mit einem Abstand von 3,2 Å relativ schwach. Verstärkt wird die Wechselwirkung der Phosphohistidinschleife mit der β -Untereinheit durch Interaktion der Seitenkette der Aminosäuren Ile258 α und Ala259 α mit einer durch die Reste Leu125 β , Met135 β , Val149 β und Phe151 β gebildeten hydrophoben Tasche.

2.8. Die α -Untereinheiten besitzen eine zusätzliche Bindungsstelle für Di- und Trinukleotide

In der Elektronendichtekarte der Kristallstrukturen *ckcACD1-D* und *ckcACD1-C* wurden klare Anzeichen für zusätzlich gebundene ADP bzw. AMPPCP-Moleküle erhalten. In beiden Fällen vermittelt die terminale Phosphatgruppe von ADP und AMPPCP die Bindung an die α -Untereinheit. Dargestellt ist dies für ADP in Abbildung 2.24a, für AMPPCP in Abbildung 2.24c. Diese Anbindung ist außerordentlich ähnlich mit dem Interaktionsmodus von Phosphationen und der Phosphogruppe des τ -Phosphohistidins His254 α an die α -Untereinheiten. So finden sich auch hier zahlreiche Wasserstoffbrücken zu den Aminofunktionen des Proteinrückgrades der Aminosäuren Gly161 α , Gly162 α , Gly308 α' und Gly309 α' sowie zur Hydroxylgruppe der Seitenkette der Aminosäure Ser160 α . Die Konformationen der ADP- und AMPPCP-Moleküle unterscheiden sich jedoch deutlich voneinander. Auch die Flexibilität der Moleküle sind verschiedenen. Während die Phosphatgruppen und die Ribose in der Elektronendichte von AMPPCP in der Struktur gut geordnet sind, scheint dessen Puringruppe im Kristall flexibel zu sein. Auch bei niedriger Konturierung der Elektronendichtekarte konnte keine bevorzugte Ausrichtung des Heteroaromats ermittelt werden. Im Fall von ADP wird die Puringruppe eine exzentrisch, parallel-verlagerten (*off-centered parallel displaced*) π -Stapelwechselwirkungen mit dem Imidazolrest des Histidin His254 α stabilisiert (siehe Abbildung 2.24b). Der beobachtete Abstand der beiden Ringsysteme von 3,4 Å scheint auch die geringstmögliche Distanz zweier Interaktionspartner zu sein (Hunter *et al.*, 1991; McGaughey *et al.*, 1998).

Ein Magnesiumion koordiniert sowohl ADP als auch AMPPCP durch ihre Phosphatgruppen. Auch hier ist der Interaktionsmodus zwischen ADP und AMPPCP verschieden. ADP komplexiert das Metallion ausschließlich durch eine der Sauerstoffatome der β -Phosphatgruppe. Um das Metall gruppieren sich weiterhin in einer annähernd oktaedrischen Koordinationssphäre fünf Wassermoleküle. Zwei dieser Wasser bilden starke Wasserstoffbrücken zu jeweils einem der beiden Sauerstoffatome des Seitenkettencarboxylats von Asp351 α' . Im Fall von AMPPCP interagiert das Magnesiumion mit der γ - und β -Phosphatgruppe. Das Metallion scheint auch hier (nur indirekt) mit der Carboxylgruppe der Seitenkette von Asp351 α' zu wechselwirken. Möglicherweise sind ebenfalls Wassermoleküle an der Vermittlung der Interaktion beteiligt. Positive Differenzdichte zwischen Metall und Carbonsäuregruppe deutet darauf hin.

Prinzipiell wurde die zusätzliche Bindung von Nukleotiden nur bei Datensätzen von Kristallen, die bei einer Temperatur von 278 K wuchsen, beobachtet. Ein artifizierlicher Ursprung ist daher nicht auszuschließen. Interessanterweise wird der oben beschriebene Interaktionsmodus von Asp351 α ' mit der Hydrathülle eines gebundenen Metallions ebenfalls in den Kristallstrukturen der *ckcACD1* mit phosphoryliertem His254 α (*ckcACD1-H*) und im Komplex mit Phosphationen (*ckcACD1-G* und *ckcACD1-I*) erhalten. Dieser Aspartatrest ist in den ACDs und SCS außerordentlich hoch konserviert (Sánchez *et al.*, 2000). Es ist daher möglich, dass dieses Bindungsmotiv eine wichtige Rolle in der Funktion der ACDs spielt.

2.9. Versuche zur Stabilisierung von Reaktionsintermediaten

Es wurden Versuche zur Stabilisierung einzelner Reaktionsintermediate durchgeführt. Es ist bekannt, dass sowohl Aluminiumtrifluorid AlF_3 bzw. Aluminiumtetrafluorid AlF_4^- (Carrier *et al.*, 1988; Antony und Chabre, 1992; Xu *et al.*, 1997) als auch Nitrationen NO_3^- (Cook *et al.*, 2002) als Analoge von Übergangszuständen des Phosphats fungieren können. Da das His254 β phosphoryliert und im Verlauf des Reaktionszyklus zwischen den α - und β -Untereinheiten schwingen muss, könnten diese Verbindungen möglicherweise die Reaktionsschleife in Aufnahme- (d.h. His254 α in Richtung der α -Untereinheit) bzw. in Abgabeposition (d.h. His254 α in Richtung der β -Untereinheit) stabilisieren und diese für kristallographische Untersuchungen zugänglich machen.

Die im Rahmen dieser Arbeiten durchgeführten Versuche zur spezifischen Stabilisierung einzelner Reaktionsintermediate durch Einsatz von Aluminiumfluorid bzw. Nitrationen waren nicht erfolgreich. In den untersuchten Kristallstrukturen wurde keine Elektrodendichte beobachtet, die als AlF_3 bzw. AlF_4^- oder NO_3^- interpretiert werden konnten. Möglicherweise ist die im Kristallgitter beobachtete Konformation der *ckcACD1* nicht in der Lage, die Anordnung der Aminosäuren im Übergangszustand zu stabilisieren.

2. Ergebnisse

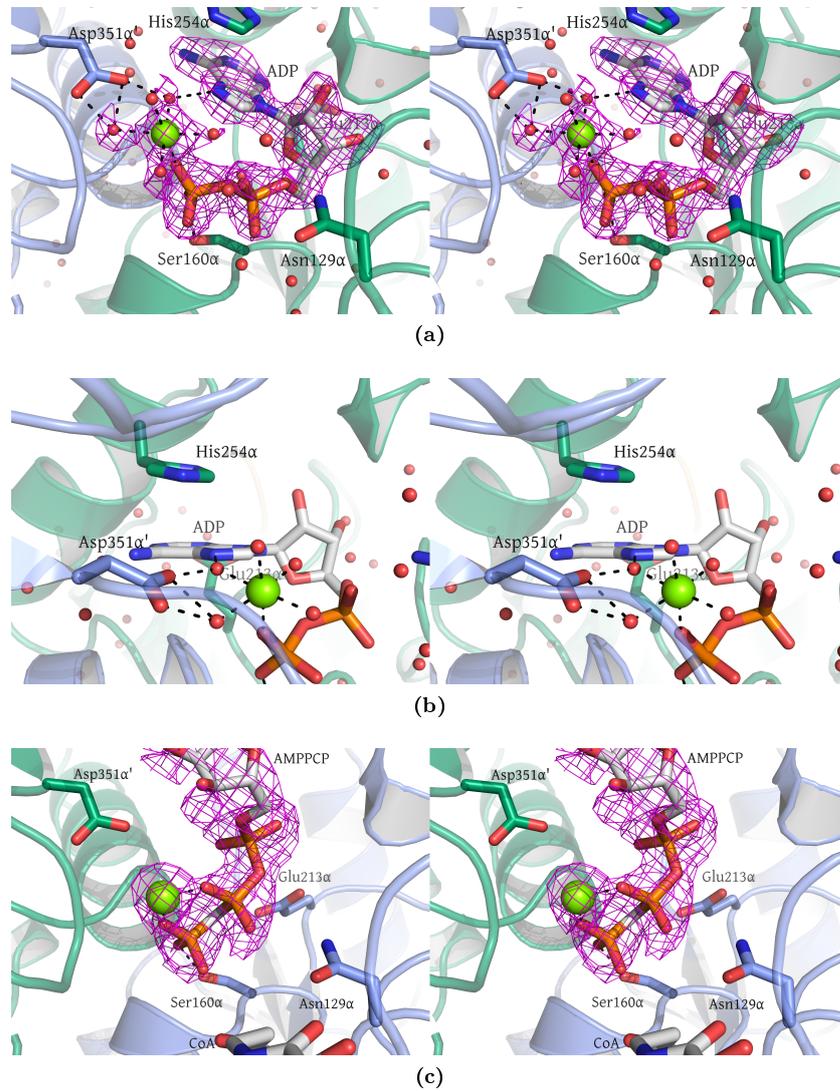


Abb. 2.24.: Bindung von ADP durch die α -Untereinheiten. Beide α -Untereinheiten (grün bzw. blau eingefärbt) binden ADP durch Wechselwirkung seiner Phosphate und durch π - π -Wechselwirkungen zwischen Adenin und His254 α . Darstellungen in *wall eye*-Stereo. Die Seitenketten einiger Aminosäuren sind als Stäbe abgebildet. Kohlenstoffatome sind entweder in der Farbe der dazugehörigen Proteinkette oder weiß. Dahingegen sind Stickstoffatome dunkelblau, Sauerstoffatome rot, Phosphoratome orange und Magnesiumionen grün. Das in (a) um ADP gelegte magentafarbene Gitter ist *simulated annealing omit*-Elektronendichte mit einer Konturierung von 1σ . (b) Koordinationssphäre des Magnesiumions angezeigt durch schwarze gestrichelte Linien. (c) In Gitterdarstellung ist *simulated annealing omit*-Elektronendichte mit einer Konturierung von $0,8\sigma$ abgebildet.

2.10. Sequenzvergleiche mit anderen ACDs zeigen hohe Homologie

Die Sequenzen einiger zum Teil biochemisch charakterisierter Nucleosiddiphosphat-bildenden Acetyl-Coenzym A Synthetasen sollten überlagert werden. Problematisch war hierbei, dass die Mitglieder der ACD-Familie ein komplexes Muster an Subdomänenkonnectivität aufweisen (Sánchez *et al.*, 2000). Das als Domänenvermischung (*domain shuffling*) bezeichnete Phänomen macht den direkten Vergleich unterschiedlich aufgebauter ACDs unmöglich. Es wurden daher einzelne Domänen der Proteine miteinander verglichen. Hierzu wurden die konservierten Domänen mit dem NCBI-Programm CD-SEARCH (Marchler-Bauer und Bryant, 2004; Marchler-Bauer *et al.*, 2009; Marchler-Bauer *et al.*, 2011) identifiziert und entsprechend der Sequenz der *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* ACD1 ausgerichtet. Die im folgenden genutzte Domänennomenklatur entspricht weiterhin der Nummerierung der *E. coli* SCS (Fraser *et al.*, 2002). Das Ergebnis für die Subdomänen 1-2-5 (die α -Untereinheit der *ckcACD1*) ist in der Abbildung 2.25 dargestellt, während die Subdomänen 3-4 (β -Untereinheit der *ckcACD1*) in Abbildung 2.26 gezeigt. In den folgenden Beschreibungen wird die Nummerierung der Aminosäuren von der *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* ACD1 verwendet. Abweichungen von dieser Regel werden explizit im Text genannt.

Allgemein zeigt sich hohe Ähnlichkeit zwischen den untersuchten Sequenzen, sichtbar an der großen Anzahl an Aminosäuren in rot bzw. mit rotfarbener Hinterlegung. Interessanterweise spielt es hierbei keine Rolle, ob das Enzym aus einer Kette besteht (*Aciduliprofundum boonei*, *Haloarcula marismortui*, *Methanocaldococcus jannaschii*, *Archaeoglobus fulgidus*) oder aus zwei Untereinheiten aufgebaut ist (*Candidatus Korarchaeum cryptofilum*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Ignisphaera aggregans*, *Hyperthermus butylicus*, *Staphylothermus hellenicus*, *Pyrobaculum aerophilum*). Auch zwischen den Einzelketten-ACDs aus *Aciduliprofundum boonei* (1-2-5-3-4) *Haloarcula marismortui* (1-2-5-3-4), *Methanocaldococcus jannaschii* (1-2-5-3-4), *Archaeoglobus fulgidus* AF_1211 (1-2-5-3-4) und AF_1938 (3-4-1-2-5) sowie dem Fusionsprotein aus Acyltransferase (AT) und ACD AF_1511 (AT-1-2-5-3-4) kann auf Sequenzebene wenig unterschieden werden. Deutlichere Differenzen zwischen den Sequenzen offenbaren sich nur in der Coenzym A-Ligase-Domäne 5 (vgl. Abbildung 1.2).

2. Ergebnisse

In den überlagerten Sequenzen finden sich die in Bräsen *et al.* als konserviert beschriebenen Histidinreste His254 α sowie His68 β (Bräsen *et al.*, 2008). Ersteres befindet sich in einem hochkonservierten SHT-Motiv. Dieser Bereich ist in den Kristallstrukturen hochflexibel. Diese Beweglichkeit wird auf Sequenzebene dadurch deutlich, dass der Anteil an Glycin, Alanin und Serin, also Aminosäuren ohne bzw. mit kleinen Seitenketten, überdurchschnittlich hoch ist. Der Vergleich mit anderen ACDs zeigt das gleiche Bild. His68 β ist in einem hochkonservierten HK(S/T)(D/E)-Motiv situiert. In einer Studie von Bräsen *et al.* (2008) konnte gezeigt werden, dass im Fall der *P. furiosus* ACD1 die Reste Glu218 α und Asp212 β maßgeblichen Einfluss auf die Katalyse haben. Diese Aminosäuren sind ebenfalls in der *ckc*ACD1 als Glu213 α bzw. Asp209 β vorhanden. Aminosäuren, beteiligt an der Bindung von Coenzym A, sind ebenfalls konserviert (siehe grüne Dreiecke in Abbildung 2.25). Dies trifft ebenfalls zu für die Reste zur Bindung von Di- bzw. Trinukleotiden durch die β -Untereinheiten (siehe grüne Dreiecke in Abbildung 2.26). Es sind auch wenige hydrophobe Aminosäuren stark konserviert, die an der Ausbildung der homo- bzw. heterotypen Kontaktflächen im *ckc*ACD1-Komplex beteiligt sind (Phe144 α , Tyr211 α , Phe223 α und Phe130 β). Möglicherweise deutet dies auf ein ähnliches Interaktionsmuster der Subdomänen bzw. Untereinheiten innerhalb der Familie der dinukleotid-abhängigen Acetyl-Coenzym A-Synthetasen hin. Die Phosphohistidinschleife der *ckc*ACD1 wird im Laufe des enzymatischen Zyklus zwischen der α - und β -Untereinheit hin- und herbewegt. Damit geht eine Umordnung der Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten von statten. Bezogen auf die α -Untereinheit betrifft dies maßgeblich die Aminosäuren des Phosphohistidinsegmentes, die α - α' - und α - β -Interaktionen bleiben gröstenteils bestehen. Im Gegensatz dazu ändert sich das Wechselwirkungsmuster der β -Untereinheit deutlich. Tendenziell sind die Aminosäuren der beteiligten Bereiche höher konserviert. Eine quantitative Aussage kann aber aufgrund des geringen Umfangs dieser Überlagerung nicht getroffen werden.

2.10. Sequenzvergleiche mit anderen ACDs zeigen hohe Homologie

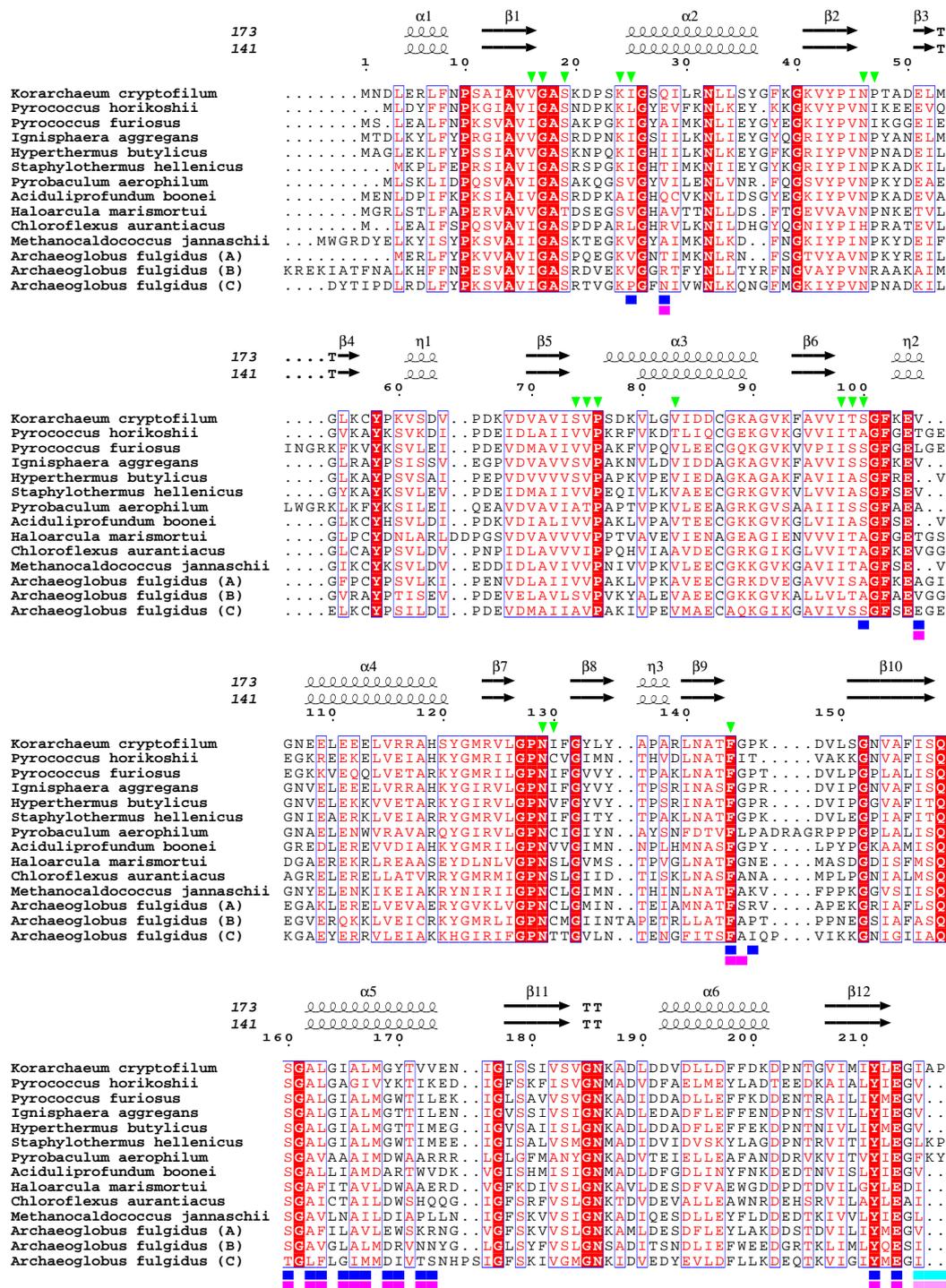


Abb. 2.25.: Sequenzbasierte Überlagerung verschiedener Acetyl-Coenzym A-Synthetasen mit der α -Untereinheit der *eckA*CD1. Beschreibung nachfolgend.

2. Ergebnisse

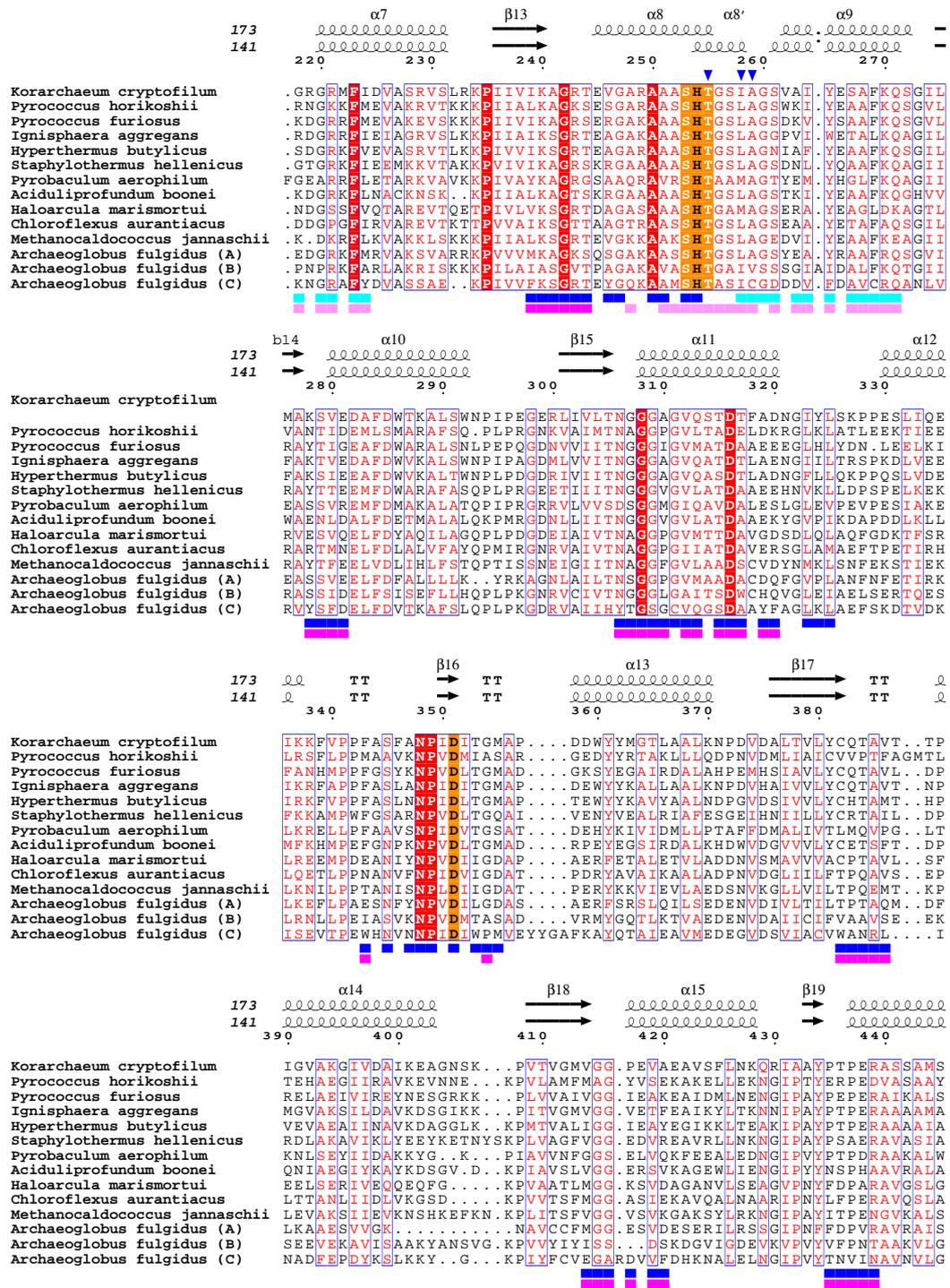


Abb. 2.25 Sequenzbasierte Überlagerung verschiedener Acetyl-Coenzyme A-Synthetasen mit der α -Untereinheit der *ckcACD1* (Fortsetzung).

2. Ergebnisse

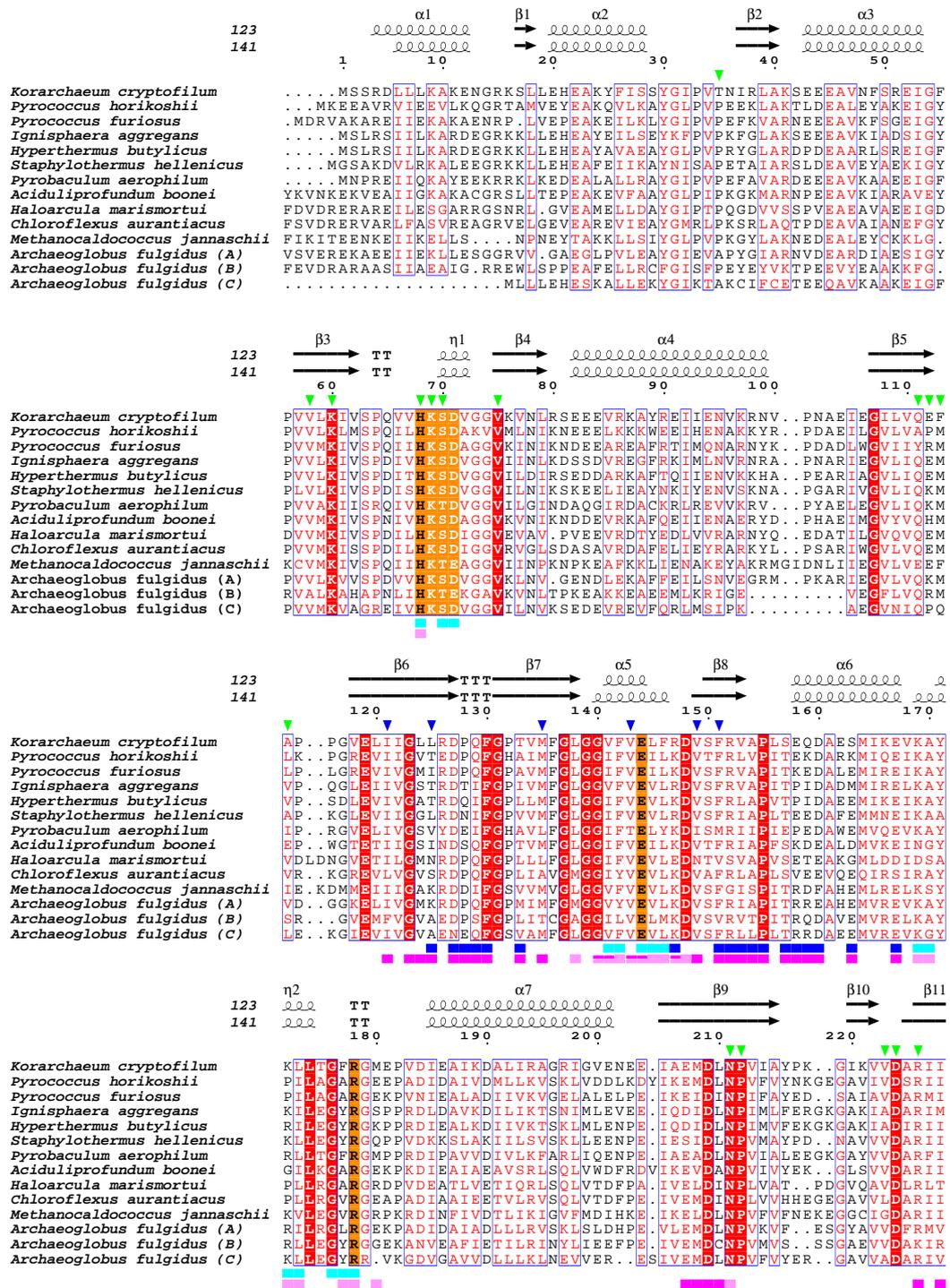


Abb. 2.26.: Sequenzbasierte Überlagerung verschiedener Acetyl-Coenzym A-Synthetasen mit der α -Untereinheit der *ckcACD1*. Beschreibung nachfolgend.

2.10. Sequenzvergleiche mit anderen ACDs zeigen hohe Homologie

```

123  ►
141  ►
      230
Korarchaeum cryptofilum  LR.....
Pyrococcus horikoshii   LKPKD.....
Pyrococcus furiosus     L.....
Ignisphaera aggregans   LR.....
Hyperthermus butylicus  LRSEEGR.....
Staphylothermus hellenicus LKT.....
Pyrobaculum aerophilum  LRMA.....
Aciduliprofundum boonei LKTGKSTKVTPKPLDKCS...
Haloarcula marismortui  LDQEKL.....
Chloroflexus aurantiacus LN.....
Methanocaldococcus jannaschii K.....
Archaeoglobus fulgidus (A) LGEEV.....
Archaeoglobus fulgidus (B) IRRNS.....
Archaeoglobus fulgidus (C) VGERKRFDYTIPLDLRDLFYPKS

```

Abb. 2.26 Sequenzbasierte Überlagerung verschiedener Acetyl-Coenzym A-Synthetasen mit der β -Untereinheit der *ckcACD1* (Fortsetzung). *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* B1L7P8, *Pyrococcus horikoshii* O59452, *Pyrococcus furiosus* Q9Y8L0, *Ignisphaera aggregans* E0SRD2, *Hyperthermus butylicus* A2BMF5, *Staphylothermus hellenicus* D7D966, *Pyrobaculum aerophilum* Q8ZTH6, *Aciduliprofundum boonei* B5IDQ6, *Haloarcula marismortui* Q5V3N6, *Methanocaldococcus jannaschii* Q58010, *Archaeoglobus fulgidus* (A) O29057 (B) O28761 (C) O28341. Unterhalb der Überlagerung finden sich verschiedenfarbige Blöcke mit der Reste markiert werden, die an der Ausbildung des *ckcACD1*-Komplexes beteiligt sind. Blau entspricht der Struktur *ckcACD1*-B, wobei dunkelblau für die Interaktion zwischen den β - und α -Untereinheiten steht und hellblau für die homotype Kontaktfläche der β -Untereinheit verwendet wurde. Zum Vergleich wurde die Situation für die Kristallstruktur *ckcACD1*-C in violett (α - β -Wechselwirkungen) und rosa (β - β' -Wechselwirkungen) dargestellt.

3. Diskussion

3.1. Expression und Reinigung der *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* ACD1

Das Expressions- und Reinigungsprotokoll wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Schönheit ausgearbeitet und ist nicht Inhalt dieser Dissertation. Jedoch traten einige Besonderheiten auf, die eine Anpassung der verwendeten Protokolle notwendig machten.

Die α - und β -Untereinheiten wurden separat in Bakterien der Spezies *E. coli* und des Stammes BL21(DE3) RIL exprimiert. Aufgeschlossen wurden die Zellen mittels Ultraschall. Neben dem Zielprotein wurde bei der Lyse der *E. coli*-Zellen eine große Menge an endogener DNS freigesetzt. So wies das Rohextrakt nach Hitzefällung, bei dem ein Großteil unerwünschter bakterieller Proteine abgetrennt wurden, im UV-Bereich eine starke Hintergrundabsorption auf. Eine spektroskopische Bestimmung der Proteinkonzentration war zu diesem Zeitpunkt unmöglich. Um die für die Rekonstitution des *ckcACD1*-Komplexes benötigten Volumenanteile der Hitzeextrakte von α - bzw. β -Untereinheit abzuschätzen, musste daher eine analytische SDS-PAGE durchgeführt werden. Die Lösung mit rekonstituierter *ckcACD1* wies zusätzlich hohe Viskosität auf. Ursächlich war hier ebenfalls die hohe Konzentration an DNS. Der Einsatz von DNase I verbesserte die Situation nur wenig. Verdaut wurde bei 278 K für etwa 12 Stunden. Möglicherweise kann die zeitliche Verlängerung der Reaktion oder die Inkubation des Reaktionsansatzes bei geringfügig höheren Temperaturen zu einem besseren Ergebnis führen. Die bloße Anwesenheit einer solch großen Menge an DNS, als auch die dadurch hervorgerufene Viskosität der Lösung war auch bei den darauffolgenden Schritten ein Problem. Letzteres wirkte sich insbesondere negativ auf die Konzentrierung der *ckcACD1* mittels Ultrazentrifugation aus. So dauerte dieser Schritt überproportional

3. Diskussion

lang, bis ein für die Applizierung auf eine Gelfiltrationssäule geeignetes Probenvolumen erreicht wurde. Aber auch die Gelfiltrationsexperimente wurden durch die Menge an DNS gestört. So konnten die proteinhaltigen Fraktionen nicht durch Beobachten der durch das Protein verursachten Absorption bei 280 nm identifiziert werden, da dieses Signal unterhalb der durch die DNS-Verunreinigung verursachten Grundabsorption lag. Diese war über den kompletten Elutionsbereich verteilt. Dadurch mussten auch hier die Fraktionen mit Zielprotein mittels analytischer SDS-PAGE ermittelt werden. Eine kontinuierliche Abreicherung an DNS wurde nur durch multiple Durchführung der Größenausschlusschromatographie erreicht. Da im Normalfall sowieso mehrere Durchgänge der Reinigung der *ckcACD1* durch Gelfiltration notwendig waren, um nicht gebundene β -Untereinheit vom *ckcACD1*-Komplex komplett abzutrennen, wurde auf die Entwicklung eines anderen Reinigungsprotokolls verzichtet. Falls dies erforderlich wäre, könnte in einem Schritt freie DNS durch einen Anionentauschers abgetrennt werden. Eventuell lässt sich durch Wahl geeigneter Bedingungen außerdem ein Großteil als Monomer vorliegende β -Untereinheit vom vollständigen *ckcACD1*-Komplex entfernen. Eine Abreicherung von DNS im Rohextrakt mit Streptomycinsulfat (Cohen und Lichtenstein, 1960) oder Polyethylenimin (Burgess, 1991) wären Möglichkeiten, einen zusätzlichen chromatographischen Schritt zu vermeiden. Dass das Protein mit dem vorliegenden Reinigungsprotokoll hinreichend von proteinogenen Verunreinigungen getrennt wurde, zeigte die apparente Homogenität der Proteinprobe bei der durchgeführten analytischen SDS-PAGE (siehe dazu Abbildung 2.1b).

3.2. Kristallisation und Strukturlösung der *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* ACD1

Die durchgeführten Kristallisationsexperimente resultierten in zwei Kristallformen, I und II. Während Kristallform I nur geringe Diffraktionskraft aufwies, streuten Kristalle der Form II bis zu einer maximalen Auflösung von etwa 2,0 Å. Die Kristalle der Form II gehörten zur orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$. Die stäbchenförmigen Kristalle wuchsen, sobald die Lösung mit dem Fällungsmittel zur Proteinlösung zugegeben wurde und konnten schon nach wenigen Minuten beobachtet werden. Erste Kristallisationsversuche wurden bei einer Temperatur von 291 K durchgeführt, später wurde bei 278 K kristallisiert.

3.2. Kristallisation und Strukturlösung der *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* ACD1

Mittels der Methode des Molekularen Ersatzes (MR) konnte das Phasenproblem gelöst werden. Mit der Verwendung von MR werden allerdings unweigerlich Phasenfehler durch Abweichung des Suchmodells von der Zielstruktur erhalten, die die Interpretation der resultierenden Elektronendichtekarten erschweren bzw. unmöglich machen kann. In manchen Fällen führen diese Fehler in der Phase aber nur zur Inkorporation von Fehlern in kleinen Bereichen des Modells, während der Großteil des Proteinmodells korrekt gebaut werden kann. Globale statistische Parameter, wie die *R*-Faktoren, die die Güte des kompletten Modells betrachten, reichen meist nicht aus, um die Anwesenheit dieser, als *model bias* (Hodel *et al.*, 1992) bezeichneten Fehler, nachzuweisen. Die in diesen Bereichen möglicherweise lokal erhöhten Temperaturfaktoren können vielfach ebenso durch die Beweglichkeit des korrespondierenden Proteinabschnitts erklärt werden. Es wurde versucht diesen Fehlern auf verschiedene Art zu begegnen. Im Rahmen des automatischen Modellbaus wurden *prime & switch*-dichtemodifizierte Karten verwendet (Terwilliger, 2004b). Das simulierte Tempern (*simulated annealing*) der Proteinstruktur wurde als sehr effektiv zur Beseitigung von *model bias* beschrieben (Hodel *et al.*, 1992). Es wurden daher *composite simulated annealing omit*-Elektronendichtekarten erstellt und das initiale Modell der *ckcACD1* dementsprechend verfeinert. Erste Versuche zur Phasierung allein über die anomalen Beiträge der Datensätze von Selen- und Quecksilber-markierten *ckcACD1*-Kristallen schlugen fehl. Jedoch wurden die anomalen Diffraktionsdaten genutzt, um das bestehende Strukturmodell zu verbessern. Hierbei werden die durch Molekularen Ersatz erhaltenen Phasen dazu genutzt, die Substruktur der anomalen Streuer zu ermitteln und daraufhin eine experimentelle Elektronendichte zu erzeugen (MRSAD, *molecular replacement and single anomalous dispersion*) (Baker *et al.*, 1995; Schuermann und Tanner, 2003). Es kann daher angenommen werden, dass die vorgestellten Modelle der *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* ACD1 nur geringe Fehler durch *model bias* beinhalten.

Problematisch war oftmals die Platzierung der Aminosäuren der B-Domäne der β -Untereinheiten. Die lokale Elektronendichte war durch die hohe Beweglichkeit der Subdomäne oftmals stark verrauscht. Durch den Vergleich mit der geschlossenen Form der *ckcACD1*-B, die in den entsprechenden Bereichen gut definiert war, konnte in den meisten Fällen zumindest α -Helices identifiziert und platziert werden. Deshalb sind die Temperaturfaktoren dieser Reste deutlich größer, als diejenigen der weniger beweglichen Proteinkette. Eine Interpretation dieser Bereiche kann deshalb nicht auf Ebene einzelner Aminosäurereste durchgeführt werden. Dies betrifft vor allem die Kristallstrukturen mit größerem Öffnungswinkel (siehe dazu Tabelle 2.15).

3.3. Aufbau der *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* ACD1

3.3.1. Die Domänen des *ckcACD1*-Komplex haben Ähnlichkeiten zu anderen ACDs

Der in dieser Arbeit präsentierte Komplex der *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* Acetyl-Coenzym A-Synthetase 1 wurde mit bereits veröffentlichten Strukturen in der Proteindatenbank PDB verglichen. Jedoch wurde kein Protein oder Proteinkomplex mit gleichem strukturellen Aufbau gefunden. Einzig Homologe der Subdomänen konnten identifiziert werden. Möglicherweise scheint ein dimeres Arrangement der α -Untereinheiten für ACDs charakteristisch zu sein. So lagern sich auch die putativen α -Untereinheiten einer ACD aus *Pyrococcus horikoshii* (*phACD α*) in einer homodimeren Form zusammen (PDB-Eintrag 2CSU) (keine Publikation). Weiterhin besitzt auch eine andere putative Acyl-Coenzym A-Synthetase aus *E. coli* (*ecACD*) eine vergleichbare dimere Struktur (PDB-Eintrag 3DMY) (keine Publikation). Bezogen auf die Domänennomenklatur der ACDs (Sánchez *et al.*, 2000) haben die genannten Proteine eine Zusammensetzung 1-2-5. Im Gegensatz zu den erstgenannten Proteinen, besitzt *ecACD* jedoch nicht den sonst in ACDs konservierten Histidinrest. Auch die Succinyl-Coenzym A-Synthetasen (SCS) gehören zur gleichen Superfamilie der dinukleotid-bildenden Acyl-Coenzym A-Synthetasen. So lassen sich auch die Anordnung der Subdomänen 1, 2 und 5 der *ecSCS* strukturell gut mit den korrespondierenden Subdomänen der *ckcACD1* und *phACD α* überlagern. So wurden zwei Publikationen veröffentlicht, die Homologiemodelle für die *Pyrococcus furiosus* ACD1 (Bräsen *et al.*, 2008) sowie die eine Succinyl-Coenzym A-umsetzende ACD aus *Thermococcus kodakaraensis* (Shikata *et al.*, 2007) beschrieben, die auf der *E. coli* SCS (*ecSCS*) und der *phACD α* basierten. Die fehlenden *ATP grasp*-Domänen (Subdomänen 3-4) wurden gemäß der Struktur der *ecSCS* ausgerichtet. Auch aufgrund der so erhaltenen sterischen Gegebenheiten im Modell wurde über einen neuartigen enzymatischen Mechanismus spekuliert, der prinzipiell auf die Klasse der ACDs zutreffen sollte (Bräsen *et al.*, 2008). Die Struktur des *ckcACD1*-Komplexes weicht jedoch deutlich von den Homologiemodellen ab. Daher können auch die Erkenntnisse der Struktur-Funktionsbeziehungen der Succinyl-Coenzym A-Synthetasen nicht direkt übernommen werden.

3.3.2. *ckcACD1* ist ein ungewöhnlicher $\alpha_2\beta_2$ -Komplex

Betrachtet man die Architektur der *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* ACD1, dann erscheint der Komplex als ziemlich ungewöhnlich. Auf der konvexen Seite eines der α -Untereinheiten wird jeweils eine der β -Untereinheiten gebunden. Über eine zweizählige Achse bildet das $\alpha\beta$ -Protomer mit seinem rotatorischen Äquivalent den kompletten *ckcACD1*-Komplex mit einer $\alpha_2\beta_2$ -heterotetrameren Komposition. Während die α - α' -Interaktionsfläche mit über 2000 Å² sehr groß ist und deren Stabilität nicht angezweifelt werden kann, stellt sich die Frage nach der Relevanz der beobachteten Kontakte zwischen den α - und β - bzw. den β - und β -Untereinheiten. Mit der größten Interaktionsfläche ist das α -Dimer vermutlich die strukturelle Basis zur Ausbildung des *ckcACD1*-Komplexes. Der *Complexation Significance Score* (CSS, siehe Tabelle 2.14) für diesen Kontakt ist mit 0,850 (CSS _{α - α'}) auch dementsprechend groß. Jedoch wird der Komplex ebenfalls durch die Wechselwirkungen der α - β - sowie β - β -Untereinheiten stabilisiert. Der dazugehörige CSS ist mit 0,269 (CSS _{α - β}) bzw. 0,074 (CSS _{β - β'}) deutlich geringer, da aber die Interaktion zwischen den α - und β -Untereinheiten doppelt auftreten, ist die Summe des CSS _{α - β} nur etwa ein Drittel kleiner als der CSS _{α - α'} . Obwohl der Komplex bei Raumtemperatur stabil ist, könnte sich bei höheren Temperaturen ein anderes Bild ergeben. Die in der Literatur beschriebenen Effekte der Stabilisierung von Proteinen hyperthermophiler Organismen, wie eine große Anzahl an Salzbrücken oder strukturelle Rigidität (Petsko, 2001), scheinen bei der *ckcACD1* geringen Einfluss zu haben. So finden sich bei der Ausbildung des α - β -Kontakts nur drei potentielle Salzbrücke zwischen den Seitenketten der Aminosäuren Arg221 α und Asp160 β , Lys270 α und Glu167 β sowie Arg464 α und Glu158 β . In der Interaktionsfläche zwischen den β -Domänen gibt es Salzbrücken zwischen der Seitenketten der Reste Arg178 β und Asp71 β' bzw. Glu144 β' . Auch die Annahme, dass bei Raumtemperatur thermostabile Proteine besonders starr sind, scheint bei der *ckcACD1* nicht zu greifen. Insbesondere die β -Untereinheit weist selbst im beschränkten Platz des Kristallgitters noch hohe Beweglichkeit auf (siehe dazu auch Kapitel 2.5.2). Eine theoretische Studie über die Beziehung von thermischer Stabilität und Flexibilität homologer G-Domänen aus mesophilen bzw. hyperthermophilen Ursprung konnte zeigen, dass das thermostabile Protein in einer Simulation der Molekulardynamik größere intrinsische Beweglichkeit aufwies (Kalimeri *et al.*, 2013). Für die SAM-Domäne des humanen p73, die ebenfalls eine hohe Thermostabilität besitzt, wurde dahingegen festgestellt, dass mit steigender Temperatur sogar einige der Bereiche des Proteins geringere Flexibilität

3. Diskussion

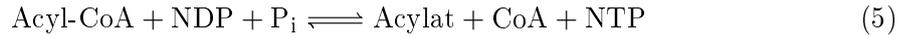
aufwiesen (Neira *et al.*, 2012). In beiden Fällen wurde diese Eigenart mit der höheren Widerstandsfähigkeit des Proteins gegenüber Wärme in Verbindung gebracht. Es wird aber auch diskutiert, dass Proteine aus Hyperthermophilen im Gegensatz zu ihren mesophilen Homologen einen höheren oligomeren Status besitzen (Petsko, 2001). Im Widerspruch dazu liegt die Succinyl-Coenzym A-Synthetasen aus dem Bakterium *E. coli* ebenfalls als Heterotetramer vor (Fraser *et al.*, 1999). Für multimere Proteine thermophiler Organismen wird jedoch diskutiert, dass diese zur Steigerung ihrer Stabilität die Packung der Protomere zueinander verbessern (Salminen *et al.*, 1996; Baldasseroni und Pascarella, 2009). Jedoch sind die Reste der hydrophoben Bereiche zwischend den Kontaktflächen der α - β - sowie β - β -Untereinheiten eher oberflächlich situiert und locker gepackt. Es kann daher nicht abschließend über die Ursache der Thermostabilität des *ckcACD1*-Komplexes geurteilt werden.

3.4. Strukturelle Einsichten in die Funktionsweise der *ckcACD1*

3.4.1. Substratspezifität und Mechanismus des Reaktionszentrums *site I*

Prinzipiell finden zwei enzymatische Schritte an Reaktionszentrum *site I* statt. Diese sind (1) die Phosphorylyse des Acyl-CoA-Thioesters unter Bildung eines enzymgebundenen Acyl-Phosphats und (2) der nukleophile Angriff des konservierten Histidinrestes His254 α auf das Acyl-Phosphat unter Bildung von Phospho-His254 α .

3.4. Strukturelle Einsichten in die Funktionsweise der *ckcACD1*



Substratspezifität - Acyl-Coenzym A-Bindestelle

Basierend auf dem Substratspektrum werden ACDs in verschiedene Klassen eingeordnet (Mai und Adams, 1996; Scott *et al.*, 2014; Jones und Ingram-Smith, 2014). Die *Ca. K. cryptofilum* ACD1 setzt hauptsächlich kurzkettige Coenzym A-Thioester um und gehört damit zur Klasse I (kleine oder verzweigte aliphatische CoA-Thioester) der ACDs. Die höchste Aktivität wird mit Acetyl-Coenzym A erreicht (Schmidt, 2013). Mit zunehmender Länge des aliphatischen Restes wird mit abnehmender Aktivität auch Propionyl-, Butyryl- und Isobutyryl-CoA umgesetzt (Schmidt, 2013). Succinyl-Coenzym A wird durch die *ckcACD1* nicht verstoffwechselt. Im Gegensatz dazu besitzt die *ecSCS* eine hohe Spezifität für Succinyl-Coenzym A, kann aber zudem kleine aliphatische Coenzym A-Thioester (Hildebrand und Spector, 1969) konvertieren. Die meisten ACDs sind in der Lage kurzkettige aliphatische CoA-Thioester zu verstoffwechseln (Reeves *et al.*, 1977; Mai und Adams, 1996; Glasemacher *et al.*, 1997; Bräsen und Schönheit, 2001; Musfeldt *et al.*, 1999; Musfeldt und Schönheit, 2002; Bräsen und Schönheit, 2004b; Bräsen und Schönheit, 2004a; Bräsen *et al.*, 2008; Schmidt, 2013; Scott *et al.*, 2014; Jones und Ingram-Smith, 2014). Katalytische Aktivität von ACDs bezüglich Succinyl-Coenzym A wurden in der Literatur bisher allerdings nur selten beschrieben (Sánchez und Müller, 1996; Shikata *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2014). Auf der anderen Seite sind Mitglieder der ACD-Familie fähig aromatische Coenzym A-Thioester umzusetzen (Mai und Adams, 1996; Bräsen und Schönheit, 2004b; Scott *et al.*, 2014). Während die Spezifität der Mitglieder der SCS-Familie für Succinyl-Coenzym A durch ihre Funktion als kritisches Element im Citrat-Cyklus, einem elementaren und konser-

3. Diskussion

vierten Stoffwechselweg in allen Domänen des Lebens, durchaus Sinn ergibt, sind im Kontrast dazu ACDs hauptsächlich dafür verantwortlich, Energie, die beispielsweise bei der Glycolyse oder der katabolen Degradation von Aminosäuren der Zelle verloren gehen würde, zu konservieren (Mai und Adams, 1996; Bräsen und Schönheit, 2004b; Jones und Ingram-Smith, 2014; Scott *et al.*, 2014). In diesem Zusammenhang scheint eine geringe Substratspezifität von Vorteil.

Bei *ckcACD1*, SCS und ACLY bildet eine konservierte Anordnung der Subdomänen 1, 2 und 5 das Reaktionszentrum *site I*. Diese zeichnet für die Bindung von Coenzym A und seiner Thioester sowie von anorganischen Phosphat verantwortlich. Anzunehmen ist, dass hier ebenfalls die freien Carbonsäuren gebunden werden. Aufgrund des sehr ähnlichen Arrangements der Subdomänen bei den genannten Enzymen werden die Unterschiede in der Substratpräferenz vermutlich nicht aufgrund der in der Superfamilie beobachteten Domänenvermischung verursacht. Für SCS und ACLY wurden bislang keine strukturellen Informationen über die Bindung eines Coenzym A-Thioesters veröffentlicht. Mit der in der Kristallstruktur *ckcACD1-E* beobachteten Anordnung von Acetyl-Coenzym A kann daher zum ersten Mal der Bindungsmodus eines Coenzym A-Thioesters beschrieben werden. Aufgrund der zu geringen Streukraft des Kristalls konnte die Ausrichtung der Methyl- bzw. Carbonylgruppe jedoch nicht mit absoluter Sicherheit erfolgen. Es wurde daher die Bindungstaschen für Thioester bei *ckcACD1* und *ecSCS* untersucht, um zu verstehen, wie die Ausrichtung der aliphatischen Gruppe (Methyl bei Acetyl-Coenzym A) erfolgt. Interessanterweise ist der für die Bindung des Thioesters zur Verfügung stehende Platz sowohl bei *ckcACD1* und SCS groß genug, um prinzipiell auch voluminösere Liganden zu beherbergen. Dies ist überraschend, da von nur eine begrenzte Anzahl an Substraten umgesetzt werden. Es findet sich jedoch im Fall der *ckcACD1* eine hydrophobe Tasche in der Nähe der Sulfhydrylgruppe des Coenzym A, die für die Erklärung der Substratspezifität der *ckcACD1* herangezogen werden kann (siehe Abbildung 3.1a). Begrenzt durch die Aminosäuren Ala162 α und Ile165 α , die sich auf der „Power-Helix 1“ befinden, die Seitenketten der Reste Phe144 α und Met355 α , Thr384 α und Ala385 α , erlaubt diese Tasche das Einpassen nur kleiner CoA-Thioester.

Es ist daher anzunehmen, dass durch Veränderungen dieser Tasche unterschiedliche Substratspezifität erreicht wird. In *ecSCS* ist der gleiche Bereich größer und partiell geladen, so dass eine Interaktion mit der Carboxylgruppe von Succinyl-CoA möglich wird (siehe Abbildung 3.1b). So findet sich in der „Power-Helix 1“ der *ecSCS* der hoch-

3.4. Strukturelle Einsichten in die Funktionsweise der *ckcACD1*

konservierte Tyrosinrest Tyr158 α , dessen Hydroxylgruppe sich in idealem Abstand zur Carboxyfunktion des Succinats befindet. Das Enzym ACLY setzt ebenfalls Acetyl-Coenzym A um (Srere und Lipmann, 1953; Srere, 1961) und ein ähnlicher Interaktionsmodus der Acetylgruppe mit dem Protein in ACLY und *ckcACD1* kann angenommen werden. Die Überlagerung der Strukturen von *ckcACD1* und der humanen ATP-Citrat-Lyase im Komplex mit Citrat (Sun *et al.*, 2010) zeigt, dass der Carbonylkohlenstoff der Acetylgruppe sich in einem Abstand von etwa 2,8 Å zum C1-Kohlenstoff des gebundenen Citratmoleküls befindet. Es ist daher anzunehmen, dass der aliphatische Rest in Richtung des Citrats in der ATP-Citrat-Lyase ausgerichtet ist. Basierend auf diesen Vergleichen wird die Ausrichtung der Methyl- bzw. Carbonylgruppe, wie in Abbildung 2.18e gezeigt, vorgeschlagen. Möglicherweise ist bei der *E. coli* SCS die Thioatfunktion vom Succinyl-Coenzym A-Thioester in Analogie zur *ckcACD1* ebenfalls coplanar zur Peptidbindung zwischen den korrespondierenden Resten Cys123 α und Pro124 α ausgerichtet. Interessanterweise weist eine katalytisch inaktive Variante der *ecSCS* eine signifikante Verzerrung der beiden Reste auf (Fraser *et al.*, 2002). Der Cysteinrest Cys123 α selbst ist jedoch nicht am katalytischen Mechanismus beteiligt (Hidber *et al.*, 2007). Weiterhin wurde gezeigt, dass mit steigender Größe der Seitenkette an Position der Aminosäure Cys123 α die enzymatische Aktivität vermindert wird (Hidber *et al.*, 2007). Möglicherweise wirken sich geringfügige Unterschiede der Orientierung der Cys-Pro-Peptidbindung auf die Ausrichtung der Thioestergruppe aus, was wiederum die Funktion des Enzyms beeinträchtigt.

Bisher sind noch zu wenige Mitglieder der ACD-Familie bezüglich ihres Substratspektrums charakterisiert, um an dieser Stelle eine detaillierte Analyse der Sequenz-Funktionsbeziehung liefern zu können. Um jedoch einen Einblick in Determinanten der Substratpräferenz zu gewinnen, wurden die Sequenzen von *ckcACD1* und den bezüglich ihres Substratspektrums charakterisierten ACDs aus *P. furiosus* überlagert. In Abbildung 3.1c ist das Ergebnis der Sequenzausrichtung für die Reste der potentiellen Substrattasche gezeigt. Es zeigt sich eine deutlich heterogene Zusammensetzung, wie sie im Prinzip jedoch bei unterschiedlicher Substratpräferenz zu erwarten ist. Interessanterweise besitzen *ckcACD1* und *pfACD1* neben einem vergleichbaren Substratspektrum auch eine identische Zusammensetzung ihrer Substrattaschen, wobei die α -Untereinheiten beider Proteine eine Sequenzidentität von etwa 50 % aufweisen. Die gleichen Reste sind in den anderen Isoenzymen aus *P. furiosus* unterschiedlich. Hierbei sind die Sequenzen zwischen 35%–42% identisch.

3. Diskussion

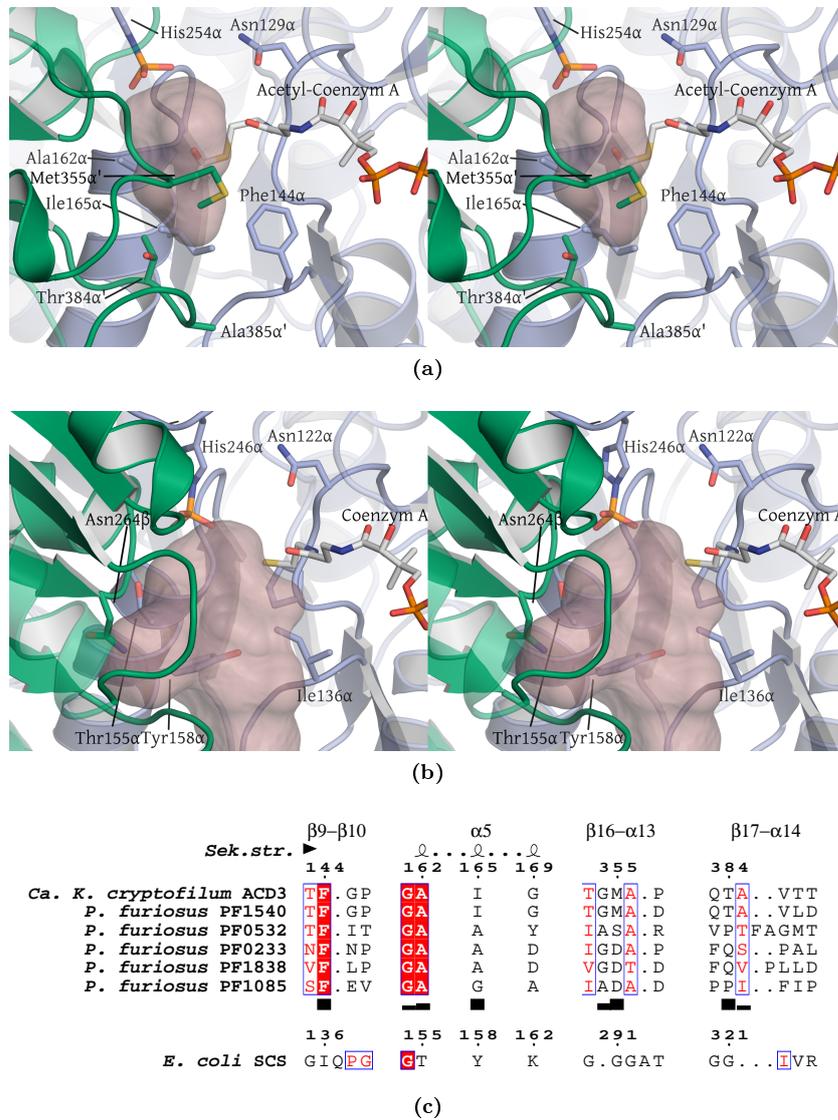


Abb. 3.1.: Die Substratspezifität wird durch den Aufbau der Substrattasche bestimmt. Das verfügbare Volumen der Substrattasche für die Bindung verschiedener Coenzym A-Thioester unterscheidet sich stark bei (a) *ckcACD1* und (b) *ecSCS*. Abbildungen (a) und (b) in *wall eye*-Stereo. (c) Überlagerung der Sequenzen von *Ca. K. cryptofilum* ACD1 mit den fünf Isoformen der ACDs aus *P. furiosus*. Von letzteren sind die umgesetzten Substrate im Detail bekannt (Scott *et al.*, 2014). Die Beteiligung einzelner Reste an der Substraterkennung wurde anhand der *ckcACD1* abgeschätzt und als schwarze Balken abgebildet. Zum Vergleich wurden zudem die korrespondierenden Reste der *ecSCS* dargestellt.

3.4. Strukturelle Einsichten in die Funktionsweise der *ckcACD1*

Sobald große CoA-Thioester umgesetzt werden sollen, muss zudem noch eine Vergrößerung der oben beschriebenen Substrattasche erfolgen. Die zu erwartenden strukturellen Unterschiede sollen anhand der Isoenzyme *pfACD1* und *pfACD2* aus *Pyrococcus furiosus* erläutert werden. *pfACD1* gehört ebenfalls zur Klasse I (Mai und Adams, 1996; Scott *et al.*, 2014). Dahingegen wird *pfACD2* aufgrund seiner Präferenz für Arylthioester des Coenzym A zur Klasse II gezählt (Mai und Adams, 1996; Scott *et al.*, 2014). Die Substrattasche der *ckcACD1* wird auf einer Seite durch Aminosäuren der Schleifen zwischen den Faltblattsträngen $\beta 16$ und der darauffolgenden Helix $\alpha 13$ (im Folgenden Schleife $\beta 16\text{-}\alpha 13$ genannt) sowie $\beta 17$ und $\alpha 14$ (Schleife $\beta 17\text{-}\alpha 14$) begrenzt. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen ACDs kann angenommen werden, dass Substrate in ähnlicher Weise zur *ckcACD1* gebunden werden und die Schleifen $\beta 16\text{-}\alpha 13$ und $\beta 17\text{-}\alpha 14$ bei anderen ACDs und auch bei der *pfACD2* eine vergleichbare Rolle spielen. Im Sequenzvergleich der *ckcACD1* und *pfACD2* zeigt sich jedoch keine Verkürzung dieser Schleifen, was prinzipiell für eine Vergrößerung der Bindetasche zu erwarten gewesen wäre. Schleife $\beta 17\text{-}\alpha 14$ der *pfACD2* weist tatsächlich sogar zwei Aminosäuren mehr auf. In Anbracht dessen, können voluminösere Liganden nur durch eine räumliche Verschiebung der Ligase-Subdomäne 5 erreicht werden. Im vorherigen Abschnitt wurde aber über die Funktion der Seitenkette des Restes Ile165 α spekuliert. So besitzt *pfACD1* an der korrespondierenden Stelle ebenfalls ein Isoleucin, Ile170 α . Auf der anderen Seiten hat *pfACD2* an der gleichen Position ein Alaninrest. Durch die kleinere Seitenkette können dementsprechend größere Thioester gebunden werden. Ob allein dieser Austausch ausreicht um effektiv aromatische CoA-Thioester zu binden, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Es ist daher anzunehmen, dass sowohl eine kleine Verschiebung der Subdomäne 5 und eine kleinere Seitenkette an der äquivalenten Stelle zur Aminosäure Ile165 α der *ckcACD1* auftreten, um spezifisch voluminöse Substrate zu metabolisieren. Es wurde daraufhin überprüft, ob einige dieser Effekte an der Kristallstruktur des PH0766 aus *Pyrococcus horikoshii* (PDB-Eintrag 2CSU) nachzuweisen sind. Dieses Protein kann basierend auf seiner Sequenz (91% Sequenzidentität zu *pfACD2*) ebenfalls zu Klasse II eingeordnet werden. Insbesondere die Aminosäuren der Bindetasche sind identisch. Die Überlagerung der Subdomänen 1, 2 und 5' der *ckcACD1* mit den korrespondierenden Subdomänen der Kristallstruktur 2CSU ergab eine mittlere Abweichung *RMSD* von 1,6 Å. Dieser Wert ist geringer als der Unterschied zwischen den kompletten α -Untereinheiten (Aufbau 1, 2 und 5) mit einem *RMSD* von 1,8 Å. Obwohl sicherlich durch die Ausbildung des vollständigen ACD-Komplexes geringe strukturelle Veränderungen zu erwarten sind, könnte dies jedoch darauf hindeuten, dass die spezifische Orientierung der Subdomänen 1, 2 und 5'

3. Diskussion

evolutionär beschränkt ist und Substratspezifität größtenteils durch Neuausrichtung der Schleifen in der Substrattasche erreicht wird. Schleife $\beta 16$ - $\alpha 13$ überlagert aber sehr gut mit dem korrespondierenden Abschnitt der *ckcACD1*. Dahingegen ist die längere Schleife $\beta 17$ - $\alpha 14$ anders orientiert. Interessanterweise ist eine der zusätzlichen Aminosäuren dieser Schleife (Phe381 α' im Fall der Struktur 2CSU) in gutem Abstand um mit aromatischen Coenzym A-Thioestern zu interagieren. Auch in der Sequenz der *pfACD2* befindet sich der gleiche Rest an der identischen Position.

Zusammenfassend kann daher angenommen werden, dass der Anordnung der Subdomänen 1, 2 und 5' in ACDs vorraussichtlich sehr ähnlich ist und die Ausrichtung und Aminosäurekomposition der dazwischenliegenden Schleifen die durch die ACD umsetzbaren Substrate bestimmen. Das Phänomen der Domänenvermischung (*domain shuffling*) scheint nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Postulierter enzymatischer Mechanismus - Reaktionszentrum *site I*

Bislang sind die enzymatischen Teilschritte von *ckcACD1* nicht im Detail untersucht. In einer Arbeit von Bräsen *et al.* (2008) wurde jedoch der Mechanismus des homologen Proteins ACD1 aus *P. furiosus* studiert. *ckcACD1* und *pfACD1* besitzen deutliche Gemeinsamkeiten auf. Beide Proteine bilden $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramere (Mai und Adams, 1996), wobei die Untereinheiten einen identischen Aufbau besitzen (α : Subdomänenkomposition 1-2-5 und β : Subdomänenkomposition 3-4). Die Sequenzen sind zu 50 % identisch. Basierend auf den umgesetzten Substraten gehören *ckcACD1* und *pfACD1* zur Klasse I der ACDs (Schmidt, 2013; Scott *et al.*, 2014). Zusammenfassend kann angenommen werden, dass *ckcACD1* und *pfACD1* nach einem vergleichbaren Mechanismus funktionieren. Interessanterweise scheinen die an Reaktionszentrum *site I* ablaufenden Teilschritte (Phosphorylyse der Acyl-CoA-Bindung und die Reaktion des Acyl-Phosphats mit dem konservierten Histidinrest) auch bei *ecSCS* analog ablaufen (Bräsen *et al.*, 2008). Möglicherweise trifft dies auch auf andere Mitglieder der Superfamilie zu. Demzufolge könnte ein Vergleich von Gemeinsamkeiten von Sequenz und Struktur von *ckcACD1*, *pfACD1* und *ecSCS* Erkenntnisse über die Funktionsweise von dinukleotid-bildenden Acyl-CoA Synthetasen erbringen.

3.4. Strukturelle Einsichten in die Funktionsweise der *ckcACD1*

Tatsächlich zeigen sich deutliche Gemeinsamkeiten in der dreidimensionalen Anordnung der korrespondierenden Subdomänen (1, 2 und 5) sowie dem Bindungsmodus des Substrates Coenzym A in *ecSCS* und *ckcACD1* (siehe dazu Abbildungen 3.2a und 3.2b). Die Überlagerung der Strukturen offenbart auch die räumliche Äquivalenz der Aminosäuren His254 α und His246 α , Glu213 α und Glu208 α , Asp351 α ' und Asp288 β sowie Asn129 α und Asn122 α der *ckcACD1* bzw. der *ecSCS* (siehe Abbildungen 3.2c und 3.2d). Aus verschiedenen Mutagenesestudien zur *E. coli* SCS ist bekannt, dass die Phosphorylierung des His246 α essentiell für die Funktion von *ecSCS* ist (Majumdar *et al.*, 1991). Weiterhin wurde auch die Aminosäure Glu208 α als notwendig für die enzymatische Aktivität der *ecSCS* identifiziert (Fraser *et al.*, 2002). Die Bedeutung der entsprechenden Reste der *pfACD1*, His257 α und Glu218 α , wurde ebenfalls durch eine Studie untersucht. Auch hier wurde festgestellt, dass diese Aminosäurereste unerlässlich für die Funktionsfähigkeit sind (Bräsen *et al.*, 2008). Bei der *ecSCS* interagiert die Carboxylgruppe des Glu208 α mit dem Proton des N δ der Imidazolseitenkette des ec-His246 α . Dies ist ebenso der Fall in der *ckcACD1*. Auch hier wird die richtige Konformation und Protonierungszustand von His254 α durch Glu213 α stabilisiert (siehe Kapitel 2.6.3). Diese Reste sind in der Superfamilie der Acyl-Coenzym A-Synthetasen hochkonserviert (Sánchez *et al.*, 2000). Es ist daher davon auszugehen, dass die äquivalenten Aminosäuren in anderen ACDs die gleiche Funktion erfüllen.

Bis jetzt konnten keine strukturelle Informationen über die beiden ersten Teilschritte, die Phosphorylyse des Coenzym A-Thioesters und die Übertragung der Phosphorylgruppe auf das aktive Histidin, der durch ACDs bzw. SCS durchgeführten enzymatischen Reaktion gewonnen werden. Auch mit den in dieser Arbeit erhaltenen Kristallstrukturen kann nur über einen möglichen Mechanismus spekuliert werden. So sind die Abstände zwischen dem gebundenen Phosphat und der Thioesterbindung mit etwa 5 Å zu groß für einen nukleophilen Angriff eines der Sauerstoffe des Phosphatrestes (siehe Abbildung 3.3a). In direktem Kontakt mit der Phosphatgruppe steht allerdings die Aminosäure Ser160 α . Die Seitenkette dieses Restes bildet eine starke Wasserstoffbrücke zu den Sauerstoffatomen sowohl zum freien Phosphat (P_i) als auch zum τ -Phospho-His254 α . Der in der *ecSCS* äquivalente Rest ist Ser153 α . Es wurde bereits in Fraser *et al.* (2002) über eine mögliche Beteiligung dieser Aminosäure spekuliert. Prinzipiell könnte das Serin mitsamt gebundenem Phosphat in einer „Aufklappbewegung“ näher an das Coenzym A bewegt werden, so dass daraufhin ein nukleophiler Angriff stattfinden kann. Interessanterweise ist dieser Serinrest als hochkonserviertes (Q/R)SG-Motiv in NDP-bildenden Acyl-Coenzym A-Synthetasen vorhanden (siehe Sánchez *et al.* (2000)).

3. Diskussion

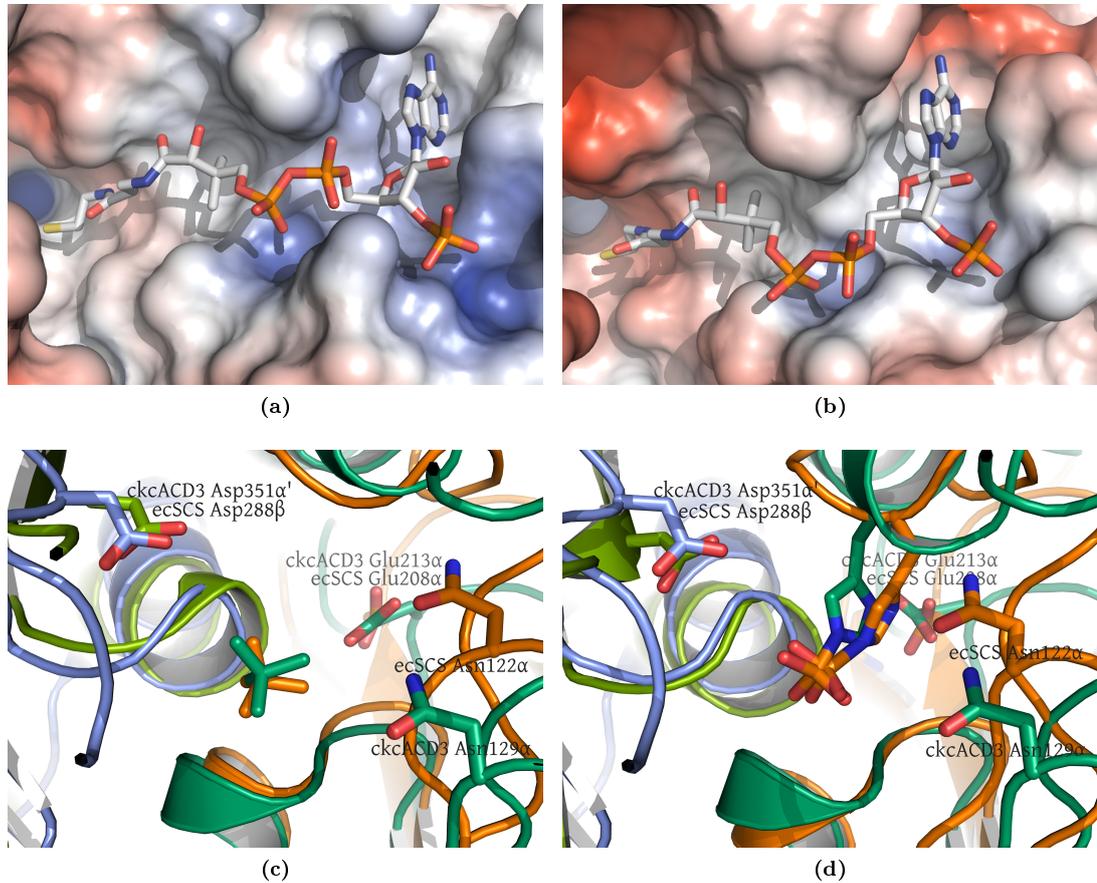


Abb. 3.2.: Vergleich der Reaktionszentren *site I* von *ecSCS* und *ckcACD1*. Darstellung der Oberflächenpotentiale und der Bindungsmodi von Coenzym A (a) der Kristallstruktur *ckcACD1*-A und (b) *E. coli* Succinyl-Coenzym A-Synthetase (PDB-Eintrag 2SCU, Fraser *et al.* (1999)). Zur besseren Ansicht wurde hier nicht das vollständige $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer der *ecSCS* gezeigt. Dargestellt ist ein $\alpha\beta$ -Protomer. Das Oberflächenpotential wurde ebenfalls für dieses Dimer berechnet. Berechnet wurden das Potential für einen pH-Wert von 8,0. Das Farbschema wurde so gewählt, dass rot einem Potential von $-8 \text{ kT}/e$, blau einem Potential von $8 \text{ kT}/e$ entspricht. Kohlenstoffatome wurden weiß, Stickstoffatome blau, Sauerstoffatome rot, Schwefelatome gelb und Phosphoratome orange gefärbt. (c) und (d) Die Untereinheiten der *E. coli* SCS und *Ca. K. cryptofilum* ACD1 sind wie folgt gefärbt: *ecSCS* α orange, β erbsgrün, *ckcACD1* α grün, β blau. Die Kohlenstoffatome der in Stabdarstellung gezeigten Reste besitzen die Farbe ihrer jeweiligen Untereinheit. Sauerstoff- und Stickstoffatome sind rot bzw. blau gezeigt. c) Bindungsmodus von Phosphationen durch die *ecSCS* und *ckcACD1*. Die Phosphate sind jeweils mittig in der Farbe des dazugehörigen Moleküls dargestellt. d) Sterische Situation der Phosphohistidinbindung durch die α -Untereinheiten der *ckcACD1* bzw. den α - und β -Untereinheiten der *ecSCS*.

3.4. Strukturelle Einsichten in die Funktionsweise der *ckcACD1*

Unterschiedlich ist die dem Serin vorangestellte Aminosäure, wobei hier eindeutig zwischen den einzelnen Proteinfamilien SCS (Arginin) und ACDs (Glutamin) differenziert werden kann. Beide haben vermutlich eine strukturelle Funktion. In der *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* ACD1 akzeptiert das O δ des Gln259 α Wasserstoffbrücken von den Aminogruppen des Proteinerückgrats der Aminosäuren Glu213 α und Gly214 α und sorgt für die korrekte Ausrichtung der β 12- α 7-Schleife. Das genannte Glutamat entspricht Glu218 α bei *pfACD1*. Dieses ist für die enzymatische Aktivität unabdingbar (Bräsen *et al.*, 2008). Arg152 α stabilisiert in der *ecSCS* eine korrespondierende Schleife. So wird die Aminosäure Glu208 α , die ebenfalls für die Funktion des Enzyms notwendig ist (Fraser *et al.*, 2002), korrekt ausgerichtet. Tatsächlich sind beide Reste strukturell äquivalent (siehe Abbildungen 3.2c und 3.2d). Möglicherweise spielt zusätzlich eine weitere hochkonservierte Aminosäure eine Rolle. Die Autoren in Fraser *et al.* (2002) vermuteten, dass die Aminosäure Cys123 α bei der *ecSCS* eine wichtige Rolle spielt. Dieser Rest ist allerdings oftmals gegen Aminosäuren mit komplett unterschiedlichen Charakteristiken ihrer Seitenkette, wie z. B. Alanin oder Isoleucin, ausgetauscht. So weisen Hidber *et al.* (2007) diesem Rest letztendlich nur strukturelle Bedeutung zu. Die *ckcACD1* besitzt an korrespondierender Position ein Isoleucin, Ile130 α . In direkter räumlicher Nähe befindet sich aber ein konserviertes GPN-Motiv, wobei die Seitenkette des Asparagins sich sowohl in den Kristallstrukturen der *ecSCS* (Asn122 α) als auch in der *ckcACD1* (Asn129 α) an der Stelle befindet, wo in etwa der Phosphatrest zum nukleophilen Angriff vermutet werden kann.

Der Bindungsmodus der Acetyl-Phosphatspezies ist ebenfalls unbekannt. Daher kann an dieser Stelle auch nur über einen möglichen Mechanismus nachgedacht werden. Mit der Analyse der Kristallstrukturen der *ckcACD1* fällt auf, dass das Phosphohistidinsegment eine große konformationelle Beweglichkeit aufweist (siehe dazu auch Abbildung 3.3b). In manchen Fällen war die Elektronendichte in diesem Bereich so verrauscht, dass die dazugehörigen Reste nicht gebaut werden konnten. Auf der anderen Seite ist der Bindungsmodus von Phosphat bzw. der Phosphorylgruppe des τ -Phosphohistidins genau definiert. Dieser unterscheidet sich in den ermittelten Strukturen nur wenig voneinander. Es ist daher anzunehmen, dass die Imidazolseitenkette des His254 α für einen nukleophilen Angriff durch eine Bewegung der Phosphohistidinsegments in die richtige Position gebracht wird. Unter der Annahme, dass der Bindungsmodus von Acylphosphat durch den Bindungsmodus des Phosphations beschrieben werden kann, müssen noch weitere Voraussetzungen gelten. Hierbei sollte (1) der Bindungsmodus nur geringfügig durch die sterischen Gegebenheiten des Acylrests beeinflusst werden und (2) der

3. Diskussion

Mechanismus sollte auf andere Acyl-Coenzym A-Synthetasen übertragbar sein. Unter den angenommenen Voraussetzungen verbleibt nur das unter Abbildung 3.3a gezeigte Sauerstoffatome. Dieses ist ebenfalls für einen nukleophilen Angriff auf die Thioesterbindung des Acetyl-Coenzym A am nächsten. Interessanterweise kann dann die Ketofunktion des Acylphosphats eines der Wassermoleküle der Koordinationssphäre des durch Asp351 α ' komplexierten Magnesiumions ersetzen. So wird auch eine Stabilisierung der negativen Ladung des bei der Reaktion entstehenden Carboxylats ermöglicht. Die positive Ladung des τ -Phosphohistidins wird durch Interaktion der Imidazolgruppe mit der negativ geladenen Carboxylgruppe von Glu213 α ausgeglichen. In Abbildung 3.3c ist ein möglicher Mechanismus dargestellt. Hierbei spielt das gebundene Metall eine wichtige Rolle. Allerdings ist bisher noch nicht untersucht, an welchem der Teilschritte Metallionen beteiligt sind. In Zukunft sollten dahingehend Studien durchgeführt werden.

3.4.2. Transport des aktivierten Phosphats zwischen den Reaktionszentren *site I* und *site II*

Die Bindetasche für die Coenzym A-Thioester auf der α -Untereinheit (Reaktionszentrum *site I*) und die Bindestelle für Nukleotide auf der β -Untereinheit (Reaktionszentrum *site II*) sind im *ckcACD1*-Komplex sehr weit voneinander entfernt (siehe dazu Abbildung 2.22c). Der Transport der aktivierten Phosphatgruppe zwischen den Reaktionszentren *site I* und *site II* erfordert daher eine bedeutende Umlagerung innerhalb des Proteins. Im Fall der *ecSCS* wird ein „*swinging loop*“-Mechanismus vermutet (Joyce *et al.*, 2000). Hierbei soll sich die Schleife, die das Phosphohistidin enthält, umlagern und im Laufe der enzymatischen Reaktionsweges zwischen den beiden Bindungsstellen hin und her „schwingen“. Bislang wurden jedoch keine strukturellen Daten veröffentlicht, die diese Umlagerung zeigen. Mit den in dieser Arbeit erhaltenen Kristallstrukturen können erstmals detaillierte strukturelle Aussagen über diese postulierte Umklappbewegung gemacht werden. In der Kristallstruktur *ckcACD1-C* sind die Aminosäuren Gly242 α bis Val262 α so angeordnet, dass diese durch die β -Untereinheit gebunden werden. Der konservierte Histidinrest His254 α wird dabei in räumliche Nähe zum gebundenen Nukleotid gebracht.

3.4. Strukturelle Einsichten in die Funktionsweise der *ckcACD1*

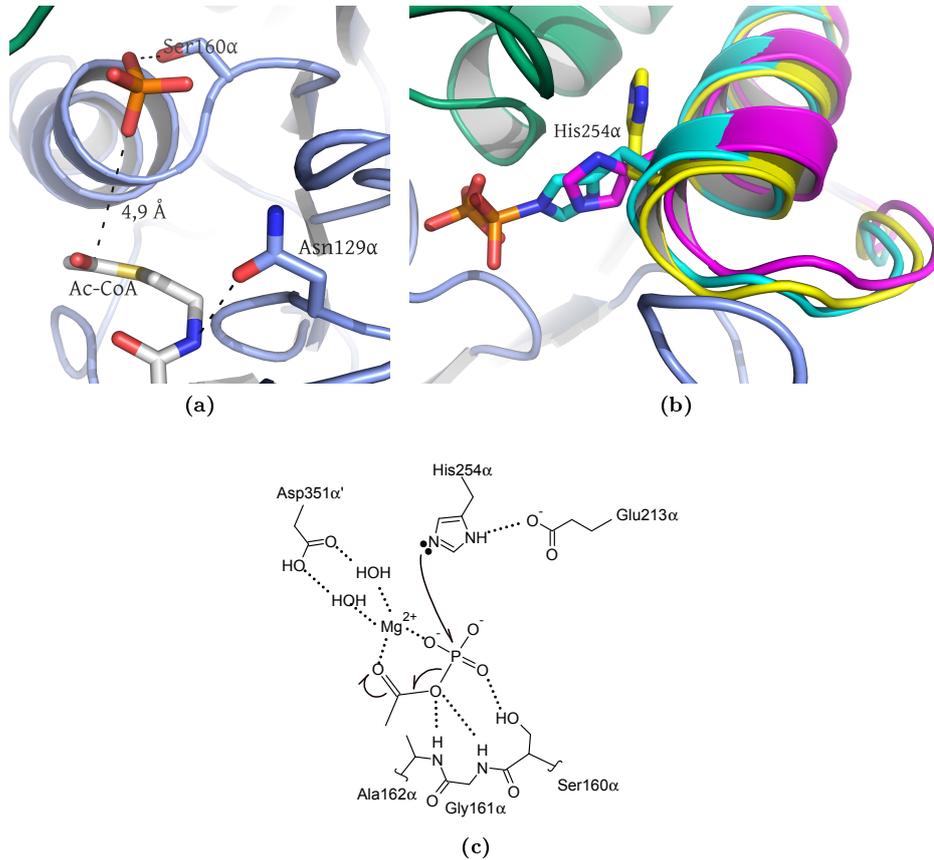


Abb. 3.3.: Phosphorylyse von Acetyl-Coenzym A und Phosphorylierung von His254 α . (a) Mit 4,9 Å ist der Abstand zwischen der Thioesterbindung zum nächstgelegenen Sauerstoffatom der Phosphatgruppe sehr groß. (b) Flexibilität der Phosphohistinschleife in Abwärtsposition und der Aminosäure His254 α . Gelb: kein Phosphat gebunden. Magenta: Phosphat gebunden. Cyan: τ -Phosphohistidin. (c) Möglicher Reaktionsmechanismus der Phosphorylierung des His254 α .

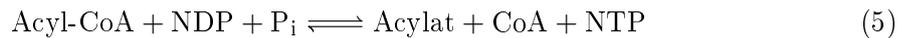
3. Diskussion

Für *E. coli* SCS wurde ein hypothetisches Modell der Phosphohistidinschleife („*swinging loop*“) in Wechselwirkung mit dem Reaktionszentrum *site II* vorgestellt (Joyce *et al.*, 2000). In diesem Modell stabilisiert die Seitenkette des Glutamatrestes Glu197 β den idealen Protonierungszustand des phosphorylierten Histidinrestes His246 α (Fraser *et al.*, 1999; Joyce *et al.*, 2000). Im Anschluß durchgeführte Mutagenestudien konnten tatsächlich zeigen, dass die Aminosäure Glu197 β am Reaktionsgeschehen beteiligt ist (Fraser *et al.*, 2002). Dies wird ebenfalls von einem weiteren Rest, Tyr109 β , angenommen (Fraser *et al.*, 2002). Die Rolle beider Reste in der enzymatischen Katalyse der *ecSCS* ist bislang jedoch nicht abschließend geklärt. Von Mutagenesestudien an der *pfACD1* ist bekannt, dass neben der Ladung auch die Länge der Seitenkette des zur Aminosäure Glu197 β in *ecSCS* korrespondierende Rest Asp212 β von Bedeutung ist (Bräsen *et al.*, 2008). Im Kontrast dazu beeinflusst die Länge der Seitenkette des Glu197 β in der *ecSCS* nur geringfügig die enzymatische Aktivität des Enzyms (Fraser *et al.*, 2002). Ob diese Unterschiede durch eine abweichende Nutzung der Reste in der Katalyse von ACD und SCS beruht, ist bisher nicht bekannt.

Der in Joyce *et al.* (2000) dargestellte Interaktionsmodus der Phosphohistidinschleife mit dem Reaktionszentrum *site II* von *ecSCS* unterscheidet sich aber signifikant von der beobachteten Wechselwirkung des Phosphohistinsegmentes mit dem Reaktionszentrum *site II* bei *ckcACD1*. So ist auch die Funktion des zum Glu197 β der *ecSCS* strukturell äquivalenten Restes Asp209 β der *ckcACD1* unterschiedlich. Die Carboxylgruppe von Asp209 β interagiert mit den Hauptkettenstickstoffatomen zweier Aminosäuren His254 α und Thr255 α und stabilisiert damit das Phosphohistidinsegment während der Interaktion mit der β -Untereinheit (siehe Abbildung 3.4a). In der beobachteten Anordnung interagiert die Aminosäure Asp144 β mit der Imidazolgruppe des konservierten Histidinrestes His254 α des Phosphohistidinsegments und gewährleistet den optimalen Protonierungszustand für den Phosphoryltransfer. Obwohl die Funktion der genannten Aminosäuren Asp144 β und Asp209 β aus den ermittelten Kristallstrukturen abgeleitet werden kann, müssen weitere Studien zur Ermittlung ihrer biochemischen Funktion durchgeführt werden.

3.4.3. Substratspezifität und Mechanismus des Reaktionszentrums *site II*

Durch Reaktionszentrum *site II* werden folgende Teilschritte katalysiert. Diese sind (3) die Übertragung der Phosphorylgruppe von der Aminosäure His254 α auf His68 β unter Bildung von Phospho-His68 β und (4) die Phosphorylierung des gebundenen Dinukleotids. Das entstandene Trinukleotid wird aus dem Reaktionsgeschehen entlassen.



Substratspezifität - Nukleotidbindestelle

Mitglieder der Proteinfamilien der ACDs als auch der SCSs sind in der Lage Purinnukleotide umzusetzen, jedoch sind einige Vertreter spezifisch für entweder Adenosin- bzw. Guanosinnukleotide (Mai und Adams, 1996; Sánchez und Müller, 1996; Glasmacher *et al.*, 1997; Musfeldt und Schönheit, 2002; Bräsen und Schönheit, 2004b). Kinetische Studien wurden bis zu diesem Zeitpunkt nur mit Adenin-basierten Nukleotiden durchgeführt (Schmidt, 2013). In dieser Arbeit wurden zudem ausschließlich Kristallisationsansätze mit ADP sowie den nicht-hydrolysierbaren ADP- und ATP-Analoga AMPCP bzw. AMPPCP durchgeführt. Da demzufolge nicht bekannt war, ob *ckcACD1* auch Guanin-basierte Nukleotide verstoffwechseln kann, wurden Sequenzvergleiche mit ACDs durchgeführt, von denen bekannt war, dass diese Guanosinnukleotide umsetzen. Nukleotidspezifität wird bei ACDs durch das Reaktionszentrum *site II* der *ATP grasp*-Domäne bewerkstelligt. Im Fall der *ckcACD1* interagiert die Seitenkette

3. Diskussion

der Aminosäure Gln111 β mit dem N6-Stickstoffatom des Adenins. Dieser Rest (im Folgenden genannt Position P1) sowie die Seitenkette der Aminosäure an der korrespondierenden Position von Thr35 β der *ckcACD1* (im Folgenden genannt Position P2) sind möglicherweise prinzipiell für die Nukleotidspezifität der *ATP grasp*-Enzymen verantwortlich (Kothe und Powers-Lee, 2004). Beide Isoformen der *ATP grasp*-Domäne der ACDs aus *P. furiosus* (Mai und Adams, 1996; Scott *et al.*, 2014) sowie AF1211 und AF1938 aus *A. fulgidus* (Musfeldt und Schönheit, 2002) können Adenosin- und Guanosinnukleotide umsetzen. Auch die SCS aus *E. coli* ist dazu in der Lage (Joyce *et al.*, 2000; Fraser *et al.*, 2002). Beide Isoenzyme aus *P. furiosus* haben an der korrespondierenden Stelle P1 entweder ein Tyrosin bzw. Alanin und als P2 ein Prolin, weshalb kein direkter Vergleich mit *ckcACD1* angestellt werden kann. Auf der anderen Seite besitzen sowohl AF1211 und AF1938 ein Glutamin an der äquivalenten Position P1. In Position P2 findet sich in beiden Fällen die Aminosäure Alanin. Sowohl Threonin als auch Alanin können in die Gruppe der Aminosäuren mit kleiner Seitenkette eingeordnet werden und haben daher ähnliche Eigenschaften. AF1211 kann ATP und GTP mit der gleichen Rate umsetzen, AF1938 bevorzugt ATP vor GTP mit gewisser Spezifität (Musfeldt und Schönheit, 2002). Basierend auf diesem Vergleich erscheint es möglich, dass auch die *ckcACD1* Guanosinnukleotide als Substrat akzeptiert. Die daraufhin in der Arbeitsgruppe Prof. Schönheit durchgeführten kinetischen Studien mit GDP zeigten, dass dieses bereitwillig von *ckcACD1* umgesetzt wird (Weiße *et al.*, 2016).

Durch die zusätzliche Aminogruppe am Purinring von Guanin müsste sich jedoch der Interaktionsmodus von Guanin-basierten Nukleotiden mit der *ATP grasp*-Domäne vom Bindungsmodus von Adenin-basierten Nukleotiden unterscheiden. Um zu verstehen, wie dieser Interaktionsmodus aussehen könnte, wurde *ckcACD1* mit der Proteinkinase CK2 aus *Zea mays* überlagert. CK2 besitzt eine *ATP grasp*-Domäne und ist in der Lage sowohl Adenosin- als auch Guanosinnukleotide zu verstoffwechseln (Issinger, 1993; Allende und Allende, 1995). Zudem wurden Proteinstrukturen von CK2 im Komplex mit ATP (PDB-Eintrag 1DAW) bzw. GTP (PDB-Eintrag 1DAY) veröffentlicht (Niefind *et al.*, 1999). Folgende Erkenntnisse konnten abgeleitet werden: (i) bei CK2 interagiert die Adeningruppe von ATP ähnlich zur *ckcACD1* und (ii) bei CK2 ist die Guaningruppe von GTP verschoben und interagiert vergleichbar dem Bindungsmodus in der Struktur der GTP-spezifischen *ssSCS* (Fraser *et al.*, 2006). Ein ähnlicher Interaktionsmodus ist für Guanin-basierte Nukleotide auch bei *ckcACD1* zu erwarten.

Postulierter enzymatischer Mechanismus - Reaktionszentrum *site II*

Die Lid-Domäne der *ATP grasp*-Domäne war in den erhaltenen Kristallstrukturen der *ckcACD1* hochbeweglich. Dies ist insofern interessant, als dass die restriktive Packung eines Kristallgitters einem Protein selten hohe Bewegungsfreiheit ermöglicht und die strukturelle Untersuchung von Enzymen, die während ihres enzymatischen Prozesses eine große konformationelle Umlagerung durchführen, dadurch erschwert wird. Üblicherweise müssen hierzu neue Kristallformen gefunden werden, in dem das Protein in der Kristallmatrix in einer anderen Konformation stabilisiert und für die Röntgenstrukturanalyse zugänglich wird. Die größte in dieser Arbeit beobachtete Öffnung der *ATP grasp*-Domäne beträgt etwa 25° in der Kristallstruktur *ckcACD1*-I. In Studien zur *E. coli* Biotin-Carboxylase (Thoden *et al.*, 2000b; Sloane *et al.*, 2001), der *S. cerevisiae* Glutathion-Synthetase (Gogos und Shapiro, 2002) und der *P. furiosus* 5-Formaminoimidazol-4-carboxamide-Ribonucleotidsynthetase (Zhang *et al.*, 2008) wurde diese Art der Öffnungs- bzw. Schließbewegung der *ATP grasp*-Domäne bereits beschrieben. So zeigt der Vergleich der Strukturen der Biotin-Carboxylase zweier Kristallformen einen Öffnungswinkel der Lid-Domäne von 45° (Thoden *et al.*, 2000b; Sloane *et al.*, 2001). In den beiden Kristallformen der Glutathion-Synthetase findet sich sogar ein Öffnungswinkel von 65° (Gogos und Shapiro, 2002). In beiden Fällen wird angenommen, dass die Bindung des Substrates die Schließbewegung der Lid-Domäne induziert. Prinzipiell sorgt die Öffnung der *ATP grasp*-Domäne dafür, dass die Substrattasche für das Substrat zugänglich ist, die Schließung, dass die katalytisch genutzten Aminosäuren in optimale Position gebracht werden und dass das umgebende Solvent vom Reaktionsgeschehen ausgeschlossen wird (Polekhina *et al.*, 1999).

Der Abstand von His254 α (Orientiert zum Reaktionszentrum *site II*) zur β -Phosphatgruppe von ADP beträgt etwa 9 \AA und etwa 7 \AA zu His68 β , dem zweiten, hochkonservierten Histidinrest in der Familie der ACDs. Die Distanz zwischen His254 α und ADP scheint für eine Übertragung des aktivierten Phosphatrestes zu groß sein, so dass ein Mediator benötigt wird. Tatsächlich wurde für His68 β festgestellt, dass *ckcACD1* nach Austausch dieses Restes nur noch geringfügig aktiv ist (Weiße *et al.*, 2016). Es ist daher anzunehmen, dass His68 β bei der Funktion von *ckcACD1* eine essentielle Rolle einnimmt. Damit übereinstimmend führt der Austausch der korrespondierenden Aminosäure His71 β in *pfACD1* zur Inaktivierung des Enzyms (Bräsen *et al.*, 2008). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass His71 β im Laufe der enzymatischen Reaktion

3. Diskussion

phosphoryliert wird (Bräsen *et al.*, 2008). Es wird daher vermutet, dass ACDs einen vierstufigen Mechanismus durchlaufen.

In dieser Arbeit konnte keine Kristallstruktur mit phosphoryliertes His68 β erhalten werden. Es wurde daher versucht, den möglichen Mechanismus aus den ermittelten Kristallstrukturen abzuleiten. Die räumliche Ausrichtung der Histidinseitenketten von His254 α und His68 β in Kristallstruktur *ckcACD1-C* lässt ausschließlich einen nukleophilen Angriff des N ϵ der Imidazolgruppe von His68 β auf die Phosphorylgruppe von Phospho-His254 α zu. Hierbei entsteht τ -Phospho-His68 β . Die Übertragung der Phosphatgruppe auf ADP unter Bildung von ATP sollte prinzipiell auch nach einem S_N2-Mechanismus verlaufen. Betrachtet man die Konformationen von ADP bzw. AMPCP in den in dieser Arbeit bestimmten Kristallstrukturen, so ist dieser Mechanismus aus sterischen Gründen ausschließlich für ein π -Phospho-His68 β plausibel. In der Kristallstruktur *ckcACD1-C* findet sich jedoch das ATP-Analog AMPPCP in einem Bindungsmodus, der sich deutlich vom Dinukleotid unterscheidet. Es kann jedoch angenommen werden, dass der Interaktionsmodus des Produktes ATP durch den Bindungsmodus von AMPPCP beschrieben werden kann. Ob die Unterschiede zwischen Di- und Trinukleotid durch die teilweise Öffnung der Lid-Domäne oder durch die Interaktion des Phosphohistidinsegmentes verursacht wurde, kann aber auch nicht ausgeschlossen werden. Modelliert man aber die α - und β -Phosphatgruppen eines ADP-Moleküls in eine dem AMPPCP vergleichbare Anordnung, wird dadurch ein nukleophiler Angriff des β -Phosphats auf τ -Phospho-His68 β nach einem „*in-line*“-Mechanismus ermöglicht. An dieser Stelle soll hervorgehoben werden, dass, analog zur Rolle der Aminosäure Glu213 α zur Phosphorylierungsreaktion von His254 α an Reaktionszentrum *site I*, die Carboxylatgruppen der in räumlicher Nähe befindlichen Reste Glu144 β und Asp71 β zur Gewährleistung des idealen Protonierungszustandes der (Phospho-)Histidinspezies fungieren. Glu144 β ist in idealem Abstand zur Stabilisierung der optimalen Protonierung von (Phospho-)His254 α während der Orientierung des Phosphohistidinsegmentes in Richtung des Reaktionszentrums *site II*. Aufgrund seiner Lage in der T-Schleife ist der Aspartatrest Asp71 β in einer Position um den benötigten Protonierungszustand von (Phospho-)His68 β sicherzustellen. Interessanterweise sind beide Aminosäuren, Glu144 β und Asp71 β , innerhalb der Familie der ACDs konserviert.

Zusammenfassend lässt sich die Notwendigkeit für einen zusätzlichen Reaktionsschritt anhand der in dieser Arbeit erhaltenen Kristallstrukturen erklären. Dargestellt ist der postulierte Mechanismus in Abbildung 3.4c. Die im Rahmen der Dissertation durchge-

3.4. Strukturelle Einsichten in die Funktionsweise der *ckcACD1*

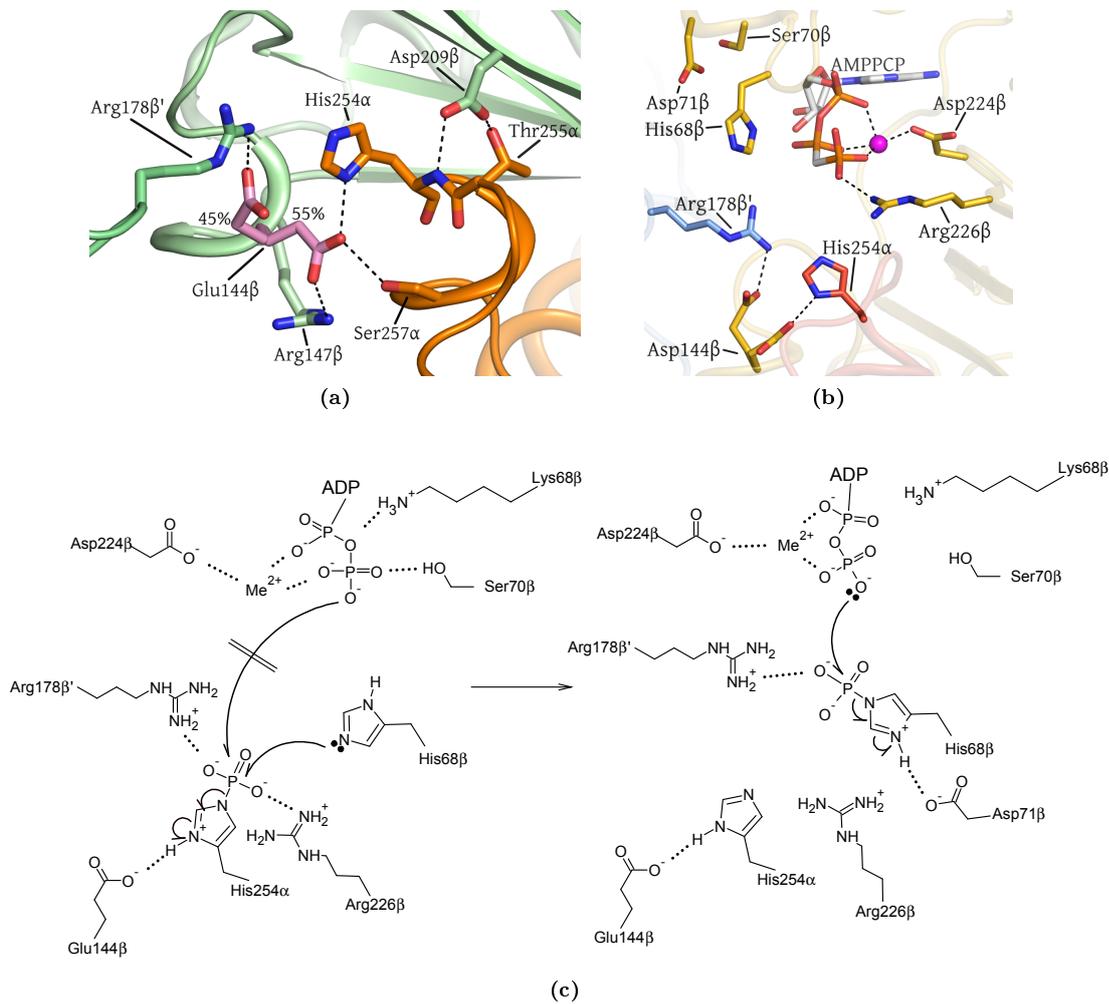


Abb. 3.4.: Vorgeschlagene Mechanismen der Energieerzeugung. (a) Interaktion des Phosphohistidinsegmentes mit Reaktionszentrum *site II*. Zwei Konformere des Glutamatrests Glu144 β werden in der Kristallstruktur *ckcACD1-C* beobachtet. Die dargestellten Werte entsprechen der verfeinerten Besetzung aus der Kristallstruktur. Konformer A (55 %) ist in Wasserstoffbrückenbindungen mit den Seitenketten von His254 α und Ser257 α des Phosphohistidinsegmentes. Zusätzlich findet sich eine Salzbrücke zur Guanidinegruppe von Arg147 β . Konformer B (45 %) bildet eine Salzbrücke zur Guanidinegruppe der Aminosäure Arg178 β' . In der Abbildung ist ebenfalls Asp209 β gezeigt. Dieser Rest stabilisiert das Phosphohistidinsegment über Wasserstoffbrückenbindungen zu der Seitenkette von Thr255 α und zum Hauptkettenstickstoff von His254 α . Einige Reste der Lid-Domäne wurden zur Klarheit der Darstellung nicht gezeigt. (b) Darstellung der Region um die Aminosäure His254 α in Orientierung zum Reaktionszentrum ADP. Die Anordnung entspricht der erwarteten Situation nach Übertragung der Phosphorylgruppe auf ADP (Kristallstruktur *ckcACD1-C*). (c) Möglicher zweistufiger Mechanismus. Der nukleophile Angriff erfolgt hier zunächst durch des N ϵ der Imidazolgruppe des His68 β . Mit einer Rotation der Seitenkette wird das entstandene τ -Phosphohistidin für einen nukleophilen Angriff der Phosphatgruppe des Dinukleotids in Position gebracht.

3. Diskussion

fürten Versuche zur Stabilisierung von Reaktionsintermediaten entlang des enzymatischen Reaktionspfades der *ckcACD1* waren jedoch bislang nicht erfolgreich. Anhand konformationeller Unterschiede der *ckcACD1* stabilisiert in verschiedenen Übergangszuständen könnten weitere Einblicke in die zugrundeliegenden enzymatischen Mechanismen gewonnen werden. Gegebenenfalls ist die im Kristall beobachtete Flexibilität der β -Untereinheit problematisch, da bestimmte Zustände des Proteins möglicherweise einen genau definierten Öffnungswinkel der *ATP grasp*-Domäne voraussetzen. In Zukunft könnte nach Kristallisationsbedingungen gesucht werden, bei denen die *ATP grasp*-Domäne im Kristallgitter stabilisiert und die Bindung von Übergangszustandsanaloga ermöglicht wird.

3.5. Der *ckcACD1*-Komplex ist prototypisch für andere ACDs

Die Superfamilie der dinukleotid-abhängigen Acyl-Coenzym A-Synthetasen ist durch ein Phänomen gekennzeichnet, dass als Domänenvermischung (*domain shuffling*) bezeichnet wird (Sánchez *et al.*, 2000). Prinzipiell scheinen fünf Subdomänen an einem funktionellem Enzym beteiligt zu sein. In Abhängigkeit von der Proteinfamilie sind diese jedoch unterschiedlich miteinander verbunden (Sánchez *et al.*, 2000). Im Fall der *E. coli* SCS besteht das Protein aus zwei Untereinheiten α - und β mit den Subdomänenkompositionen 1-2 bzw. 3-4-5 (Fraser *et al.*, 1999). Hierbei sind die Subdomänen 3 und 4 jedoch als eine strukturelle Einheit anzusehen (*ATP grasp*-Domäne). Ein SCS-ähnlicher struktureller Aufbau wird auch bei der ATP-Citrat-Synthase beobachtet. Hierbei besitzt dieses Enzym den Aufbau 3-4-5-1-2 mit einer zusätzlichen C-terminal fusionierten Domäne (Citrat-Synthase-ähnlich). Die Subdomänen 1, 2, 3, 4 und 5 sind gleich der *ecSCS* positioniert, weshalb ATP-Citrat-Synthase (ACLY) und *ecSCS* diesbezüglich in die gleiche Strukturfamilie eingeordnet werden können. Jedoch wurde die ACLY nur in einer verkürzten Form kristallisiert, die durch partiellen Verdau mit der Protease Trypsin erhalten wurde (Sun *et al.*, 2010). Das native Enzym weist eine homotetramere Struktur auf (Singh *et al.*, 1976). Bisher ist nicht bekannt, ob die Subdomänen in den Kristallstrukturen der ACLY von einer oder mehreren Polypeptidketten stammen (Sun *et al.*, 2010). Auch zwischen SCS, ACLY und *ckcACD1* finden sich strukturelle Gemeinsamkeiten. So sind die an der Ausbildung des Reaktionszentrums *site I* beteiligten

3.5. Der *ckcACD1*-Komplex ist prototypisch für andere ACDs

Subdomänen 1, 2 und 5 auf gleiche Weise zueinander ausgerichtet. Im Gegensatz dazu ist die *ATP grasp*-Domäne bei der *ckcACD1* auf eine andere Weise im Proteinkomplex angeordnet. Das ist nicht absolut verwunderlich. Obwohl nah verwandte Mitglieder einer bestimmten Proteinfamilie oftmals identische Domänenkontakte aufweisen (Valdar und Thornton, 2001; Rekha *et al.*, 2005), müssen die Kontaktflächen zwischen Domänen von entfernten Verwandten, die zu einer Proteinsuperfamilie zusammengefasst werden können, nicht unbedingt konserviert sein (Rekha *et al.*, 2005). Die Interaktionsbereiche sind im Laufe der Evolution oftmals divergiert. Bezogen auf die Familie der SCS sollte dies bedeuten, dass deren Mitglieder strukturell sehr ähnlich zueinander sind. Tatsächlich lässt sich dies bei den Strukturen der bakteriellen SCS aus *E. coli* (Wolodko *et al.*, 1994) und *T. aquaticus* (Joyce *et al.*, 2012) und der tierischen SCS aus dem Schwein (Fraser *et al.*, 2006) beobachten. Hier sind zudem die Komposition und das Arrangement der einzelnen Subdomänen identisch. In diesem Zusammenhang kann spekuliert werden, dass die Mitglieder der Familie der ACDs ebenfalls einen zueinander sehr ähnlichen dreidimensionalen Aufbau aufweisen und die in dieser Arbeit präsentierten Strukturen der *ckcACD1* charakteristisch für die Proteinfamilie sind.

Auch der Vergleich der Sequenzen verschiedener ACDs mit der *ckcACD1* zeigt eine allgemein hohe Konservierung der Subdomänen. Größere Abweichungen finden sich nur in der CoA-Ligase Subdomäne 5. Interessanterweise ist dies unabhängig davon, ob das Protein zur Klasse der Zwei-Komponenten- (Aufbau 1-2-5 & 3-4) oder Fusionstyp-ACDs (Aufbau 1-2-5-3-4 oder 3-4-1-2-5) angehört (siehe dazu auch Abbildungen 2.25 und 2.26). Womöglich kann die Komplexstruktur der *ckcACD1* als charakteristisch für die Familie der ACDs angesehen werden. Mittels dem Programm ConSurf (Glaser *et al.*, 2003; Landau *et al.*, 2005; Ashkenazy *et al.*, 2010; Celniker *et al.*, 2013) wurde der Konservierungsgrad von Aminosäuren ermittelt, die an der Oberfläche der einzelnen Domänen lokalisiert sind. Dargestellt ist das Ergebnis in Abbildung 3.5. Insbesondere diejenigen Reste, die an der Ausbildung der Reaktionszentren *site I* und *site II* beteiligt sind, sind hochgradig konserviert. Aber auch die Aminosäuren der Interdomänenkontakte, d. h. zwischen den α - α' -, α - β - und β - β' -Untereinheiten, sind im Großteil evolutionär durchschnittlich bis überdurchschnittlich konserviert. Dies gilt sowohl für die homotype Wechselwirkung zwischen den α -Untereinheiten (Abbildung 3.5a oben) sowie zwischen beiden β -Untereinheiten (Abbildungen 3.5b und 3.5c links) als auch für die heterotype Interaktion der α - und β -Untereinheiten (Abbildungen 3.5a unten sowie 3.5b und 3.5c rechts). Dies deutet auf konservierte Wechselwirkungsepitope hin. Analog dazu wurde das Interaktionsprofil der *E. coli* SCS untersucht. Auch hier sind

3. Diskussion

insbesondere diejenigen Reste konserviert, die an der Ausbildung der Reaktionszentren *site I* und *site II* beteiligt sind. Interessanterweise scheinen die Interaktionsflächen zwischen den Untereinheiten nicht gleichermaßen konserviert zu sein. So bestehen die Kontaktflächen zwischen den α - und β -Untereinheiten, die für ein funktionelles Enzym erforderlich ist, aus stärker konservierten Aminosäuren, als die Interaktionsfläche zwischen den $\alpha\beta$ -Protomeren der *ecSCS*. *SCS* kommen sowohl in einer heterodimeren (Aufbau $\alpha\beta$) oder heterotetrameren (Aufbau $\alpha_2\beta_2$) Form vor. Aus diesem Blickwinkel betrachtet, erscheint eine geringere Konservierung dieser Reste logisch.

Es wurde daraufhin nach weiteren Anhaltspunkten für die These gesucht, dass der *ckcACD1*-Komplex modellhaft für *ACDs* angesehen werden kann. In der Kristallstruktur der putativen α -Untereinheit aus *P. horikoshii* (PDB-Eintrag 2CSU) findet sich ein dimerer Aufbau, der identisch mit der Anordnung der α -Untereinheiten des *ckcACD1*-Komplex ist. In beiden sind ebenfalls die gleichen Epitope an der Bildung des Kontakts zwischen den Ketten verantwortlich. Subdomäne 1 beteiligt sich hierbei nur mit wenigen Resten an der Stabilisierung der Wechselwirkung, wohingegen die Interaktion zwischen den Subdomänen 2 und 5 maßgeblich für den Kontakt zwischen den α -Untereinheiten sorgen. Die Reste des Phosphohistidinsegments sind in der Kristallstruktur der *P. horikoshii* *ACD* nicht aufgelöst. Daher ist diesbezüglich kein Vergleich zur *ckcACD1* möglich. Trotz der hohen Sequenzidentität zwischen den beiden Proteinen, die ebenfalls eine hohe strukturelle Ähnlichkeit vermuten lässt, zeigt die Strukturvergleich eine relativ große Abweichung *RMSD* von 1,8 Å. Der Unterschied wird noch größer, wenn das komplette α -Dimer in Betracht gezogen wird (*RMSD* von 2,9 Å). Die Übertragbarkeit der *ckcACD1*-Komplexstruktur auf andere *ACDs* wurde daher durch Modellierung eines putativen *P. horikoshii* $\alpha_2\beta_2$ -Komplex weiter hinterfragt. Dazu wurden die Kristallstrukturen der Untereinheiten der putativen *P. horikoshii* *ACD* (PDB-Einträge 2CSU und 1WR2) mit den entsprechenden Untereinheiten des *ckcACD1*-Komplex strukturell überlagert. Es wurden keine großen sterischen Überlappungen erhalten, die nicht durch einfache Rotation der entsprechenden Seitenketten behoben werden konnten. Dies betraf ausschließlich die Aminosäuren Phe153 und Met137 der *P. horikoshii* β -Untereinheit. Interessanterweise passt sich die Seitenkette eines hochkonservierten Phenylalanins (Phe132 β der *phACD*) in eine hydrophobe Tasche der α -Untereinheit so ein, wie es ebenfalls bei der heterotypen Wechselwirkung zwischen den α - und β -Untereinheiten der *ckcACD1* beobachtet wird (Phe130 β der *ckcACD1*). In Zusammenfassung ist anzunehmen, dass der *ckcACD1*-Komplex als pro-

3.5. Der *ckcACD1*-Komplex ist prototypisch für andere ACDs

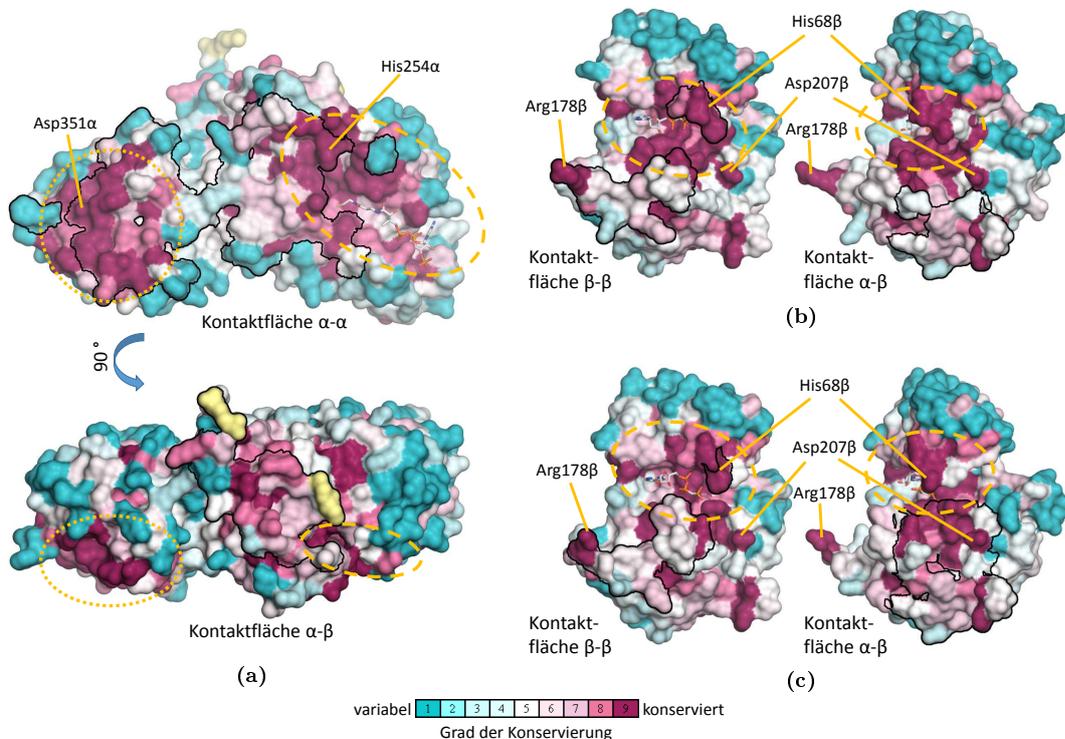


Abb. 3.5.: Oberflächenkonservierung der Untereinheiten des *ckcACD1*-Komplexes. Es wurde die evolutionäre Konservierung der Aminosäuren auf der Oberfläche der α - und β -Untereinheiten mittels dem Programm ConSurf (Glaser *et al.*, 2003; Landau *et al.*, 2005; Ashkenazy *et al.*, 2010; Celniker *et al.*, 2013) berechnet. Die verwendeten Farben geben den Grad der Sequenzkonservierung an. Gelb gefärbt sind Aminosäuren über die keine Aussage gemacht werden können. In schwarz sind die Bereiche eingerahmt, die an der Ausbildung des angegebenen Interdomänenkontakts beteiligt sind. (a) Dargestellt sind die Seitenansicht (oben) und die Aufsicht (unten) auf die α -Untereinheit der Kristallstruktur *ckcACD1*-G. In den Abbildungen (b) und (c) sind jeweils leicht gedrehte Aufsichten auf die Interaktionsfläche zwischen den beiden β -Untereinheiten (links) und dem Kontakt zwischen der β - und α -Untereinheit dargestellt. Gezeigt in (b) ist die geschlossene *ATP grasp*-Domäne in Kristallstruktur *ckcACD1*-B, in (c) die *ATP grasp*-Domäne der Kristallstruktur *ckcACD1*-C. Es wird deutlich, dass insbesondere die Reste stark konserviert sind, die an der Ausbildung der Reaktionszentren oder Bindungsstellen für die Substrate beteiligt sind. Mit orangefarbenen Ellipsen wurden jeweils diese Bereiche gekennzeichnet. Eine unterbrochene Linie wurde für in Abbildung (a) für den N-terminalen, eine gestrichelte Linie für den C-terminalen Anteil der *site I* verwendet. In Abbildung (b) und (c) wurde die unterbrochene Linie zur Markierung der Bindungsstelle des Nukleotids benutzt.

3. Diskussion

totypisch für zumindest diejenigen ACDs mit $\alpha_2\beta_2$ -heterotetrameren Aufbau angesehen werden kann.

Ob der Aufbau der *ckcACD1* auch denjenigen ACDs ähnelt, die aus nur einer Kette bestehen, kann nicht abschließend ausgesagt werden. Jedoch spricht einiges dafür. So scheinen die Primärstrukturen von ACDs unabhängig ihrer Komposition stark konserviert zu sein (siehe Kapitel 2.10). Dies trifft auch auf die Epitope zu, die an der Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten der *ckcACD1* beteiligt sind (siehe dazu auch Kapitel 2.10 und Abbildung 3.5). Es kann daher angenommen werden, dass die korrespondierenden Aminosäuren auch in Einzelketten-ACDs die gleiche Funktion übernehmen könnten. Weiterhin ergibt sich aus einer *ckcACD1*-ähnlichen Domänenanordnung eine relativ günstige Ausgangssituation für eine Fusion der Subdomänen sowohl für den Typ 1-2-5-3-4 als auch den Typ 3-4-1-2-5. Die frei zugänglichen Termini der Untereinheiten nähern sich in der *ckcACD1* auf etwa 33 Å, eine Entfernung, die leicht mit weniger als 20 Aminosäuren überbrückt werden kann. Vergleicht man dazu ein hypothetisches Modell basierend auf der *ecSCS*, so müssen die im Fall eines Fusionsproteins des Typs 1-2-5-3-4 mehr als 60 Å und beim Typ 3-4-1-2-5 ungefähr 30 Å überwunden werden. Jedoch sind die Termini in beiden Fällen sterisch schlechter zugänglich, so dass die verbrückende Aminosäurekette deutlich länger sein müsste. Diese Gelenkverbindungen zwischen den Domänen scheinen allerdings kurz zu sein (Sánchez *et al.*, 2000). In Zusammenfassung könnte der *ckcACD1*-Komplex daher auch für die Modellierung einer Struktur eines ACD-Fusionsproteins herangezogen werden.

3.6. Schlußfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden erstmals Strukturen einer Dinukleotid-bildenden Acetyl-Coenzym A-Synthetase vorgestellt. Der funktionale Komplex zeigt eine bislang nicht bekannte Anordnung der für die Superfamilie charakteristischen fünf Subdomänen. Mit den ermittelten Kristallstrukturen konnten zudem Schnappschüsse entlang des enzymatischen Reaktionsweges gewonnen werden. Erstmals konnte der Bindungsmodus von Acetyl-Coenzym A beschrieben werden. Aus den Strukturen wurden darüber hinaus die Grundlagen der Substratspezifität abgeleitet. Unterschiedliche Affinität von ACDs zu bestimmten Substraten scheinen durch die Ausrichtung und Komposition der Schlei-

fen im Reaktionszentrum *site I* vermittelt zu werden. Obwohl mit dieser Arbeit erste Hinweise auf den zugrundeliegenden Selektionsprozess erhalten werden konnten, bedürfen einige Aspekte jedoch weiterer Studien. Insbesondere die Bedeutung einzelner Aminosäuren an der Auswahl von Substraten sollte überprüft werden. Um detaillierte Einsichten in die Sequenz-Funktionsbeziehung zu gewinnen, sollten in Zukunft weitere ACDs betreffend ihrer Substratpräferenzen charakterisiert werden.

Eines der wichtigsten Ergebnisse ist jedoch die Beobachtung der Umlagerung eines Proteinsegments, in dieser Arbeit als Phosphohistidinsegment bezeichnet. Dieser Bereich beinhaltet den ersten phosphorylierten Histidinrest. Durch die beobachtete Umlagerung werden die weit voneinander entfernten Reaktionszentren *site I* und *site II* miteinander verknüpft. Aus den räumlichen Gegebenheiten der Interaktion des Phosphohistidinsegments mit Reaktionszentrum *site II* erklärt sich zudem die Notwendigkeit des zweiten konservierten Histidinrestes als Intermediat bei der Übertragung der Phosphorylgruppe auf das gebundene Dinukleotid.

Die in dieser Arbeit präsentierte Strukturen des $\alpha_2\beta_2$ -heterotetrameren *ckcACD1*-Komplexes erscheinen zudem prototypisch für die Familie der dinukleotid-abhängigen Acetyl-Coenzym A-Synthetasen. Obwohl ein möglicher Mechanismus für die vier enzymatischen Teilschritte postuliert werden konnte, sollten jedoch im Folgenden weiterführende biochemische Studien durchgeführt werden, in denen einzelne Aspekte näher untersucht werden. So scheint die Aufgabe bivalenter Metallionen bei der Katalyse noch nicht abschließend klar. Nukleotide interagieren oft nur als Metallkomplex mit Proteinen und so konnte beispielsweise eine Komplexstruktur der *E. coli* SCS mit ADP nur in Anwesenheit von Magnesiumionen erhalten wurde (Joyce *et al.*, 2000). An dieser Stelle ist die Aufgabe des Metallions verstanden. Welche Rolle jedoch das in den Kristallstrukturen *ckcACD1-G*, *ckcACD1-H* und *ckcACD1-I* durch die Aminosäure Asp351 α gebundene Metallion während der ersten Teilschritte, der Phosphorylyse der Coenzym A-Thioester und der Reaktion des aktivierten Phosphats mit dem His254 α des Phosphohistidinsegments, spielt, sollte in Folgeexperimenten untersucht werden. Interessanterweise sind die Voraussetzungen bezüglich benötigter Cofaktoren und des katalytischen Mechanismus in einer Superfamilie gleich (Rekha *et al.*, 2005). So sind alle charakterisierten dinukleotid-abhängigen Acyl-Coenzym A-Synthetasen auf bestimmte bivalente Metallionen angewiesen (Srere und Lipmann, 1953; Gibson *et al.*, 1967; Glasemacher *et al.*, 1997; Mai und Adams, 1996; Sánchez und Müller, 1996; Musfeldt *et al.*, 1999; Bräsen und Schönheit, 2001; Musfeldt und Schönheit, 2002; Bräsen *et al.*,

3. Diskussion

2008; Schmidt und Schönheit, 2013). Es finden sich auch wesentliche Gemeinsamkeiten in den Reaktionsmechanismen innerhalb der Superfamilie. Detailliertes Verständnis der Funktionsweise der *ckcACD1* führt daher auch zu einem besseren Verständnis der Superfamilie. Auch die tatsächlichen Funktionen der Aminosäuren Asn129 α , Asp71 β , Glu144 β und Arg178 β sind unklar. Diese sind in ACDs hochkonserviert und in idealer Position für eine mögliche Beteiligung an der Katalyse angeordnet.

Ursache und Sinn der Vielfalt an Konnektivität und unterschiedlicher Anordnung der Subdomänen in der Superfamilie konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die Autoren in Rekha *et al.* (2005) führen jedoch aus, dass die Organisation der (Sub-)Domänen eines Proteins an dessen biochemische Funktion und auch an den Stoffwechselweg gekoppelt ist, an dem sich das Enzym beteiligt (Rekha *et al.*, 2005). Durch Variation des Interaktionsmusters kann die Möglichkeit für zusätzliche Wechselwirkung mit weiteren Proteinen geschaffen oder regulatorische Mechanismen eingeführt werden (Rekha *et al.*, 2005; de Souza, 2012). Für die *E. coli* SCS beschreiben verschiedene Publikationen einen synergistischen Effekt bei der Ligandenbindung (Nishimura und Mitchell, 1984; Nishimura und Mitchell, 1985; Bridger *et al.*, 1968; Bild *et al.*, 1980). Es gibt ebenfalls Hinweise für eine Regulation des Enzyms auf Proteinebene (Birney *et al.*, 1997). Eine kürzlich veröffentlichten Studie über die *Entamoeba histolytica* ACD konnte zeigen, dass Pyrophosphat und ATP inhibitorisch wirken und so bei einem großen Energievorrats in der Zelle als Regulationsmechanismen wirken können (Jones und Ingram-Smith, 2014). Prinzipiell kann daher angenommen werden, dass ACDs auch solche regulatorische Elemente besitzen. Weiterhin sollten Versuche unternommen werden, Einzelketten-ACDs strukturell zu charakterisieren. Möglicherweise führt die kovalente Verknüpfung der Subdomänen bzw. Untereinheiten zu weiteren nicht erwarteten Unterschieden im Arrangement. So besitzt die Einzelketten-ACD aus dem Bakterium *Chloroflexus aurantiacus* eine ungewöhnliche homotetramere Konstitution (Schmidt und Schönheit, 2013). Im Kontrast dazu liegen andere Einzelketten-ACDs als Homodimer vor (Musfeldt und Schönheit, 2002; Bräsen und Schönheit, 2004b; Awano *et al.*, 2014).

Prinzipiell lässt sich jedoch anhand der Sequenzkonservierung der bakteriellen und archaellen ACDs annehmen, dass diese einen ähnlichen strukturellen Aufbau besitzen. So wird der *ckcACD1*-Komplex vermutlich Ähnlichkeit zu den ACDs aus *Giardia lamblia* und *Entamoeba histolytica* besitzen. Beides sind parasitische Protozoen und Verursacher von Giardiasis bzw. Amöbiasis. Giardiasis ist üblicherweise nicht tödlich,

3.6. Schlußfolgerung und Ausblick

wohingegen Amöbiasis nach Malaria die zweithäufigste Todesursache durch Parasiten darstellt („Amoebiasis“ 1997; WHO, 1998). *E. histolytica* ACD ist am Abbau von Zuckern und Aminosäuren beteiligt und ist eine wichtige Quelle für intracelluläres ATP (Jones und Ingram-Smith, 2014). Weiterhin scheint das Enzym im Parasiten häufig aufzutreten. So ist es einer der bedeutendsten Histokompatibilitätsmarker in Amöbenabszess der Leber in Hamstern (Huat *et al.*, 2014). Beide Enzyme weisen eine moderate Sequenzidentität zur *ckcACD1* auf (37% *E. histolytica* und 35% *G. lamblia* verglichen mit der α -Untereinheiten der *ckcACD1* und 42% (*E. histolytica*) und 36% (*G. lamblia*) verglichen mit der β -Untereinheit der *ckcACD1*). Beide Enzyme besitzen die Acetyl-Coenzym A-Synthetase-spezifischen Sequenzmotive, das SHT-Motiv (Ser252 α -Thr255 α in der *ckcACD1*) in deren Phosphohistidinsegment der α -Untereinheit und das HK(S/T)(D/E)-Motiv (His68 β -Asp71 β in der *ckcACD1*) sowie der konservierte Argininrest (Arg178 β in der *ckcACD1*) in deren β -Untereinheit. Bezogen auf das Substratspektrum der Enzyme können diese als ACD vom Typ I eingeordnet werden (Reeves *et al.*, 1977; Sánchez und Müller, 1996; Jones und Ingram-Smith, 2014). Sollte das Arrangement der Subdomänen dieser beiden Enzyme dem Aufbau der *ckcACD1* folgen, könnte der Unterschied im Aufbau der ACDs verglichen mit bekannten humanen Proteinen (wie SCS und ACLY) die Entwicklung hochspezifischer Inhibitoren mit nur geringen Nebenwirkungen zur pharmakologischen Nutzung ermöglichen.

Teil III.

Charakterisierung der Struktur
der TIR-Domäne aus
Hydra magnipapillata TRR-2

4. Ergebnisse

4.1. Herstellen des Expressionskonstruktes, heterologe Expression und Reinigung der *hy*TRR2 TIR-Domäne

Die Expression der TIR-Domäne des *Hydra magnipapillata* Toll-Rezeptor-verwandten 2 (*hy*TRR-2) sollte im Bakterium *E. coli* erfolgen. Dazu wurde in das Plasmid pET19b der kodierende Abschnitt der TIR-Domäne aus *hy*TRR-2 (korrespondierend den Resten Lys95–Asn221) eingefügt um das Plasmid pET19b_*hy*TRR2_{95–221} zu erzeugen. Bei der Vervielfältigung der dazugehörigen DNS wurden C-terminal die genetischen Informationen für sechs Histidinreste angefügt. Das rekombinante Protein enthielt aufgrund der Klonierstrategie außerdem am N-Terminus zwei weitere Aminosäuren Methionin und Glycin. Sequenzierung der rekombinanten DNS ergab, dass das Zielgen abweichend zur in der Datenbank Uniprot (The UniProt Consortium, 2015) hinterlegten Aminosäuresequenz (Zugriffsnummer A6M946) anstelle für die Reste Glu118 und Val119 für die Aminosäuren Lys118 und Leu119 kodierte. Die ähnlichen physikochemischen Eigenschaften der Seitenketten der ausgetauschten Reste deuten auf eine natürliche Ursache hin und es wurde daher mit dieser Variante weitergearbeitet. Das Protein weist damit eine theoretische Masse von 16 136,4 Da auf.

Im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) CodonPlus RIL wurde die heterologe Expression durchgeführt (siehe dazu Kapitel 8.3). Das Kapitel 8.4 beschreibt die genaue Vorgehensweise der Reinigung der *hy*TRR-2 TIR-Domäne (im folgenden *hy*TIR2). Eine erste Anreicherung des Proteins aus dem geklärten Zellysate erfolgte über immobilisierte Nickelionenaффinitätschromatographie. Die C-terminal fusionierte Hexahistidinsequenz bindet hierbei als mehrdentater Ligand hochaffin an das Metall und das Zielprotein wird so effizient von Verunreinigungen getrennt. Elution erfolgte in einem Konzentrationsgra-

4. Ergebnisse

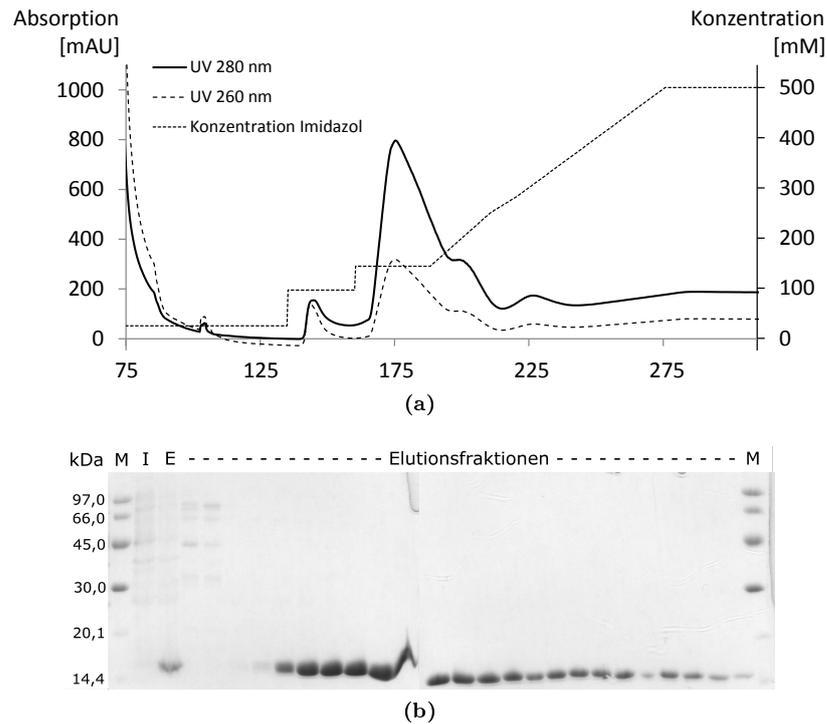


Abb. 4.1.: Reinigung von *hyTIR2* über Nickelionenaffinitätschromatographie (IMAC). (a) Elutionsprofil der Ni^{2+} -Affinitätschromatographie. (b) Gelelektrophorese der Elutionsfraktionen. Die Bahnen haben folgende Bezeichnung. M Marker, I Zellen vor der Induktion, E Zellen bei der Ernte.

dienten mit Imidazol, das als Analog der Seitenkette Histidin das Protein kompetitiv von der Matrix verdrängt. Nach diesem Schritt wurde bereits nahezu reines Protein erhalten (siehe Abbildung 4.1).

Es folgte anschließend eine letzte Abtrennung von proteinogenen Verunreinigungen mittels Gelfiltration. Zuvor wurde die Proteinlösung durch Dialyse in Gelfiltrationspuffer überführt. Imidazol und andere kleinmolekulare Verunreinigungen wurden während dieses Schritts entfernt. Das Elutionsprofil weist nur einen Peak auf. Wie in Abbildung 4.2 zu sehen, entsprachen die dazugehörigen Fraktionen dem Zielprotein.

Die Zusammenfassung des Reinigungsfortschritts ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Das finale Produkt wies eine apparente Homogenität auf. Vor der Kristallisation wurde das Protein auf etwa 4,1 mg/ml konzentriert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Reinigung erbrachte 2,3 mg reines Protein pro Gramm feuchter Zellpaste oder 3,1 mg pro Liter Expressionsmedium. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde ein theoretische Extinktionskoeffizient $\epsilon_{\lambda_{260\text{nm}}}$ von $23\,950\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ verwendet.

4.1. Herstellen des Expressionskonstruktes, heterologe Expression und Reinigung der *hyTIR2* TIR-Domäne

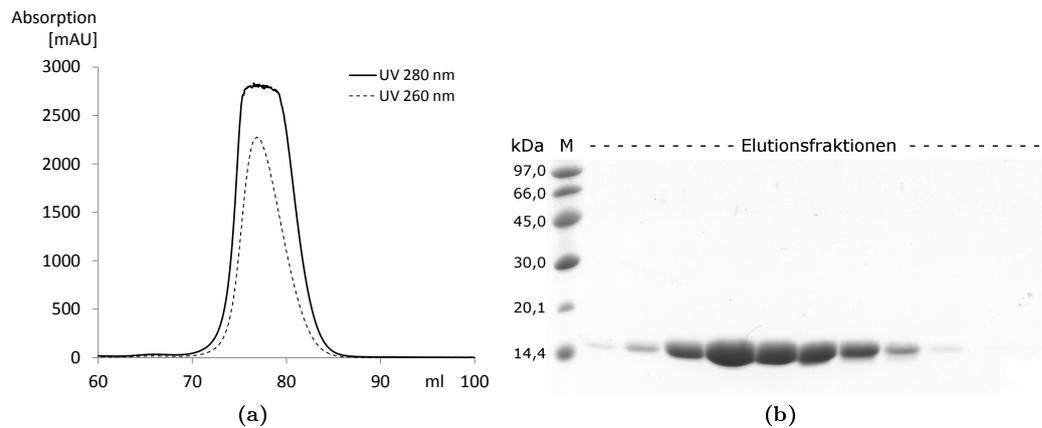


Abb. 4.2.: Reinigung von *hyTIR2* über Gelfiltration. (a) Elutionsprofil der Trennung der TIR-Domäne über Gelfiltration. (b) Gelelektrophoretische Analyse der proteinhaltigen Elutionsfraktionen. M bezeichnet den Proteinmarker.

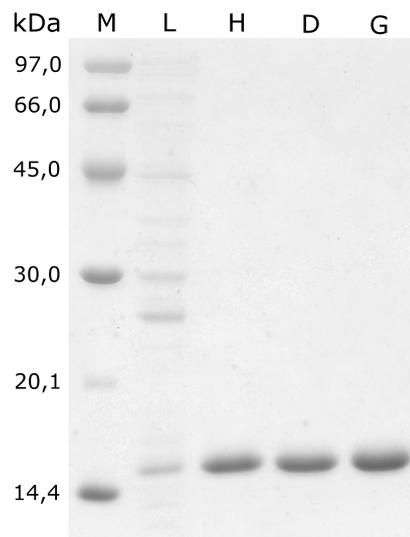


Abb. 4.3.: Übersicht der Reinigung von *hyTIR2*. M- Größenstandard (LMW, GE Healthcare, München, Deutschland), L- geklärtes Lysat, H- Eluat nach Nickelaffinitätschromatographie, D- Protein nach Dialyse, G- finales Produkt nach Gelfiltration. Wie in Spur G zu sehen ist, lag nach Durchführung der Reinigungsstrategie apparent reines Protein *hyTIR2* vor.

4.2. Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse

Im Rahmen der Hochdurchsatzkristallisationsplattform HT-X (EMBL, Hamburg) der Protein Production Platform (P-Cube) wurden 384 Lösungen mit verschiedenen Zusammensetzungen angesetzt und auf das Entstehen von Kristallen untersucht. Bei mehreren ähnlichen Bedingungen wurden stark verwachsene Kristalle mit nadeligem Habitus erhalten. Durch Variation der Konzentration an Fällungsmittel, der Konzentration des Proteins und durch Einsatz verschiedener Additive wurden die initialen Bedingungen verfeinert. Nadeln mit einer Größe von etwa $300\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ wurden aus $270\ \text{mM MgCl}_2$, $10\ \text{mM Natriumacetat}$ (pH 4,6), $350\ \text{mM Natriumformat}$ und $18\ \%$ (w/v) PEG 3350 mit Protein der Konzentration $3,5\ \text{mg/ml}$ erhalten. Jedoch war diese Kristallisationsbedingung mit Protein einer anderen Reinigungscharge nicht reproduzierbar. Vermutlich reichten bereits die geringen Unterschiede der Zusammensetzung des Proteinpuffers um den idealen pH-Wert im ungepufferten Kristallisationstropfen zu verfehlen. Verschiedene Puffersysteme wurden daraufhin auf ihre Verwendbarkeit getestet. Optimierte Kristalle wurden in Ansätzen mit $100\ \text{mM Natriumacetat}$ (pH 5,8), $290\text{--}350\ \text{mM MgCl}_2$ und $16\text{--}20\ \%$ (w/v) PEG 3350 erhalten (siehe Abbildung 4.4a). Die Proteinkonzentration betrug $2,9\ \text{mg/ml}$. Bei niedrigeren Konzentrationen an PEG wuchsen einzelne stäbchenförmige Kristalle (Abbildung 4.4b). Die optisch nur wenig voneinander zu unterscheidenden Kristalle gehörten allerdings zwei Kristallformen an, die gravierend unterschiedliches Streuvermögen aufwiesen. Zusammengefasst findet sich die Datenstatistik der in dieser Arbeit vermessenen Kristalle in Tabelle 4.1.

4.2.1. Kristallform I

Normalerweise wuchsen Kristalle der Form I in Büscheln aus der Proteinhaut, die sich auf den Kristallisationstropfen bildete. Diese Art des Wachstums konnte auch nicht durch Verwendung von Additiven oder durch Variation des pH-Wertes verbessert werden. Einzelne Kristalle mussten daher vor dem Montieren herausgebrochen und in Gefrierschutzlösung transferiert werden. Diese bestand aus $80\ \%$ Reservoir und $20\ \%$ MPD. Die Qualität der untersuchten Kristalle war sehr unterschiedlich. Die stäbchenförmigen Kristalle zeigten lokal sehr anisotropes Streuverhalten und mussten mit dem Röntgenstrahl nach gut streuenden Abschnitten abgesucht werden. Kristalle die-

4.2. Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse

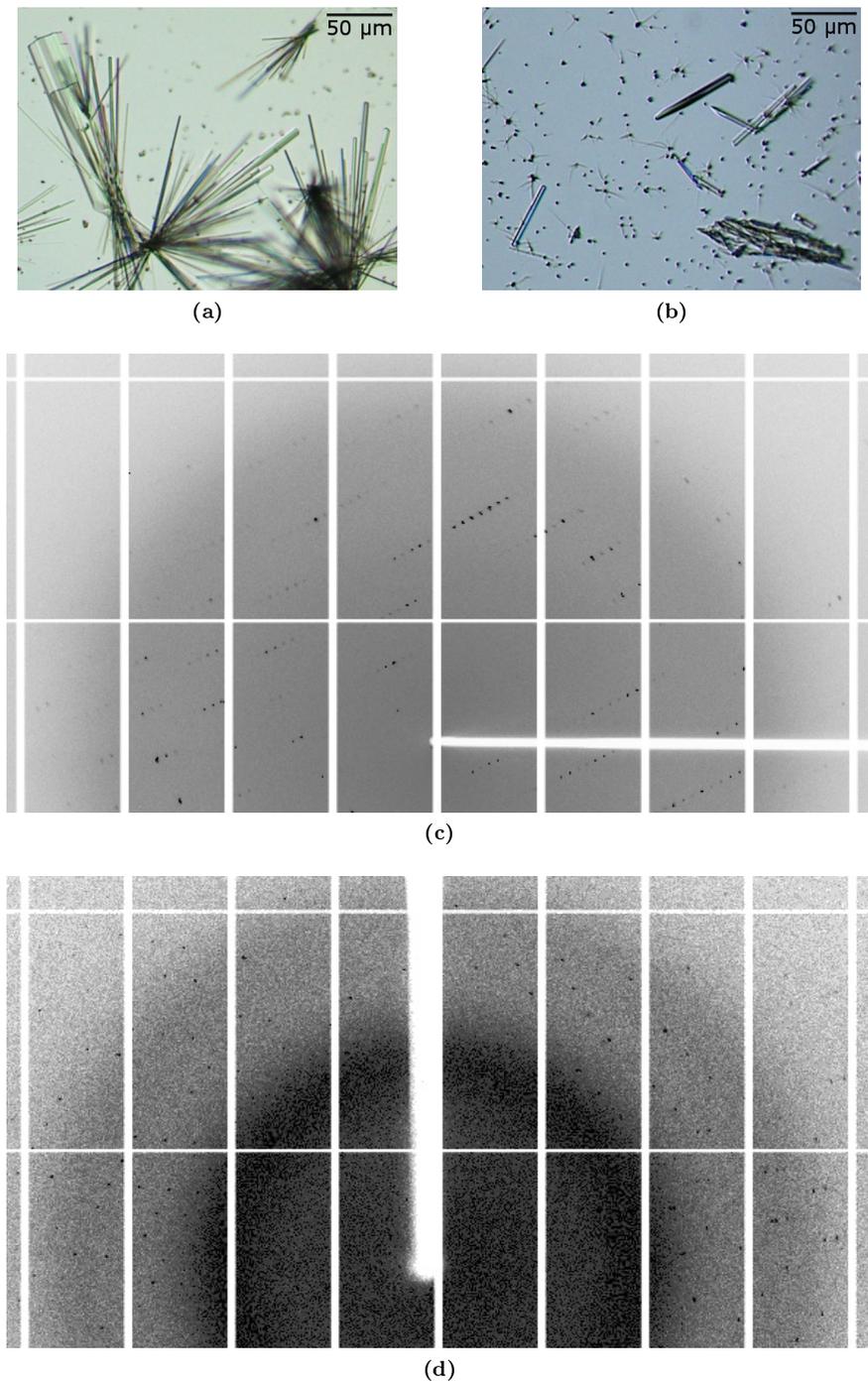


Abb. 4.4.: Kristalle der *Hydra magnipapillata* TRR-2 TIR-Domäne. (a) Kristallform I. Im Kristallisationstropfen befand sich 100 mM NaOAc (pH 5,6), 310 mM MgCl₂, 20 % (w/v) PEG 3350. b) Kristallform II. Der Tropfen enthielt 100 mM NaOAc (pH 5,8), 350 mM MgCl₂, 18 % (w/v) PEG 3350. Repräsentative Diffraktionsbilder von einem Kristall der c) Kristallform I und d) Kristallform II. Der Rotationswinkel betrug jeweils 1°. Zur besseren Darstellung wurde der Kontrast der Bilder angepasst. An der oberen Kante der Diffraktionsbilder beträgt die Auflösung etwa c) 2,8 Å und d) 1,9 Å.

4. Ergebnisse

ser Form gehören zur orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$ mit den allgemeinen Zellparametern $a = 33 \text{ \AA}$, $b = 33 \text{ \AA}$, $c = 106 \text{ \AA}$. Mit diesen Zellparametern war nur ein Molekül in der asymmetrischen Einheit zu erwarten (Matthews, 1968). Der berechnete Wassergehalt in der Elementarzelle war mit etwa 39 % relativ niedrig. Kristalle dieser Form streuten bis zu einer maximalen Auflösung von $2,3 \text{ \AA}$, jedoch wiesen die untersuchten Kristalle mit $0,25^\circ$ – $0,35^\circ$ eine hohe Mosaizität auf (berechnet mit XDS (Kabsch, 2010)).

4.2.2. Kristallform II

Es wurden während des Versuchs der Optimierung der Kristallform I einzelne stäbchenförmige Kristalle erhalten. Dies wurde ursprünglich als Verbesserung der ersten Kristallform angesehen. Jedoch ergab die röntgenographische Analyse, dass diese Kristalle einer anderen Kristallform II zuzuordnen waren. Diese gehörten der monoklinen Raumgruppe $P2_1$ an. Mit den gegebenen Zellkonstanten $a = 31 \text{ \AA}$, $b = 63 \text{ \AA}$, $c = 32 \text{ \AA}$ und $\beta = 105^\circ$ ist ebenfalls nur ein Molekül pro Elementareinheit wahrscheinlich (Matthews, 1968). Diffraktionsdaten dieser Kristallform wurden bis zu einer Auflösung von $1,14 \text{ \AA}$ aufgenommen. Der Wassergehalt der Elementarzelle ist mit 34, % um etwas weniger als 5 % niedriger als in Kristallform I. Die bessere Packung korrespondierte gleichzeitig mit einer geringeren Kristallmosaizität ($0,08^\circ$, nach XDS (Kabsch, 2010)).

4.3. Strukturlösung und Verfeinerung

4.3.1. Positionierung und Verfeinerung des molekularen Modells

Phasierung der Struktur erfolgte über die Methode des molekularen Ersatzes an Daten eines Kristalls der Kristallform I (maximale Auflösung $2,7 \text{ \AA}$). Die verwendeten Suchmodelle wurden mit SwissModel (Peitsch, 1995; Arnold *et al.*, 2006; Kiefer *et al.*, 2009) anhand der Strukturmodelle verschiedener TIR-Domänen erstellt (siehe dazu Tabelle 4.2). Durch Vergleich der Modelle untereinander wurden Bereiche großer Varianz und,

Tab. 4.1.: Statistiken der Prozessierung der Diffraktionsdaten der *hyTRR-2* TIR-Domäne.

Kristallparameter	Kristallform I	Kristallform II ^a	Kristallform II ^a – Langwellendatensatz
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
Zelldimensionen (Å)	a = 32,32, b = 33,55, c = 109,78 α = β = γ = 90°	a = 30,74, b = 63,58, c = 32,14 α = γ = 90°, β = 105,17°	a = 30,70, b = 63,42, c = 32,08 α = γ = 90°, β = 105,09°
Prozessierungsparameter			
Auflösungsgrenze (Å) ¹	109,78–2,00 (2,05–2,00)	31,79–1,14 (1,16–1,14)	31,71–1,83 (1,87–1,83)
Zahl der einzigartigen Reflexe ¹	8 625 (614)	42 226 (2 045)	9 197 (304)
Vollständigkeit (%) ¹	100,0 (99,9)	97,5 (96,1)	86,9 (45,4)
Durchschnittliche Redundanz ¹	12,1 (12,1)	5,8 (3,6)	11,9 (7,7)
I/σ(I) ¹	7,4 (0,8)	9,1 (0,7)	17,4 (2,9)
R _{meas} (%) ^{1, 2}	19,4 (394,4)	12,3 (223,2)	12,3 (77,7)
R _{pim} (%) ^{1, 3}	5,6 (112,5)	5,1 (100,0)	3,5 (26,3)
CC _{1/2} ¹	0,998 (0,309)	0,998 (0,196)	0,998 (0,623)
Anomale Vollständigkeit (%) ¹			82,8 (36,9)
Anomale Redundanz ¹			5,8 (4,4)
RCR _{anom}			1,234
CC _{anom}			0,207
Kristallmosazität (°)	0,35	0,11	0,08
B-Faktor, nach Wilson-Plot (Å ²) ⁴	54,2	8,2	11,8

^a Datensätze gemessen am gleichen Kristall.

¹ Werte in Klammern: äußerste Auflösungsschale.

² Redundanz-unabhängiger *R*-Faktor. $R_{\text{meas}} = \sum_{hkl} \frac{N}{N-1} \left| \frac{1}{2} \sum_i \frac{|I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_i I_i(hkl)} \right|$, mit $I_i(hkl)$ als die Intensität der *i*-ten Messung der Reflexe mit den

Miller'schen Indizes *h, k, l* und $\langle I_i(hkl) \rangle >$ als der mittleren Intensität aller Messungen von $I(hkl)$. *N* gibt die Redundanz der gemessenen Reflexionen an (Diederichs und Karplus, 1997b; Diederichs und Karplus, 1997a; Weiss, 2001).

³ Präzisions-anzeigender *R*-Faktor. $R_{\text{pim}} = \sum_{hkl} \frac{1}{N-1} \left| \frac{1}{2} \sum_i \frac{|I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_i I_i(hkl)} \right|$, mit $I_i(hkl)$ als die Intensität der *i*-ten Messung der Reflexe mit den

Miller'schen Indizes *h, k, l* und $\langle I_i(hkl) \rangle >$ als der mittleren Intensität aller Messungen von $I(hkl)$. *N* gibt die Redundanz der gemessenen Reflexionen an (Diederichs und Karplus, 1997b; Diederichs und Karplus, 1997a; Weiss, 2001).

⁴ Berechnet nach (Popov und Bourenkov, 2003).

4. Ergebnisse

basierend auf der Einschätzung des Modellierprogramms, hoher Unsicherheit gelöscht. Die resultierenden Modelle enthielten die Faltblattstränge βA – βC , die Helices αA – αC und αE sowie die unmittelbar verbindenden Schleifen. Die Modelle wurden mit MOLREP (Vagin und Teplyakov, 1997) im *slow mode* platziert. Bei der Verfeinerung mit den Modellen beruhend auf den TIR-Domänen der C713S-Mutante des humanen TLR-2 (PDB-Eintrag 1O77, Tao *et al.*, 2002) und des humanen TLR-1 (1FYV, Xu *et al.*, 2000) sanken der R_{work} sowie der freie R -Faktor R_{free} sichtbar. Weitergearbeitet wurde deshalb mit dem Modell auf Grundlage der Struktur der TIR-Domäne des humanen Toll-ähnlichen Rezeptors 1 (PDB-Eintrag 1FYV, Xu *et al.*, 2000). Nach Anwendung eines Verfeinerungsprotokolls, bestehend aus abwechselnder Starre-Körper- und Beschränkter Verfeinerung, wurde ein $R_{\text{work}} = 0,40$ und $R_{\text{free}} = 0,46$ erhalten. Das Modell wurde in PHENIX.AUTOBUILD (Rebuild-in-place) (Terwilliger, 2004a; Terwilliger, 2004b; Zwart *et al.*, 2005; Terwilliger *et al.*, 2008; Afonine *et al.*, 2012) automatisch neu gebaut und verfeinert. Es zeigten sich in der Elektronendichte fehlende Bereiche, besonders die Faltblattstränge βD und βE . Die dazugehörigen Reste wurden aus der Struktur 1FYV (korrespondierend den Aminosäuren Ser725–Leu731 und Leu756–Trp758 des TLR-1) entnommen und als Polyalaninmodell in die Elektronendichte eingefügt. Nach mehreren Schritten manuellen Modellbaus und Rückbaus ergaben sich die R -Faktoren zu $R_{\text{work}} = 0,25$ und $R_{\text{free}} = 0,32$. Dieses Modell beinhaltete nahezu das komplette Molekül der *hy*TIR2 (AS Tyr97–Ser176 und Ile179–Asn221). Problematisch war zu diesem Zeitpunkt die Modellierung der Helix αC (Asn165–Gln178). Die Elektronendichte in diesem Bereich war entweder stark verrauscht oder fehlte. Der Modellbau gelang jedoch mit Daten mit der maximalen Auflösung von $2,0 \text{ \AA}$. Das finale Modell enthält die Reste Thr96–Asn220 mit $R_{\text{work}} = 0,25$ und $R_{\text{free}} = 0,30$. Die Inspektion des Protokolls des Programms REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997; Murshudov *et al.*, 2011) bei Durchführung der Verfeinerung zeigte hohe anisotrope Skalierungsfaktoren. Die Daten wurden aus diesem Grund mit dem *Diffraction Anisotropy Server* untersucht (Strong *et al.*, 2006). Leichte Anisotropie wurde in Richtung der b^* -Richtung festgestellt. Die Daten wurden daher in dieser Richtung bis zu einer Auflösung von $2,5 \text{ \AA}$ geschnitten. Eine Verfeinerung mit REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997; Murshudov *et al.*, 2011) ergab nur ein sehr geringfügiges Sinken des freien R -Wertes. Die Elektronendichtekarte zeigte ebenfalls keine Verbesserung. Eine Anpassung der Struktur an die erhaltene Dichte und deren Verfeinerung führte ebenfalls nicht zum sichtbaren Erfolg. Die Strukturen wurden mit PHENIX.CALCULATE_CC* verglichen und zeigten deutlich schlechtere CC_{work} - und CC_{free} -Werte. Die Daten wurden deshalb ungeschnitten belassen. Weiterhin wurde eine Verfeinerung unter Einbeziehung von TLS

(*Translation/Libration/Screw*) durchgeführt. Hierzu wurden 20 TLS-Segmente mittels des *TLS Motion Determination* (TLSMD)-Server bestimmt (Painter und Merritt, 2006a; Painter und Merritt, 2006b). Die Verfeinerung der Struktur erbrachte ebenfalls keine wesentliche Erniedrigung der *R*-Werte. Deshalb wurde auch auf die Verwendung von TLS verzichtet. Die Statistiken der Prozessierung und Verfeinerung der Struktur findet sich in Tabelle 4.3.

Tab. 4.2.: Verwendete Suchmodelle zur Phasierung der *hy*TRR-2 TIR-Domäne

PDB-Eintrag	Sequenz-identität	Beschreibung
1FYV	30	TIR-Domäne des humanen Toll-ähnlichen Rezeptors 1 (TLR-1) (Xu <i>et al.</i> , 2000)
2J67	31	TIR-Domäne des humanen Toll-ähnlichen Rezeptors 10 (TLR-10) (Nyman <i>et al.</i> , 2008)
2JS7	29	TIR-Domäne des humanen <i>myeloid differentiation primary response</i> 88 (MyD88)
1T3G	24	TIR-Domäne des humanen Interleukin-1 Receptor Accessory Protein-like 1 (Khan <i>et al.</i> , 2004)
3H16	22	TIR-Domäne aus <i>Paracoccus denitrificans</i> (Chan <i>et al.</i> , 2009)
3JRN	21	TIR-Domäne aus <i>Arabidopsis thaliana</i> (Chan <i>et al.</i> , 2010)
3OZI	21	TIR-Domäne des Flachs (<i>Linum usitatissimum</i>) Disease Resistance Proteins L6 (Bernoux <i>et al.</i> , 2011)

4.3.2. Verbesserung des Modells anhand höher aufgelöster Daten der Kristallform II

Es wurden Diffraktionsdaten eines Kristalls der Kristallform II bis zu einer maximalen Auflösung von 1,14 Å gemessen. Das aus Kristallform I erhaltene Strukturmodell wurde mittels MOLREP (Vagin und Teplyakov, 1997) in der Einheitszelle positioniert. Nach 50 Zyklen Geleekörperverfeinerung (*jelly body refinement*) wurden die *R*-Faktoren $R_{\text{work}} = 0,27$ und $R_{\text{free}} = 0,27$ erhalten. Das Modell wurde anschließend mit BUCCANEER (Cowtan, 2006; Cowtan, 2008) neu gebaut. Bei Bedarf wurden einzelne Reste manuell in die Dichte eingepasst und Wassermoleküle in das Modell integriert. Das

4. Ergebnisse

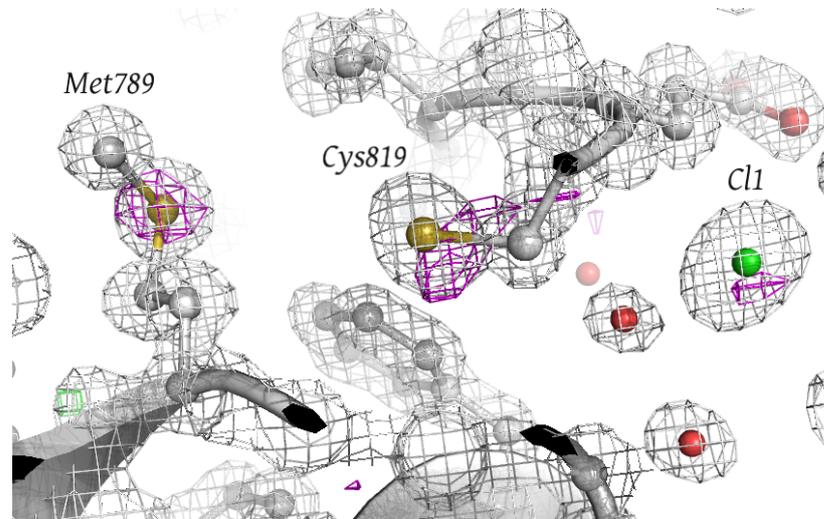


Abb. 4.5.: Überlagerung der Elektronendichte mit der anomalen Dichtekarte. Atombezeichnung: grau Kohlenstoff, gold Schwefel, rot Sauerstoff/Wasser, grün Chlor. Gitter: grau ($2F_o - F_c, \alpha_c$)-Dichte (Konturierung $1,5\sigma$), grün positive Dichte der ($F_o - F_c, \alpha_c$)-Karte (Konturierung $4,0\sigma$), pink anomale Dichte (Konturierung $3,5\sigma$).

komplette Modell enthielt die Aminosäuren Gly94 bis Asn220. Für die Reste Arg108, Asp145, Ser150, Val155, Ile173, His195, Arg212 und Arg216 wurden alternative Konformationen modelliert. Zusätzlich wurde in der Nähe des C-Terminus Elektronendichte gefunden, in die weitere Aminosäuren modelliert wurden. Über die anomalen Signale eines langwelligen Datensatz konnte weiterhin ein Chloridion zugeordnet werden. Dieser Datensatz zeigt ebenfalls ein schwaches anomales Signal der sich im Molekül befindlichen Schwefelatome. Dargestellt ist dies in Abbildung 4.5. Die R -Faktoren der mit anisotropen B -Faktoren verfeinerten Struktur betragen $R_{\text{work}} = 0,14$ und $R_{\text{free}} = 0,17$.

4.4. Struktureller Aufbau der TRR-2 TIR-Domäne

Um den allgemeinen Aufbau zu beschreiben, soll hauptsächlich die hochaufgelöste Struktur der Kristallform II herangezogen werden. In der Elektronendichte fehlen im Wesentlichen die Aminosäuren, die zum Zweck der heterologen Expression und Proteinreinigung an die Zielsequenz fusioniert wurden. Diese werden bei der nachfolgenden Betrachtung daher nicht einbezogen.

Tab. 4.3.: Statistiken der Verfeinerung der *hg*TRR-2 TIR-Domäne.

Kristallparameter	Kristallform I	Kristallform II ^a	Kristallform II ^{a, b} – Langwellendatensatz
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
Zelldimensionen (Å)	a = 32,32, b = 33,55, c = 109,78 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	a = 30,74, b = 63,58, c = 32,14 $\alpha = \gamma = 90^\circ, \beta = 105,17^\circ$	a = 30,70, b = 63,42, c = 32,08 $\alpha = \gamma = 90^\circ, \beta = 105,09^\circ$
Verfeinerung			
R_{cryst} (%) ¹ / R_{free} (%) ^{1, 3}	23,9 / 29,7	15,0 / 16,9	17,3 / 18,4
CC*, CC _{cryst} ² / CC _{free} ^{2, 3}	0,999 / 0,948 / 0,819	1,000 / 0,972 / 0,976	0,945 / 0,974
Clashscore über alle Atome	1,94		
Ramachandran-Plot (%) ⁴	98,4 / 1,6 / 0,0	97,8 / 1,5 / 0,7	
Crucikshank DPI (Å) ⁵	0,292	0,048	
<i>Abweichungen von Idealwerten (RMSD)</i> ⁶			
Bindungslängen (Å)	0,004	0,007	
Bindungswinkel (°)	1,151	1,132	
Isotrope B-Faktoren (Å ²) ⁷			
Alle Atome	59,3 (1 050)	13,8	
Protein	59,3 (1 043)	13,8	
Rückgrat	55,3 (500)	10,2	
Seitenketten	63,0 (543)	14,7	
Solvens	52,3 (7)	25,1	
Chlorid		20,7	
PDB-Eintrag			

^a Datensätze gemessen am gleichen Kristall.

^b Nicht zuende verfeinert.

$$1 \quad R_{\text{cryst}} = 100 \cdot \frac{\sum |F_{\text{obs}}| - k |F_{\text{calc}}|}{\sum |F_{\text{obs}}|}, \text{ mit } F_{\text{obs}} \text{ und } F_{\text{calc}} \text{ als gemessene bzw. kalkulierte Strukturfaktor-Amplituden.}$$

2 Berechnet mit CALCULATE CC* des PHENIX-Programmpakets nach (Karplus und Diederichs, 2012).

3 R_{free} und CC_{free} werden entsprechend R_{cryst} bzw. CC_{cryst} berechnet, verwenden aber die 5,1% der vom Verfeinerungsprozess ausgenommenen Reflexe (Brünger, 1992; Tickle *et al.*, 2000).

4 Berechnet mit MOLPROBITY (Chen *et al.*, 2010): bevorzugt / erlaubt / verboten

⁵ *Diffraction-component precision index* (Crucikshank, 1999) berechnet mit SfcHECK (Vaguine *et al.*, 1999)

⁶ Abweichungen bezüglich der Standardgeometrie der Bibliothek von Engh und Huber (Engh und Huber, 2001)

⁷ In Klammern: Anzahl der Atome

4. Ergebnisse

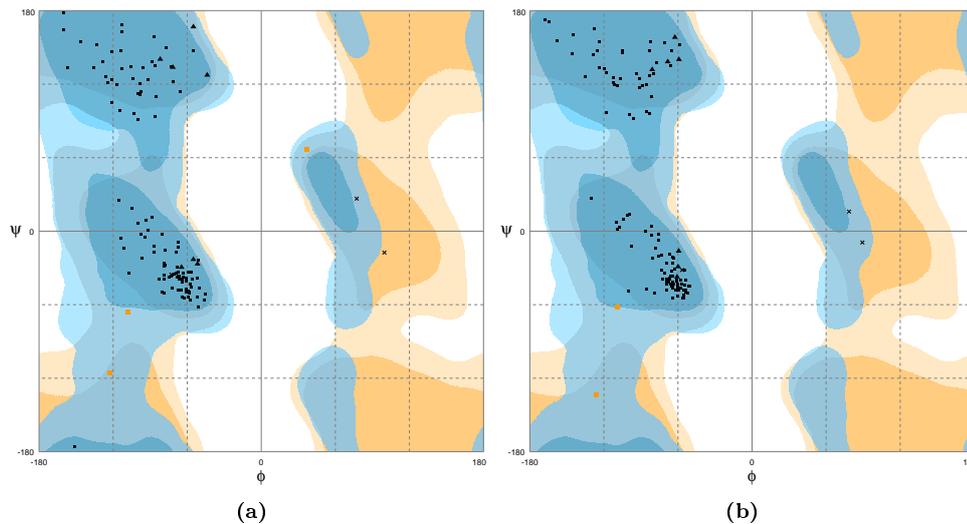


Abb. 4.6.: Φ, Ψ -Plot zur Validierung der Struktur der *hyTRR-2* TIR-Domäne beider Kristallformen (Lovell *et al.*, 2003). Berechnet wurden die Diagramme mit SFcheck (Vaguine *et al.*, 1999). (a) Kristallform I. (b) Kristallform II. Legende: \blacktriangle Allgemein, Präprolin, Prolin bevorzugt, \blacktriangle Allgemein, Präprolin, Prolin erlaubt, \blacksquare Glycin bevorzugt, \times Glycin erlaubt.

Strukturell entspricht die TIR-Domäne von *Hydra magnipapillata* TRR-2 einer typischen Flavodoxin-ähnlichen Faltung. Das Grundgerüst besteht aus einem Faltblatt mit fünf parallelen Faltblattsträngen, wobei die Stränge βB und βE sehr kurz und nur wenig ausgeprägt sind. Verbunden werden die β -Stränge hauptsächlich durch Helices. Zwischen βD und βE findet sich eine aus den hydrophoben Aminosäuren Tyr191, Phe192 und Leu193 bestehende kurze 3_{10} -Helix. In Analogie zu den bereits charakterisierten TIR-Domänen soll diese trotzdem mit αD bezeichnet werden (siehe Abbildung 4.7). Das Protein weist zwei hydrophobe Kernbereiche auf. Interessant ist hier die Anordnung der Reste Trp110, Thr114, Lys118, Tyr184, Trp201 und Trp211. Die polaren Endgruppen bzw. polaren Molekülbereiche, das O_{γ} des Threonins, O_n des Tyrosins, das N_{ϵ} der Tryptophanreste und N_{ζ} des Lysins, sind so ausgerichtet, dass sie in Richtung des Lösungsmittels zeigen und den oberflächlich liegenden hydrophoben Kern abschirmen. In beiden Kristallformen befindet sich jedoch in direkter Nähe ein über kristallographische Symmetrie verbundenes Proteinmolekül. Es ist daher anzunehmen, dass dieser Bereich trotzdem einen hydrophoben Charakter besitzt. Die kompakte Domänenstruktur wird an einer Stelle aufgebrochen. Zwischen dem Faltblattstrang βA , der BB-Schleufe, der Helix αB und der Helix αC befindet sich eine hydratisierte Tasche, die das Eindringen von Wassermolekülen tief in das Proteinmolekül ermöglicht (siehe Abbildung 4.9b). Von den vier Cysteinresten sind drei oberflächlich situiert. Allerdings ist nur die Sei-

4.4. Struktureller Aufbau der TRR-2 TIR-Domäne

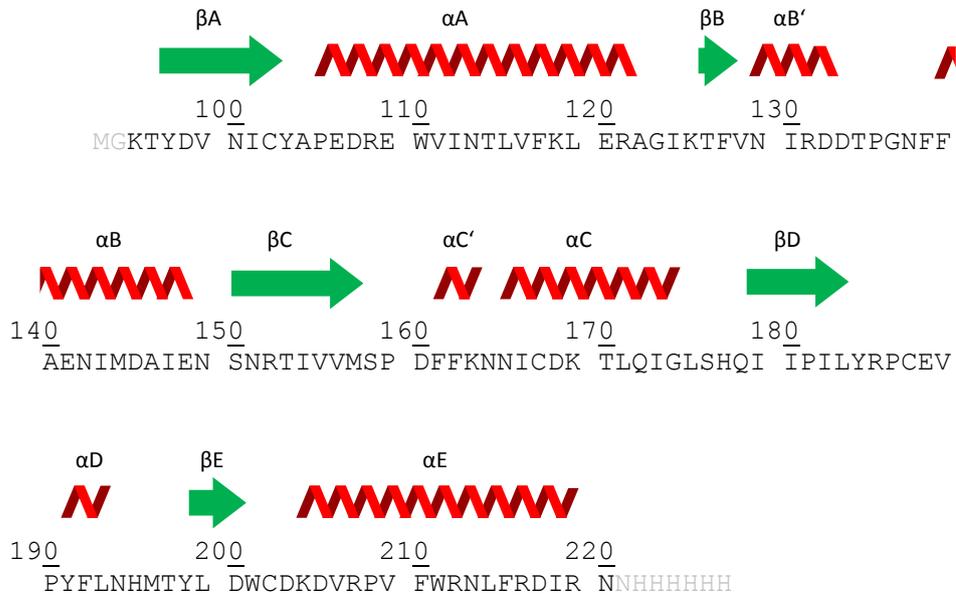


Abb. 4.7.: Sekundärstruktur der TIR-Domäne aus *Hydra magnipapillata* TRR-2. Die Sekundärstrukturelemente sind über ihrer korrespondierenden Aminosäuresequenz angeordnet. Helikale Bereiche werden als rote Zickzacklinien, β -Faltblattstränge als grüne Pfeile dargestellt. Grau eingefärbt sind diejenigen Aminosäuren des N-Terminus bzw. C-Terminus, die in der Elektronendichte nicht sichtbar sind. Bezeichnet wurden die Faltblattstränge und Helices analog der für Toll/Interleukin-Rezeptor homologe Domänen üblichen Nomenklatur. Die zwischen den Sekundärstrukturelementen befindlichen Schleifen, werden gewöhnlich mit den Buchstaben der Sekundärstrukturen beschrieben. So wird die Schleife zwischen dem Faltblattstrang βB und der Helix αB als BB-Schleife bzw. BB-Loop bezeichnet. Abweichend davon wird in dieser Arbeit die Schleife zwischen Strang βD und βE als D-Schleife bzw. D-Loop bezeichnet.

4. Ergebnisse

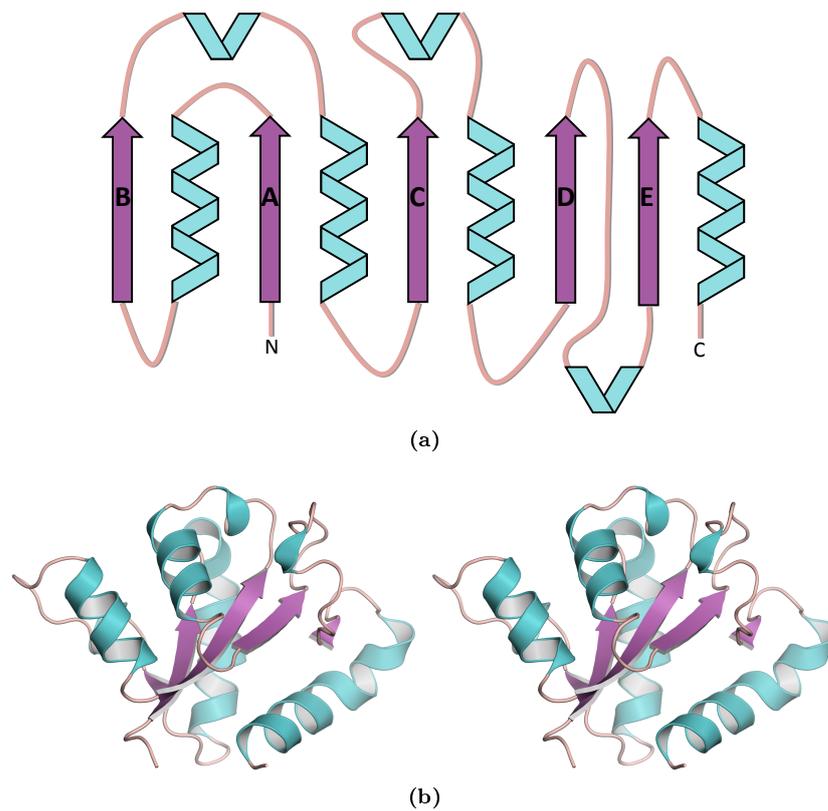


Abb. 4.8.: Topologischer Überblick über die Kristallstruktur der *Hydra magnipapillata* TRR 2 TIR-Domäne. (a) Topologiediagramm. Die Bezeichnung der β -Stränge ist eingetragen. (b) *Wall-eye* Stereodarstellung der Kristallstruktur *hyTIR2*, gefärbt nach der Sekundärstruktur (β -Strang: magenta, helikale Strukturen: blau).

tenkette von Cys202 für das umgebende Solvent zugänglich. Sowohl in Kristallform I und II lassen die Kristallpackungen keine intermolekularen Disulfidbrücken zu. Intramolekular nähern sich die Schwefelatome der beiden Cysteinreste Cys102 und Cys167 bis auf 4,3 Å in Kristallform II. Der Abstand beider Schwefel in der Kristallstruktur der Form I beträgt 4,8 Å. Eindeutig kann anhand der Elektronendichtekarte ausgesagt werden, dass die Reste nicht in einer (partiell) disulfidverbrückten Form vorliegen.

In der Elektronendichtekarte der Kristallform II sind vier weitere Aminosäuren in direkter Nähe zum C-Terminus zu erkennen (siehe Abbildung 4.9c). Zwei der Aminosäuren konnten eindeutig als Histidinreste identifiziert werden. Vermutlich stammen diese von der C-terminal fusionierten Hexahistidin-Affinitätssequenz. Zwischen der Hauptkette und den zusätzlichen Histidinresten findet sich allerdings keine Elektronendichte, die eine kovalente Verknüpfung beider Elemente zweifelsfrei erlaubt. Die vier Aminosäuren wurden daher als eine weitere Kette definiert, wobei die Nummerierung der theoretischen Primärsequenz angepasst wurde.

4.4.1. Zwischen den Kristallformen gibt es nur geringe strukturelle Unterschiede

In dieser Arbeit wurden Strukturen von *hy*TIR2 in zwei Kristallformen erhalten. Durch das unterschiedliche Interaktionsmuster der Proteinmoleküle innerhalb der jeweiligen Kristallpackung könnten prinzipiell verschiedene Zustände des Proteins stabilisiert werden. Dies führt im einfachsten Fall dazu, dass an der Oberfläche gelegene Aminosäuren unterschiedliche Konformationen annehmen. Jedoch könnten auch flexible Schleifen oder Bereiche des Proteins nach Stabilisierung in der Elektronendichte sichtbar werden. Im Fall von *hy*TIR2 scheint der Einfluss der Kristallpackung auf die Faltung von *hy*TIR2 gering zu sein. Zudem sind nur wenige konformationelle Unterschiede sichtbar. Beide Strukturen überlagern mit einem sehr kleinen *RMSD* von 0,5 Å über 125 C α -Atome. Dargestellt ist diese in Abbildung 4.10. Unterschiede in der Position der C α -Atome mit einem *RMSD* größer als 0,8 Å finden sich am N-Terminus, dem BB-Loop, den 3₁₀-Helices α C' und α D sowie der N-terminalen Hälfte der Helix α E.

4. Ergebnisse

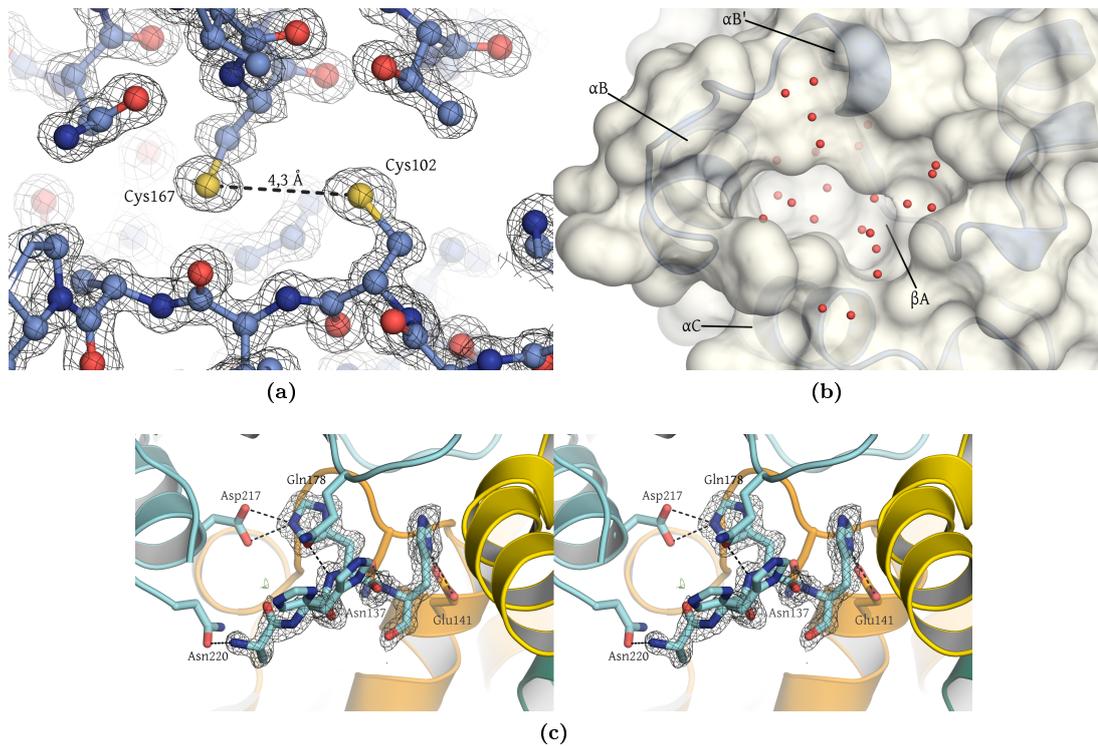


Abb. 4.9.: Besonderheiten der TIR-Domäne von *Hydra magnipapillata* TRR-2. (a) Die Schwefelatome der Cysteinreste Cys102 und Cys167 nähern sich bis auf 4,3 Å in Kristallform II. In Gitterdarstellung wurde $(2F_o - F_c, \alpha_c)$ -Elektronendichte mit einer Konturierung $\sigma = 1,5$ gezeigt. (b) Wassermoleküle (rote Sphären) in einer hydratisierten Tasche. Die Oberfläche von *hy*TIR2 ist in grau dargestellt. (c) In Kristallform II sind zwei symmetrieverwandte Moleküle (hellblau und orange) an der direkten Bindung eines aus vier Aminosäuren bestehenden Peptids beteiligt. Zwei weitere *hy*TIR2 (grün und gelb) befinden sich in direkter Nachbarschaft. Gezeigt ist eine *wall eye*-Stereoabbildung. Die Konturierung (σ -Niveau) der $(2F_o - F_c, \alpha_c)$ -Elektronendichte beträgt 1σ .

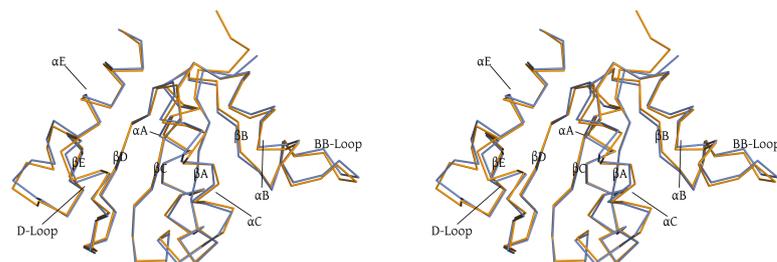


Abb. 4.10.: Strukturelle Überlagerung von *hy*TIR2 zweier Kristallformen. Abbildung ist in *wall eye*-Stereo. Es finden sich nur geringe Unterschiede in den Proteinstrukturen. Der Einfluss der Kristallpackung kann demnach vernachlässigt werden.

4.4.2. Beweglichkeit der hyTRR-2 TIR-Domäne im Kristall

Mit Hilfe beider Kristallformen soll versucht werden, die intramolekulare Beweglichkeit der TIR-Domäne des *Hydra magnipapillata* TRR-2 zu verstehen. Neben den Koordinaten x, y, z eines Atoms im Kristallgitter wird dessen thermische Bewegung durch einen Temperaturfaktor B ausgedrückt. Dieser beschreibt im Allgemeinen die Abschwächung der Röntgenbeugung an einem Atom bezogen auf seine thermische Beweglichkeit im Kristall. Hier soll allerdings aus den B -Faktoren auf die Flexibilität spezifischer Bereiche von *hyTIR2* geschlossen werden. Hohe Beweglichkeit wird durch einen erhöhten B -Faktor ausgedrückt. Auf die gleiche Weise zeigt ein niedriger B -Faktor eine eher geringe Bewegungsfreiheit an. Die aus einer Kristallstruktur erhaltenen Informationen müssen jedoch vorsichtig betrachtet werden. Insbesondere die Bewegungsfreiheit von Bereichen des Moleküls, die sich in einem Kristallkontakt befinden, könnten stark eingeschränkt werden und daher im Kristall geringe B -Faktoren aufweisen. Die Kristallformen I und II unterscheiden sich zudem stark in ihren B -Faktoren. In Kristallform I ist dieser Wert mit durchschnittlich 52 \AA^2 im Vergleich zum mittleren äquivalenten B_{eq} von 10 \AA^2 in Form II mehr als 5fach erhöht. Ein direkter numerischer Vergleich ist deshalb nicht möglich. Daher wurden die Temperaturfaktoren beider Proteinstrukturen durch Berechnung eines relativen B -Faktors B' nach Parthasarathy und Murthy (1997) zueinander skaliert.

Prinzipiell weist der Kern des Moleküls vergleichsweise niedrige B -Faktoren und daher auch geringe Flexibilität auf. Insbesondere die Stränge des β -Faltblatts und die Helices αA , αB und der Teile der Helix αE sind in beiden Kristallformen rigide angeordnet. Diese Bereiche des Moleküls beherbergen die Aminosäuren, die an der Ausbildung des hydrophoben Bereiches beteiligt sind (siehe dazu Abbildung 4.11). Im Gegensatz dazu haben die peripher angeordneten Schleifen und Helices deutlich höhere Temperaturfaktoren und haben demzufolge größere Beweglichkeit. Unterschiede in den B -Faktoren der Aminosäuren von Helix αC werden durch stabilisierende Effekte von Kristallkontakten bewirkt. Gleichermäßen führt in Kristallform II die Interaktion mit dem zusätzlich gebundenem Peptid zur Erniedrigung der B -Faktoren der BB- und D-Schleife.

Die Seitenketten aller Aminosäuren (außer Alanin) zeigen intrinsische Beweglichkeit. Im Kristall können einige der möglichen Konformation durch stabilisierende Wechselwirkungen fixiert und daher in der Elektronendichte beobachtet werden. Unterschied-

4. Ergebnisse

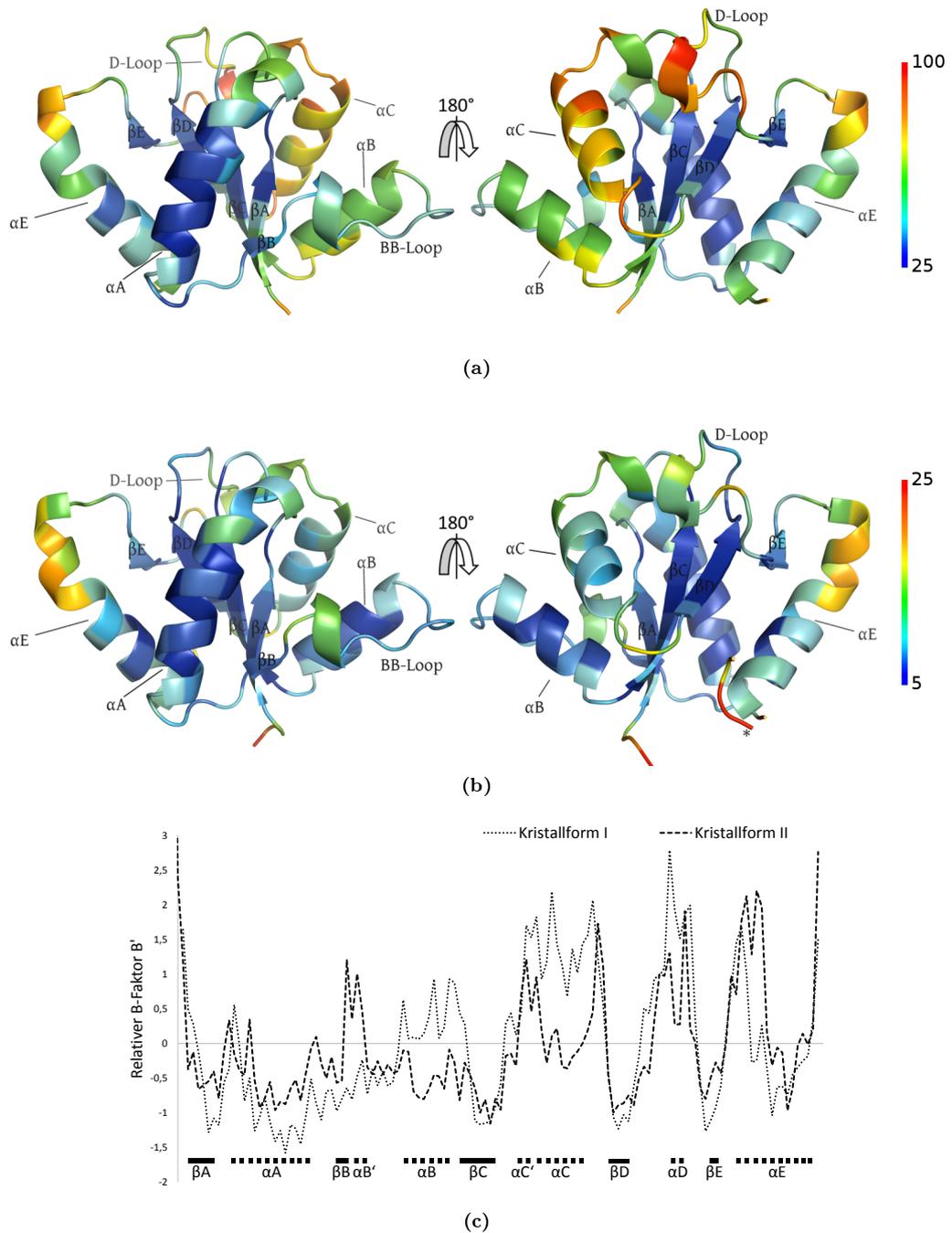


Abb. 4.11.: B-Faktoren von *hyTIR2* der beiden Kristallformen. (a) Kristallform I, (b) Kristallform II. Die Werte des rechts gezeigten Balkens sind in der Einheit \AA^2 . (c) Verteilung der relativen Temperaturfaktoren der $C\alpha$ -Atome der Proteinketten beider Kristallformen. Zur besseren Übersicht wurden die Positionen der helikalen Bereiche (unterbrochene Balken) sowie die β -Stränge in die Graphik eingefügt (ausgefüllte Balken).

4.4. Struktureller Aufbau der TRR-2 TIR-Domäne

liche Konformationen konnten aufgrund der niedrigeren Auflösung der gesammelten Diffraktionsdaten der Kristalle der Form I nicht beobachtet werden. In diesem Fall sind die Reste in der Elektronendichte nicht oder nur bei sehr niedriger Konturierung sichtbar. So war die Seitenkette der Aminosäure His177 nicht in der Elektronendichte definiert und wurde daher nicht modelliert. Das Gegenteil war bei der Verfeinerung der hochaufgelösten Kristallform II der Fall. Hier konnten den hauptsächlich an der Oberfläche befindlichen Aminosäureresten Arg108, Asp145, Ser150, Ile173, His195, Arg212 und Arg216 alternative Konformationen zugeordnet werden. Es lassen sich vielfach spezifische intra- und intermolekulare Interaktionen der einzelnen Konformer beobachten. Diese verringern die Flexibilität der beteiligten Reste.

In beiden Kristallformen sind also die gleichen Bereiche durch höhere Temperaturfaktoren gekennzeichnet. Auf die Kristallpackung allein lässt sich dieses Phänomen nicht zurückführen. Die Vermutung liegt deshalb nahe, dass es sich hierbei um tatsächliche Flexibilität handeln könnte. Proteinkristallisation ist jedoch nicht in der Lage diese Frage detailliert zu beantworten. Hier können spektroskopische und massenspektrometrische Techniken Abhilfe schaffen. Im besonderem Maße ist die Verwendung von NMR-Spektroskopie dafür geeignet. Neben Informationen über die Konstitution eines Moleküls können durch Nutzen des Kern-Overhauser-Effektes zusätzlich Daten über die Wechselwirkung spezifischer Reste durch den Raum beobachtet werden. Simulation der Molekulardynamik unter den experimentellen Randbedingungen ermöglicht einen Einblick in die intramolekulare Flexibilität. Eine weitere Möglichkeit ist die Markierung des Proteins mit Deuterium in Abhängigkeit von der Zeit. Die Rate des Austauschs wird durch die Zugänglichkeit des beteiligten Protons zum umgebenden Solvens und die Beteiligung an Wasserstoffbrückenbindungen bestimmt. Werden einzelne Fragmente des markierten Proteins mittels Massenspektrometrie untersucht, ergibt sich aus der Veränderung der Masse einzelner Reste unter Berücksichtigung ihrer lokaler chemischen Situation ein Bild ihrer Beweglichkeit.

4.5. Die TIR-Domäne aus *Hydra magnipapillata* TRR-2 zeigt hohe strukturelle Ähnlichkeit zu anderen TIR-Domänen

Die Kristallstruktur der *Hydra magnipapillata* TRR-2 TIR-Domäne wurde mit anderen in der Proteindatenbank abgelegten Strukturen verglichen. Dies erfolgte mit dem DALI-Server (Holm und Rosenstrom, 2010). Das Ergebnis ist in Tabelle 4.4 dargestellt. Wie zu erwarten zeigt *hy*TIR2 hohe Homologie zu den TIR-Domänen der menschlichen Toll-ähnlichen Rezeptoren und Adapterproteinen sowie zu bakteriellen und pflanzlichen TIR-Proteinen. Weiterhin identifizierte Kristallstrukturen waren die SEFIR-Domänen des humanen IL-R17A (Zhang *et al.*, 2014) und des murinen IL-R18B (Zhang *et al.*, 2013). Diese Ähnlichkeit ist erstaunlich, aber nicht komplett überraschend. Bereits 2003 stellten Novatchkova u. a. fest, dass TIR- und SEFIR-Domänen in eine Superfamilie STIR eingeordnet werden können (Novatchkova *et al.*, 2003). Kürzlich wurde zudem gezeigt, dass Interaktionen zwischen TIR- und SEFIR-Domänen aktiv an der Regulation der TLR-Signalweges beteiligt sind (Mellett *et al.*, 2015).

Größte strukturelle Ähnlichkeit zeigt *hy*TIR2 zu den TIR-Domänen der Toll-ähnlichen Rezeptoren mit einem *RMSD* von 1,8 Å bis 2,3 Å. Auch die Strukturen der Adapterproteine MyD88 und TIRAP (auch bekannt als Mal) haben einen niedrigen *RMSD* von 2,1 Å bzw. 2,2 Å. Die Sequenzen sind zu 25 % bis 34 % identisch. Trotz einer geringen Sequenzidentität von 11 % bzw. 6 % überlagern *hy*TIR2 und die SEFIR-Domänen des humanen IL-17 Rezeptors A und murinen IL-17-Rezeptors B mit einem *RMSD* vergleichbar mit diesen TIR-Domänen. Zu den Strukturen der TIR-Domänen der Adapterproteine TICAM-1 und -2 und IL-1RAPL-1 sowie den TIR-Domänen pflanzlicher und bakterieller Herkunft besitzt *hy*TIR2 ebenfalls moderate Ähnlichkeit. So lässt sich *hy*TIR2 aus strukturellen Gesichtspunkten zu den TIR-Domänen Toll-ähnlicher Rezeptoren zählen. Es finden sich in *hy*TIR2 zudem drei in den TIR-Domänen Toll-ähnlicher Rezeptoren konservierte Motive, Box 1, 2 und 3 (Slack *et al.*, 2000). Im Fall von *hy*TIR2 besteht Box 1 aus den Aminosäuren Tyr97 bis 103, Box 2 aus den Resten Ile124 bis Gly136 und Box 3 aus Phe210 bis Asn213. Für TLR-1, -2 und -4 konnte gezeigt werden, dass sich Mutationen innerhalb dieser Motive negativ auf die Signalkapazität auswirken, möglicherweise aufgrund verminderter Fähigkeit zur Ausbildung homo- und heterotyper Wechselwirkungen (Poltorak *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2000; Ronni *et al.*, 2003).

4.5. hyTIR2 zeigt hohe strukturelle Ähnlichkeit zu anderen TIR-Domänen

Tab. 4.4.: Ergebnis der strukturellen Überlagerung der TIR-Domäne aus *Hydra magnipapillata* TRR-2 mit der Proteindatenbank PDB. Dies geschah mit dem Programm DALI (Holm und Rosenstrom, 2010).

Beschreibung	<i>RMSD</i> [Å] ^a	PDB- Einträge
Tierischer Ursprung		
TIR-Domäne des humanen TLR-1 (Xu <i>et al.</i> , 2000)	1,8 (32 %)	1FYV
TIR-Domäne des humanen TLR-6 (Jang und Park, 2014)	1,9 (31 %)	4OM7
TIR-Domäne des humanen MyD88 (Ohnishi <i>et al.</i> , 2009; Snyder <i>et al.</i> , 2013)	2,1 (28 %)	4EO7, 4DOM, 2Z5V, 2JS7
SEFIR-Domäne des humanen IL-17 Rezeptors A (Zhang <i>et al.</i> , 2014)	2,1 (11 %)	4NUX
TIR-Domäne des humanen TLR-2 (Xu <i>et al.</i> , 2000; Tao <i>et al.</i> , 2002)	2,2 (34 %)	1FYW, 1FYX, 1O77
TIR-Domäne des humanen TIRAP (Valkov <i>et al.</i> , 2011; Lin <i>et al.</i> , 2012; Woo <i>et al.</i> , 2012; Snyder <i>et al.</i> , 2014)	2,2 (25 %)	4LQD, 3UB2, 3UB3, 3UB4, 2Y92, 4FZ5
TIR-Domäne des humanen TLR-10 (Nyman <i>et al.</i> , 2008)	2,3 (31 %)	2J67
SEFIR-Domäne des murinen IL-17-Rezeptors B (Zhang <i>et al.</i> , 2013)	2,3 (6 %)	3VBC
TIR-Domäne des humanen IL-1RAPL-1 (Khan <i>et al.</i> , 2004)	2,6 (23 %)	1T3G
TIR-Domäne des humanen TICAM-2 (Enokizono <i>et al.</i> , 2013)	2,8 (19 %)	2M1W
TIR-Domäne des humanen TICAM-1 (Enokizono <i>et al.</i> , 2013)	3,2 (21 %)	2M1X
Pflanzlicher Ursprung		
TIR-Domäne aus <i>A. thaliana</i> (Chan <i>et al.</i> , 2010)	2,3 (23 %)	3JRN
TIR-Domäne des <i>A. thaliana</i> RPS4 (Williams <i>et al.</i> , 2014)	2,7 (19 %)	4C6R, 4C6T
TIR-Domäne des <i>A. thaliana</i> RRS1 (Williams <i>et al.</i> , 2014)	2,7 (19 %)	4C6S, 4C6T
TIR-Domäne des <i>L. usitatissimum</i> L6 (Bernoux <i>et al.</i> , 2011)	2,9 (21 %)	3OZI
Bakterieller Ursprung		
TIR-Domäne aus <i>P. denitrificans</i> (Chan <i>et al.</i> , 2009)	2,5 (26 %)	3H16
TIR-Domäne des <i>B. melitensis</i> TcpB (Kaplan-Türköz <i>et al.</i> , 2013; Snyder <i>et al.</i> , 2014; Alaidarous <i>et al.</i> , 2014)	2,5 (30 %)	4C7M, 4LQC, 4LZP

^a In Klammern ist die Anzahl der überlagerten Aminosäuren angegeben. Beinhaltet die Kristallstruktur mehr als eine Kette (d. h. mehrere Monomere bzw. Protomere in der asymmetrischen Einheit) wird ausschließlich diejenige mit der geringsten strukturellen Abweichung (*RMSD*) aufgeführt. Das Gleiche gilt für Strukturen mit multiplen Einträgen in der Proteindatenbank.

4. Ergebnisse

Zudem weist *hy*TIR2 eine für MyD88-bindende TIR-Proteine typische Triade bestehend aus den Aminosäuren Tyr97-Asp98-Asp132 auf (Brown *et al.*, 2006). Heutzutage wird jedoch insbesondere den Motiven Box 1 bis 3 wenig Bedeutung beigemessen, da diese für die korrekte Faltung der TIR-Domäne notwendige Bereiche umfassen (Narayanan und Park, 2015). In Zusammenfassung scheint *hy*TIR2 ein klassischer Vertreter der Familie der Toll/Interleukin 1-Rezeptor-Domänen zu sein.

4.6. Analyse der Kristallpackung

Über homotype Interaktionen von TIR-Domänen erfolgt die Weiterleitung eines Gefahrensignals innerhalb der Zelle (Song und Lee, 2012; Narayanan und Park, 2015). In dieser Arbeit wurden zwei Kristallformen der TIR-Domäne aus *Hydra magnipapillata* TRR-2 erhalten, bei denen sich jedoch nur jeweils ein Molekül in der asymmetrischen Einheit befindet. Während der Ausbildung eines Kristallgitters geht das kristallisierte Protein eine Vielzahl von Wechselwirkungen ein. Für eine Analyse der homotypen Wechselwirkungspartner sollte daher die Anordnung der symmetrieverwandten Moleküle im Kristallgitter einbezogen werden. In manchen Fällen kann auch ein Vergleich der intermolekularen Interaktionen unterschiedlicher Kristallformen Aufschluss über physiologisch relevante Wechselwirkungen liefern. Mit dem Programm PDBePI-SA (Krissinel und Henrick, 2007) wurden daraufhin für beide Kristallformen die Eigenschaften der Kontaktflächen zu symmetrieverwandten Molekülen ermittelt (siehe dazu Tabelle 4.5).

4.6.1. In beiden Kristallformen findet sich ein identischer Kristallkontakt

Die für Wechselwirkungen zur Verfügung stehende Oberfläche ist bei *hy*TIR2 in beiden Kristallformen etwa gleich groß. Berechnet wurde diese für Kristallform I zu 7255 \AA^2 und 7332 \AA^2 für Kristallform II. In beiden Kristallformen ist der Wassergehalt relativ gering. Für Kristallform I und Kristallform II beträgt dieser 38,8 % bzw. 36,4 % (berechnet mit SFCheck (Vaguine *et al.*, 1999) nur für den Anteil des Proteins, Solvensmoleküle und das zusätzlich gebundene Peptid sowie das Chloridion wurden zuvor entfernt). Es sollte daher in Form II eine insgesamt größere Proteinoberfläche an Interaktionen betei-

Tab. 4.5.: Analyse der Kristallpackung der Kristallformen I und II. Berechnet wurden die Kontaktflächen zwischen den über die kristallographische Symmetrie erzeugten Molekülen. Dies geschah mit dem PISA-Server (Krissinel und Henrick, 2007).

Kristallform I					
Symmetrie- operation	Anzahl beteiligter Reste		Kontakt- fläche (Å ²)	Δ^iG (kcal/mol)	Δ^iG P-Wert
	Molekül 1	Molekül 2			
x-1, y, z	20	13	557,8	-5,2	0,267
x-1/2, -y+1/2, -z+1	10	11	413,3	-6,3	0,139
-x+2, y-1/2, -z+1/2	14	13	384,0	1,2	0,765
x, y-1, z	6	4	117,8	0,3	0,674
x-1/2, -y-1/2, -z+1	2	2	68,8	1,3	0,769
	Summe		1541,7		

Kristallform II					
Symmetrie- operation	Anzahl beteiligter Reste		Kontakt- fläche (Å ²)	Δ^iG (kcal/mol)	Δ^iG P-Wert
	Molekül 1	Molekül 2			
x-1, y, z	13	18	628,3	-0,7	0,592
x, y, z-1	12	19	572,6	-4,3	0,286
-x, y-1/2, -z+1	7	7	202,0	1,4	0,740
-x+1, y-1/2, -z+1	4	6	149,3	0,1	0,500
x-1, y, z+1	3	1	51,2	-1,1	0,180
x-1, y, z-1	1	1	4,3	0,0	0,591
	Summe		1607,7		

ligt sein. Werden jedoch ausschließlich die Wechselwirkungen mit symmetrieverwandten Molekülen betrachtet, ist die beteiligte Fläche etwa gleich groß. Etwa 21 % (Form I) bzw. 22 % (Form II) der Proteinoberfläche sind in homotypen Wechselwirkungen involviert. Unter Einbeziehung des in Kristallform II gebundenen Peptids erhöht sich dieser Wert deutlich auf 27 %. Jedoch bringt die Betrachtung der Interaktion von *hyTIR2* mit einem Peptid artifiziellen Ursprungs nur wenig Informationsgewinn bezüglich, aus physiologischer Sicht, potentiell relevanter Protein-Protein-Kontakte. Im folgenden sollen daher nur die tatsächlichen Protein-Protein-Interaktionen betrachtet werden. Positive Affinität zweier Wechselwirkungspartner zueinander könnte auf biochemische Relevanz hindeuten. In beiden Kristallformen weisen die beiden großflächigsten Wechselwirkungen einen negativen Δ^iG -Wert auf, was auf eine gewisse Affinität hindeutet.

4. Ergebnisse

Die Anordnung der *hy*TIR2-Moleküle in den Kristallpackungen der Formen I und II wurden verglichen. Interessanterweise ist eine der Kontaktflächen in beiden Kristallformen nahezu identisch (siehe Abbildung 4.13). Ausgebildet wird die Wechselwirkung durch diejenigen symmetrieverwandten Moleküle, die durch die Symmetrieeoperationen $(x \pm 1, y, z)$ in Kristallform I bzw. $(x, y, z \pm 1)$ in Kristallform II erzeugt werden können. In beiden Fällen sind die involvierten Flächen gleich groß und haben eine leicht negative kalkulierte Bildungsenthalpie $\Delta^{\ddagger}G$. Beiden Kontaktflächen wird zudem ein vergleichbarer P-Wert von 0,27 und 0,29 für Form I bzw. Form II zugeschrieben. Mit diesem Wert wird versucht zu unterscheiden, ob eine Kontaktfläche durch hydrophobe (P-Wert < 0,5) oder ionische Wechselwirkungen (P-Wert > 0,5) zustande kommt. Letzteres deutet darauf hin, dass es sich um einen reinen Kristallkontakt handelt. Das Peptid in Kristallform II steht zudem maßgeblich mit beiden symmetrieverwandten Molekülen in Interaktion (siehe Abbildungen 4.9c und 4.13b). Jedoch verringert dies nur geringfügig die Interaktionsfläche ($559,9 \text{ \AA}^2$) und den $\Delta^{\ddagger}G$ ($-4,1 \text{ kcal/mol}$) der Wechselwirkung.

4.6.2. Die BB-Schleife interagiert in beiden Kristallformen mit einem benachbarten symmetrieverwandten Molekül

In eine hydrophobe Tasche, aufgespannt durch die Faltblattstränge βD und βE , die Helix αE und der D-Schleife, ragen die Reste Pro135 und Gly136 der BB-Schleife eines symmetrieverwandten Moleküls. Insbesondere die Aminosäure Pro135 wird dadurch vollständig verborgen. Dies ist sehr interessant. Pro135 gehört zu einem in TIR-Domänen evolutionär konservierten PG-Motiv, das vielfach als unerlässlich für die Signalfunktion beschrieben wurde (siehe u. a. Xu *et al.*, 2000; Dunne *et al.*, 2003; Ronni *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2006; Núñez Miguel *et al.*, 2007; Toshchakov und Vogel, 2007). So führen Mutationen dieses Prolinrestes zu einer Verminderung bzw. zum Verlust der Signalfähigkeit oder zu einer veränderten Adapterspezifität (Li *et al.*, 2005; Toshchakov und Vogel, 2007; Bovijn *et al.*, 2012; Piao *et al.*, 2013; Qiu *et al.*, 2013; Verstak *et al.*, 2013; Snyder *et al.*, 2014). Austausch von Pro135 zu einer sterisch anspruchsvolleren Aminosäure würde auch hier die Ausbildung dieses Kontaktes verhindern. Aufgrund der sterischen Gegebenheiten der Interaktion zwischen beiden TIR-Domänen wird auch an der Position des Glycinrest Gly136 keine andere Aminosäure toleriert. Bisher ist die strukturelle Rolle des hochkonservierten Glycinrestes unklar.

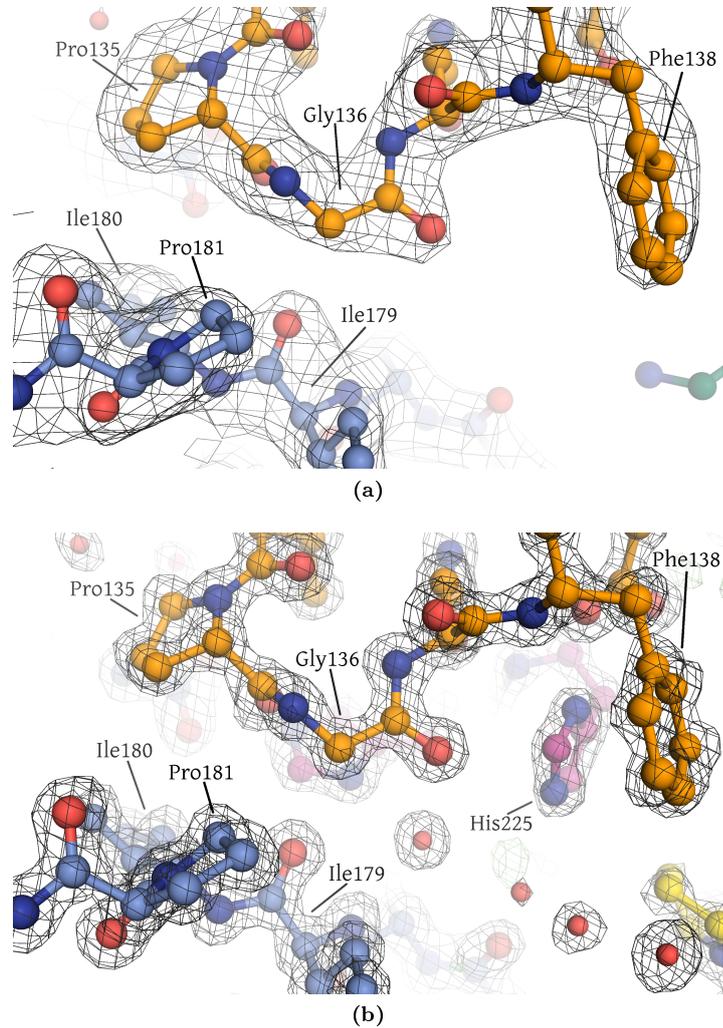


Abb. 4.12.: Ein in beiden Kristallformen identischer Kristallkontakt ist durch Elektronendichte genau definiert. Darstellung der Elektronendichte der BB-Schleife (oben) und dem Faltblattstrang β D (unten) in (a) Kristallform I und (b) Kristallform II. Zur Klarheit wurde die α D-Schleife nicht gezeigt. Unterschiedliche Proteinketten wurden mit verschiedenen Farben ihrer Kohlenstoffatome gekennzeichnet. Sauerstoffatome werden rot, Stickstoffatome blau dargestellt. $(2F_o - F_c, \alpha_c)$ -Elektronendichte ist grau. Die Konturierung (σ -Niveau) beträgt bei (a) 1σ und bei (b) $1,5\sigma$. $(F_o - F_c, \alpha_c)$ ist jeweils konturiert auf $\pm 4\sigma$ und grün bzw. rot dargestellt.

4. Ergebnisse

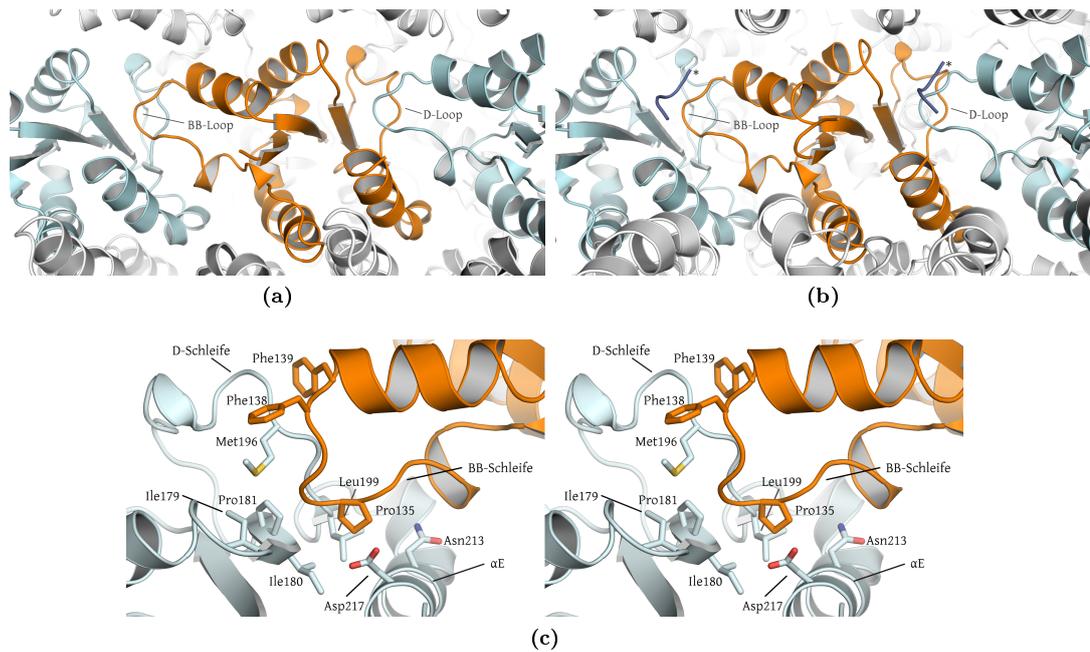


Abb. 4.13.: Identischer Kristallkontakt in Kristallform I und II. Dieser entsteht durch translatorische Symmetrie entlang der X-Achse in Kristallform I bzw. der Z-Achse in Kristallform II (siehe dazu auch Tabelle 4.5). Orange dargestellt ist *Hydra magnipapillata* hyTIR2 in der asymmetrischen Einheit. Die symmetrieverwandten Moleküle sind hellblau (identisch in beiden Kristallformen) bzw. hellgrau (unterschiedlich in beiden Kristallformen) gefärbt. Die Beschriftung bezieht sich jeweils auf die orange gefärbten Moleküle. (a) Kristallform I. (b) Kristallform II. (c) Detaillierte Aufsicht auf die TIR–TIR-Interaktion (*wall-eye*-Stereoabbildung).

Es wird angenommen, dass Signalweiterleitung durch transiente Interaktion zwischen TIR-Domänen vermittelt wird (Song und Lee, 2012; Narayanan und Park, 2015). Die zugrundeliegende Wechselwirkung ist daher vermutlich relativ schwach. Ob die hier beobachtete Interaktion möglicherweise auch eine physiologische Funktion besitzt, kann ohne weiterführende Studien nicht ausgesagt werden.

4.7. Aminosäuren der *hyTIR2*–*hyTIR2*-Kontaktfläche sind evolutionär konserviert

Obwohl in allen multizellulären Organismen Proteine mit TIR-Domänen bekannt sind, soll hier nur der Vergleich mit einer Auswahl verschiedener Sequenzen von Organismen unterschiedlicher Ordnung geschehen. Die Wahl der Organismen erfolgte der Einfach-

4.7. Aminosäuren der *hyTIR2*–*hyTIR2*-Kontaktfläche sind evolutionär konserviert

heit halber nach der Publikation von Song *et al.* (2012). In dieser Publikation beschreiben die Autoren die evolutionäre Entwicklung des Systems der Toll- bzw. Toll-ähnlichen Rezeptoren. Dazu wurden die Toll/Interleukin-1-Rezeptor-homologen Domänen aus folgenden Lebewesen verglichen: *Amphimedon queenslandica*, *Suberites domuncula* als Vertreter der Schwämme, *Nematostella vectensis*, *Hydra magnipapillata* repräsentieren die Ordnung der Nesseltiere und *Branchiostoma floridae* sowie *Danio rerio* die Chordatiere. Aus dem Reich der Amphibien wurde *Xenopus tropicalis* gewählt. Die Säugetiere werden durch den Menschen *Homo sapiens* vertreten. Zur Veranschaulichung der evolutionären Verwandtschaft dient Abbildung 4.14. Eine notwendige Anforderung für eine aussagekräftige Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen ist, dass hauptsächlich TLR oder TLR-ähnliche Proteine, die ausschließlich mit MyD88 wechselwirken, verglichen werden. Jedoch fehlen dazu biochemische und molekularbiologische Informationen der einzelnen Organismen. Es wurde daher wie folgt verfahren. Im Fall der niederen Organismen *A. queenslandica*, *S. domuncula*, *N. vectensis*, *H. magnipapillata* und *D. melanogaster* sind keine weiteren Adapterproteine neben MyD88 bekannt. Hier sollte die Voraussetzung der Interaktion mit MyD88 gegeben sein. Aus dem Menschen ist bekannt, dass TLR-5 über MyD88 signalisiert (Song und Lee, 2012). In Analogie dazu wurden daher die Sequenzen der TIR-Domäne der TLR-5-Orthologe im Zebrafisch und Krallenfrosch genutzt. Die Überlagerung der vorliegenden Sequenzen sollte idealerweise unter dem Gesichtspunkt struktureller Ähnlichkeit stattfinden. Jedoch sind bisher nur Strukturen der TIR-Domänen humaner Toll-ähnlicher Rezeptoren bekannt. Ein Vergleich auf Basis der Primärsequenz könnte durch die ferne evolutionäre Verwandtschaft und die daraus resultierende geringe Sequenzidentität problematisch werden. So wurde das Programm PRALINE (Heringa, 1999; Heringa, 2000; Heringa, 2002; Simossis und Heringa, 2003; Simossis und Heringa, 2005; Simossis *et al.*, 2005) genutzt. Dieses zieht neben der reinen sequenzbasierten Überlagerung zusätzlich die aus den Sequenzen *in silico* vorhergesagten Sekundärstrukturinformationen heran. Da im Laufe der Evolution die Tertiärstruktur eines Proteins stärker konserviert ist als die zugrundeliegende Sequenz, ermöglicht die Kombination der Informationen aus Sequenz und Sekundärstruktur eine genauere Überlagerung korrespondierender Aminosäuren. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.14 dargestellt.

Überlagert wurden hauptsächlich die in der Datenbank Uniprot (The UniProt Consortium, 2015) als TIR-Domäne gekennzeichnete Sequenzbereiche. Unterschiede im N-Terminus sollen hier nicht betrachtet werden. Nicht dargestellt wurden zudem etwa 100 Aminosäuren N-terminal vor der TIR-Domäne des *Drosophila melanogaster* Toll-Rezeptors.

4. Ergebnisse

Die vorhergesagte TIR-Domäne ist in allen Fällen ungefähr gleich groß. Interessanterweise scheint die Länge der reinen TIR-Domänen mit steigendem Grad der evolutionären Stufe stetig zuzunehmen. So wird insbesondere die AB-Schleife, die DD-Schleife und die EE-Schleife länger. Die genannten Größenunterschiede haben für sich allein jedoch nur wenig Aussagekraft. Rezeptor- und Adaptermoleküle befinden sich in einem coevolutiven Prozess und sind daher aneinander angepasst (Yeang und Haussler, 2007). Aus diesem Grund wurden auch die Sequenzen der TIR-Domänen des Adaptermoleküls MyD88 auf die gleiche Art überlagert (siehe Abbildung 4.15). Auf den ersten Blick erscheint die Länge der Sequenzen von MyD88 deutlich gleichförmiger zu sein. Abweichend davon finden sich in *B. floridae*, *A. queenslandica* und *S. domuncula*, aus wenigen Aminosäuren bestehenden Insertionen im Bereich der AB- bzw. FF-Schleife. Vergleichbar mit der Situation des Toll-Rezeptors besitzt MyD88 aus *D. melanogaster* N-terminal weitere 150 Aminosäuren. Weiterhin scheinen die Sequenzen höher konserviert. Weitere Studien sollten folgen, um diese Diskrepanz weiter zu beleuchten.

Trotz der evolutiven Entfernung besitzen relativ viele der überlagerten Reste vergleichbare Eigenschaften ihrer Seitenketten. Dies sind insbesondere die Aminosäuren, die das Innere des Proteins auskleiden und am Aufbau des hydrophoben Kerns beteiligt sind (geringe Zugänglichkeit zum Solvent in Abbildung 4.14). Vier Aminosäuren sind weiterhin in allen Sequenzen identisch. Bezogen auf die Nummerierung von *hyTIR2* sind das die Reste Gly136, Leu199, Phe200 und Leu204. Gly136 ist Teil eines für TIR-Domänen spezifischen Sequenzmotivs. Hierbei ist dem Glycinrest eine hydrophobe Aminosäure, wie Prolin, seltener auch Alanin oder Valin, vorangestellt. Leu199, Phe200 und Leu204 interagieren in *hyTIR2* miteinander. Erstaunlicherweise ist Leu199 zudem direkt an der homotypen TIR–TIR-Wechselwirkung beteiligt, die sowohl in Kristallform I als auch Kristallform II identisch ist. Hier wechselwirkt es mit Pro135. Dieser Rest ist in einer der überlagerten Sequenzen gegen Alanin (*N. vectensis*) und Valin (*D. melanogaster*) ausgetauscht. In *hyTIR2* stehen Pro135 die Aminosäuren Ile180, Thr197, Asn213 und Asp217 gegenüber. Wird angenommen, dass die Wechselwirkung in *hyTIR2* eine mögliche Art der homotypen TIR–TIR-Interaktion abbildet, findet sich allerdings kein Hinweis auf einen korrespondierend Austausch. Valin und Prolin besitzen allerdings sehr ähnliche Charakteristiken ihrer Seitenketten, sind also möglicherweise austauschbar. Der intrazelluläre Teil des *Drosophila* Toll-Rezeptors ist zudem aufgrund seiner überdurchschnittlichen Länge außergewöhnlich. Abschließend lässt sich, möglicherweise auch aufgrund der sehr geringen Anzahl an untersuchten Sequenzen, keine Aussage über die Relevanz der Wechselwirkung machen.

4.7. Aminosäuren der *hyTIR2*–*hyTIR2*-Kontaktfläche sind evolutionär konserviert

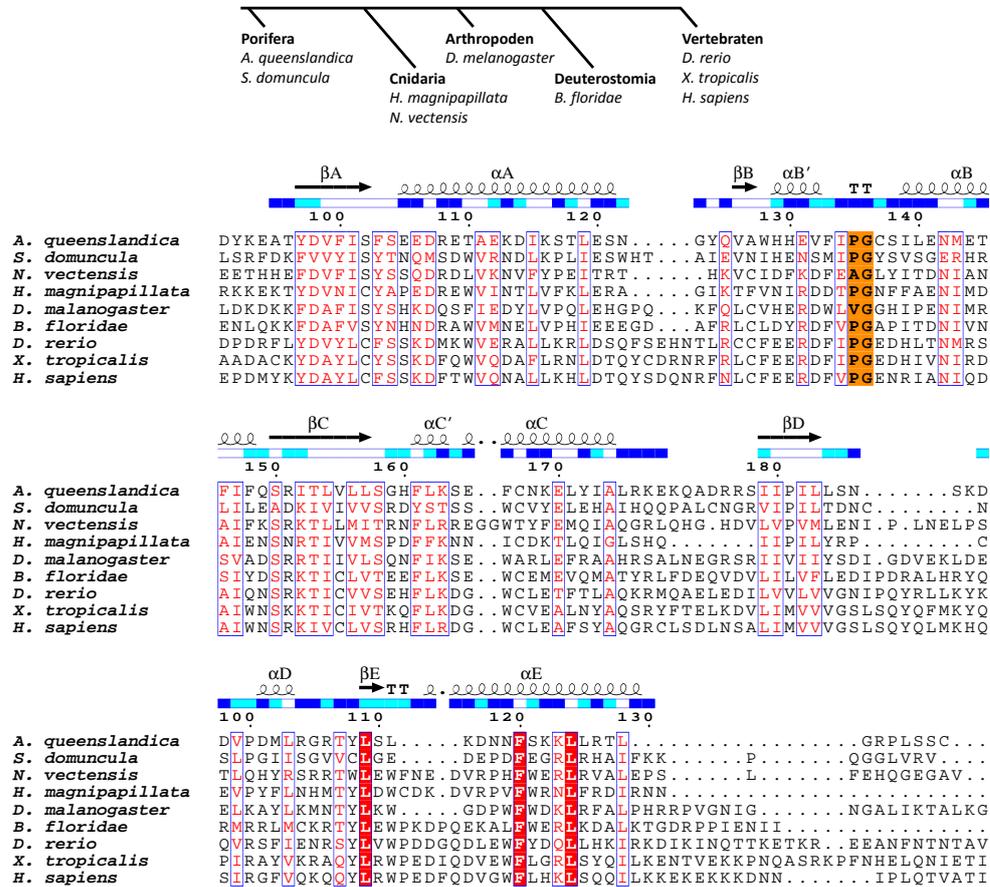


Abb. 4.14.: Sequenzüberlagerung von TIR-Domänen verschiedener Toll-ähnlicher Rezeptoren. Uniprot-Zugriffsnummern: *A. queenslandica* E5KCC6, *S. domuncula* A7M856, *N. vectensis* A7RYG9, *H. magnipapillata* TRR-2 abgebildet. Verwendete Symbolik: Spirale... helikale Struktur, Pfeil... β -Faltblattstrang, TT... β -Schleife. Die Zeile darunter gibt die Zugänglichkeit der Aminosäureseitenkette zum umgebenden Solvens an (Farbschema: weiß... nicht zugänglich, hellblau... teilweise frei zugänglich, dunkelblau... exponiert). Sequenzüberlagerung: Färbung der Reste nach der Risler-Matrix (Risler *et al.*, 1988). Rot hinterlegte Aminosäuren sind in allen Sequenzen identisch, in rot gedruckte Reste auf weißem Grund haben einen gleichen Charakter ihrer Seitenkette. Bereiche von Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften sind in einer blauen Box dargestellt. Abweichend davon sind die Aminosäuren des PG-Motivs orangefarben gefärbt.

4. Ergebnisse

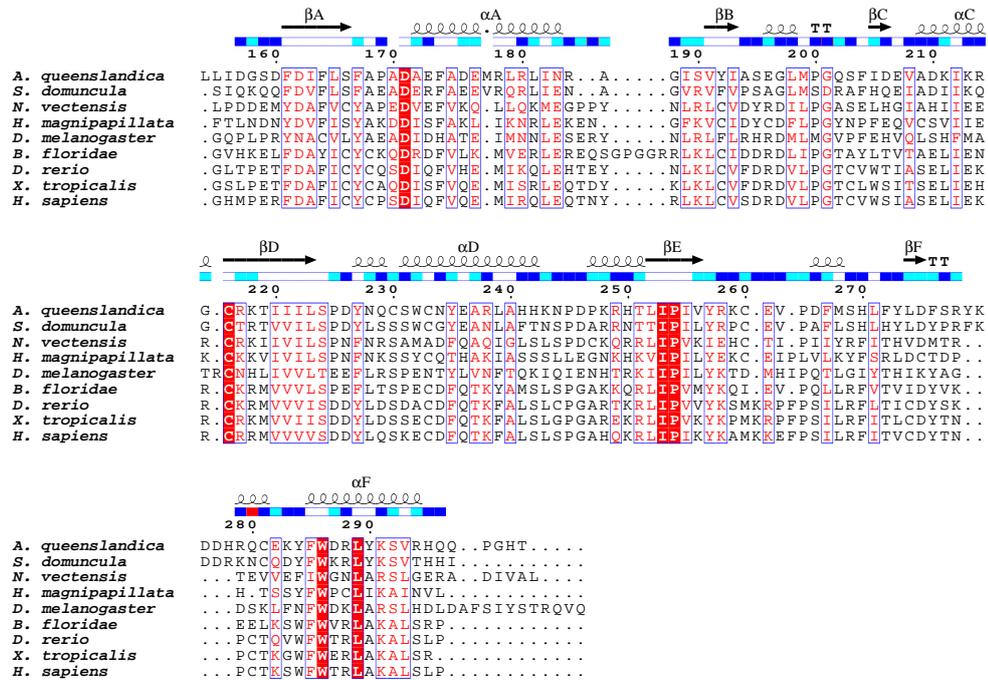


Abb. 4.15.: Sequenzüberlagerung von TIR-Domänen verschiedener MyD88-ähnlicher Adapterproteine. Uniprot-Zugriffsnummern: *A. queenslandica* E5KCC5, *S. domuncula* Q4W1E7, *N. vectensis* A7RHZ4, *H. magnipapillata* MyD88 (persönliche Kommunikation mit Dr. Ren'e Augustin), *D. melanogaster* Q7K105, *B. floridae* C3ZGY7, *D. rerio* Q5XJ85, *X. tropicalis* Q28DJ2 und *H. sapiens* Q99836. In der ersten Zeile sind die Sekundärstrukturelemente (Spirale... helikale Struktur, Pfeil... β -Faltblattstrang, TT... β -Schleife) der TIR-Domäne des menschlichen MyD88 gezeigt (PDB-Eintrag 4EO7, Snyder *et al.*, 2013), die zweite gibt die Zugänglichkeit der entsprechenden Aminosäureseitenkette zum umgebenden Solvens an (Farbschema: weiß... nicht zugänglich, hellblau... teilweise frei zugänglich, dunkelblau... exponiert). Sequenzüberlagerung: Färbung der Reste nach der Risler-Matrix (Risler *et al.*, 1988). Rot hinterlegte Aminosäuren sind in allen Sequenzen identisch, in rot gedruckte Reste auf weißem Grund haben einen gleichen Charakter ihrer Seitenkette. Bereiche von Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften sind in einer blauen Box dargestellt.

5. Diskussion

5.1. Kristallisation und Strukturlösung durch Molekularen Ersatz

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die TIR-Domäne des *Hydra magnipapillata* Toll-Rezeptor-Verwandten 2, korrespondierend den Aminosäuren 95 bis 221, heterolog in *E. coli* hergestellt und mittels chromatographischer Methoden zur apparenten Homogenität gereinigt. Versuche zur Kristallisation waren erfolgreich. Röntgenkristallographische Untersuchungen der nadelförmigen Kristalle zeigten, dass diese zwei Kristallformen zugeordnet werden müssen. Die als Form I bezeichnete Kristallform gehörte der orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$ an, die zweite Form zur monoklinen Raumgruppe $P2_1$. Der Wassergehalt war mit 39 % (Matthewkoeffizient $2,06 \text{ \AA}^3/\text{Da}$) bzw. 35 % (Matthewkoeffizient $1,92 \text{ \AA}^3/\text{Da}$) in beiden Formen niedrig. Unterschiedlich war jedoch die Fähigkeit, Röntgenlicht zu streuen. Kristalle der Form I streuten anisotrop bis zu einer Auflösung von 2 \AA , wohingegen für Form II Diffraktionsdaten bis unter $1,2 \text{ \AA}$ gesammelt werden konnten.

Die Lösung des Phasenproblems erfolgte anhand von Daten der Kristallform I. Ein verkürztes Modell von *hyTIR2* basierend auf der Struktur der TIR-Domäne des humanen TLR-1 (Xu *et al.*, 2000) konnte erfolgreich für die Phasierung mittels Molekularen Ersatz verwendet werden. Verglichen mit der finalen Struktur hatte das Suchmodell eine mittlere Abweichung *RMSD* über 89 C α -Atome von $1,9 \text{ \AA}$. Eine sequenzunabhängige Strukturüberlagerung ergab einen *RMSD* von $1,2 \text{ \AA}$. Trotz dieser relativ geringen Abweichungen bewertete das Programm MOLREP (Vagin und Teplyakov, 1997) die gefundene Lösung mit einem niedrigen *score* von 0,246 und einem ebenso geringen Kontrast von 1,89. Der Fehler der initialen Phasen war mit über 60° dementsprechend groß.

5. Diskussion

Die kalkulierte Elektronendichte war jedoch interpretierbar. Im Rahmen des automatischen Modellbaus führte der durch den niedrigen Wassergehalt und demzufolge große intermolekulare Wechselwirkungsfläche im Kristall zu Problemen, da insbesondere das Programm BUCCANEER (Cowtan, 2006; Cowtan, 2008) oft die Ketten symmetrieverwandter Moleküle miteinander verband. Während des Modellbaus wurden Maßnahmen zur Reduktion von *model bias* ergriffen. So wurden simuliertes Tempern des Modells durchgeführt und *prime & switch*-dichtemodifizierte Karten (Terwilliger, 2004b) verwendet. Der Vergleich der Strukturen der niedrig aufgelösten Kristallformen I und der hochaufgelösten Form II zeigt nur geringe Unterschiede (*RMSD* von 0,5 Å). *Model bias* wurden daher effektiv eliminiert.

5.2. Einfluss der Affinitätssequenz auf die Kristallpackung

In Kristallform II befindet sich nahe dem C-Terminus ein Peptid, das nicht zum Kristallisationstropfen zugesetzt wurde. Trotz der hochaufgelösten Diffraktionsdaten kann in der Elektronendichte keine Verbindung zwischen Protein und Peptid beobachtet werden. Das Peptid besteht aus vier Aminosäuren, wovon zwei benachbarte Reste zweifelsfrei als Histidine identifiziert werden konnten. Damit stammt dieses von der C-terminal fusionierten Hexahistinsequenz. Die Aminosäuren wurden vermutlich durch mitgeschleppte Proteasen vom restlichen Protein abgetrennt. Durch eine massenspektrometrische Analyse der Kristalle könnte diese Vermutung verifiziert werden.

Ob dieses Peptid die Bildung von Kristallform II erst ermöglicht, kann jedoch nicht ausgesagt werden. Wechselwirkungen des Peptids finden sich hauptsächlich zwischen den symmetrieverwandten *hyTIR2*-Molekülen in Richtung der *z*-Achse. Möglicherweise führen die zusätzlichen intermolekularen Wechselwirkungen zur Stabilisierung schwacher Kontakte und damit die Ausbildung eines nahezu komplett unterschiedlichen Kristallgitters. Andererseits könnte es sein, dass sich die strukturelle Grundlage zur Bindung des Peptids erst mit Ausbildung des Kristallgitters ergibt. Tatsächlich könnte es schwer werden, Kristalle der Form II zuverlässig zu reproduzieren. Möglicherweise können bereits durch Co-Kristallisation mit dem Tetrapeptid H₂N–His₄–COOH Kristalle der Kristallform II erhalten werden. Jedoch könnte aufgrund der sterischen Situation eine Modifikation des Proteins nötig sein. Eine abspaltbare Affinitätssequenz sollte am

5.3. Die TIR-Domäne aus *Hydra magnipapillata* Toll-Rezeptor-Verwandter 2 als Modellprotein

N-Terminus angebracht und das Protein C-terminal um drei Histidinreste verkürzt werden. So könnte eine Anordnung der Aminosäuren, wie in der Kristallstruktur der Kristallform II beobachtet, erreicht werden.

Die Rolle bestimmter Fusionssequenzen bei der Expression und Reinigung eines Proteins ist gut untersucht. So kann die Löslichkeit und die Stabilität in Lösung eines Proteins durch eine angebrachte Affinitätssequenz merklich verbessert sowie die Anreicherung des Zielproteins effizienter gestaltet werden (Walls und Loughran, 2011). Jedoch kann der Einfluss der Affinitätssequenz auf das Kristallisationsverhalten nicht abgeschätzt werden. In einer Studie am Maltodextrin-bindenden Protein aus *Pyrococcus furiosus* wurde der Einfluss verschiedener Affinitätssequenzen getestet (Bucher *et al.*, 2002). Hier zeigten sich deutlich Unterschiede bei der Kristallisation des Proteins sowie im Diffraktionsverhalten der untersuchten Kristalle. Die Octopindehydrogenase aus *Pecten maximus* kristallisierte in Anwesenheit ihres Substrates Nicotinamidadeninukleotid (NADH) deutlich besser als die Apo-Form (Smits *et al.*, 2008). Aus der Analyse der Kristallstruktur wurde ersichtlich, dass die zur Reinigung genutzte Hexahistidinsequenz mit dem Cofaktor wechselwirkte und das Protein so in einer stabilen Konformation fixierte. Im Gegensatz dazu wurden bei der Prolidase aus *Thermococcus sibiricus* zwei Kristallformen beobachtet (Trofimov *et al.*, 2012). In der ersten Form waren die Moleküle im Kristall gut gepackt und dieser daher relativ stabil gegenüber mechanischem Stress während des Montierens. Bei der zweiten Form erwiesen sich die Kristalle als sehr wenig mechanisch belastbar. Bei letzterem ermöglichen erst die Aminosäuren der His₆-Sequenz eine zusätzliche intermolekulare Wechselwirkung, die diese instabile Packung bedingt. Jedoch ist nicht nur die bloße Anwesenheit einer Affinitätssequenz über Erfolg und Misserfolg bei der Kristallisation entscheidend, sondern auch die Position der Fusion an das Zielprotein (Eschenfeldt *et al.*, 2010).

5.3. Die TIR-Domäne aus *Hydra magnipapillata* Toll-Rezeptor-Verwandter 2 als Modellprotein

Im Genom des Süßwasserpolyphen *Hydra magnipapillata* finden sich alle wesentlichen Bestandteile des Toll-Rezeptor-Systems (Hemmrich *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2007; Lange *et al.*, 2011). Jedoch besitzt *Hydra* keinen klassischen TLR. Anstelle dessen

5. Diskussion

erfüllen zwei Proteinklassen die Aufgabe der Erkennung von Gefahrensignalen (Leucinreiche Wiederholungen *LRR*) und der Signalweiterleitung (Toll-Rezeptor-Verwandte *TRR*) (Miller *et al.*, 2007; Bosch *et al.*, 2009). Ein Vergleich der Sequenzen und der dreidimensionalen Strukturen verschiedener TIR-Domänen könnte Hinweise auf eine möglicherweise in allen Organismen konservierte Interaktionsfläche liefern. Interessanterweise haben die TIR-Domänen der *Hydra magnipapillata* Toll-Rezeptor-Verwandten TRR-1 und -2 im Vergleich mit anderen bekannten TIR-Domänen die geringsten Längen (siehe dazu auch Abbildung 4.14). Im Kontrast dazu ist die TIR-Domäne des Adaptermoleküls MyD88 in seiner Länge wesentlich stärker konserviert (siehe Abbildung 4.15). In den TIR-Domänen der Toll-ähnlichen Rezeptoren und von MyD88 sind insbesondere die Reste des hydrophoben Kerns stark konserviert. Im Gegensatz dazu zeigen sich die solvenszugänglichen Reste stärker veränderlich. Sollte ein evolutionär bewahrter Mechanismus homotyper TIR–TIR-Wechselwirkung bestehen, wird dieser sich ebenfalls in der Proteinstruktur der „kleinen“ *Hydra* TIR-Domäne wiederfinden. Allein auf Basis der reinen Sequenzinformation ist es vielleicht unmöglich diesen Mechanismus abzuleiten und soll in dieser Arbeit auch nicht versucht werden.

Auf struktureller Ebene ist *hyTIR2* den TIR-Domänen der Toll-ähnlichen Rezeptoren TLR-1, -2, -6 und -10 am nächsten. Entfernt man die Reste mit der größten Abweichung erhält man einen Eindruck über das strukturell und evolutionär hochkonservierte Rückgrad der TIR-Domäne. Eine multiple strukturelle Überlagerung dieser fünf Strukturen mit dem Programm MultiProt (Shatsky *et al.*, 2004) identifizierte 88 Reste mit einem *RMSD* von 0,91 Å. Aufgebaut wird das Grundgerüst hauptsächlich aus dem fünfsträngigen β -Faltblatt sowie Teilen der Helices αA , αB , $\alpha C'$ und αE . Ob die beteiligten Reste an einer Interaktion mit anderen TIR-Domänen beteiligt sind, bleibt allerdings unsicher. Möglicherweise resultiert dieser Aufbau auch daraus, dass sich TIR-Domänen auf eine vergleichbare Art und Weise falten. Denn vergleicht man die Eigenschaften der weniger konservierten Teile dieser TIR-Domänen, stellt man fest, dass diese Bereiche in Relation zum kompletten Molekül erhöhte Temperaturfaktoren aufweisen und somit höhere Flexibilität besitzen. Es bleibt daher die Frage, welche Bereiche vielleicht für homotype Wechselwirkung verantwortlich sind. Denkbar wäre, dass strukturell konservierte Teile des Proteins zur initialen Anlagerung anderer TIR-Domänen beitragen, wobei diese durch Interaktion mit den flexibleren Resten stabilisiert wird.

Betrachtet man die Sequenz- und Strukturhomologie sowie die ähnliche Beweglichkeit der Sekundärstrukturelemente verschiedener Vertreter von Toll/Interleukin-1-Rezeptor

5. Diskussion

homologen Domänen, so kann die TIR-Domäne aus *Hydra magnipapillata* TRR-2 als ein klassischer Vertreter dieser Proteinfamilie angesehen werden. Die geringe Größe macht diese zusätzlich zu einem ausgezeichneten Untersuchungsobjekt für Studien der Funktionalität einzelner Reste. Weiterhin ist nur ein Adapterprotein MyD88 bekannt. Studien zur Weiterleitung von Gefahrensignalen sind in *Hydra* demnach leichter zu handhaben und *hyTIR2* kann als Modellprotein angesehen werden.

5.4. Untersuchung der homotypen TIR–TIR-Wechselwirkungen

5.4.1. Bekannte TIR–TIR-Wechselwirkungen

Prinzipiell kann sich vorgestellt werden, dass TIR-Domänen in drei verschiedenen Interaktionsmodi involviert sein können (Burns *et al.*, 1998; Medzhitov *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2000). Die als „*R face*“ (*R*=Rezeptor) bezeichnete TIR–TIR-Kontaktfläche bildet die Plattform zur Oligomerisierung der Rezeptor-TIR-Domänen nach Erkennung eines Gefahrensignals. Art und Weise dieser Interaktion bestimmt ebenfalls die Form der Immunantwort. Das sogenannte „*A face*“ (*A*=Adapter) beschreibt die Oligomerisierung der TIR-Domänen der Adaptermoleküle. Indes beschreibt das „*S face*“ (*S*=Signal) den Interaktionsmodus zwischen (aktivierten) Rezeptor- und Adapter-TIR-Domänen. Mit den Kristallstrukturen der TIR-Domänen der humanen Toll-ähnlichen Rezeptoren 1, 2, 6, 10 und IL1RAPL wurden erste strukturelle Informationen über die Konstitution potentieller homotyper TIR–TIR-Wechselwirkungen erhalten. Über deren physiologische Relevanzen wird jedoch kontrovers diskutiert (Tao *et al.*, 2002; Gautam *et al.*, 2006; Nyman *et al.*, 2008). Im Zusammenspiel zahlreich verfügbarer Daten aus Mutagenesestudien, die einen Zusammenhang einzelner Reste mit der Funktionalität *in vivo* herstellen, wird das TLR-10 TIR-Dimer (PDB-Eintrag 2J67, (Nyman *et al.*, 2008)) als physiologisch präsentiert (Núñez Miguel *et al.*, 2007; Nyman *et al.*, 2008; Bovijn *et al.*, 2012). Dieses Dimer wurde so für theoretische Arbeiten über mögliche TIR-TIR-Interaktionsflächen und Andockbereiche für die Adapterproteine MAL und MyD88 des humanen TLR-4 herangezogen (Núñez Miguel *et al.*, 2007; Bovijn *et al.*, 2012).

5.4. Untersuchung der homotypen TIR-TIR-Wechselwirkungen

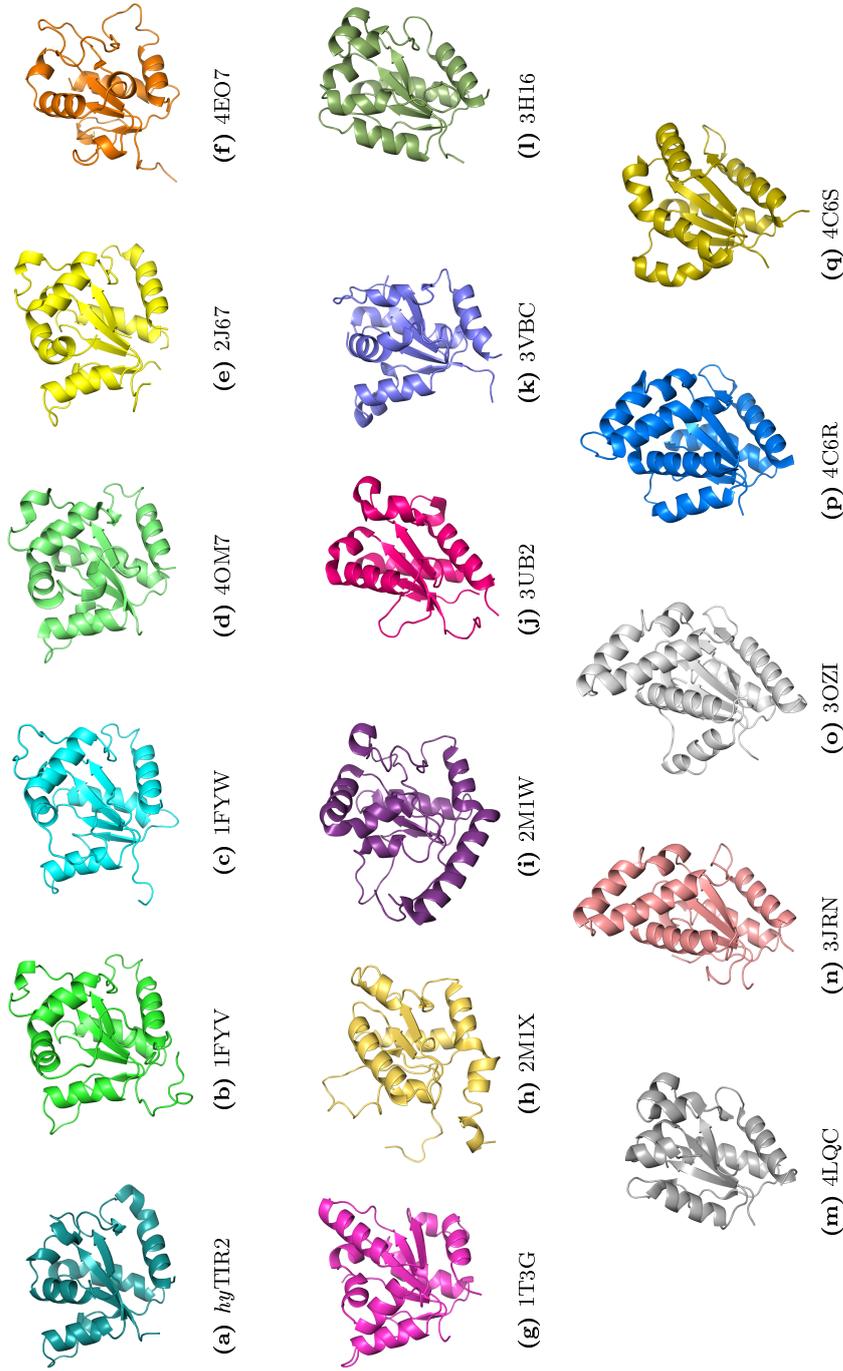


Abb. 5.2.: Vergleich der Strukturen homologer TIR-Domänen. IFYV: humaner Toll-ähnlicher Rezeptor 1 (Xu *et al.*, 2000), IFYW: humaner Toll-ähnlicher Rezeptor 2 (Xu *et al.*, 2000), 4OM7: humaner Toll-ähnlicher Rezeptor 6 (Jang und Park, 2014), 2J67: humaner Toll-ähnlicher Rezeptor 10 (Nyman *et al.*, 2008), 4EO7: humanes MyD88 (Snyder *et al.*, 2013), 1T3G: humanes Interleukin-1-Rezeptor *accessory protein-like* 1 (Khan *et al.*, 2004), 2MIX: humanes TICAM-1 (Enokizono *et al.*, 2013), 2MIW: humanes TICAM-2 (Enokizono *et al.*, 2013), 3UB2: humanes TIRAP (Lin *et al.*, 2012), 3VBC: SEFIR-Domäne des murinen IL-17 Rezeptors B (Zhang *et al.*, 2013), 3H16: *P. denitrificans* TIR-Protein (Chan *et al.*, 2009), 4LQC: *B. melitensis* TcpB (Snyder *et al.*, 2014), 3JRN: *A. thaliana* TIR-Protein (Chan *et al.*, 2010), 3OZI: *L. usitassimum* disease resistance protein L6 (Bernoux *et al.*, 2011), 4C6R: *A. thaliana* RPS4 (Williams *et al.*, 2014), 4C6S: *A. thaliana* RRS1 (Williams *et al.*, 2014)

5. Diskussion

Das TLR-10 TIR-Dimer weist als Modellsystem jedoch einige Schwächen auf. Toll-ähnlicher Rezeptor 10 gehört zur TLR-1-Unterfamilie und zeigt hohe Sequenzhomologie mit TLR-1 und TLR-6 (Chuang und Ulevitch, 2001). Guan *et al.* (2010) konnten zeigen, dass TLR-10 analog zu TLR-1 zusammen mit TLR-2 das PAMP triacetyliertes Lipopeptid Pam₃CSK₄ detektiert (Guan *et al.*, 2010). Sowohl diese Studie (Guan *et al.*, 2010) als auch Hasan *et al.* (2005) (Hasan *et al.*, 2005) konnten in Immunopräzipitationsexperimenten eine Wechselwirkung des TLR-2/TLR-10-Komplex mit MyD88 und eine Aktivierung des NF- κ B-Signalweges nachweisen. Beide Studien stehen aber in der Frage der TLR-10-Homodimere im Widerspruch. So beobachteten Hasan *et al.* (2005) eine Aktivierung von NF- κ B bei Expression eines konstitutiv dimeren TLR-10 (Hasan *et al.*, 2005), wohingegen das nahezu gleiche Experiment in Guan *et al.* (2010) nicht reproduziert werden konnte (Guan *et al.*, 2010). Im Kontrast dazu berichten letztere, dass TLR-10 allein und im Komplex mit TLR-2 nicht in der Lage ist, den für diese Unterfamilie typischen NF- κ B-Signalweg zu aktivieren (Guan *et al.*, 2010). Im Jahr 2012 veröffentlichten Mikami *et al.* ihre Untersuchungen über die evolutionäre Entwicklung der TLR in Vertebraten (Mikami *et al.*, 2012). In dieser Studie wird die außergewöhnliche Rolle des TLR-10 deutlich. Während die TIR-Domänen der Toll-ähnlichen Rezeptoren 1–9 durchweg geringere evolutionäre Entwicklungsgeschwindigkeit als die Ektodomäne aufweisen, was auf einen Selektionsdruck bezüglich der Ausbildung eines Rezeptor-TIR-Adapter-TIR-Komplexes hindeutet, ist diese im Fall von TLR-10 umgekehrt (Mikami *et al.*, 2012). Die geringe Konservierung könnte daher auch mit einem unterschiedlichen Mechanismus der Signalweiterleitung zusammenhängen (Mikami *et al.*, 2012). Die Vermutung, dass insbesondere der Signalweg des Toll-ähnlichen Rezeptors 2 von anderen abweicht, wurde bereits in der 2006 veröffentlichten Publikation von Jiang u. a. aufgestellt (Jiang *et al.*, 2006). Diese Publikation stellte ebenfalls ein Modell einer möglichen Kontaktfläche zwischen TLR-TIR und MyD88-TIR vor, die der in der Kristallstruktur von TLR-10 beobachteten entspricht (Jiang *et al.*, 2006). In Anbetracht der Tatsache, dass TLR-1, -2, -6 und -10 aufgrund ihrer Sequenzhomologie zusammen gruppiert werden (Chuang und Ulevitch, 2001), könnte das beobachtete Dimer entweder als molekulare Grundlage für die Rekrutierung spezifischer Adapterproteine des TLR-2-Signalweg dienen oder der Anordnung des Rezeptor-TIR-MyD88-TIR-Komplexes entsprechen. Für die TIR-Domänen von TLR-2 und -6 wurde zudem spekuliert, dass die Signalweiterleitung die Ausbildung von Cystinbrücken voraussetzt (Tao *et al.*, 2002; Núñez Miguel *et al.*, 2007; Jang und Park, 2014).

5.4. Untersuchung der homotypen TIR–TIR-Wechselwirkungen

Es lässt sich aufgrund der geringen Sequenzidentität von 20-30 % und den konformationellen Unterschieden in den Strukturen der TIR-Domänen der mustererkennenden Rezeptoren nicht von einem sehr ähnlichen *modus operandi* der homotypen Interaktion und Wechselwirkung mit Adapterproteinen auszugehen. So berichten Jiang *et al.* (2006) von einer Mutation (genannt Poc), die sich auf die Signalfunktion von TLR-4 und -9 auswirkt, jedoch auf die Weiterleitung über den TLR-2-Signalweg keinen Einfluss hat (Jiang *et al.*, 2006). Studien zur Wechselwirkung von BB-Schleifen-mimetischen Peptiden auf die TLR-Signalwege ergaben ein ähnliches Bild (Toshchakov und Vogel, 2007). Die BB-Schleife ist zudem nicht immer an der Ausbildung von TIR–TIR-Interaktionen beteiligt (Horng *et al.*, 2001; Toshchakov *et al.*, 2002; Horng *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2002; Valkov *et al.*, 2011).

5.4.2. Ein potentielles TIR–TIR-Dimer in den Kristallstrukturen der TIR-Domäne von *Hydra magnipapillata* TRR-2

Ein Vergleich des Elutionsvolumens von *hy*TIR2 mit denen anderer Proteine ergab, dass das gereinigte Protein in Lösung als Monomer vorliegt. Das Resultat wurde ebenfalls durch dynamische Lichtstreuung bestätigt. Dies ist konsistent mit den Ergebnissen der Reinigung der TIR-Domänen der menschlichen TLR-1 und TLR-2 (Xu *et al.*, 2000), TLR-10 (Nyman *et al.*, 2008), IL-1RAPL (Khan *et al.*, 2004), MyD88 (Ohnishi *et al.*, 2009) sowie der pflanzlichen TIR-Domänen *Arabidopsis thaliana* TIR (Chan *et al.*, 2010), RPS4 und RRS1 (Williams *et al.*, 2014) und *Linum usitatissimum* L6 TIR (Bernoux *et al.*, 2011). Auch das bakterielle *Paracoccus denitrificans* TIR liegt als Monomer vor (Chan *et al.*, 2009). Xu und Mitarbeiter beobachteten für die TIR-Domänen aus TLR-1 und TLR-2 eine Oligomerisierung zu Dimeren und Tetrameren bei hoher Proteinkonzentration (Xu *et al.*, 2000). Ähnliches gilt für *Linum usitatissimum* L6 TIR, das ebenfalls bei höherer Konzentration Dimere ausbildet (Bernoux *et al.*, 2011). Die TIR-Domäne des humanen TLR-6 scheint sich in einem Gleichgewicht zwischen monomerer und dimerer Form zu befinden (Jang und Park, 2014). TICAM-1 und -2 oligomerisieren bei erhöhten Konzentrationen und präzipitieren (Enokizono *et al.*, 2013). Im Gegensatz dazu existiert *Brucella melitensis* TcpB in Lösung als Dimer (Kaplan-Türköz *et al.*, 2013; Snyder *et al.*, 2014; Alaidarous *et al.*, 2014).

5. Diskussion

Ob *hy*TIR2 bei hohen Konzentrationen ebenfalls in eine dimere oder oligomere Form übergeht, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Jedoch sollten diese Untersuchungen durchgeführt werden. Die Signalfunktion von Interleukin- und Toll-ähnlichen Rezeptoren erfolgt über Ausbildung homotyper Wechselwirkung ihrer TIR-Domänen. Wäre die Affinität zueinander zu groß hätte dies eine permanente Aktivierung des Signalweges zur Folge. Die dauerhafte oder extensive Überfunktion des TLR/ILR-Systems wird jedoch im Menschen mit Krankheiten, beispielsweise rheumatoider Arthritis (Joosten *et al.*, 2003) oder multipler Sklerose (Racke und Drew, 2009) und Alzheimer (Kitazawa *et al.*, 2011), in Verbindung gebracht. Im Normalfall ist die Konzentration von Toll-ähnlichen Rezeptoren in der Membran gering. Nach Interaktion mit einem Liganden werden die intrazellulär befindlichen TIR-Domänen in eine Position gebracht, die eine homotype Wechselwirkung begünstigt. Im Prinzip steigt dadurch die lokale „Konzentration“ stark an. Diese Betrachtungsweise trifft auch auf ein Protein im Kristallgitter zu. Gleichzeitig kann die Anordnung der Proteine im Kristall die Stabilisierung schwacher Interaktionen ermöglichen.

In dieser Arbeit wurden Kristalle der *Hydra magnipapillata* TRR-2 TIR-Domäne in zwei Kristallformen I (Raumgruppe $P2_12_12_1$) und II (Raumgruppe $P2_1$) erhalten. Trotz der unterschiedlichen Packung ist in beiden einer der beobachteten Kristallkontakte identisch. Die Aminosäure Pro135 der sogenannten BB-Schleife bindet in einer Tasche aus hydrophoben Resten der Faltblattstränge β D und β E sowie der Helix α E. Pro135 ist in in nahezu allen TIR-Domänen konserviert. Austausch dieses Rests kann die Signalfunktion der TIR-Domäne beeinträchtigen oder ganz verhindern (Xu *et al.*, 2000; Dunne *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005; Toshchakov und Vogel, 2007; Bovijn *et al.*, 2012). Die strukturelle Integrität der BB-Schleife scheint durch Austausch des Prolinrestes nicht destabilisiert zu werden (Xu *et al.*, 2000). Basierend auf dem TLR-10-Dimer kann der Verlust der Signalfunktion mit Austausch des Prolins jedoch nicht in jedem Fall erklärt werden. So reicht nach Substitution mit Histidin eine einfache Rotation dieser Seitenkette, um sterischen Hindernissen auszuweichen und sogar stabilisierende Wechselwirkung mit der komplementären Proteinkette zu etablieren. Dahingegen muss die Substitution des Pro135 mit Histidin der *Hydra* TIR aufgrund sterischer Faktoren zum Verlust der homotypen Wechselwirkung führen. Gleichzeitig ist dieses Modell mit dem natürlichen Auftreten von Alanin und Valin anstelle der Aminosäure Prolin vereinbar. Tatsächlich ist die Anordnung des potentiellen *Hydra* TIR–TIR-Dimer auf die TIR-Domänen der TLR-1, -2, -6 und -10 sowie IL1RAPL ohne große sterische Konflikte übertragbar.

5.4. Untersuchung der homotypen TIR–TIR-Wechselwirkungen

In einer Arbeit von Mikacenic u. a. (2013) wurde der Zusammenhang zwischen *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) auf Chromosom 4 und der Ausschüttung proentzündlicher Cytokine nach Gabe des MAMP Pam₃CSK₄ untersucht (Mikacenic *et al.*, 2013). Mit einer nicht-synonymen Mutation in der TIR-Domäne des TLR-10 (Austausch Ile775Val) konnte eine hypermorphe Reaktion verknüpft werden (Mikacenic *et al.*, 2013). Die Autoren spekulieren in ihrer Publikation über eine mögliche Aktivierung der Signalfunktion des Toll-ähnlichen Rezeptors 10 (Mikacenic *et al.*, 2013). Ronni *et al.* (2003) konnten für auch für TLR-4 zeigen, dass der Austausch der korrespondierenden Aminosäure Val815 zu Alanin zum Verlust der Signalfunktion führt, wobei das Expressionsniveau der Rezeptorvariante ähnlich dem Wildtyp blieb (Ronni *et al.*, 2003). Es stellt sich die Frage, ob im Fall des TLR-10 der Austausch der Aminosäure Ile775 gegen das ebenfalls hydrophobe Valin eine signifikante Veränderung der Struktur verursacht und damit die Funktion beeinträchtigt. In einer theoretischen Arbeit über das Zusammenspiel der inneren Struktur der TIR-Domäne und seiner Funktion stellen Singh und Mitarbeiter jedoch genau eine entgegengesetzte Hypothese auf (Singh *et al.*, 2014). Ihre Annahme, dass die Funktionalität der TIR-Domäne insbesondere über ein Wechselspiel des hydrophoben Kerns zustande kommt, unterstützen die Autoren unter anderem am Beispiel der Punktmutation des Restes Leu815Ala des TLR-4 (Singh *et al.*, 2014). Die in *hy*TRR2 korrespondierende Aminosäure Ile218 ist nicht direkt an der TIR–TIR-Interaktion beteiligt, befindet sich aber in unmittelbarer Nähe (siehe dazu Abbildung 4.13c). Eine Mutation an dieser Position könnte konformationelle Änderungen der benachbarten Reste induzieren und würde daher die komplette Bindetasche betreffen.

Betrachtet man die Kontaktfläche zwischen einem potentiellen *Hydra* TIR–TIR-Dimer, so ist diese mit 590 Å² in Kristallform I und 560 Å² in Kristallform II gering. Dieser Punkt ist die größte Schwachstelle des Modellsystems. Im Vergleich dazu bilden die TIR–TIR-Komplexe des TLR-10 und IL1RAPL mit einer Kontaktfläche von über 700 Å² bzw. 1000 Å² deutlich stärkere Wechselwirkung untereinander aus. Für eine „niederenergetische“ Wechselwirkung, wie sie in der Kristallstruktur der *Hydra* TIR-Domäne des Toll-Rezeptor-Verwandten 2 zu finden ist, spricht jedoch ein anderer Fakt. So liegen die Toll-ähnlichen Rezeptoren 5 und 9 bereits ohne gebundenen Liganden dimerisiert vor (Zhou *et al.*, 2012; Latz *et al.*, 2007). Trotz dessen lässt sich in der EM-Struktur des TLR-5 nur eine der intrazellulären TIR-Domänen beobachten, die andere ist beweglich und nicht aufgelöst (Zhou *et al.*, 2012). Eine homotype Wechselwirkung der TIR-Domänen wird hier wahrscheinlich erst durch eine Umlagerung des

5. Diskussion

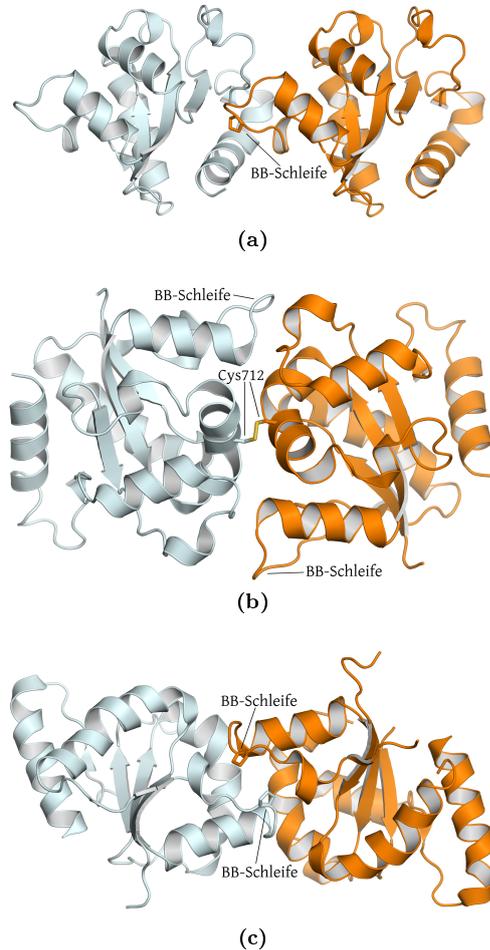


Abb. 5.3.: Wechselwirkungen der BB-Schleife von *hy*TIR2, TLR-6 und TLR-10. Zwei interagierende TIR-Moleküle sind orange und blau gefärbt. Vom konservierten PG-Motiv der BB-Schleife wurde die Aminosäure Prolin als Stabmodell gezeigt, d. h. bei (a) *hy*TIR2 die Aminosäure Pro135, bei der TIR-Domäne des TLR-6 (b) der Rest Pro712 und des TLR-10 (c) der Rest Pro674. (a) Dargestellt sind zwei über translationale kristallographische Symmetrie verbundene TIR-Moleküle von *hy*TIR2 der Kristallform II. Zur Klarheit wurde das zusätzlich gebundene Peptid nicht abgebildet. (b) Durch eine Disulfidbrücke stabilisiertes TIR-TIR-Dimer des Toll-ähnlichen Rezeptors 6 (PDB-Eintrag 4OM7, Jang und Park, 2014). (c) In der Kristallstruktur der TIR-Domäne des TLR-10 wird eine Umlagerung der BB-Schleife beobachtet, in der sich das konservierte PG-Motiv in unmittelbarer räumlicher Nähe befindet (PDB-Eintrag 2J67, Nyman *et al.*, 2008). Beide Prolinreste sind auf der gleichen Seite positioniert.

TLR-5-Dimers nach Erkennung von Flagellin oder mit der Anlagerung eines Adapters stabilisiert.

Mit der Aktivierung eines Toll-ähnlichen Rezeptors werden Adapterproteine rekrutiert, die über ihre TIR-Domänen wechselwirken und einen Signalkomplex Signalosom ausbilden (Song und Lee, 2012; Narayanan und Park, 2015; Guven-Maiorov *et al.*, 2015). Dieser ist die Grundlage zur Bildung des nachgelagerten Signalkomplexes Myddosom (Lin *et al.*, 2010; Guven-Maiorov *et al.*, 2015). Die Grundstruktur der DEATH-Domänen des Myddosoms ist veröffentlicht (PDB-Eintrag 3MOP, Lin *et al.*, 2010), jedoch ist die Anordnung der TIR-Domänen unbekannt. Interessanterweise bestärkt die Anordnung der DEATH-Domänen im Myddosom-Komplex die These eines über translatorische Symmetrie angeordneten TIR–TIR-Dimers. Betrachtet man die Ausrichtung der DEATH-Domänen von MyD88 (Ketten A–F), fällt auf, dass die Ketten A zu D und B zu F nahezu linear angeordnet sind. Mit einem Abstand ihrer C-Termini (Verknüpfungspunkte zur TIR-Domäne) von ungefähr 25 Å ist dieser in der Dimension einer TIR-Domäne. Basierend auf dieser Anordnung kann sich die Ausbildung eines linearen TIR–TIR-Komplexes, wie in den Kristallstrukturen von *Hydra* TIR beobachtet wurde, vorgestellt werden.

5.5. Zusammenfassung und Schlußfolgerung

Die Erkennung und Beseitigung einer Bedrohung durch eine mikrobielle Infektion ist für jeden höheren Organismus eine Herausforderung. Obwohl eine Vielzahl an unterschiedlichen Pathogenen existieren, besitzen diese meist evolutionär konservierte molekulare Muster (MAMPs), die teilweise in allen Organismen eines Reichs vorkommen und essentiell mit der Lebensfähigkeit verknüpft sind (Medzhitov und Janeway, 1997). Alle Tiere besitzen ein angeborenes Immunsystem, das in der Lage ist eben diese Muster zu detektieren. Beteiligt daran sind u. a. Toll-ähnliche Rezeptoren. Diese TypI-Membranproteine sorgen für die Übertragung eines Gefahrensignals in die Zelle. Hierzu dimerisiert die intrazellulär gelegene Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR) homologe Domäne, was die Anlagerung weiterer Adapterproteine ermöglicht. Dies ist der erste Schritt einer Signalkaskade, die letztendlich zur Ausschüttung entzündungsfördernder Botenstoffe oder antimikrobieller Substanzen führt (Song und Lee, 2012).

5. Diskussion

Der Süßwasserpolyt *Hydra magnipapillata* ist ein Modellorganismus für Studien des angeborenen Immunsystems (Galliot, 2012). Er besitzt alle essentiellen Bestandteile eines funktionierenden TLR-Signalwegs (Hemmrich *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2007). Im Vergleich zum Menschen findet sich in *Hydra* jedoch eine weitaus geringere Anzahl an Toll-ähnlichen Rezeptoren und Adapterproteinen. Mit diesen Voraussetzungen kann ein Studium des Vorgangs der Signalweiterleitung unter einfacheren experimentellen Bedingungen durchgeführt werden. *Hydra magnipapillata* besitzt ebenfalls eine der kürzesten bekannten TIR-Domänen. Wenn ein konservierter Mechanismus der Signalweiterleitung über homotype TIR–TIR-Wechselwirkung besteht, könnte sich dieser in der dreidimensionalen Struktur der beteiligten Proteinmoleküle niederschlagen.

Es wurde daher die TIR-Domäne des *Hydra magnipapillata* Toll-Verwandten-2 in *E. coli* heterolog exprimiert, das Protein gereinigt und kristallisiert. Es wurden zwei Kristallformen erhalten, wobei die beobachteten Strukturen mit einer mittleren Abweichung (*RMSD*) von 0,5 Å im Wesentlichen identisch aufgebaut sind. Die *Hydra* TIR-Domäne besitzt eine Flavodoxin-ähnliche Faltung. Dieses entspricht dem Aufbau eines klassischen Vertreters dieser Proteinfamilie (Pålsson-McDermott und O’Neill, 2007). Ein Vergleich der Sequenzen von TIR-Domänen Toll-verwandter und Toll-ähnlicher Rezeptoren mit Tieren verschiedener biologischer Ordnung zeigt geringe Sequenzidentität. In einer strukturbasierten Überlagerung mit bekannten TIR-Domänen humaner TLR sind jedoch große Teile der Proteine erstaunlich ähnlich. Doch selbst Bereiche mit geringerer struktureller Übereinstimmung besitzen ähnliche physikochemische Eigenschaften, wie beispielsweise deren intramolekulare Beweglichkeit. Insgesamt kann vermutet werden, dass die Toll-verwandten Rezeptoren aus *Hydra magnipapillata* und Toll-ähnlichen Rezeptoren anderer Organismen auf eine vergleichbare Art und Weise funktionieren.

Eine Besonderheit der Kristallformen der *Hydra* TRR-2 TIR-Domäne ist die Anordnung der TIR-Moleküle im Kristallgitter. In beiden stehen zwei TIR-Moleküle über eine identische Wechselwirkung in Kontakt. Hierbei bindet die BB-Schleife mit dem biologisch hochrelevanten PG-Motiv in eine hydrophobe Tasche eines benachbarten Moleküls. Normalerweise werden insbesondere die über reine translatorische Symmetrie erzeugten Proteinkontakte nur in Ausnahmefällen als biochemisch sinnvoll angesehen (Krissinel, 2010). Das wiederholte Auftreten eines bestimmten Kristallkontakts bei homologen Proteinen erhöht jedoch die Wahrscheinlichkeit einer biochemisch repräsentativen Protein–Protein-Interaktion (Shoemaker *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2008). Die eigentliche biochemische Funktion einer Domäne scheint zudem stärker konserviert, als

5.5. Zusammenfassung und Schlußfolgerung

die Position der Interaktionsfläche (Rekha *et al.*, 2005). Letztendlich bleibt die Frage nach dem strukturellen Aufbau einer physiologischen, d. h. in der Zelle tatsächlich auftretenden, TIR–TIR-Wechselwirkung offen.

Mit der in dieser Arbeit vorgestellten Kristallstrukturen der Toll/Interleukin-1-Rezeptor homologen Domäne des *Hydra magnipapillata* Toll-Rezeptor-Verwandten 2 wurden erstmalig Einblicke in die Funktionsweise des Toll-Rezeptor-Systems eines niederen Tieres gewährt. Jedoch müssen noch weitere Studien folgen, um detaillierte Einblicke in die molekulare Grundlagen der Signalweiterleitung im Modellorganismus *Hydra magnipapillata* zu gewinnen. Aufgrund der konservierten Ähnlichkeit der Mechanismen der Erkennung und Weiterleitung eines Gefahrensignals durch Toll-ähnliche Rezeptoren kann so ebenfalls unser Verständnis dieses Vorgangs im Menschen vertieft werden.

Teil IV.

Experimentelle Methoden

6. Allgemeine Methoden

6.1. Molekular- und mikrobiologische Methoden

6.1.1. Bakterienstämme

Die Vervielfältigung der DNS als auch die Expression der *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* ACD3 sowie der TIR-Domäne des *Hydra magnipapillata* Toll-verwandtem Rezeptor TRR-2 erfolgten im Bakterium *Escherichia coli*. Der in Tabelle 6.1 aufgeführte Stamm BL21(DE3) CodonPlus RIL benötigt zur Aufrechterhaltung seines CodonPlus-Genotyps die Zugabe von Chloramphenicol in das Nährmedium.

Tab. 6.1.: Benutzte *E. coli* Stämme.

Intrazelluläre Vervielfältigung von DNS		
Name	Genotyp	Herkunft
XL1 blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F <i>proAB lacI^qΔ M15 Tn10</i> (Tet ^r)]	Stratagene, La Jolla, CA, Vereinigte Staaten von Amerika
Expression der Zielproteine		
Name	Genotyp	Herkunft
BL21(DE3) CodonPlus RIL	B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal λ</i> (DE3) <i>endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW Cam^r</i>]	Promega, Madison, WI, Vereinigte Staaten von Amerika

6. Allgemeine Methoden

6.1.2. Nährmedien und Selektion

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in LB-Medium. Flüssigmedium wurde durch Zugabe der entsprechenden Menge Wassers zu LB-Pulver (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) erhalten. Medium für Festkulturen wurde durch Resuspendieren von LB-Agar (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in der benötigten Menge Wasser erhalten. Vor Gebrauch wurden die Medien autoklaviert.

<i>lysogeny broth</i> (LB)		<i>lysogeny broth-Agar</i> (LB-Agar)	
Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration
Trypton/Pepton	1 % (w/v)	Trypton/Pepton	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	1 % (w/v)	NaCl	1 % (w/v)
		Agar-Agar	1,5 % (w/v)

Jedem Medium wurde eine entsprechende Menge an Antibiotika zugegeben, um einen beständigen Selektionsdruck aufrechtzuerhalten.

Antibiotika

Substanz	Endkonzentration	Stock
Ampicillin	100 µg/ml	100 mg/ml in Wasser
Chloramphenicol	25,5 µg/ml	34 mg/ml in Ethanol

6.1.3. Kultivierung der Bakterien

Die Bakterien wurden, soweit nicht anders angegeben, bei 37 °C kultiviert. Submerskulturen wurden zusätzlich mit einer Schüttelfrequenz von mindestens 180 U/min (Erlenmeyerkolben ohne Schikane) bzw. 125 U/min (Erlenmeyerkolben mit Schikane) agitiert.

6.2. Analytische Methoden

6.2.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Trenngelpuffer

Substanz	Konzentration
Tris/HCl pH 8,8	1,5 M
SDS	0,4 % (w/v)

Sammelgelpuffer

Substanz	Konzentration
Tris/HCl pH 6,8	1,0 M
SDS	0,4 % (w/v)

Trenngel 12 % (je Gel 5 ml)

Substanz	Konzentration
Trenngelpuffer	25,0 % (v/v)
Acrylamidmix	40,0 % (v/v)
APS	0,1 % (w/v)
TEMED	0,01 % (v/v)

Trenngel 15 % (je Gel 5 ml)

Substanz	Konzentration
Trenngelpuffer	25,0 % (v/v)
Acrylamidmix	50,0 % (v/v)
APS	0,1 % (w/v)
TEMED	0,01 % (v/v)

Sammelgel 5 % (je Gel 1 ml)

Substanz	Konzentration
Sammelgelpuffer	12,5 % (v/v)
Acrylamidmix	17,0 % (v/v)
APS	0,1 % (w/v)
TEMED	0,01 % (v/v)

Um den Reinheitszustand der Proteinproben zu bestimmen, wurde eine diskontinuierliche, denaturierende Gelelektrophorese durchgeführt. Trenngele wurden je nach der Masse des erwarteten Proteins entweder 12 %ig (Trennbereich 12–60 kDa) oder 15 %ig (Trennbereich 10–43 kDa) hergestellt. Sammelgele waren jeweils 5 %ig. Das eingesetzte Mischverhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamidmix betrug 37,5:1 (Rotiphorese Gel 30, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland). Zum Einsatz kam ein Mini-Protean-Electrophoresis-System (BioRad, München, Deutschland).

20 µl der zu untersuchenden Probe wurden mit 5 µl Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Das der Lösung zugesetzte SDS denaturiert das Protein und versieht es mit einer gleichmäßigen negativen Ladung. Disulfidbrücken werden durch β-Mercaptoethanol aufgebrochen. Die Trennung im Gel erfolgt also ausschließlich nach

6. Allgemeine Methoden

der Größe der Proteine. Diese Prozedur wurde erstmals von (Laemmli, 1970) beschrieben. Die Proben wurden elektrophoretisch bei einer konstanten Spannung (200 V) getrennt. Zur Abschätzung der Größe wurden entweder der *Low Molecular Weight Marker* (GE Healthcare, Chalfont St Giles, Vereinigtes Königreich) oder der *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Anschließend wurde das Gel in Färbelösung versetzt mit Coomassie Brilliant Blue G250 oder Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbt. Zum Entfärben wurde das Gel in 10 %iger Essigsäure inkubiert.

Probenpuffer 5x

Substanz	Konzentration
Tris/HCl pH 6,8	250 mM
Glycerin	50 % (v/v)
β -Mercaptoethanol	200 mM
SDS	10 % (w/v)
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)

Laufpuffer

Substanz	Konzentration	Stock
Tris	25 mM	250 mM
Glycin	200 mM	2 M
SDS	0,1 % (w/v)	1 % (w/v)

Färbelösung

Substanz	Konzentration
Methanol	25 % (v/v)
Essigsäure	25 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue	0,1 % (w/v)

6.2.2. Bestimmung der Konzentration von DNS und Protein in Lösung

Die Konzentration von DNS und Protein in Lösung wurde photometrisch mit einem NanoDrop 1000 (ThermoScientific, Waltham, MA, Vereinigte Staaten von Amerika) bestimmt. Es erfolgte die Berechnung der DNS-Konzentration aus der Absorption bei der Wellenlänge $\lambda = 260$ nm. Angenommen wurde hierbei ein Absorptionskoeffizient für doppelsträngige DNS von $50 \text{ ng}\cdot\text{cm}/\mu\text{l}$. Korrespondierend dazu wurde die Konzentration einer Proteinlösung aus der Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm bestimmt. Der theoretische Extinktionskoeffizient ϵ eines Proteins wurde ausgehend von seiner Aminosäuresequenz mit dem Programm PROTPARAM (Gasteiger *et al.*, 2005) berechnet.

6.2.3. Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Sollte der dispersive Zustand einer Proteinlösung bestimmt werden, wurde dynamische Lichtstreuung (DLS) verwendet. Die Proben wurden in einem Zetasizer Nano S (Malvern, Worcestershire, Vereinigtes Königreich) bei einer Temperatur von 18 °C gehalten und mindestens 20 Messungen durchgeführt. Diese wurden anschließend gemittelt und bezüglich Modalität und Dispersität der untersuchten Lösung analysiert. Dies geschah mit dem Gerät zugehörigen Programm Dispersion Technology Software (DTS, Version 5.10).

6.3. Kristallisation und röntgenographische Experimente

6.3.1. Kristallisation

Zur Kristallisation von Proteinen wird versucht, die Löslichkeit des Proteins über ein gezieltes Verändern des Milieus herabzusetzen und so dessen Aggregation einzuleiten. Es wird deutlich, dass dieser Vorgang hauptsächlich nicht zu Kristallen führen wird, eine Form der Proteinaggregation, die durch eine hohe Ordnung der aggregierenden Moleküle ausgezeichnet ist. Es wird daher hauptsächlich Aggregation in Form von amorphen Niederschlag beobachtet, bei dem sich die Proteinmoleküle ungeordnet aneinanderlagern. Letztere Form ist für die Nutzung in der Strukturaufklärung nicht geeignet.

Um ein in Lösung befindliches Protein auszukristallisieren, wird überwiegend die Methode der Dampfdiffusion angewendet (Davies und Segal, 1997; Weber, 1997). Für die Ermittlung der initialen Kristallisationsbedingung wurde das Verfahren des sitzenden Tropfens verwendet. Für weitere Kristallisationsexperimente wurde das Verfahren des hängenden Tropfens genutzt.

Die Verfeinerung der Kristallisationsbedingung wurde mit 24-Well-Linbro-Platten (MP Biomedicals, Inc., Solon, Vereinigte Staaten von Amerika) durchgeführt. Der Rand der Aussparung wurde mit Silikonfett versehen und in die Aussparung eine Reservoirlö-

6. Allgemeine Methoden

sung vorgelegt. Der Kristallisationstropfen wurde auf ein Deckgläschen (22 mm, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) pipettiert. So wurde die Proteinelösung, der falls nötig alle nötigen Cofaktoren zugesetzt wurde, auf das Gläschen gegeben. In diese Lösung wurde daraufhin ein bestimmtes Volumen Reservoir pipettiert und das Reservoir mit dem Deckglas verschlossen. Das entstandene geschlossene System ist jedoch nicht im Dampfgleichgewicht und dementsprechend wird aus dem Kristallisationstropfen kontinuierlich Wasser an die Umgebung abgegeben. Dies führt zur Erhöhung der Konzentration von Protein und Fällungsmittel im Tropfen, was zur Kristallisation des Proteins führen kann.

6.3.2. Gefrieren von Kristallen

Im Normalfall können Kristalle nicht direkt aus dem Kristallisationstropfen in flüssigem Stickstoff überführt werden ohne das Gitter des Proteinkristalls durch Bildung von kristallinem Wasser zu beschädigen. Des Weiteren stören die durch die Eiskristalle gestreuten Röntgenstrahlen bei der Datensammlung von Proteinkristallen, da diese eine stärkere Intensität aufweisen und so Bereiche des Diffraktionsbildes überdecken. Es wurden daher die Kristalle vor dem Frieren in Gefrierschutzlösung getränkt. Dadurch sollte das Wasser beim schnelle Abkühlen des Kristalls in flüssigem Stickstoff amorph erstarren. Diese Form des Wassers resultiert in einem diffusen Beitrag zum Diffraktionsbild, der bei der Integration und Skalierung der Daten gut herausgerechnet werden kann.

6.3.3. Diffraktionsexperimente

Verschiedene Röntgenquellen wurden zur Durchführung von Diffraktionsexperimenten herangezogen. Aufgrund der Größe der Kristalle eignete sich die Heimanlage nur bedingt für die Aufnahme von hochaufgelösten Beugungsbildern. Es wurde daher verstärkt auf durch Synchrotrons generiertes Röntgenlicht zurückgegriffen, das sich im Vergleich durch eine um Größenordnungen höhere Brillianz auszeichnet. Diese Brillianz wird auch durch das Fokussieren des Röntgenstrahls erreicht. Der Durchmesser des Strahls war kleiner als die Größe des Kristalls und ermöglichte somit das Untersuchen

einzelner Teile des Kristalls ohne den kompletten Kristall zu durchleuchten. Bereiche höherer diffraktiver Qualität konnten so gezielt gefunden und für Diffraktionsexperimente herangezogen werden. Die Kristalle wurden bei der kompletten Datenmessung im Stickstoffstrom bei 100 K gehalten und danach zurück in flüssigen Stickstoff überführt.

6.3.4. Integration und Skalierung der Daten

Die Reduktion und Skalierung der gemessenen Daten erfolgte mit dem Programmen XDS und XSCALE (Kabsch, 2010). Reflexe wurden mit dem Programm AIMLESS gemittelt (Evans, 2006; Evans, 2011; Evans und Murshudov, 2013). Sollten anomale Daten prozessiert werden, wurden die Bijvoet-Paare getrennt behandelt. 5 % aller Reflexe eines Datensatzes wurden für den freien R-Faktor reserviert (Brünger, 1992; Brünger, 1997). Dieser wurde bei Datensätzen einer Kristallform identisch gehalten.

6.4. Strukturlösung und Verfeinerung

6.4.1. Molekularer Ersatz – Suchmodell

Der Erfolg des Molekularen Ersatzes hängt maßgeblich von der Übereinstimmung zwischen dem Suchmodell und der zu bestimmenden Struktur ab. Daher wurden ausschließlich Modelle verwendet, die die höchsten Sequenzidentitäten zur Zielsequenz aufwiesen. Da jedoch auch geringe Unterschiede in der Sequenz zu strukturellen Unterschieden führen können, wurde versucht, diesen auf unterschiedlichen Wegen zu begegnen. Eine Art der Anpassung erfolgte durch das Programm SCWRL (Krivov *et al.*, 2009). Das für das Programm notwendige Sequenzalignment wurde mit FFAS (Jaroszewski *et al.*, 2000; Rychlewski *et al.*, 2000; Jaroszewski *et al.*, 2005; Jaroszewski *et al.*, 2011) erstellt. SCWRL (Krivov *et al.*, 2009) nutzt eine Bibliothek verschiedener Rotamere für die auszutauschenden Aminosäuren und kombiniert dies mit einer Minimierungsfunktion, die die Orientierung der Seitenketten, die van-der-Waals-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen in Betracht zieht. Des Weiteren

6. Allgemeine Methoden

wurde das Programm SwissModel (Peitsch, 1995; Arnold *et al.*, 2006; Kiefer *et al.*, 2009) eingesetzt. Es wurde der automatische Modus der Pipeline verwendet. Diese führt ausgehend von der vorgegebenen Sequenz eine vollautomatische Suche nach geeigneten Templatmodellen in der Proteindatenbank PDB (Berman *et al.*, 2000) durch. Der Modellbau erfolgt durch Zusammenfügen starrer Fragmente, wobei über heuristische Methoden versucht wird, Unterschiede, wie Deletionen sowie Insertionen, in die Zielstruktur einzupassen. Das ausgegebene Modell wird hinsichtlich seiner Validität überprüft und unsichere Bereiche gekennzeichnet. Diese Bereiche wurden vor Verwendung als Suchmodell entfernt.

6.4.2. Molekularer Ersatz – Positionierung

Die Positionierung der Suchmodelle in der Einheitszelle wurde mit den Programmen MOLREP (Vagin und Teplyakov, 1997) bzw. PHASER (McCoy *et al.*, 2007) durchgeführt. Bei letzterem wurde entweder die Version aus dem Programmpaket CCP4 (Versionen 2.0.6 bzw. 2.2.0 (CCP4, 1994; Winn *et al.*, 2011)) oder PHENIX (Versionen 1.8.2-1309 (Adams *et al.*, 2010)) verwendet. Anschließend wurde das erhaltene Modell mit REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997; Murshudov *et al.*, 2011) verfeinert, wobei zuerst eine Starre-Körper-Verfeinerung, danach eine Beschränkte Verfeinerung durchgeführt wurde. Die nicht-kristallographische Symmetrie unter den Untereinheiten wurde mit PHENIX.FIND_NCS (Phenix Package (Adams *et al.*, 2010)) bestimmt. Sollten die ermittelten Symmetrioperationen angewendet werden, kam PHENIX.APPLY_NCS (Phenix Package (Adams *et al.*, 2010)) zum Einsatz. Der automatische Modellbau erfolgte mit PHENIX.AUTOBUILD (Terwilliger, 2004a; Terwilliger, 2004b; Zwart *et al.*, 2005; Terwilliger *et al.*, 2008; Afonine *et al.*, 2012), wobei entweder der Modus *Rebuild-in-place* zum Einsatz kam oder das Modell mit Hilfe von BUCCANEER (Cowtan, 2006; Cowtan, 2008) und RESOLVE (Terwilliger, 2004a) gebaut wurde.

6.4.3. Verfeinerung des Modells

Eine manuelle Anpassung des Modells an die $(2F_O - F_C, \alpha_C)$ - und $(F_O - F_C, \alpha_C)$ -Karten erfolgte mit dem Programm COOT (Emsley und Cowtan, 2004; Emsley *et al.*, 2010).

Jeder Rest wurde auf seine Stimmigkeit überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Bewegliche Seitenketten wurden bei Bedarf entfernt, wenn keine Dichte zu erkennen war. Alle Substrate bzw. modifizierte Aminosäuren wurden in COOT (Emsley und Cowtan, 2004; Emsley *et al.*, 2010) eingefügt. Wassermoleküle wurden im letzten Schritt in das Modell integriert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Abstände zu Protonendonoren bzw. -akzeptoren sinnvoll waren. Die überarbeiteten Modelle wurden mit den Programmen REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997; Murshudov *et al.*, 2011) oder PHENIX.REFINE (Afonine *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 2007; Urzhumtseva *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010; Afonine *et al.*, 2012) verfeinert. Letzteres wurde eingesetzt um *simulated annealing*-Verfeinerung oder Verfeinerungen der Torsionswinkel der Aminosäureseitenketten durchzuführen. Die Cofaktoren wurden entweder zuvor gelöscht (früherer Status des Modellbaus) und anschließend in die Dichte eingepasst oder in der Struktur beibehalten (späterer Status des Modellbaus). Es sollte so verhindert werden, dass die Elektronendichte im Bereich der Liganden aufgrund von *model bias* überinterpretiert wurde (Pozharski *et al.*, 2013). Wenn es notwendig war, wurde das Modell nochmals mit PHENIX.AUTOBUILD (Terwilliger, 2004a; Terwilliger, 2004b; Zwart *et al.*, 2005; Terwilliger *et al.*, 2008; Afonine *et al.*, 2012) gebaut. Anomale Dichtekarten wurden mit dem Programm FFT (CCP4-Paket, (Immirzi, 1966; Ten Eyck, 1973; Read und Schierbeek, 1988)) aus den experimentell erhaltenen anomalen Differenzen und den berechneten Phasen aus den Koordinaten einer Struktur erstellt. Um den Einfluss des Ausgangsmodells des molekularen Ersatzes auf die resultierenden Phasen (*model bias*) zu minimieren, wurden Strukturen mit Schweratomen nochmals mit PHENIX.AUTOSOL (Zwart *et al.*, 2005; McCoy *et al.*, 2007; Terwilliger *et al.*, 2009; Adams *et al.*, 2010) nach dem MRSAD-Protokoll gelöst und das Modell mit den so erhaltenen Phasen neu gebaut. Die für die Verfeinerung von Proteinstrukturen im Komplex mit Liganden notwendigen *restraints* wurden mit dem Webserver GRADE erstellt (Smart *et al.*, 2011).

6.4.4. Überprüfen der Cofaktoren

Um zu verhindern, dass Elektronendichte, im Besonderen im Bereich der Substrate, überinterpretiert wurde, folgte als letzter Schritt eine Verfeinerung ohne Liganden. Es wurde daher *simulated annealing omit*-Elektronendichtekarte erstellt. Dieses geschah mit PHENIX-Suite (Adams *et al.*, 2010). Die erhaltenen Elektronendichtekarten wurden zur Validierung des Modells kritisch betrachtet.

6.5. Bioinformatische Werkzeuge

6.5.1. Finden von Sequenzen

Bei der Suche nach homologen Proteinsequenzen wurde entweder das Programm BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1990) oder die UniProt-Datenbank (The UniProt Consortium, 2015) verwendet. Ausnahmen werden im Text spezifisch erwähnt.

6.5.2. Sequenz- und Strukturabgleich

Zum Abgleichen von Proteinsequenzen wurde PRALINE (Heringa, 1999; Heringa, 2000; Heringa, 2002; Simossis und Heringa, 2003; Simossis *et al.*, 2005; Simossis und Heringa, 2005) verwendet. In seltenen Fällen waren geringe manuelle Anpassungen nötig. Zur graphischen Darstellung der Überlagerung von Proteinsequenzen und Sekundärstrukturen bzw. der Zugänglichkeit einzelner Reste zum Solvens wurde ESPript (Gouet *et al.*, 1999; Gouet *et al.*, 2003) angewendet. Ein Abgleich der in dieser Arbeit charakterisierten Proteinstrukturen mit bereits veröffentlichten Strukturen in der PDB geschah mit DaliLite v. 3 (Holm und Rosenstrom, 2010).

6.5.3. Zuweisen von Sekundärstrukturelementen

Zur einheitlichen Zuordnung von Sekundärstrukturelementen wurde das Programm DSSP verwendet (Kabsch und Sander, 1983; Joosten *et al.*, 2011).

6.5.4. Erzeugung von Molekülgrafiken

Die in dieser Arbeit gezeigten Molekülgrafiken wurden mit dem PyMOL Molecular Graphics System (Version 1.6.0.0, Schrödinger LLC, Vereinigte Staaten von Amerika)

6.5. *Bioinformatische Werkzeuge*

erzeugt. Einige der Annotationen der Bilder wurden mit gängiger Bildbearbeitungssoftware eingefügt.

7. Expression, Reinigung, Kristallisation und Strukturlösung der *ckcACD1*

7.1. Plasmide

Die in Tabelle 7.1 aufgezählten Plasmide ermöglichten die Expression der Untereinheiten der *Ca. Korarchaeum cryptofilum* ACD1. Die Selektion der Plasmide erfolgte jeweils über Zugabe von Ampicillin.

Tab. 7.1.: In dieser Arbeit verwendeten Plasmide zur Expression der *ckcACD1*.

Name	Beschreibung	Herkunft
pET17b_ <i>ckcACD1</i> _alpha	IPTG induzierbare Expression der <i>ckcACD1</i> α -Domäne (Gen <i>Kcr_0198</i>), Amp ^R	erhalten von Marcel Schmidt (AG Schönheit, Universität Kiel)
pet17b_ <i>ckcACD1</i> _beta	IPTG induzierbare Expression der <i>ckcACD1</i> β -Domäne (Gen <i>Kcr_0115</i>), Amp ^R	erhalten von Marcel Schmidt (AG Schönheit, Universität Kiel)

7.2. Expression von *ckcACD1*

7.2.1. Expression von nativem Protein

Zellen einer Glycerinkultur wurden auf LB-Agar ausplattiert und über Nacht kultiviert. Eine einzelne Kolonie wurde in ein kleines Volumen LB-Medium transferiert und für mindestens 12 Stunden kultiviert. Zum Starten der Expression wurden 1% (v/v)

7. Expression, Reinigung, Kristallisation und Strukturlösung der *ckcACD1*

der Übernachtskultur für 5 Minuten bei 4 000 g pellettiert, in frischem LB-Medium resuspendiert und damit das Expressionsmedium angeimpft. Induktion der Expression erfolgte bei einer optischen Dichte OD_{600} bei der Wellenlänge $\lambda = 600$ nm zwischen 0,4 und 0,8 mit IPTG einer finalen Konzentration von 0,4 mM. Die Zellen wurden für weitere fünf Stunden kultiviert und dann geerntet. Dies erfolgte durch Zentrifugation bei 6 000 g für 10 Minuten. Zellpellets wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

7.2.2. Expression von Se-Methionin markiertem Protein

Sollte Se-Methionin markiertes Protein hergestellt werden, wurde ein modifiziertes Protokoll angewandt. Eine Vorkultur wurde wie oben beschrieben kultiviert und die Zellen vor dem Überimpfen pelletiert. In den darauffolgenden Schritten wurde LeMaster-Medium verwendet. Dies bestand aus SelenoMethionine Medium Base (Molecular Dimensions, Newmarket, Vereinigtes Königreich) versetzt mit SelenoMethionine Medium Nutrient Mix (Molecular Dimensions, Newmarket, Vereinigtes Königreich) nach Herstellerprotokoll (nachfolgend als Minimalmedium bezeichnet). Dem Medium wurden entweder Methionin oder Selenomethionin zu einer Endkonzentration von 50 mM bzw. 25 mM zugegeben. Die Kultivierung der Hauptkultur in Minimalmedium versetzt mit Methionin erfolgte bis zu einer optischen Dichte OD_{600} von 0,4. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen bei 6 000 g pelletiert und anschließend in einem gleichen Volumen vorgewärmten Minimalmedium mit Selenomethionin resuspendiert. Nach 20 minütiger Kultivierung erfolgte die Induktion mit IPTG zu einer Endkonzentration von 0,4 mM. Die Expression wurde für 3 Stunden fortgeführt und die Zellen anschließend geerntet. Dies erfolgte durch 10 minütige Zentrifugation bei 6 000 g. Das Pellett wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

7.2.3. Dialyse

Die Probe wurde in einem Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgrenze (*molecular weight cut-off*) von 12 kDa gegen das 10fache Volumen an Puffer dialysiert. Nach einer Stunde wurde der Puffer ausgetauscht und anschließend für weitere 12 h inkubiert.

7.3. Lyse und Reinigung der *ckcACD1*

Alle folgenden Schritte wurden, wenn möglich, gekühlt durchgeführt, um eine Degradation des Zielproteins durch Proteolyse zu verhindern.

ACD-Puffer		Reaktionspuffer (100x)	
Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration
Tris/HCl pH 7,5	100 mM	Tris/HCl pH 7,5	100 mM
NaCl	150 mM	NaCl	150 mM
MgCl ₂	5 mM	MgCl ₂	5 mM
Der Puffer wurde vor Nutzung durch einen 0,2 µm Filter filtriert und entgast.		ATP	200 mM

7.3.1. Lyse

Das Zellpellet wurde gewogen und in ACD-Puffer resuspendiert. Hierzu wurden für ein Gramm der Zellpaste acht Milliliter Puffer verwendet. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch mindestens 8 Runden des Sonifizierens mit einem SONOPULS HD 2200 (Bandelin, Berlin, Deutschland) ausgestattet mit einem Titanteller TT 13 (Power 75 %, Cycle 0,6). Hierbei wurde das Probengefäß mit Eiswasser gekühlt, um einen stetigen Wärmeaustausch zu gewährleisten. Intakte Zellen, Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile wurden anschließend durch Zentrifugation bei 75 600 g für 30 min abgetrennt.

Das Reinigungsprotokoll wurde von Marcel Schmidt (AG Prof. Schönheit, Universität Kiel) übernommen.

7.3.2. Hitzefällung

Der erste Reinigungsschritt nutzt eine inherente Eigenschaft von Proteinen thermophiler Organismen aus. Diese Lebewesen haben sich an ihre Umgebung so angepasst, dass ihre Zellbestandteile bei hohen Temperaturen stabil arbeiten. Endogene Proteine aus

7. Expression, Reinigung, Kristallisation und Strukturlösung der *ckcACD1*

E. coli zeigen keine Thermostabilität über einen längeren Zeitraum. Das geklärte Lysat wurde daher bei 68 °C für 20 Minuten inkubiert. Während dieser Zeit denaturierten nahezu alle anderen Proteine und präzipitierten. Die Zielproteine dahingegen blieben in Lösung. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 75 600 g für 30 min entfernt.

7.3.3. Rekonstitution des aktiven Enzyms

ckcACD1 bildet ein Heterotetramer bestehend aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten. Beide Untereinheiten wurden separat exprimiert und mussten zum aktiven Enzym rekonstituiert werden. Zur Abschätzung der Proteinmenge in den hitzegeklärten Lösungen wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt und über eine SDS-Gelelektrophorese analysiert. Die mit Coomassie Brilliant Blau gefärbten Banden wurden visuell ausgewertet. Die Rekonstitution erfolgte über simples Vermischen der angemessenen Menge beider Proteinlösungen. Es wurde angenommen, dass die α -Domäne analog zur homologen *P. furiosus* ACD-1 (Musfeldt *et al.*, 1999) in Lösung als Dimer vorliegt. Dies könnte die Reinigung des rekonstituierten Proteins über Gelfiltration erschweren, da die Größenunterschiede zu gering für eine effiziente Trennung sind. Es wurde daher darauf geachtet, dass eine größere Menge an β -Domäne zugesetzt wurde um eine vollständige Rekonstitution zu gewährleisten. Der Masseunterschied zwischen dem aktiven Enzym *ckcACD1* und der monomeren β -Domäne ist ausreichend für eine Reinigung mittels Gelfiltration.

7.3.4. Gelfiltration I

Der *ckcACD1*-Komplex wurde konzentriert und auf eine in ACD-Puffer voräquilibrierte Gelfiltrationssäule HiLoad 16/60 Superdex S200 pg (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) aufgetragen. Die eluierten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und gemäß dem Proteingehalt vereint. Außergewöhnlich war eine hohe Hintergrundabsorption, die eine Aufnahme analysierbarer Spektren zwischen 215–280 nm verhinderte. Das Problem stammte von DNS-Fragmenten, die durch die Sonifizierung freigesetzt wurden. Zusatz einer katalytischen Menge DNase I verringerte zwar die Anzahl der hochmolekularen DNS-Fragmente, konnte das Problem jedoch nicht komplett lösen.

Um diese Verunreinigungen mit Nukleotiden zu beseitigen, wurde der Gelfiltrationsschritt wiederholt, bis das Chromatogramm einen klaren Proteinpeak enthielt.

7.3.5. Hitzereinigung

Eine zweite Hitzefällung wurde durchgeführt. Hierbei wurden die vereinigten Fraktionen bei 78 °C für 15 min inkubiert. Entstandenes Präzipitat wurde durch Zentrifugation mit einer Beschleunigung von 75 600 g für 30 Minuten entfernt. Dieser Schritt war gedacht, um das Protein auf einen einheitlichen Zustand „zurückzusetzen“. Da die erste Hitzefällung im Zellrohextrakt stattfand, könnten theoretisch eine Vielzahl an potentiellen Substraten anwesend sein, die durch die ACD umsetzbar sind. Das Enzym ist aber nur bei erhöhten Temperaturen aktiv und könnte daher beim Abkühlen in verschiedenen konformationellen Zuständen gefangen bleiben. Analytisch kann zwischen diesen Zuständen nur sehr schwer unterschieden werden, aber diese Art der Heterogenität könnte eine erfolgreiche Kristallisation verhindern.

7.3.6. Gelfiltration II

Die Proteinlösung wurde auf eine mit ACD-Puffer äquilibrierte Gelfiltrationssäule Hi-Load 16/60 Superdex S200 pg (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) geladen. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und entsprechend dem Gehalt an Protein und dessen Reinheit vereint. Hierbei wurden nur die reinsten Fraktionen verwendet.

7.3.7. Vorbereitung zur Kristallisation

Das vereinigte Protein wurde in zwei Fraktionen aufgeteilt. Einer Fraktion wurde Reaktionspuffer zur einfachen Konzentration zugesetzt. Beide Chargen wurden bei 55 °C für 30 Minuten inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit einem gleichen Volumen ACD-Puffer versetzt und über ein Amicon Ultrazentrifugationsröhrchen konzentriert

7. Expression, Reinigung, Kristallisation und Strukturlösung der *ckcACD1*

(MWCO 30 kDa, 1 min, 3 000 rpm). Dieser Schritt wurde mindestens zehnmal wiederholt, bis freies Nukleotid aus der Lösung entfernt war.

7.4. Kristallisation der *ckcACD1*

Kristallisationsexperimente wurden bei 18 °C und 4 °C durchgeführt. Der Aufbau des Experiments sah vor, dass in den Proteintropfen ein bestimmtes Volumen Fällungsmittel, zumeist im Verhältnis Protein:Fällungsmittel 1:1 oder 1:0,75, gegeben wurde. Runde Tropfen führten normalerweise zu einer Vielzahl an kleinen Kristallen, die nur durch eine veränderte Tropfenform bezüglich ihrer Größe optimiert werden konnten. Hier wurde die Proteinlösung in einer länglichen Form vorgelegt und das Fällungsmittel in ein Ende des Tropfens gegeben. Bei niedriger Temperatur wurden jedoch beide Tropfenformen verwendet, wobei je nach Substrat bzw. Modifikation des Proteins entweder in runden und/oder keulenförmigen Tropfen Kristalle mit nutzbarer Größe und Aussehen entstanden. Die Konzentration der Proteinlösung war in allen Fällen etwa 85 µM.

Kristallisation Se-Methionin modifiziertem Proteins Um die Oxidation des Selen zu verhindern, wurde der Kristallisationslösung zusätzlich 20 mM DTT zugesetzt.

Derivatisierung von Proteinkristallen der *ckcACD1* Es wurden verschiedene Versuche zur Derivatisierung des Proteins mit Schweratomen gemacht. Hierzu kamen die in Dauter *et al.* (2000) publizierten Vorschriften zum Schnelltränken von Kristallen mit Halogenidionen zum Einsatz (Dauter *et al.*, 2000). Verwendet wurde jeweils ein 1 molarer Zusatz an NaBr oder NaI zur Gefrierschutzlösung. Die Inkubationsdauer der Kristalle in dieser Lösung betrug etwa 30 sec. Weiterhin wurden Kristalle mit verschiedenen Schwermetallen getränkt (Sun *et al.*, 2002). Kristalle wurden aus ihrer Mutterlauge (Konzentration 100 %) in einer Lösung mit 80 % der Stammkonzentration und Zusatz von 10 mM einiger Schwermetallverbindungen (SmCl₃, YbCl₃, YbCl₂, Thio-mersal (Natrium-2-(ethylmercurithio)-benzoat) oder Na[Au(CN)₂]) überführt und für

5 Minuten inkubiert. Nicht gebundene Schwermetallionen wurden durch 30 sekundige Inkubation in Gefrierschutzlösung entfernt.

Co-Kristallisation mit Quecksilber Die Derivatisierung der *ckcACD1* mit Quecksilber erfolgte mit HgCl_2 , das zu einer Endkonzentration von 2 mM zum Kristallisationstropfen gegeben wurde.

Derivatisierung mit Aluminiumfluorid, Phosphat und Nitrat Das Protein wurde vorab der Kristallisationsexperimente gegen das 100fache Volumen an 100 mM Tris/HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl dialysiert. Die finale Konzentration an Mg^{2+} -Ionen beträgt demnach 0,5 mM (Magnesium-reduzierte Reaktionslösung). Dies geschah bei einer mittleren Temperatur von 75 °C für 1 Stunde. Aufgrund einer defekten Steuerung des verwendeten Heizblocks wurde zweimalig eine Temperatur von etwa 85 °C erreicht. Entstandenes Präzipitat wurde durch Zentrifugation entfernt. Es wurden anschließend die in Tabelle 7.2 dargestellten Experimente durchgeführt. Dazu wurden die benötigten Chemikalien, außer ADP und Ac-CoA, in wässriger Lösung in einem Gefäß vorgelegt, getrocknet und anschließend in einer Lösung von ADP- bzw. Ac-CoA gelöst. Die Proben wurden vor der Kristallisation geteilt. Ein Teil wurde für eine Minute bei 75 °C inkubiert, der andere wurde weiterhin auf Eis gelagert. Alle Kristallisationsexperimente wurden bei 4 °C durchgeführt. Für Kristallstrukturen mit gebundenem Phosphat wurden Kristalle aus den Ansätzen mit Ac-CoA+ Na_2HPO_4 und ADP+ $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ verwendet. Diese wurden für 30 Sekunden in Gefrierschutzlösung inkubiert, die zusätzlich 50 mM Na_2HPO_4 enthielten.

7.5. Diffraktionsexperimente

Die Parameter der Datensammlung sind zusammenfassend in Tabelle 7.3 dargestellt.

7. Expression, Reinigung, Kristallisation und Strukturlösung der *ckcACD1*

Tab. 7.2.: Kristallisationsexperimente zur Derivatisierung der *ckcACD1*. Folgende Versuche wurden zur Derivatisierung der *ckcACD1* mit Mg · ADP · AlF₃, Acetyl-Coenzym A, Phosphat und Nitrat durchgeführt. Zum Protein wurden die folgenden Chemikalien zur angegebenen Endkonzentration zugefügt.

Apo		Mg · ADP · AlF ₃	
Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration
MgCl ₂	6,3 mM	ADP	2,0 mM
		AlCl ₃	2,5 mM
		MgCl ₂	2,5 mM
		NaF	8,6 mM
ADP + Mg(NO ₃) ₂		Ac-CoA · AlF ₃	
Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration
ADP	2,0 mM	Ac-CoA	1,0 mM
Mg(NO ₃) ₂	5,0 mM	AlCl ₃	5,0 mM
		NaF	17,0 mM
		NaOAc	5,0 mM
Ac-CoA + Na ₂ HPO ₄		Ac-CoA + Mg(NO ₃) ₂	
Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration
Ac-CoA	1,0 mM	Ac-CoA	1 mM
Na ₂ HPO ₄	10,0 mM	Mg(NO ₃) ₂	9,9 mM
NaOAc	5,0 mM	NaOAc	5,0 mM

7.5.1. Beschreibung der Bewegung von Domänen

Zur Beschreibung der relativen Bewegung einer Domäne oder eines Teils einer Domäne in den erhaltenen Kristallstrukturen wurden die zu vergleichenden Abschnitte mit dem Programm LSQKAB (Kabsch, 1976; CCP4, 1994) folgendermaßen überlagert. Hierzu wurden in zwei Schritten jeweils ein als fix gewählter Abschnitt und ein, als beweglich definierter Bereich eines Proteins, mit einer Referenzstruktur verglichen. Durch die strukturelle Überlagerung der im letzten Schritt erhaltenen Anordnung der Proteine wurde der Rotationswinkel der untersuchten Bewegung aus der so erhaltenen Rotationsmatrix berechnet.

Tab. 7.3.: Parameter der Datenmessung.

Datensatz	<i>ckcACD1-A</i>	<i>ckcACD1-B</i>	<i>ckcACD1-C</i>	<i>ckcACD1-D</i>	<i>ckcACD1-E-1</i>
Synchrotron	PETRA III	PETRA III	BESSY II	BESSY II	PETRA III
Beamline	P14	P14	BL14.1	BL14.1	P14
Detektor	PILATUS 6M				
Wellenlänge [Å]	1,24	1,24	0,98	0,98	0,98
Detektorabstand [mm]	229	291	390	461	387
Rotation pro Bild [°]	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Zahl der Bilder	1800	1800	3600	1800	2350

Tab. 7.3.: Parameter der Datenmessung. (Fortsetzung)

Datensatz	<i>ckcACD1-E-2</i>	<i>ckcACD1-F</i>	<i>ckcACD1-G</i>	<i>ckcACD1-H</i>	<i>ckcACD1-I</i>
Synchrotron	BESSY II	BESSY II	PETRA III	PETRA III	PETRA III
Beamline	BL14.1	BL14.1	P14	P14	P14
Detektor	PILATUS 6M	PILATUS 6M	PILATUS 6M	PILATUS 6M	PILATUS 6M
Wellenlänge [Å]	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
Detektorabstand [mm]	480	291	383	388	384
Rotation pro Bild [°]	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Zahl der Bilder	950	2150	3600	1800	1800

8. Expression, Reinigung, Kristallisation und Strukturlösung der *hy*TRR2 TIR-Domäne

8.1. Plasmide

Tab. 8.1.: Plasmide zur Expression der *hy*TRR2 TIR-Domäne.

Name	Beschreibung	Herkunft
pGEMT_ <i>hy</i> TRR2_TIR	Amp ^R	erhalten von René Augustin (AG Bosch)
pET19b	Amp ^R	Novagen
pET19b_ <i>hy</i> TRR2 ₉₅₋₂₂₁	IPTG induzierbare Expression der TIR-Domäne der <i>hy</i> TRR2, C-terminale His ₆ -Affinitätssequenz, Amp ^R	diese Arbeit

8.2. Herstellen des Expressionskonstruktes

Die DNS der TIR-Domäne des Toll-verwandten Rezeptors 2 aus *Hydra magnipapillata* wurde über eine Polymerasekettenreaktion vervielfältigt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 8.2 aufgeführt. Über die durch die Oligonukleotide eingebrachten Schnittstellen für zwei Endonukleasen (NcoI und XhoI) wurde die Zielsequenz in das Plasmid pET19b insertiert. Mit dem Oligonukleotid TIR reverse wurde C-terminal ei-

8. Expression, Reinigung, Kristallisation und Strukturlösung der *hyTRR2* TIR-Domäne

ne Hexahistidin-Affinitätssequenz (kodiert durch **catcaccatcaccatcac**) an das Protein angefügt.

Tab. 8.2.: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz
TIR forward	gtgaagccatgggcaagacttatgatgtcaatatatggttacg
TIR reverse	cgagtctcgagattagtgatggtgatggtgatgattatttcgaatatctc

Fett gedruckt sind die eingeführten Schnittstellen für NcoI bzw. XhoI.
Kursiv dargestellt sind die Nukleobasen des His₆-Affinitätssequenz.

8.2.1. Ethanolfällung

Die Probe wurde mit 1/10 des Probenvolumens an 3 M NaOAc (pH 5,4) versetzt. Die Fällung von DNS erfolgte nach Zugabe des 2,75fachen an unvergälltem Ethanol. Zur Beschleunigung dieses Vorgangs wurde die Probe in flüssigem Stickstoff gefroren. Nach Zentrifugieren für 10 min bei 20 716 g und 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde nochmals für fünf Minuten zentrifugiert. Das getrocknete DNS-Pellet wurde in Wasser gelöst.

8.2.2. Polymerasekettenreaktion - PCR

Oligonukleotide wurden mit einer finalen Konzentration 17 µM, dNTPs zur finalen Konzentration 200 µM eingesetzt. Pfu-Polymerase und der Reaktionspuffer (inklusive MgSO₄) stammten von Promega (Madison, WI, Vereinigte Staaten von Amerika). Die DNS der *hyTRR2* TIR-Domäne wurde *in vitro* mit folgendem Zeit-Temperatur-Profil amplifiziert. Das entstandene Produkt wurde über eine Ethanolfällung gereinigt und konzentriert.

8.2. Herstellen des Expressionskonstruktes

Wiederholungen	Temperatur (° C)	Zeit (sec)
1	95	300
	95	30
30	49	30
	72	45
1	72	600
1	4	∞

8.2.3. Restriktionsverdau

Das Zielplasmid pET19b und das PCR-Produkt wurden mit NcoI und XhoI verdaut. Beide Enzyme stammten von Promega (Madison, WI, USA). Die Reaktion wurde in Puffer D durchgeführt und gemäß den Empfehlungen des Herstellers angesetzt. Reaktionsdauer war drei Stunden. Anschließend wurde die Reaktion durch 15 minütige Inkubation bei 65 °C gestoppt und die Reaktionsprodukte über Ethanolfällung gereinigt.

8.2.4. Ligation

Zur Fusion des geschnittenen Vektors pET19b und des Inserts wurden 200 ng pET19b in einem molarem Verhältnis von 1:3 mit Insert versetzt. Die Reaktion wurde in T4 Ligase-Puffer mit T4 Ligase von Promega (Madison, WI, Vereinigte Staaten von Amerika) durchgeführt, wobei die vom Hersteller empfohlene Mengen an Puffer und Enzym verdoppelt wurden. Ligiert wurde bei 18 °C für 12 Stunden, danach erfolgte eine Fällung der DNS mittels Ethanolpräzipitation. Aufgenommen wurde das Produkt in 10 µl Wasser.

8.2.5. Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli*

Kompetente Zellen des *E. coli*-Stammes XL1 blue wurden zur Verwendung bei der Elektroporation durch wiederholtes Resuspendieren der Bakterien in 100 mM CaCl₂-

8. Expression, Reinigung, Kristallisation und Strukturlösung der *hyTRR2* TIR-Domäne

Lösung hergestellt. Zur Lagerung der *E. coli* wurde zusätzlich 15 % (v/v) Glycerin zugegeben und Aliquots zu je 100 μ l in flüssigem Stickstoff gefroren.

Ein Aliquot mit Zellen elektrokompenter *E. coli* XL1 blue wurde mit dem Ligationprodukt versetzt und in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (Spalt 1 mm) überführt. Durch Anlegen eines elektrischen Pulses über einen GenePulser II (BioRad, Berkeley, CA, Vereinigte Staaten von Amerika) (Spannung $U = 1800$ V, Widerstand $R = 200 \Omega$, Kapazität $C = 25 \mu\text{F}$) wurde der Vektor in die Bakterien transformiert. Nach anschließender Kultivierung der Zellen für 30 min wurden diese auf LB-Agar ausplattiert und über Nacht kultiviert.

8.2.6. Isolierung von plasmidischer DNS aus *E. coli*

Die Präparation von plasmidischer DNS aus *E. coli* erfolgte mit einem NucleoSpin Plasmid QuickPure Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerprotokoll.

8.2.7. Sequenzierung

Plasmidische DNS wurde durch die MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) sequenziert. Verwendet wurde dazu das Standardoligonukleotid T7 Promoter.

8.2.8. Transformation in *E. coli* zur Expression

Expression sollte im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) CodonPlus RIL erfolgen. Dazu wurden 100 μ l hitzekompetente Zellen mit 180 ng Plasmid versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C für 2 min. Nach zweiminütiger Ruhephase auf Eis wurden die Zellen in 700 μ l LB-Medium resuspendiert und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Auf LB-Agar wurden 100 μ l der Bakteriensuspension ausplattiert und über Nacht kultiviert.

8.2.9. Herstellen einer Glycerindauerkultur

Mit einer Bakterienkolonie wurden 5 ml LB-Medium angeimpft und für 12 Stunden kultiviert. Mit 0,5 ml der Kultur wurden 0,5 ml Glycerin (50 % (v/v)) versetzt, die Suspension gemischt und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Gelagert wurde die Glycerinkultur bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8.3. Expression der *hyTRR2* TIR-Domäne

Aus einer Glycerinkultur wurde eine Vorkultur angeimpft und diese für mindestens zwölf Stunden kultiviert. Inokulation der Expressionskultur erfolgte mit Zellen aus der Übernachtskultur. Hierzu wurde 1 % (v/v) des Volumens der Expressionskultur an Vorkultur für 5 Minuten bei 4000 g abzentrifugiert, das Pellet im gleichen Volumen frischem LB-Medium resuspendiert und in die Expressionskultur überführt. Bei einer optischen Dichte OD_{600} bei Wellenlänge $\lambda = 600\text{ nm}$ zwischen 0,4 und 0,8 wurde die Expression mit IPTG einer finalen Konzentration von 1,0 mM induziert. Nach einer weiteren Stunde Kultivierung bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde die Temperatur auf $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gesenkt und bei dieser Temperatur für weitere 10–12 Stunden kultiviert. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min. Zellpellets wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

8.4. Reinigung der *hyTRR2* TIR-Domäne

Die Reinigung der *hyTRR2* TIR-Domäne erfolgte, soweit es möglich war, gekühlt oder auf Eis. Chromatographische Schritte wurden an einem Äkta System (Äkta Basic, Äkta Purifier) durchgeführt. Hierbei waren die Proben und die Säulen in einem Kühlkabinett untergebracht, um Degradation des Proteins zu verhindern.

8. Expression, Reinigung, Kristallisation und Strukturlösung der *hyTRR2* TIR-Domäne

Lysepuffer

Substanz	Konzentration
Tris/HCl pH 7,0	20 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	25 mM
Glycerin	5 % (v/v)
β -Mercaptoethanol	10 mM
PMSF	0,5 mM

Elutionspuffer

Substanz	Konzentration
Tris/HCl pH 7,0	20 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	500 mM
Glycerin	5 % (v/v)
β -Mercaptoethanol	10 mM

Waschpuffer

Substanz	Konzentration
Tris/HCl pH 7,0	20 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	25 mM
Glycerin	5 % (v/v)
β -Mercaptoethanol	10 mM

Gelfiltrationspuffer

Substanz	Konzentration
Tris/HCl pH 7,0	20 mM
NaCl	300 mM
DTT	2 mM

Proteinpuffer

Substanz	Konzentration
Tris/HCl pH 7,0	20 mM
NaCl	300 mM
DTT	10 mM

8.4.1. Immobilisierte Nickel-Affinitätschromatographie

Die mit Lysepuffer äquilibrierte Säule HisTrap HP 5ml (GE Healthcare, München, Deutschland) wurde mit dem geklärten Lysat beladen. Unspezifisch gebundenes Protein wurde mit fünf Säulenvolumen Lysepuffer und zehn Säulenvolumen Waschpuffer entfernt. Elution erfolgte durch Erhöhung der Imidazolkonzentration. Hierzu wurde zuerst in einem Stufengradienten der Anteil an Elutionspuffer auf 15 % erhöht und dieses für 5 Säulenvolumen konstant gehalten. Das Zielprotein eluierte hauptsächlich nach Erhöhen des Anteils an Elutionspuffer auf 30 %. Diese Konzentration war für weitere 5 Säulenvolumen konstant, dann erfolgte ein linearer Gradient über 15 Säulenvolumen bis 100 % Elutionspuffer. Das Eluat wurde auf seinen Proteingehalt untersucht und die Fraktionen vereint.

8.4.2. Dialyse

Zur Entfernung des Imidazols und des Glycerins aus der Lösung wurden die vereinten Fraktionen gegen das 20fache ihres Volumens an Gelfiltrationspuffer dialysiert. Verwendet wurde Spectra/Por aus regenerierter Cellulose (Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit einer Ausschlußgrenze von 3,5 kDa.

8.4.3. Gelfiltration

Eine Gelfiltrationssäule Superdex 75 16/60 pg (GE Healthcare, München, Deutschland) wurde mit Gelfiltrationspuffer äquilibriert. Bevor diese mit Probe beschickt wurde, erfolgte die Konzentrierung des Proteins durch Ultrafiltration. Hierzu kamen Vivaspin-Konzentratoren (Sartorius, Göttingen, Deutschland) mit einem Ausschlußgrenze von 3 kDa zum Einsatz. Das eingesetzte Probenvolumen betrug 2 ml, die angelegte Flussrate 0,5 ml/min. Die gesammelten Fraktionen wurden entsprechend ihres Proteingehalts vereint.

8.5. Kristallisation

Der Kristallisationsvorgang kann über einen längeren Zeitraum ablaufen, während dessen es zur Oxidation spezifischer Reste in einem Protein kommen kann. Beispielsweise können Cysteine, die sich räumlich gesehen nah zueinander befinden, durch Knüpfen einer Disulfidbindung miteinander verbunden werden. Das Expressionskonstrukt enthielt vier, vermutlich freie, Cysteinreste, daher wurde jedem Kristallisationsansatz mindestens 10 mM DTT zugegeben, um ein unspezifisches Vernetzen der Proteinmoleküle durch Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken zu verhindern.

Kristalle wurden nur reproduzierbar erhalten, wenn für die Tropfen zuerst das Fällungsmittel vorgelegt und in diese Lösung das Protein pipettiert wurde. Es wurden jeweils die gleichen Volumina von Proteinlösung und Fällungsmittel eingesetzt.

8.6. Diffraktionsexperimente

Die Sammlung von Diffraktionsdaten wurde an verschiedenen Röntgenquellen durchgeführt. Erste Diffraktionsexperimente erfolgten am Berliner Synchrotron BESSY II und am Synchrotron ESRF in Grenoble. Hochaufgelöste Datensätze wurden am Berliner Elektronenspeicherring BESSY II an der Beamline BL14.1 und an der EMBL-Beamline P14 am Hamburger Synchrotron PETRA III aufgenommen. BL14.1 ist ausgestattet mit einem Microdiffraktometer (MD2) mit einem Mini-kappa Goniometer MK3, einem Kühlsystem CryoJet-XL crystal cooling system (Oxford Instruments, Abingdon, Vereinigtes Königreich), einem CATS-Probenwechsler sowie einem Pilatus 6M-Detektor (Dectris, Baden, Schweiz). Die Hamburger Beamline P14 war ausgestattet mit einem MD3-Mikrodiffraktometer sowie einem Pilatus 6M-Detektor (Dectris, Baden, Schweiz).

Tab. 8.3.: Statistiken zur Datensammlung der Strukturbestimmung der *Hydra magnipillata* TRR-2 TIR-Domäne.

Datensatz	Kristallform I	Kristallform II hochaufgelöster Datensatz	Kristallform II Langwellen- datensatz
Wellenlänge [Å]	1,240	0,918	1,697
Detektorabstand [mm]	290,35	266,77	158,99
Rotation pro Bild [°]	0,1	0,1	0,1
Zahl der Bilder	2 400	3 600	7 200*
Synchrotron	PETRA III	BESSY II	PETRA III
Beamline	P14	BL14.1	P14
Detektor	PILATUS 6M	PILATUS 6M	PILATUS 6M

* Es wurden zwei Datensätze zu jeweils 3 600 Bildern aufgenommen.

Literatur

- Adams, P. D., P. V. Afonine, G. Bunkóczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L.-W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. Oeffner, R. J. Read, D. C. Richardson, J. S. Richardson, T. C. Terwilliger und P. H. Zwart (2010). „PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution.“ In: *Acta crystallographica Section D* 66(2), S. 213–221.
- Afonine, P. V., R. W. Grosse-Kunstleve und P.D. Adams (2005). „The Phenix refinement framework.“ In: *The CCP4 newsletter*. Bd. 42, Contribution 8.
- Afonine, P. V., R. W. Grosse-Kunstleve, N. Echols, J. J. Headd, N. W. Moriarty, M. Mustyakimov, T. C. Terwilliger, A. Urzhumtsev, P. H. Zwart und P. D. Adams (2012). „Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine.“ In: *Acta Crystallographica Section D* 68(Pt 4), S. 352–367.
- Alaidarous, M., T. Ve, L. W. Casey, E. Valkov, D. J. Ericsson, M. O. Ullah, M. A. Schembri, A. Mansell, M. J. Sweet und B. Kobe (2014). „Mechanism of bacterial interference with TLR4 signaling by *Brucella* Toll/interleukin-1 receptor domain-containing protein TcpB.“ In: *Journal of Biological Chemistry* 289(2), S. 654–668.
- Allende, J. E. und C. C. Allende (1995). „Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation.“ In: *The FASEB Journal* 9(5), S. 313–23. eprint: <http://www.fasebj.org/content/9/5/313.full.pdf+html>. URL: <http://www.fasebj.org/content/9/5/313.abstract>.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers und D. J. Lipman (1990). „Basic local alignment search tool.“ In: *Journal of Molecular Biology* 215(3), S. 403–410.
- „Amoebiasis“ (1997). In: *The Weekly Epidemiological Record* 72(14), S. 97–99.
- Anderson, D. H., M. S. Weiss und D. Eisenberg (1996). „A Challenging Case for Protein Crystal Structure Determination: the Mating Pheromone Er-1 from *Euplotes raikovi*.“ In: *Acta Crystallographica Section D* 52(3), S. 469–480.

Literatur

- Antonny, B. und M. Chabre (1992). „Characterization of the aluminum and beryllium fluoride species which activate transducin. Analysis of the binding and dissociation kinetics.“ In: *Journal of Biological Chemistry* 267(10), S. 6710–6718.
- Aoshima, M., M. Ishii und Y. Igarashi (2004). „A novel enzyme, citryl-CoA synthetase, catalysing the first step of the citrate cleavage reaction in *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6“. In: *Molecular Microbiology* 52(3), S. 751–761.
- Arnold, K., L. Bordoli, J. Kopp und T. Schwede (2006). „The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling.“ In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 22(2), S. 195–201.
- Ashkenazy, H., E. Erez, E. Martz, T. Pupko und N. Ben-Tal (2010). „ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids“. In: *Nucleic Acids Research* 38(Web Server issue), W529–533.
- Awano, T., A. Wilming, H. Tomita, Y. Yokooji, T. Fukui, T. Imanaka und H. Atomi (2014). „Characterization of two members among the five ADP-forming acyl coenzyme A (Acyl-CoA) synthetases reveals the presence of a 2-(Imidazol-4-yl)acetyl-CoA synthetase in *Thermococcus kodakarensis*“. In: *Journal of Bacteriology* 196(1), S. 140–147.
- Bailey, D. L., M. E. Fraser, W. A. Bridger, M. N. James und W. T. Wolodko (1999). „A dimeric form of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase produced by site-directed mutagenesis“. In: *Journal of Molecular Biology* 285(4), S. 1655–1666.
- Baker, E. N., B. F. Anderson, A. J. Dobbs und E. J. Dodson (1995). „Use of iron anomalous scattering with multiple models and data sets to identify and refine a weak molecular replacement solution: structure analysis of cytochrome c' from two bacterial species“. In: *Acta Crystallographica Section D* 51(Pt 3), S. 282–289.
- Baldasseroni, F. und S. Pascarella (2009). „Subunit interfaces of oligomeric hyperthermophilic enzymes display enhanced compactness“. In: *International Journal of Biological Macromolecules* 44(4), S. 353–360.
- Beesu, M., G. Caruso, A. C. Salyer, K. K. Khetani, D. Sil, M. Weerasinghe, H. Tanji, U. Ohto, T. Shimizu und S. A. David (2015). „Structure-Based Design of Human TLR8-Specific Agonists with Augmented Potency and Adjuvanticity“. In: *Journal of Medicinal Chemistry* 58(19), S. 7833–7849.
- Bell, J. K., I. Botos, P. R. Hall, J. Askins, J. Shiloach, D. M. Segal und D. R. Davies (2005). „The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(31), S. 10976–10980.

- Berman, H. M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov und P. E. Bourne (2000). „The Protein Data Bank“. In: *Nucleic Acids Research* 28(1), S. 235–242. DOI: 10.1093/nar/28.1.235.
- Bernoux, M., T. Ve, S. Williams, C. Warren, D. Hatters, E. Valkov, X. Zhang, J. G. Ellis, B. Kobe und P. N. Dodds (2011). „Structural and functional analysis of a plant resistance protein TIR domain reveals interfaces for self-association, signaling, and autoregulation“. In: *Cell Host Microbe* 9(3), S. 200–211.
- Bild, G. S., C. A. Janson und P. D. Boyer (1980). „Subunit interaction during catalysis. ATP modulation of catalytic steps in the succinyl-CoA synthetase reaction“. In: *Journal of Biological Chemistry* 255(17), S. 8109–8115.
- Birney, M., H. Um und C. Klein (1997). „Multiple levels of regulation of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase“. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 347(1), S. 103–112.
- Blake, C. C., R. H. Fenn, A. C. North, D. C. Phillips und R. J. Poljak (1962). „Structure of lysozyme. A Fourier map of the electron density at 6 angstrom resolution obtained by x-ray diffraction“. In: *Nature* 196, S. 1173–1176.
- Bosch, T. C. (2014). „Rethinking the role of immunity: lessons from *Hydra*“. In: *Trends in Immunology* 35(10), S. 495–502.
- Bosch, T. C., R. Augustin, F. Anton-Erxleben, S. Fraune, G. Hemmrich, H. Zill, P. Rosenstiel, G. Jacobs, S. Schreiber, M. Leippe, M. Stanisak, J. Grotzinger, S. Jung, R. Podschun, J. Bartels, J. Harder und J. M. Schroder (2009). „Uncovering the evolutionary history of innate immunity: the simple metazoan *Hydra* uses epithelial cells for host defence“. In: *Developmental and Comparative Immunology* 33(4), S. 559–569.
- Botos, I., D. M. Segal und D. R. Davies (2011). „The structural biology of Toll-like receptors“. In: *Structure* 19(4), S. 447–459.
- Bovijn, C., P. Ulrichs, A. S. De Smet, D. Catteeuw, R. Beyaert, J. Tavernier und F. Peelman (2012). „Identification of interaction sites for dimerization and adapter recruitment in Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain of Toll-like receptor 4“. In: *Journal of Biological Chemistry* 287(6), S. 4088–4098.
- Bragg, W. L., R. W. James und C. H. Bosanquet (1921a). „I. The intensity of reflexion of X-rays by rock-salt. Part II“. In: *Philosophical Magazine Series 6* 42(247), S. 1–17.
- Bragg, W. L., R. W. James und C. H. Bosanquet (1921b). „XXIX. The intensity of reflexion of X-rays by rock-salt“. In: *Philosophical Magazine Series 6* 41(243), S. 309–337.
- (1922). „XLIII. The distribution of electrons around the nucleus in the sodium and chlorine atoms“. In: *Philosophical Magazine Series 6* 44(261), S. 433–449.

Literatur

- Bräsen, C. und P. Schönheit (2001). „Mechanisms of acetate formation and acetate activation in halophilic archaea“. In: *Archives of Microbiology* 175(5), S. 360–368.
- (2004a). „Regulation of acetate and acetyl-CoA converting enzymes during growth on acetate and/or glucose in the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*“. In: *FEMS Microbiology Letters* 241(1), S. 21–26.
- (2004b). „Unusual ADP-forming acetyl-coenzyme A synthetases from the mesophilic halophilic euryarchaeon *Haloarcula marismortui* and from the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*“. In: *Archives of Microbiology* 182(4), S. 277–287.
- Bräsen, C., M. Schmidt, J. Grötzinger und P. Schönheit (2008). „Reaction mechanism and structural model of ADP-forming Acetyl-CoA synthetase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: evidence for a second active site histidine residue“. In: *Journal of Biological Chemistry* 283(22), S. 15409–15418.
- Brautigam, C. A., Y. Chelliah und J. Deisenhofer (2004). „Tetramerization and ATP binding by a protein comprising the A, B, and C domains of rat synapsin I“. In: *Journal of Biological Chemistry* 279(12), S. 11948–11956.
- Bridger, W. A., W. A. Millen und P. D. Boyer (1968). „Substrate synergism and phosphoenzyme formation in catalysis by succinyl coenzyme A synthetase“. In: *Biochemistry* 7(10), S. 3608–3616.
- Brink, C., D. Hodgkin, J. Lindsey, J. Pickworth, J. H. Robertson und J. G. White (1954). „Structure of Vitamin B12: X-ray Crystallographic Evidence on the Structure of Vitamin B12“. In: *Nature* 174(4443), S. 1169–1171.
- Brown, V., R. A. Brown, A. Ozinsky, J. R. Hesselberth und S. Fields (2006). „Binding specificity of Toll-like receptor cytoplasmic domains“. In: *European Journal of Immunology* 36(3), S. 742–753.
- Brünger, A. T. (1992). „Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures“. In: *Nature* 355(6359), S. 472–475.
- (1997). „Free R value: cross-validation in crystallography“. In: *Methods in Enzymology* 277, S. 366–396.
- Bucher, M. H., A. G. Evdokimov und D. S. Waugh (2002). „Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein“. In: *Acta Crystallographica Section D* 58(Pt 3), S. 392–397.
- Buchmann, K. (2014). „Evolution of Innate Immunity: Clues from Invertebrates via Fish to Mammals“. In: *Frontiers in Immunology* 5, S. 459.
- Burgess, R. R. (1991). „Use of polyethyleneimine in purification of DNA-binding proteins“. In: *Methods in enzymology* 208, S. 3–10.

- Burns, K., F. Martinon, C. Esslinger, H. Pahl, P. Schneider, J. L. Bodmer, F. Di Marco, L. French und J. Tschopp (1998). „MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling“. In: *Journal of Biological Chemistry* 273(20), S. 12203–12209.
- Carlier, M. F., D. Didry, R. Melki, M. Chabre und D. Pantaloni (1988). „Stabilization of microtubules by inorganic phosphate and its structural analogues, the fluoride complexes of aluminum and beryllium“. In: *Biochemistry* 27(10), S. 3555–3559.
- Carlisle, C. H. und D. Crowfoot (1945). „The crystal structure of cholesteryl iodide“. In: *Proceedings of the Royal Society, Series A* 184(996), S. 64–83.
- CCP4 (1994). „The CCP4 suite: programs for protein crystallography“. In: *Acta Crystallographica Section D* 50(5), S. 760–763.
- Celniker, G., G. Nimrod, H. Ashkenazy, F. Glaser, E. Martz, I. Mayrose, T. Pupko und N. Ben-Tal (2013). „ConSurf: Using Evolutionary Data to Raise Testable Hypotheses about Protein Function“. In: *Israel Journal of Chemistry* 53(3-4), S. 199–206.
- Chamberlain, P. P., X. Qian, A. R. Stiles, J. Cho, D. H. Jones, S. A. Lesley, E. A. Grabau, S. B. Shears und G. Spraggon (2007). „Integration of inositol phosphate signaling pathways via human ITPK1“. In: *Journal of Biological Chemistry* 282(38), S. 28117–28125.
- Chan, S. L., L. Y. Low, S. Hsu, S. Li, T. Liu, E. Santelli, G. Le Negrato, J. C. Reed, V. L. Woods und J. Pascual (2009). „Molecular mimicry in innate immunity: crystal structure of a bacterial TIR domain“. In: *Journal of Biological Chemistry* 284(32), S. 21386–21392.
- Chan, S. L., T. Mukasa, E. Santelli, L. Y. Low und J. Pascual (2010). „The crystal structure of a TIR domain from *Arabidopsis thaliana* reveals a conserved helical region unique to plants“. In: *Protein Science* 19(1), S. 155–161.
- Chen, V. B., W. B. Arendall III, J. J. Headd, D. A. Keedy, R. M. Immormino, G. J. Kapral, L. W. Murray, J. S. Richardson und D. C. Richardson (2010). „MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography“. In: *Acta Crystallographica Section D* 66(Pt 1), S. 12–21.
- Choe, J., M. S. Kelker und I. A. Wilson (2005). „Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain“. In: *Science* 309(5734), S. 581–585.
- Chuang, T. und R. J. Ulevitch (2001). „Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells“. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1518(1-2), S. 157–161.
- Cirl, C., A. Wieser, M. Yadav, S. Duerr, S. Schubert, H. Fischer, D. Stappert, N. Wantia, N. Rodriguez, H. Wagner, C. Svanborg und T. Miethke (2008). „Subversi-

Literatur

- on of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins“. In: *Nature Medicine* 14(4), S. 399–406.
- Cohen, S. S. und J. Lichtenstein (1960). „The isolation of deoxyribonucleic acid from bacterial extracts by precipitation with streptomycin“. In: *Journal of Biological Chemistry* 235, PC55–PC56.
- Cook, A., E. D. Lowe, E. D. Chrysina, V. T. Skamnaki, N. G. Oikonomakos und L. N. Johnson (2002). „Structural studies on phospho-CDK2/cyclin A bound to nitrate, a transition state analogue: implications for the protein kinase mechanism.“ In: *Biochemistry* 41(23), S. 7301–7311.
- Cowtan, K. (2006). „The 'Buccaneer' software for automated protein chain tracing“. In: *Acta Crystallographica Section A* 62(a1), S. 87.
- (2008). „Fitting molecular fragments into electron density“. In: *Acta Crystallographica Section D* 64(1), S. 83–89.
- Crowther, R. A. (1972). „The fast rotation function.“ In: Hrsg. von G. M. Rossmann. Gordon & Breach, New York. Kap. The Molecular Replacement Method. S. 173–183.
- Cruickshank, D. W. J. (1999). „Remarks about protein structure precision“. In: *Acta Crystallographica Section D* 55(3), S. 583–601.
- Dauter, Z., M. Dauter und K. R. Rajashankar (2000). „Novel approach to phasing proteins: derivatization by short cryo-soaking with halides“. In: *Acta Crystallographica Section D* 56(2), S. 232–237.
- Davies, D. R. und D. M. Segal (1997). „Enzyme purification and related techniques“. In: Hrsg. von W. B. Jakoby. Academic Press, Inc., London, New York, San Diego. Kap. Protein crystallization: Micro techniques involving vapor diffusion. 266–269.
- Davis, I. W., A. Leaver-Fay, V. B. Chen, J. N. Block, G. J. Kapral, X. Wang, L. W. Murray, W. B. Arendall III, Snoeyink J., J. S. Richardson und D. C. Richardson (2007). „MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids.“ In: *Nucleic Acids Research* 35(Web Server issue), W375–W383.
- D'Costa, V. M., C. E. King, L. Kalan, M. Morar, W. W. Sung, C. Schwarz, D. Froese, G. Zazula, F. Calmels, R. Debruyne, G. B. Golding, H. N. Poinar und G. D. Wright (2011). „Antibiotic resistance is ancient“. In: *Nature* 477(7365), S. 457–461.
- de Souza, S. J. (2012). „Domain shuffling and the increasing complexity of biological networks“. In: *Bioessays* 34(8), S. 655–657.
- Deane, C. M., F. H. Allen, R. Taylor und T. L. Blundell (1999). „Carbonyl-carbonyl interactions stabilize the partially allowed Ramachandran conformations of asparagine and aspartic acid“. In: *Protein Engineering* 12(12), S. 1025–1028.

- DeTitta, G. T., C. M. Weeks, P. Thuman, R. Miller und H. A. Hauptman (1994). „Structure solution by minimal-function phase refinement and Fourier filtering. I. Theoretical basis“. In: *Acta Crystallographica Section A* 50 (Pt 2), S. 203–210.
- Dickinson, R. G. und A. L. Raymond (1923). „THE CRYSTAL STRUCTURE OF HEXAMETHYLENE-TETRAMINE“. In: *Journal of the American Chemical Society* 45(1), S. 22–29.
- Diederichs, K. und P. A. Karplus (1997a). „Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography.“ In: *Nature Structural Biology* 4(4), S. 269–75.
- (1997b). „On the use of the merging R factor as a quality indicator for X-ray data“. In: *Nature Structural Biology* 4, S. 269–275.
- Drenth, J. (1999). *Principles of Protein X-ray Crystallography*. 2nd. Springer Verlag New York Berlin Heidelberg.
- Dunne, A., M. Ejdeback, P. L. Ludidi, L. A. O’Neill und N. J. Gay (2003). „Structural complementarity of Toll/interleukin-1 receptor domains in Toll-like receptors and the adaptors Mal and MyD88“. In: *Journal of Biological Chemistry* 278(42), S. 41443–41451.
- Elkins, J. G., M. Podar, D. E. Graham, K. S. Makarova, Y. Wolf, L. Randau, B. P. Hedlund, C. Brochier-Armanet, V. Kunin, I. Anderson, A. Lapidus, E. Goltsman, K. Barry, E. V. Koonin, P. Hugenholtz, N. Kyrpides, G. Wanner, P. Richardson, M. Keller und K. O. Stetter (2008). „A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(23), S. 8102–8107.
- Emsley, P. und K. Cowtan (2004). „Coot: model-building tools for molecular graphics.“ In: *Acta Crystallographica Section D* 60(12), S. 2126–2132.
- Emsley, P., B. Lohkamp, W. G. Scott und K. Cowtan (2010). „Features and development of Coot.“ In: *Acta Crystallographica Section D* 66(4), S. 486–501.
- Engh, R. A. und R. Huber (1991). „Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement“. In: *Acta Crystallographica Section A* 47(4), S. 392–400.
- (2001). In: *International Tables for Crystallography*. Hrsg. von M. G. Rossmann und E. Arnold. Bd. F. Kluwer Academic Publishers, S. 382–392.
- Enokizono, Y., H. Kumeta, K. Funami, M. Horiuchi, J. Sarmiento, K. Yamashita, D. M. Standley, M. Matsumoto, T. Seya und F. Inagaki (2013). „Structures and interface mapping of the TIR domain-containing adaptor molecules involved in interferon

- signaling“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(49), S. 19908–19913.
- Eschenfeldt, W. H., N. Maltseva, L. Stols, M. I. Donnelly, M. Gu, B. Nocek, K. Tan, Y. Kim und A. Joachimiak (2010). „Cleavable C-terminal His-tag vectors for structure determination“. In: *Journal of Structural and Functional Genomics* 11(1), S. 31–39.
- Esser, L., C. R. Wang, M. Hosaka, C. S. Smagula, T. C. Sudhof und J. Deisenhofer (1998). „Synapsin I is structurally similar to ATP-utilizing enzymes“. In: *EMBO Journal* 17(4), S. 977–984.
- Evans, P. (2006). „Scaling and assessment of data quality.“ In: *Acta Crystallographica Section D* 62(1), S. 72–82.
- Evans, P. R. (2011). „An introduction to data reduction: space-group determination, scaling and intensity statistics“. In: *Acta Crystallographica Section D* 67(Pt 4), S. 282–292.
- Evans, P. R. und G. N. Murshudov (2013). „How good are my data and what is the resolution?“ In: *Acta Crystallographica Section D* 69(Pt 7), S. 1204–1214.
- Fawaz, M. V., M. E. Topper und S. M. Firestine (2011). „The ATP-grasp enzymes“. In: *Bioorganic Chemistry* 39(5-6), S. 185–191.
- Fekonja, O., M. Benčina und R. Jerala (2012). „Toll/interleukin-1 receptor domain dimers as the platform for activation and enhanced inhibition of Toll-like receptor signaling“. In: *Journal of Biological Chemistry* 287(37), S. 30993–31002.
- Ferrao, R., J. Li, E. Bergamin und H. Wu (2012). „Structural insights into the assembly of large oligomeric signalosomes in the Toll-like receptor-interleukin-1 receptor superfamily“. In: *Science Signaling* 5(226), re3.
- Franzenburg, S., S. Fraune, S. Künzel, J. F. Baines, T. Domazet-Loso und T. C. Bosch (2012). „MyD88-deficient *Hydra* reveal an ancient function of TLR signaling in sensing bacterial colonizers“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(47), S. 19374–19379.
- Fraser, M. E., M. N. James, W. A. Bridger und W. T. Wolodko (1999). „A detailed structural description of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase“. In: *Journal of Molecular Biology* 285(4), S. 1633–1653.
- (2000). „Phosphorylated and dephosphorylated structures of pig heart, GTP-specific succinyl-CoA synthetase“. In: *Journal of Molecular Biology* 299(5), S. 1325–1339.
- Fraser, M. E., M. A. Joyce, D. G. Ryan und W. T. Wolodko (2002). „Two glutamate residues, Glu 208 α and Glu 197 β , are crucial for phosphorylation and dephosphorylation of the active-site histidine residue in succinyl-CoA synthetase“. In: *Biochemistry* 41(2), S. 537–546.

- Fraser, M. E., K. Hayakawa, M. S. Hume, D. G. Ryan und E. R. Brownie (2006). „Interactions of GTP with the ATP-grasp domain of GTP-specific succinyl-CoA synthetase.“ In: *Journal of Biological Chemistry* 281(16), S. 11058–11065.
- Friedrich, W., P. Knipping und M. Laue (1912). In: *Sitzungsberichte der mathematisch-physikalischen Klasse der Königlich Bayerischen Akademie der Wissenschaften zu München*, S. 303–322.
- Galliot, B. (2012). „Hydra, a fruitful model system for 270 years“. In: *International Journal of Developmental Biology* 56(6-8), S. 411–423.
- Galperin, M. Y. und E. V. Koonin (1997). „A diverse superfamily of enzymes with ATP-dependent carboxylate-amine/thiol ligase activity.“ In: *Protein Science* 6(12), S. 2639–2643.
- Gangloff, M., A. Moreno und N. J. Gay (2013). „Liesegang-like patterns of Toll crystals grown in gel“. In: *Journal of Applied Crystallography* 46(Pt 2), S. 337–345.
- Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel und A. Bairoch (2005). „The Proteomics Protocols Handbook“. In: Hrsg. von John M. Walker. Humana Press. Kap. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, S. 571–607.
- Gautam, J. K., Ashish, L. D. Comeau, J. K. Krueger und M. F. Smith (2006). „Structural and Functional Evidence for the Role of the TLR2 DD Loop in TLR1/TLR2 Heterodimerization and Signaling“. In: *Journal of Biological Chemistry* 281(40), S. 30132–30142.
- Gay, N. J. und F. J. Keith (1991). „Drosophila Toll and IL-1 receptor“. In: *Nature* 351(6325), S. 355–356.
- Gibson, J., C. D. Upper und I. C. Gunsalus (1967). „Succinyl coenzyme A synthetase from *Escherichia coli*. I. Purification and properties“. In: *Journal of Biological Chemistry* 242(10), S. 2474–2477.
- Glasemacher, J., A. K. Bock, R. Schmid und P. Schönheit (1997). „Purification and properties of acetyl-CoA synthetase (ADP-forming), an archaeal enzyme of acetate formation and ATP synthesis, from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*“. In: *European Journal of Biochemistry* 244(2), S. 561–567.
- Glaser, F., T. Pupko, I. Paz, R. E. Bell, D. Bechor-Shental, E. Martz und N. Ben-Tal (2003). „ConSurf: identification of functional regions in proteins by surface-mapping of phylogenetic information“. In: *Bioinformatics* 19(1), S. 163–164.
- Gogos, A. und L. Shapiro (2002). „Large conformational changes in the catalytic cycle of glutathione synthase“. In: *Structure* 10(12), S. 1669–1676.

Literatur

- Gouet, P., E. Courcelle, D. I. Stuart und F. Metoz (1999). „ESPrript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript“. In: *Bioinformatics* 15(4), S. 305–308.
- Gouet, P., X. Robert und E. Courcelle (2003). „ESPrript/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins.“ In: *Nucleic Acids Research* 31(13), S. 3320–3323.
- Green, D. W., V. M. Ingram und M. F. Perutz (1954). „The Structure of Haemoglobin. IV. Sign Determination by the Isomorphous Replacement Method“. In: *Proceedings of the Royal Society of London, Series A* 225(1162), S. 287–307.
- Grosse-Kunstleve, R. W. und P. D. Adams (2003). „Substructure search procedures for macromolecular structures“. In: *Acta Crystallographica Section D* 59(11), S. 1966–1973.
- Guan, Y., D. R. Ranao, S. Jiang, S. K. Mutha, X. Li, J. Baudry und R. I. Tapping (2010). „Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling“. In: *Journal of Immunology* 184(9), S. 5094–5103.
- Guex, N., M. C. Peitsch und T. Schwede (2009). „Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective“. In: *Electrophoresis* 30 Suppl 1, S162–173.
- Güven-Maiorov, E., O. Keskin, A. Gursoy, C. VanWaes, Z. Chen, C. J. Tsai und R. Nussinov (2015). „The Architecture of the TIR Domain Signalosome in the Toll-like Receptor-4 Signaling Pathway“. In: *Scientific Reports* 5, S. 13128.
- Hasan, U., C. Chaffois, C. Gaillard, V. Saulnier, E. Merck, S. Tancredi, C. Guet, F. Brière, J. Vlach, S. Lebecque, G. Trinchieri und E. E. Bates (2005). „Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88“. In: *Journal of Immunology* 174(5), S. 2942–2950.
- Hauptman, H. A. (1997a). „[1] Shake-and-bake: An algorithm for automatic solution ab initio of crystal structures“. In: *Macromolecular Crystallography Part B*. Hrsg. von Robert M. Sweet Charles W. Carter Jr. Bd. 277. Methods in Enzymology. Academic Press, S. 3–13.
- (1997b). „Phasing methods for protein crystallography“. In: *Current Opinion in Structural Biology* 7(5), S. 672–680.
- Hemmrich, G., D. J. Miller und T. C. Bosch (2007). „The evolution of immunity: a low-life perspective“. In: *Trends in Immunology* 28(10), S. 449–454.
- Heringa, J. (1999). „Two strategies for sequence comparison: profile-preprocessed and secondary structure-induced multiple alignment“. In: *Computers & Chemistry* 23(3-4), S. 341–364.

- (2000). „Computational methods for protein secondary structure prediction using multiple sequence alignments“. In: *Current Protein & Peptide Science* 1(3), S. 273–301.
- (2002). „Local weighting schemes for protein multiple sequence alignment“. In: *Computers & Chemistry* 26(5), S. 459–477.
- Hidber, E., E. R. Brownie, K. Hayakawa und M. E. Fraser (2007). „Participation of Cys123alpha of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase in catalysis“. In: *Acta Crystallographica Section D* 63(8), S. 876–884.
- Hildebrand, J. G. und L. B. Spector (1969). „Succinyl phosphate and the succinyl coenzyme A synthetase reaction“. In: *Journal of Biological Chemistry* 244(10), S. 2606–2613.
- Hiyama, T. B., M. Zhao, Y. Kitago, M. Yao, S. Sekine, T. Terada, C. Kuroishi, Z. J. Liu, J. P. Rose, S. Kuramitsu, M. Shirouzu, N. Watanabe, S. Yokoyama, I. Tanaka und B. C. Wang (2006). „Structural basis of CoA recognition by the *Pyrococcus* single-domain CoA-binding proteins“. In: *Journal of Structural and Functional Genomics* 7(3-4), S. 119–129.
- Hodel, A., S.-H. Kim und A. T. Brünger (1992). „Model bias in macromolecular crystal structures“. In: *Acta Crystallographica Section A* 48(6), S. 851–858.
- Hodgekin, D., J. Pickworth, J. H. Robertson, K. N. Trueblood, R. J. Prosen und J. G. White (1955). „Structure of Vitamin B12 : The Crystal Structure of the Hexacarboxylic Acid derived from B12 and the Molecular Structure of the Vitamin“. In: *Nature* 176(4477), S. 325–328.
- Holm, L. und P. Rosenstrom (2010). „Dali server: conservation mapping in 3D“. In: *Nucleic Acids Research* 38(Web Server issue), W545–W549.
- Horng, T., G. M. Barton und R. Medzhitov (2001). „TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway“. In: *Nature Immunology* 2(9), S. 835–841.
- Horng, T., G. M. Barton, R. A. Flavell und R. Medzhitov (2002). „The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors“. In: *Nature* 420(6913), S. 329–333.
- Hu, Y. und J. F. Holden (2006). „Citric acid cycle in the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum islandicum* grown autotrophically, heterotrophically, and mixotrophically with acetate“. In: *Journal of Bacteriology* 188(12), S. 4350–4355.
- Huang, J., M. Malhi, J. Deneke und M. E. Fraser (2015). „Structure of GTP-specific succinyl-CoA synthetase in complex with CoA“. In: *Acta Crystallographica Section F* 71(Pt 8), S. 1067–1071.

Literatur

- Huat, L. B., A. O. Garcia, T. Z. Ning, W. W. Kin, R. Noordin, S. S. Azham, L. Z. Jie, G. C. Ching, F. P. Chong und P. C. Dam (2014). „*Entamoeba histolytica* acetyl-CoA synthetase: biomarker of acute amoebic liver abscess“. In: *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4(6), S. 446–450.
- Hultmark, D. (1994). „Insect immunology. Ancient relationships“. In: *Nature* 367(6459), S. 116–117.
- Hunter, C. A., J. Singh und J. M. Thornton (1991). „ π - π interactions: the geometry and energetics of phenylalanine-phenylalanine interactions in proteins“. In: *Journal of Molecular Biology* 218(4), S. 837–846.
- Hutchins, A. M., X. Mai und M. W. Adams (2001). „Acetyl-CoA synthetases I and II from *Pyrococcus furiosus*“. In: *Methods in Enzymology* 331, S. 158–167.
- Immirzi, A. (1966). *Crystallographic Computing Techniques*. Hrsg. von F. R. Ahmed. Munksgaard, S. 399.
- Issinger, O.-G. (1993). „Casein kinases: pleiotropic mediators of cellular regulation“. In: *Pharmacology & Therapeutics* 59(1), S. 1–30.
- Jang, T. H. und H. H. Park (2014). „Crystal structure of TIR domain of TLR6 reveals novel dimeric interface of TIR-TIR interaction for toll-like receptor signaling pathway“. In: *Journal of Molecular Biology* 426(19), S. 3305–3313.
- Jaroszewski, L., L. Rychlewski und A. Godzik (2000). „Improving the quality of twilight-zone alignments“. In: *Protein Science* 9(8), S. 1487–1496.
- Jaroszewski, L., L. Rychlewski, Z. Li, W. Li und A. Godzik (2005). „FFAS03: a server for profile–profile sequence alignments“. In: *Nucleic Acids Research* 33(Web Server issue), W284–W288.
- Jaroszewski, L., Z. Li, X. H. Cai, C. Weber und A. Godzik (2011). „FFAS server: novel features and applications“. In: *Nucleic Acids Research* 39(Web Server issue), W38–W44.
- Jiang, Z., P. Georgel, C. Li, J. Choe, K. Crozat, S. Rutschmann, X. Du, T. Bigby, S. Mudd, S. Sovath, I. A. Wilson, A. Olson und B. Beutler (2006). „Details of Toll-like receptor:adapter interaction revealed by germ-line mutagenesis“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(29), S. 10961–10966.
- Jin, M. S. und J. O. Lee (2008). „Application of hybrid LRR technique to protein crystallization“. In: *Biochemistry and Molecular Biology Reports* 41(5), S. 353–357.
- Jin, M. S., S. E. Kim, J. Y. Heo, M. E. Lee, H. M. Kim, S. G. Paik, H. Lee und J. O. Lee (2007). „Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide“. In: *Cell* 130(6), S. 1071–1082.

- Jones, C. P. und C. Ingram-Smith (2014). „Biochemical and kinetic characterization of the recombinant ADP-forming acetyl coenzyme A synthetase from the amitochondriate protozoan *Entamoeba histolytica*“. In: *Eukaryotic Cell* 13(12), S. 1530–1537.
- Joosten, L. A., M. I. Koenders, R. L. Smeets, M. Heuvelmans-Jacobs, M. M. Helsen, K. Takeda, S. Akira, E. Lubberts, F. A. van de Loo und W. B. van den Berg (2003). „Toll-like receptor 2 pathway drives streptococcal cell wall-induced joint inflammation: critical role of myeloid differentiation factor 88“. In: *Journal of Immunology* 171(11), S. 6145–6153.
- Joosten, R. P., T. A. H. te Beek, E. Krieger, M. L. Hekkelman, R. W. W. Hooft, R. Schneider, C. Sander und G. Vriend (2011). „A series of PDB related databases for everyday needs“. In: *Nucleic Acids Research* 39(suppl 1), S. D411–D419.
- Jorda, J., M. R. Sawaya und T. O. Yeates (2014). „CrowdPhase: crowdsourcing the phase problem“. In: *Acta Crystallographica Section D* 70(Pt 6), S. 1538–1548.
- Joyce, M. A., M. E. Fraser, M. N. James, W. A. Bridger und W. T. Wolodko (2000). „ADP-binding site of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase revealed by x-ray crystallography.“ In: *Biochemistry* 39(1), S. 17–25.
- Joyce, M. A., E. R. Brownie, K. Hayakawa und M. E. Fraser (2007). „Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of *Thermus aquaticus* succinyl-CoA synthetase.“ In: *Acta Crystallographica Section F* 63(Pt 5), S. 399–402.
- Joyce, M. A., K. Hayakawa, W. T. Wolodko und M. E. Fraser (2012). „Biochemical and structural characterization of the GTP-preferring succinyl-CoA synthetase from *Thermus aquaticus*.“ In: *Acta Crystallographica Section D* 68(Pt 7), S. 751–762.
- Kabsch, W. (1976). „A solution for the best rotation to relate two sets of vectors“. In: *Acta Crystallographica Section A* 32(5), S. 922–923.
- (2010). „XDS.“ In: *Acta Crystallographica Section D* 66(2), S. 125–132.
- Kabsch, W. und C. Sander (1983). „Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features“. In: *Biopolymers* 22(12), S. 2577–2637.
- Kalimeri, M., O. Rahaman, S. Melchionna und F. Sterpone (2013). „How conformational flexibility stabilizes the hyperthermophilic elongation factor G-domain“. In: *Journal of Physical Chemistry B* 117(44), S. 13775–13785.
- Kanao, T., T. Fukui, H. Atomi und T. Imanaka (2002). „Kinetic and biochemical analyses on the reaction mechanism of a bacterial ATP-citrate lyase“. In: *European Journal of Biochemistry* 269(14), S. 3409–3416.

Literatur

- Kantardjieff, K. A. und B. Rupp (2003). „Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals“. In: *Protein Science* 12(9), S. 1865–1871.
- Kaplan-Türköz, B., T. Koelblen, C. Felix, M. P. Candusso, D. O’Callaghan, A. C. Vergunst und L. Terradot (2013). „Structure of the Toll/interleukin 1 receptor (TIR) domain of the immunosuppressive *Brucella* effector BtpA/Btp1/TcpB“. In: *FEBS Letters* 587(21), S. 3412–3416.
- Karplus, P. A. und K. Diederichs (2012). „Linking Crystallographic Model and Data Quality“. In: *Science* 336(6084), S. 1030–1033.
- Kendrew, J. C., G. Bodo, H. M. Dintzis, R. G. Parrish, H. Wyckoff und D. C. Phillips (1958). „A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis“. In: *Nature* 181(4610), S. 662–666.
- Khan, J. A., E. K. Brint, L. A. O’Neill und L. Tong (2004). „Crystal structure of the Toll/interleukin-1 receptor domain of human IL-1RAPL“. In: *Journal of Biological Chemistry* 279(30), S. 31664–31670.
- Kiefer, F., K. Arnold, M. Künzli, L. Bordoli und T. Schwede (2009). „The SWISS-MODEL Repository and associated resources.“ In: *Nucleic Acids Research* 37(Database issue), S. D387–D392.
- Kim, H. M., B. S. Park, J. I. Kim, S. E. Kim, J. Lee, S. C. Oh, P. Enkhbayar, N. Matsushima, H. Lee, O. J. Yoo und J. O. Lee (2007). „Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran“. In: *Cell* 130(5), S. 906–917.
- Kitazawa, M., D. Cheng, M. R. Tsukamoto, M. A. Koike, P. D. Wes, V. Vasilevko, D. H. Cribbs und F. M. LaFerla (2011). „Blocking IL-1 signaling rescues cognition, attenuates tau pathology, and restores neuronal β -catenin pathway function in an Alzheimer’s disease model“. In: *Journal of Immunology* 187(12), S. 6539–6549.
- Kopp, E. B. und R. Medzhitov (1999). „The Toll-receptor family and control of innate immunity“. In: *Current Opinion in Immunology* 11(1), S. 13–18.
- Kothe, M. und S. G. Powers-Lee (2004). „Nucleotide recognition in the ATP-grasp protein carbamoyl phosphate synthetase“. In: *Protein Science* 13(2), S. 466–475.
- Koymans, K. J., L. J. Feitsma, T. H. Brondijk, P. C. Aerts, E. Lukkien, P. Lossel, K. P. van Kessel, C. J. de Haas, J. A. van Strijp und E. G. Huizinga (2015). „Structural basis for inhibition of TLR2 by staphylococcal superantigen-like protein 3 (SSL3)“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(35), S. 11018–11023.

- Kraemer, T. D., O. D. Quintanar Haro, E. Domann, T. Chakraborty und S. Tchalbachev (2014). „The TIR Domain Containing Locus of *Enterococcus faecalis* Is Predominant among Urinary Tract Infection Isolates and Downregulates Host Inflammatory Response“. In: *International Journal of Microbiology* 2014, S. 918143.
- Krasileva, K. V., D. Dahlbeck und B. J. Staskawicz (2010). „Activation of an *Arabidopsis* resistance protein is specified by the in planta association of its leucine-rich repeat domain with the cognate oomycete effector“. In: *Plant Cell* 22(7), S. 2444–2458.
- Kreil, G. und P. D. Boyer (1964). „Detection of bound phosphohistidine in *E. coli* succinate thiokinase“. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 16(6), S. 551–555.
- Krissinel, E. (2010). „Crystal contacts as nature’s docking solutions“. In: *Journal of Computational Chemistry* 31(1), S. 133–143.
- (2012). „Enhanced fold recognition using efficient short fragment clustering“. In: *Journal of Molecular Biochemistry* 1(2), S. 76–85.
- Krissinel, E. und K. Henrick (2007). „Inference of macromolecular assemblies from crystalline state.“ In: *Journal of Molecular Biology* 372(3), S. 774–797.
- Krivov, G. G., M. V. Shapovalov und R. L. Dunbrack (2009). „Improved prediction of protein side-chain conformations with SCWRL4“. In: *Proteins* 77(4), S. 778–795.
- Kuzin, A. P., T. Sun, J. Jorczak-Baillass, V. L. Healy, C. T. Walsh und J. R. Knox (2000). „Enzymes of vancomycin resistance: the structure of D-alanine-D-lactate ligase of naturally resistant *Leuconostoc mesenteroides*“. In: *Structure* 8(5), S. 463–470.
- Kyriakis, J. M. und J. Avruch (2001). „Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation“. In: *Physiological Reviews* 81(2), S. 807–869.
- Labes, A. und P. Schönheit (2001). „Sugar utilization in the hyperthermophilic, sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* strain 7324: starch degradation to acetate and CO₂ via a modified Embden-Meyerhof pathway and acetyl-CoA synthetase (ADP-forming)“. In: *Archives of Microbiology* 176(5), S. 329–338.
- Laemmli, U.K. (1970). „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.“ In: *Nature* 227(5259), S. 680–685.
- Landau, M., I. Mayrose, Y. Rosenberg, F. Glaser, E. Martz, T. Pupko und N. Ben-Tal (2005). „ConSurf 2005: the projection of evolutionary conservation scores of residues on protein structures“. In: *Nucleic Acids Research* 33(Web Server issue), S. 299–302.

Literatur

- Lange, C., G. Hemmrich, U. C. Klostermeier, J. A. López-Quintero, D. J. Miller, T. Rahn, Y. Weiss, T. C. Bosch und P. Rosenstiel (2011). „Defining the origins of the NOD-like receptor system at the base of animal evolution“. In: *Molecular Biology and Evolution* 28(5), S. 1687–1702.
- Latz, E., A. Verma, A. Visintin, M. Gong, C. M. Sirois, D. C. Klein, B. G. Monks, C. J. McKnight, M. S. Lamphier, W. P. Duprex, T. Espevik und D. T. Golenbock (2007). „Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9“. In: *Nature Immunology* 8(7), S. 772–779.
- Lehtio, L., I. Fabrichniy, T. Hansen, P. Schonheit und A. Goldman (2005). „Unusual twinning in an acetyl coenzyme A synthetase (ADP-forming) from *Pyrococcus furiosus*“. In: *Acta Crystallographica Section D* 61(Pt 3), S. 350–354.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart und J. A. Hoffmann (1996). „The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/*cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults“. In: *Cell* 86(6), S. 973–983.
- Leulier, F. und B. Lemaitre (2008). „Toll-like receptors—taking an evolutionary approach“. In: *Nature Reviews Genetics* 9(3), S. 165–178.
- Lewis, M., C. J. Arnot, H. Beeston, A. McCoy, A. E. Ashcroft, N. J. Gay und M. Gangloff (2013). „Cytokine Spätzle binds to the *Drosophila* immunoreceptor Toll with a neurotrophin-like specificity and couples receptor activation“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(51), S. 20461–20466.
- Li, C., J. Zienkiewicz und J. Hawiger (2005). „Interactive sites in the MyD88 Toll/interleukin (IL) 1 receptor domain responsible for coupling to the IL1beta signaling pathway“. In: *Journal of Biological Chemistry* 280(28), S. 26152–26159.
- Li, X., F. Wu und D. A. Beard (2013). „Identification of the kinetic mechanism of succinyl-CoA synthetase“. In: *Bioscience Reports* 33(1), S. 145–163.
- Lin, S. C., Y. C. Lo und H. Wu (2010). „Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling“. In: *Nature* 465(7300), S. 885–890.
- Lin, Z., J. Lu, W. Zhou und Y. Shen (2012). „Structural insights into TIR domain specificity of the bridging adaptor Mal in TLR4 signaling“. In: *PLoS ONE* 7(4), e34202.
- Lindmark, D. G. und M. Müller (1975). In: *Journal of Protozoology* 22, 13A.
- Liu, L., I. Botos, Y. Wang, J. N. Leonard, J. Shiloach, D. M. Segal und D. R. Davies (2008). „Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA“. In: *Science* 320(5874), S. 379–381.

- Loll, P. J., A. E. Bevivino, B. D. Korty und P. H. Axelsen (1997). „Simultaneous Recognition of a Carboxylate-Containing Ligand and an Intramolecular Surrogate Ligand in the Crystal Structure of an Asymmetric Vancomycin Dimer“. In: *Journal of the American Chemical Society* 119(7), S. 1516–1522.
- Lovell, S. C., I. W. Davis, W. B. Arendall, P. I. W. de Bakker, J. M. Word, M. G. Prisant, J. S. Richardson und D. C. Richardson (2003). „Structure validation by Ca geometry: Φ , Ψ and $C\beta$ deviation“. In: *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 50(3), S. 437–450.
- Mai, X. und M. W. Adams (1996). „Purification and characterization of two reversible and ADP-dependent acetyl coenzyme A synthetases from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*“. In: *Journal of Bacteriology* 178(20), S. 5897–5903.
- Majumdar, R., J. R. Guest und W. A. Bridger (1991). „Functional consequences of substitution of the active site (phospho)histidine residue of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase“. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1076(1), S. 86–90.
- Marchler-Bauer, A. und S. H. Bryant (2004). „CD-Search: protein domain annotations on the fly“. In: *Nucleic Acids Research* 32(suppl 2), W327–W331.
- Marchler-Bauer, A., J. B. Anderson, F. Chitsaz, M. K. Derbyshire, C. DeWeese-Scott, J. H. Fong, Lewis Y. Geer, R. C. Geer, N. R. Gonzales, M. Gwadz, S. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, Z. Ke, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert, C. Liu, F. Lu, S. Lu, G. H. Marchler, M. Mullokandov, J. S. Song, A. Tasneem, N. Thanki, R. A. Yamashita, D. Zhang, N. Zhang und S. H. Bryant (2009). „CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database“. In: *Nucleic Acids Research* 37(suppl 1), S. D205–D210.
- Marchler-Bauer, A., S. Lu, J. B. Anderson, F. Chitsaz, M. K. Derbyshire, C. DeWeese-Scott, J. H. Fong, L. Y. Geer, R. C. Geer, N. R. Gonzales, M. Gwadz, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, Z. Ke, C. J. Lanczycki, F. Lu, G. H. Marchler, M. Mullokandov, M. V. Omelchenko, C. L. Robertson, J. S. Song, N. Thanki, R. A. Yamashita, D. Zhang, N. Zhang, C. Zheng und S. H. Bryant (2011). „CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins“. In: *Nucleic Acids Research* 39(suppl 1), S. D225–D229.
- Matthews, B. W. (1968). „Solvent content of protein crystals“. In: *Journal of Molecular Biology* 33(2), S. 491–497.
- The UniProt Consortium (2015). „UniProt: a hub for protein information“. In: *Nucleic Acids Research* 43(D1), S. D204–D212.

Literatur

- McCoy, A. J., L. C. Storoni und R. J. Read (2004). „Simple algorithm for a maximum-likelihood SAD function“. In: *Acta Crystallographica Section D* 60(Pt 7), S. 1220–1228.
- McCoy, A. J., R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni und R. J. Read (2007). „Phaser crystallographic software.“ In: *Journal of applied crystallography* 40(4), S. 658–674.
- McGaughey, G. B., M. Gagné und A. K. Rappé (1998). „ π -Stacking interactions. Alive and well in proteins“. In: *Journal of Biological Chemistry* 273(25), S. 15458–15463.
- Medzhitov, R. und C. A. Jr. Janeway (1997). „Innate immunity: the virtues of a non-clonal system of recognition“. In: *Cell* 91(3), S. 295–298.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt und C. A. Janeway (1997). „A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity“. In: *Nature* 388(6640), S. 394–397.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, E. Kopp, A. Stadlen, C. Chen, S. Ghosh und C. A. Janeway (1998). „MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways“. In: *Molecular Cell* 2(2), S. 253–258.
- Mellet, M., P. Atzei, R. Bergin, A. Horgan, T. Floss, W. Wurst, J. J. Callanan und P. N. Moynagh (2015). „Orphan receptor IL-17RD regulates Toll-like receptor signalling via SEFIR/TIR interactions“. In: *Nature Communications* 6, S. 6669.
- Mikacenic, C., A. P. Reiner, T. D. Holden, D. A. Nickerson und M. M. Wurfel (2013). „Variation in the TLR10/TLR1/TLR6 locus is the major genetic determinant of interindividual difference in TLR1/2-mediated responses“. In: *Genes and Immunology* 14(1), S. 52–57.
- Mikami, T., H. Miyashita, S. Takatsuka, Y. Kuroki und N. Matsushima (2012). „Molecular evolution of vertebrate Toll-like receptors: evolutionary rate difference between their leucine-rich repeats and their TIR domains“. In: *Gene* 503(2), S. 235–243.
- Miles, B. W., J. B. Thoden, H. M. Holden und F. M. Raushel (2002). „Inactivation of the amidotransferase activity of carbamoyl phosphate synthetase by the antibiotic acivicin“. In: *Journal of Biological Chemistry* 277(6), S. 4368–4373.
- Miller, D. J., G. Hemmrich, E. E. Ball, D. C. Hayward, K. Khalturin, N. Funayama, K. Agata und T. C. Bosch (2007). „The innate immune repertoire in cnidaria—ancestral complexity and stochastic gene loss“. In: *Genome Biology* 8(4), R59.
- Mineev, K. S., S. A. Goncharuk und A. S. Arseniev (2014). „Toll-like receptor 3 transmembrane domain is able to perform various homotypic interactions: an NMR structural study“. In: *FEBS Letters* 588(21), S. 3802–3807.

- Mitchell, R. A., L. G. Butler und P. D. Boyer (1964). „The association of readily-soluble bound phosphohistidine from mitochondria with succinate thiokinase“. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 16(6), S. 545–550.
- Mochalkin, I., J. R. Miller, A. Evdokimov, S. Lightle, C. Yan, C. K. Stover und G. L. Waldrop (2008). „Structural evidence for substrate-induced synergism and half-sites reactivity in biotin carboxylase“. In: *Protein Science* 17(10), S. 1706–1718.
- Mårdh, S., O. Ljungström, S. Högstedt und O. Zetterqvist (1971). „Studies on a rat-liver cell-sap protein yielding 3-^[32P]-phosphohistidine after incubation with ^[32P]ATP and alkaline hydrolysis. Identification of the protein as ATP citrate lyase“. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 251(3), S. 419–426.
- Murshudov, G. N. und E. J. Dodson (1997). „Simplified error estimation *à la* Cruickshank in macromolecular crystallography“. In: *CCP4 Newsletter*. Januar 1997.
- Murshudov, G. N., A. A. Vagin und E. J. Dodson (1997). „Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method“. In: *Acta Crystallographica Section D* 53(3), S. 240–255.
- Murshudov, G. N., P. Skubak, A. A. Lebedev, N. S. Pannu, R. A. Steiner, R. A. Nicholls, M. D. Winn, F. Long und A. A. Vagin (2011). „REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures“. In: *Acta Crystallographica Section D* 67(4), S. 355–367.
- Murzin, A. G. (1996). „Structural classification of proteins: new superfamilies.“ In: *Current Opinion in Structural Biology* 6(3), S. 386–394.
- Musfeldt, M. und P. Schönheit (2002). „Novel type of ADP-forming acetyl coenzyme A synthetase in hyperthermophilic archaea: heterologous expression and characterization of isoenzymes from the sulfate reducer *Archaeoglobus fulgidus* and the methanogen *Methanococcus jannaschii*“. In: *Journal of Bacteriology* 184(3), S. 636–644.
- Musfeldt, M., M. Selig und P. Schönheit (1999). „Acetyl coenzyme A synthetase (ADP forming) from the hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*: identification, cloning, separate expression of the encoding genes, *acdAI* and *acdBI*, in *Escherichia coli*, and in vitro reconstitution of the active heterotetrameric enzyme from its recombinant subunits“. In: *Journal of Bacteriology* 181(18), S. 5885–5888.
- Narayanan, K. B. und H. H. Park (2015). „Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-mediated cellular signaling pathways“. In: *Apoptosis* 20(2), S. 196–209.
- Neira, J. L., P. Sevilla und F. Garcia-Blanco (2012). „The C-terminal sterile alpha motif (SAM) domain of human p73 is a highly dynamic protein, which acquires high thermal stability through a decrease in backbone flexibility“. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 14(29), S. 10308–10323.

Literatur

- Nelson, D. L. und M. M. Cox (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5th. W. H. Freeman und Company.
- Newman, R. M., P. Salunkhe, A. Godzik und J. C. Reed (2006). „Identification and characterization of a novel bacterial virulence factor that shares homology with mammalian Toll/interleukin-1 receptor family proteins“. In: *Infection and Immunity* 74(1), S. 594–601.
- Niefind, K., M. Putter, B. Guerra, O. G. Issinger und D. Schomburg (1999). „GTP plus water mimic ATP in the active site of protein kinase CK2“. In: *Nature Structural Biology* 6(12), S. 1100–1103.
- Nishimura, J. S. und T. Mitchell (1984). „*Escherichia coli* succinyl coenzyme A synthetase. Inhibition of ATP-stimulated succinate–succinyl coenzyme A exchange at low succinyl coenzyme A concentrations by an ADP trap“. In: *Journal of Biological Chemistry* 259(4), S. 2144–2148.
- (1985). „Reaction of substrates with ^{35}S -thiophosphorylated succinyl-CoA synthetase of pig heart. Similarities to the case of the *Escherichia coli* enzyme“. In: *Journal of Biological Chemistry* 260(4), S. 2077–2079.
- Novatchkova, M., A. Leibbrandt, J. Werzowa, A. Neubuser und F. Eisenhaber (2003). „The STIR-domain superfamily in signal transduction, development and immunity“. In: *Trends in Biochemical Sciences* 28(5), S. 226–229.
- Núñez Miguel, R., J. Wong, J. F. Westoll, H. J. Brooks, L. A. J. O’Neill, N. J. Gay, C. E. Bryant und T. P. Monie (2007). „A Dimer of the Toll-Like Receptor 4 Cytoplasmic Domain Provides a Specific Scaffold for the Recruitment of Signalling Adaptor Proteins“. In: *PLoS ONE* 2(8), e788.
- Nyman, T., P. Stenmark, S. Flodin, I. Johansson, M. Hammarström und P. Nordlund (2008). „The crystal structure of the human toll-like receptor 10 cytoplasmic domain reveals a putative signaling dimer“. In: *Journal of Biological Chemistry* 283(18), S. 11861–11865.
- Ohnishi, H., H. Tochio, Z. Kato, K. E. Orii, A. Li, T. Kimura, H. Hiroaki, N. Kondo und M. Shirakawa (2009). „Structural basis for the multiple interactions of the MyD88 TIR domain in TLR4 signaling“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, S. 10260–10265.
- Ohto, U., K. Miyake und T. Shimizu (2011). „Crystal structures of mouse and human RP105/MD-1 complexes reveal unique dimer organization of the toll-like receptor family“. In: *Journal of Molecular Biology* 413(4), S. 815–825.

- Ohto, U., T. Shibata, H. Tanji, H. Ishida, E. Krayukhina, S. Uchiyama, K. Miyake und T. Shimizu (2015). „Structural basis of CpG and inhibitory DNA recognition by Toll-like receptor 9“. In: *Nature* 520(7549), S. 702–705.
- Olsen, G. J., C. R. Woese, R. Overbeek und C. R. Woese (1994). „The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology“. In: *Journal of Bacteriology* 176(1), S. 1–6.
- Painter, Jay und Ethan A. Merritt (2006a). „*TLSMD* web server for the generation of multi-group TLS models“. In: *Journal of Applied Crystallography* 39(1), S. 109–111.
- (2006b). „Optimal description of a protein structure in terms of multiple groups undergoing TLS motion“. In: *Acta Crystallographica Section D* 62(4), S. 439–450.
- Parthasarathy, S. und M. R. Murthy (1997). „Analysis of temperature factor distribution in high-resolution protein structures“. In: *Protein Science* 6(12), S. 2561–2567.
- Parthier, C., M. Stelter, C. Ursel, U. Fandrich, H. Lilie, C. Breithaupt und M. T. Stubbs (2014). „Structure of the Toll-Spatzle complex, a molecular hub in *Drosophila* development and innate immunity“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(17), S. 6281–6286.
- Peitsch, M. C. (1995). „Protein modeling by Email.“ In: *Bio/Technology* 13, S. 658–660.
- Pekkala, S., E. Munukka, L. Kong, E. Pöllänen, R. Autio, C. Roos, P. Wiklund, P. Fischer-Posovszky, M. Wabitsch, M. Alen, P. Huovinen und S. Cheng (2015). „Toll-like receptor 5 in obesity: the role of gut microbiota and adipose tissue inflammation“. In: *Obesity (Silver Spring)* 23(3), S. 581–590.
- Perutz, M. F., M. G. Rossmann, A. F. Cullis, H. Muirhead, G. Will und A. C. North (1960). „Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis“. In: *Nature* 185(4711), S. 416–422.
- Petsko, G. A. (2001). „Structural Basis of Thermostability in Hyperthermophilic Proteins, or „There’s More Than One Way to Skin a Cat““. In: *Methods in Enzymology* 334, S. 469–478.
- Piao, W., L. W. Ru, K. H. Piepenbrink, E. J. Sundberg, S. N. Vogel und V. Y. Tsohchakov (2013). „Recruitment of TLR adapter TRIF to TLR4 signaling complex is mediated by the second helical region of TRIF TIR domain“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(47), S. 19036–19041.
- Polekhina, G., P. G. Board, R. R. Gali, J. Rossjohn und M. W. Parker (1999). „Molecular basis of glutathione synthetase deficiency and a rare gene permutation event“. In: *EMBO Journal* 18(12), S. 3204–3213.

Literatur

- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton und B. Beutler (1998). „Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene“. In: *Science* 282(5396), S. 2085–2088.
- Popov, A. N. und G. P. Bourenkov (2003). „Choice of data-collection parameters based on statistic modelling“. In: *Acta Crystallographica Section D* 59(7), S. 1145–1153.
- Pozharski, E., C. X. Weichenberger und B. Rupp (2013). „Techniques, tools and best practices for ligand electron-density analysis and results from their application to deposited crystal structures“. In: *Acta Crystallographica Section D* 69(2), S. 150–167.
- Pålsson-McDermott, E. M. und L. A. O’Neill (2007). „Building an immune system from nine domains“. In: *Biochemical Society Transactions* 35(Pt 6), S. 1437–1444.
- Qiu, Y., Y. Ding, L. Zou, Z. Tan, T. Liu, X. Fu und W. Xu (2013). „Divergent Roles of Amino Acid Residues Inside and Outside the BB Loop Affect Human Toll-Like Receptor (TLR)2/2, TLR2/1 and TLR2/6 Responsiveness“. In: *PLoS ONE* 8(4), e61508.
- Racke, M. K. und P. D. Drew (2009). „Toll-like receptors in multiple sclerosis“. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology* 336, S. 155–168.
- Radhakrishnan, G. K., Q. Yu, J. S. Harms und G. A. Splitter (2009). „*Brucella* TIR Domain-containing Protein Mimics Properties of the Toll-like Receptor Adaptor Protein TIRAP“. In: *Journal of Biological Chemistry* 284(15), S. 9892–9898.
- Ramachandran, G. N., C. Ramarishnan und V. Sasisekharan (1963). „Stereochemistry of polypeptide chain configurations“. In: *Journal of Molecular Biology* 7, S. 95–99.
- Rana, R. R., P. Simpson, M. Zhang, M. Jennions, C. Ukegbu, A. M. Spear, Y. Alguel, S. J. Matthews, H. S. Atkins und B. Byrne (2011). „*Yersinia pestis* TIR-domain protein forms dimers that interact with the human adaptor protein MyD88“. In: *Microbial Pathogenesis* 51(3), S. 89–95.
- Rao, S. T. und M. G. Rossmann (1973). „Comparison of super-secondary structures in proteins“. In: *Journal of Molecular Biology* 76(2), S. 241–256.
- Read, R. J. und A. J. Schierbeek (1988). „A phased translation function“. In: *Journal of Applied Crystallography* 21(5), S. 490–495.
- Reeves, R. E., L. G. Warren, B. Susskind und H. S. Lo (1977). „An energy-conserving pyruvate-to-acetate pathway in *Entamoeba histolytica*. Pyruvate synthase and a new acetate thiokinase“. In: *Journal of Biological Chemistry* 252(2), S. 726–731.
- Rekha, N., S. M. Machado, C. Narayanan, A. Krupa und N. Srinivasan (2005). „Interaction interfaces of protein domains are not topologically equivalent across families

- within superfamilies: Implications for metabolic and signaling pathways“. In: *Proteins* 58(2), S. 339–353.
- Risler, J. L., M. O. Delorme, H. Delacroix und A. Henaut (1988). „Amino acid substitutions in structurally related proteins. A pattern recognition approach. Determination of a new and efficient scoring matrix“. In: *Journal of Molecular Biology* 204(4), S. 1019–1029.
- Roach, J. M., L. Racioppi, C. D. Jones und A. M. Masci (2013). „Phylogeny of Toll-like receptor signaling: adapting the innate response“. In: *PLoS ONE* 8(1), e54156.
- Ronni, T., V. Agarwal, M. Haykinson, M. E. Haberland, G. Cheng und S. T. Smale (2003). „Common interaction surfaces of the toll-like receptor 4 cytoplasmic domain stimulate multiple nuclear targets“. In: *Molecular and Cellular Biology* 23(7), S. 2543–2555.
- Rossmann, M. G. und D. M. Blow (1962). „The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit“. In: *Acta Crystallographica* 15(1), S. 24–31.
- Rupp, B. (2010). *Biomolecular Crystallography*. Garland Science.
- Rychlewski, L., L. Jaroszewski, W. Li und A. Godzik (2000). „Comparison of sequence profiles. Strategies for structural predictions using sequence information“. In: *Protein Science* 9(2), S. 232–241.
- Salcedo, S. P., M. I. Marchesini, H. Lelouard, E. Fugier, G. Jolly, S. Balor, A. Muller, N. Lapaque, O. Demaria, L. Alexopoulou, D. J. Comerci, R. A. Ugalde, P. Pierre und J. P. Gorvel (2008). „*Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1“. In: *PLOS Pathogens* 4(2), e21.
- Salcedo, S. P., M. I. Marchesini, C. Degos, M. Terwagne, K. Von Bargen, H. Lepidi, C. K. Herrmann, T. L. Santos Lacerda, P. R. Imbert, P. Pierre, L. Alexopoulou, J. J. Letesson, D. J. Comerci und J. P. Gorvel (2013). „BtpB, a novel *Brucella* TIR-containing effector protein with immune modulatory functions“. In: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3, S. 28.
- Salminen, T., A. Teplyakov, J. Kankare, B. S. Cooperman, R. Lahti und A. Goldman (1996). „An unusual route to thermostability disclosed by the comparison of *Thermus thermophilus* and *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatases“. In: *Protein Science* 5(6), S. 1014–1025.
- Sánchez, L. B. und M. Müller (1996). „Purification and characterization of the acetate forming enzyme, acetyl-CoA synthetase (ADP-forming) from the amitochondriate protist, *Giardia lamblia*“. In: *FEBS Letters* 378(3), S. 240–244.

Literatur

- Sánchez, L. B., H. G. Morrison, M. L. Sogin und M. Müller (1999). „Cloning and sequencing of an acetyl-CoA synthetase (ADP-forming) gene from the amitochondriate protist, *Giardia lamblia*“. In: *Gene* 233(1-2), S. 225–231.
- Sánchez, L. B., M. Y. Galperin und M. Müller (2000). „Acetyl-CoA synthetase from the amitochondriate eukaryote *Giardia lamblia* belongs to the newly recognized superfamily of acyl-CoA synthetases (Nucleoside diphosphate-forming)“. In: *Journal of Biological Chemistry* 275(8), S. 5794–5803.
- Sanseverino, W. und M. R. Ercolano (2012). „In silico approach to predict candidate R proteins and to define their domain architecture“. In: *BMC Research Notes* 5, S. 678.
- Schäfer, T. und P. Schönheit (1991). „Pyruvate metabolism of the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*“. In: *Archives of Microbiology* 155(4), S. 366–377.
- Schmidt, M. und P. Schönheit (2013). „Acetate formation in the photoheterotrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus* involves an archaeal type ADP-forming acetyl-CoA synthetase isoenzyme I“. In: *FEMS Microbiol. Lett.* 349(2), S. 171–179.
- Schmidt, M. C. (2013). „ADP-abhängige Acyl-CoA Synthetasen in Archaea, Bacteria und Eukarya: Charakterisierung, Funktion und Phylogenie“. Diss. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät.
- Schuermann, J. P. und J. J. Tanner (2003). „MRSAD: using anomalous dispersion from S atoms collected at Cu K α wavelength in molecular-replacement structure determination“. In: *Acta Crystallographica Section D* 59(Pt 10), S. 1731–1736.
- Scott, J. W., F. L. Poole und M. W. Adams (2014). „Characterization of ten heterotetrameric NDP-dependent acyl-CoA synthetases of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*“. In: *Archaea* 2014, S. 176863.
- Shatsky, M., R. Nussinov und H. J. Wolfson (2004). „A method for simultaneous alignment of multiple protein structures“. In: *Proteins* 56(1), S. 143–156.
- Shikata, K., T. Fukui, H. Atomi und T. Imanaka (2007). „A novel ADP-forming succinyl-CoA synthetase in *Thermococcus kodakaraensis* structurally related to the archaeal nucleoside diphosphate-forming acetyl-CoA synthetases.“ In: *Journal of Biological Chemistry* 282(37), S. 26963–26970.
- Shoemaker, B. A., A. R. Panchenko und S. H. Bryant (2006). „Finding biologically relevant protein domain interactions: conserved binding mode analysis“. In: *Protein Science* 15(2), S. 352–361.
- Simossis, V. A. und J. Heringa (2003). „The PRALINE online server: optimising progressive multiple alignment on the web“. In: *Computational Biology and Chemistry* 27(4-5), S. 511–519.

- (2005). „PRALINE: a multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information“. In: *Nucleic Acids Research* 33(Web Server issue), W289–294.
- Simossis, V. A., J. Kleinjung und J. Heringa (2005). „Homology-extended sequence alignment“. In: *Nucleic Acids Research* 33(3), S. 816–824.
- Singh, M., E. G. Richards, A. Mukherjee und P. A. Srere (1976). „Structure of ATP citrate lyase from rat liver. Physicochemical studies and proteolytic modification“. In: *Journal of Biological Chemistry* 251(17), S. 5242–5250.
- Singh, S., K. Pandey, Y. S. Rathore, A. Sagar, U. B. K. Pattnaik und Ashish (2014). „A communication network within the cytoplasmic domain of toll-like receptors has remained conserved during evolution“. In: *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 32(5), S. 694–700.
- Slack, J. L., K. Schooley, T. P. Bonnert, J. L. Mitcham, E. E. Qwarnstrom, J. E. Sims und S. K. Dower (2000). „Identification of Two Major Sites in the Type I Interleukin-1 Receptor Cytoplasmic Region Responsible for Coupling to Pro-inflammatory Signaling Pathways“. In: *Journal of Biological Chemistry* 275(7), S. 4670–4678.
- Sloane, V., C. Z. Blanchard, F. Guillot und G. L. Waldrop (2001). „Site-directed mutagenesis of ATP binding residues of biotin carboxylase. Insight into the mechanism of catalysis“. In: *Journal of Biological Chemistry* 276(27), S. 24991–24996.
- Smart, O. S., T. O. Womack, A. Sharff, C. Flensburg, P. Keller, W. Paciorek, C. Vornrhein und G. Bricogne (2011). *grade, version 1.2.7*. <http://www.globalphasing.com>.
- Smits, S. H., A. Mueller, M. K. Grieshaber und L. Schmitt (2008). „Coenzyme- and Histag-induced crystallization of octopine dehydrogenase“. In: *Acta Crystallographica Section F* 64(Pt 9), S. 836–839.
- Snyder, G. A., C. Cirl, J. Jiang, K. Chen, A. Waldhuber, P. Smith, F. Rommler, N. Snyder, T. Fresquez, S. Durr, N. Tjandra, T. Miethke und T. S. Xiao (2013). „Molecular mechanisms for the subversion of MyD88 signaling by TcpC from virulent uropathogenic *Escherichia coli*“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(17), S. 6985–6990.
- Snyder, G. A., D. Deredge, A. Waldhuber, T. Fresquez, D. Z. Wilkins, P. T. Smith, S. Durr, C. Cirl, J. Jiang, W. Jennings, T. Luchetti, N. Snyder, E. J. Sundberg, P. Wintrobe, T. Miethke und T. S. Xiao (2014). „Crystal structures of the Toll/Interleukin-1 receptor (TIR) domains from the *Brucella* protein TcpB and host adaptor TIRAP reveal mechanisms of molecular mimicry“. In: *Journal of Biological Chemistry* 289(2), S. 669–679.

Literatur

- Song, D. H. und J. O. Lee (2012). „Sensing of microbial molecular patterns by Toll-like receptors“. In: *Immunological Reviews* 250(1), S. 216–229.
- Song, W., J. Wang, Z. Han, Y. Zhang, H. Zhang, W. Wang, J. Chang, B. Xia, S. Fan, D. Zhang, J. Wang, H. W. Wang und J. Chai (2015). „Structural basis for specific recognition of single-stranded RNA by Toll-like receptor 13“. In: *Nature Structural and Molecular Biology* 22(10), S. 782–787.
- Song, X., P. Jin, S. Qin, L. Chen und F. Ma (2012). „The evolution and origin of animal Toll-like receptor signaling pathway revealed by network-level molecular evolutionary analyses“. In: *PLoS ONE* 7(12), e51657.
- Spear, A. M., N. J. Loman, H. S. Atkins und M. J. Pallen (2009). „Microbial TIR domains: not necessarily agents of subversion?“ In: *Trends in Microbiology* 17(9), S. 393–398.
- Spear, A. M., R. R. Rana, D. C. Jenner, H. C. Flick-Smith, P. C. Oyston, P. Simpson, S. J. Matthews, B. Byrne und H. S. Atkins (2012). „A Toll/interleukin (IL)-1 receptor domain protein from *Yersinia pestis* interacts with mammalian IL-1/Toll-like receptor pathways but does not play a central role in the virulence of *Y. pestis* in a mouse model of bubonic plague“. In: *Microbiology (Reading, Engl.)* 158(Pt 6), S. 1593–1606.
- Srere, P. A. (1961). „The Citrate Cleavage Enzyme: II. STOICHIOMETRY SUBSTRATE SPECIFICITY AND ITS USE FOR COENZYME A ASSAY“. In: *Journal of Biological Chemistry* 236(1), S. 50–53.
- Srere, Paul A. und Fritz Lipmann (1953). „AN ENZYMATIC REACTION BETWEEN CITRATE, ADENOSINE TRIPHOSPHATE AND COENZYME A1“. In: *Journal of the American Chemical Society* 75(19), S. 4874–4874.
- Strong, M., M. R. Sawaya, S. Wang, M. Phillips, D. Cascio und D. Eisenberg (2006). „Toward the structural genomics of complexes: crystal structure of a PE/PPE protein complex from *Mycobacterium tuberculosis*“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(21), S. 8060–8065.
- Sun, P. D., S. Radaev und M. Kattah (2002). „Generating isomorphous heavy-atom derivatives by a quick-soak method. Part I: test cases“. In: *Acta Crystallographica Section D* 58(7), S. 1092–1098.
- Sun, T., K. Hayakawa, K. S. Bateman und M. E. Fraser (2010). „Identification of the citrate-binding site of human ATP-citrate lyase using X-ray crystallography“. In: *Journal of Biological Chemistry* 285(35), S. 27418–27428.

- Sun, T., K. Hayakawa und M. E. Fraser (2011). „ADP-Mg²⁺ bound to the ATP-grasp domain of ATP-citrate lyase“. In: *Acta Crystallographica Section F* 67(Pt 10), S. 1168–1172.
- Swiderski, M. R., D. Birker und J. D. Jones (2009). „The TIR domain of TIR-NB-LRR resistance proteins is a signaling domain involved in cell death induction“. In: *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(2), S. 157–165.
- Tanji, H., U. Ohto, T. Shibata, K. Miyake und T. Shimizu (2013). „Structural reorganization of the Toll-like receptor 8 dimer induced by agonistic ligands“. In: *Science* 339(6126), S. 1426–1429.
- Tao, X., Y. Xu, Y. Zheng, A. A. Beg und L. Tong (2002). „An extensively associated dimer in the structure of the C713S mutant of the TIR domain of human TLR2“. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 299(2), S. 216–221.
- Technau, U., S. Rudd, P. Maxwell, P. M. Gordon, M. Saina, L. C. Grasso, D. C. Hayward, C. W. Sensen, R. Saint, T. W. Holstein, E. E. Ball und D. J. Miller (2005). „Maintenance of ancestral complexity and non-metazoan genes in two basal cnidarians“. In: *Trends in Genetics* 21(12), S. 633–639.
- Ten Eyck, L. F. (1973). „Crystallographic fast Fourier transforms“. In: *Acta Crystallographica Section A* 29(2), S. 183–191.
- Terwilliger, T. (2004a). „SOLVE and RESOLVE: automated structure solution, density modification and model building“. In: *Journal of Synchrotron Radiation* 11(1), S. 49–52.
- Terwilliger, T. C. (1994). „MAD phasing: Bayesian estimates of F(A)“. In: *Acta Crystallographica Section D* 50(Pt 1), S. 11–16.
- (2000). „Maximum-likelihood density modification“. In: *Acta Crystallographica Section D* 56(Pt 8), S. 965–972.
- (2002a). „Rapid automatic NCS identification using heavy-atom substructures“. In: *Acta Crystallographica Section D* 58(Pt 12), S. 2213–2215.
- (2002b). „Statistical density modification with non-crystallographic symmetry“. In: *Acta Crystallographica Section D* 58(Pt 12), S. 2082–2086.
- (2003a). „Automated main-chain model building by template matching and iterative fragment extension“. In: *Acta Crystallographica Section D* 59(Pt 1), S. 38–44.
- (2003b). „Automated side-chain model building and sequence assignment by template matching“. In: *Acta Crystallographica Section D* 59(Pt 1), S. 45–49.
- (2004b). „Using prime-and-switch phasing to reduce model bias in molecular replacement“. In: *Acta Crystallographica Section D* 60(12), S. 2144–2149.

Literatur

- Terwilliger, T. C., R. W. Grosse-Kunstleve, N. W. Afonine P. V. und Moriarty, P. H. Zwart, L. Hung und P. D. Read R. J. und Adams (2008). „Iterative model building, structure refinement and density modification with the *PHENIX AutoBuild* wizard“. In: *Acta Crystallographica Section D* 64(1), S. 61–69.
- Terwilliger, T. C., P. D. Adams, R. J. Read, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. W. Grosse-Kunstleve, P. V. Afonine, P. H. Zwart und L.-W. Hung (2009). „Decision-making in structure solution using Bayesian estimates of map quality: the *PHENIX AutoSol* wizard“. In: *Acta Crystallographica Section D* 65(6), S. 582–601.
- Terwilliger, T. C., R. J. Read, P. D. Adams, A. T. Brunger, P. V. Afonine und L. W. Hung (2013). „Model morphing and sequence assignment after molecular replacement“. In: *Acta Crystallographica Section D* 69(Pt 11), S. 2244–2250.
- Thoden, J. B., S. Firestine, A. Nixon, S. J. Benkovic und H. M. Holden (2000a). „Molecular structure of *Escherichia coli* PurT-encoded glycinamide ribonucleotide transformylase“. In: *Biochemistry* 39(30), S. 8791–8802.
- Thoden, J. B., C. Z. Blanchard, H. M. Holden und G. L. Waldrop (2000b). „Movement of the biotin carboxylase B-domain as a result of ATP binding“. In: *Journal of Biological Chemistry* 275(21), S. 16183–16190.
- Tickle, I. J., R. A. Laskowski und D. S. Moss (2000). „ R_{free} and the R_{free} ratio. II. Calculation of the expected values and variances of cross-validation statistics in macromolecular least-squares refinement“. In: *Acta Crystallographica Section D* 56(4), S. 442–450.
- Toshchakov, V., B. W. Jones, P. Y. Perera, K. Thomas, M. J. Cody, S. Zhang, B. R. Williams, J. Major, T. A. Hamilton, M. J. Fenton und S. N. Vogel (2002). „TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages“. In: *Nature Immunology* 3(4), S. 392–398.
- Toshchakov, V. Y. und S. N. Vogel (2007). „Cell-penetrating TIR BB loop decoy peptides a novel class of TLR signaling inhibitors and a tool to study topology of TIR-TIR interactions“. In: *Expert Opinion on Biological Therapy* 7(7), S. 1035–1050.
- Toshchakov, V. Y., H. Szmanski, L. A. Couture, J. R. Lakowicz und S. N. Vogel (2011). „Targeting TLR4 signaling by TLR4 Toll/IL-1 receptor domain-derived decoy peptides: identification of the TLR4 Toll/IL-1 receptor domain dimerization interface“. In: *Journal of Immunology* 186(8), S. 4819–4827.
- Trofimov, A. A., E. A. Slutskaia, K. M. Polyakov, P. V. Dorovatovskii, V. M. Gumev und V. O. Popov (2012). „Influence of intermolecular contacts on the structure of recombinant prolidase from *Thermococcus sibiricus*“. In: *Acta Crystallographica Section F* 68(Pt 11), S. 1275–1278.

- Urzhumtseva, L., Afonine P. V., P. D. Adams und A. Urzhumtsev (2009). „Crystallographic model quality at a glance.“ eng. In: *Acta Crystallographica Section D* 65(Pt 3), S. 297–300.
- Vagin, A. und A. Teplyakov (1997). „*MOLREP*: an Automated Program for Molecular Replacement“. In: *Journal of Applied Crystallography* 30(6), S. 1022–1025.
- Vaguine, Alexei A., Jean Richelle und S. J. Wodak (1999). „*SFCHECK*: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model“. In: *Acta Crystallographica Section D* 55, S. 191–205.
- Valdar, W. S. und J. M. Thornton (2001). „Protein-protein interfaces: analysis of amino acid conservation in homodimers“. In: *Proteins* 42(1), S. 108–124.
- Valkov, E., A. Stamp, F. Dimairo, D. Baker, B. Verstak, P. Roversi, S. Kellie, M. J. Sweet, A. Mansell, N. J. Gay, J. L. Martin und B. Kobe (2011). „Crystal structure of Toll-like receptor adaptor MAL/TIRAP reveals the molecular basis for signal transduction and disease protection“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(36), S. 14879–14884.
- Ve, T., N. J. Gay, A. Mansell, B. Kobe und S. Kellie (2012). „Adaptors in toll-like receptor signaling and their potential as therapeutic targets“. In: *Current Drug Targets* 13(11), S. 1360–1374.
- Ve, T., S. J. Williams und B. Kobe (2015). „Structure and function of Toll/interleukin-1 receptor/resistance protein (TIR) domains“. In: *Apoptosis* 20(2), S. 250–261.
- Verstak, B., C. J. Arnot und N. J. Gay (2013). „An alanine-to-proline mutation in the BB-loop of TLR3 Toll/IL-1R domain switches signalling adaptor specificity from TRIF to MyD88“. In: *Journal of Immunology* 191(12), S. 6101–6109.
- Wada, T., M. Shirouzu, T. Terada, Y. Ishizuka, T. Matsuda, T. Kigawa, S. Kuramitsu, S. Y. Park, J. R. Tame und S. Yokoyama (2003). „Structure of a conserved CoA-binding protein synthesized by a cell-free system“. In: *Acta Crystallographica Section D* 59(Pt 7), S. 1213–1218.
- Walls, D. und S. T. Loughran (2011). „Tagging recombinant proteins to enhance solubility and aid purification“. In: *Methods in Molecular Biology* 681, S. 151–175.
- Wang, H., J. R. Falck, T. M. Hall und S. B. Shears (2012). „Structural basis for an inositol pyrophosphate kinase surmounting phosphate crowding“. In: *Nature Chemical Biology* 8(1), S. 111–116.
- Wanke, I., H. Steffen, C. Christ, B. Krismer, F. Götz, A. Peschel, M. Schaller und B. Schitteck (2011). „Skin commensals amplify the innate immune response to pa-

- thogens by activation of distinct signaling pathways“. In: *Journal of Investigative Dermatology* 131(2), S. 382–390.
- Weber, P. C. (1997). „Overview of protein crystallization methods“. In: Hrsg. von Jr. Carter C. W. Academic Press, Inc., London, New York, San Diego. Kap. Overview of protein crystallization methods, S. 13–22.
- Weeks, C. M., G. T. DeTitta, H. A. Hauptman, P. Thuman und R. Miller (1994). „Structure solution by minimal-function phase refinement and Fourier filtering. II. Implementation and applications“. In: *Acta Crystallographica Section A* 50 (Pt 2), S. 210–220.
- Weiss, M. S. (2001). „Global indicators of X-ray data quality“. In: *Journal of Applied Crystallography* 34(2), S. 130–135.
- Weiß, R. H.-J., A. Faust, M. Schmidt, P. Schönheit und A. J. Scheidig (2016). „Structure of NDP-forming Acetyl-CoA synthetase ACD1 reveals a large rearrangement for phosphoryl transfer“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(5), E519–528.
- WHO (1998). *The World Health Report 1998: Life in the 21st century*. Geneva.
- Williams, S. J., K. H. Sohn, L. Wan, M. Bernoux, P. F. Sarris, C. Segonzac, T. Ve, Y. Ma, S. B. Saucet, D. J. Ericsson, L. W. Casey, T. Lonhienne, D. J. Winzor, X. Zhang, A. Coerd, J. E. Parker, P. N. Dodds, B. Kobe und J. D. Jones (2014). „Structural basis for assembly and function of a heterodimeric plant immune receptor“. In: *Science* 344(6181), S. 299–303.
- Winn, M. D., C. C. Ballard, K. D. Cowtan, E. J. Dodson, P. Emsley, P. R. Evans, R. M. Keegan, E. B. Krissinel, A. G. Leslie, A. McCoy, S. J. McNicholas, G. N. Murshudov, N. S. Pannu, E. A. Potterton, H. R. Powell, R. J. Read, A. Vagin und K. S. Wilson (2011). „Overview of the CCP4 suite and current developments“. In: *Acta Crystallographica Section D* 67(Pt 4), S. 235–242.
- Woese, C. R., O. Kandler und M. L. Wheelis (1990). „Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(12), S. 4576–4579.
- Wolodko, W. T., M. E. Fraser, M. N. James und W. A. Bridger (1994). „The crystal structure of succinyl-CoA synthetase from *Escherichia coli* at 2.5-Å resolution.“ In: *Journal of Biological Chemistry* 269(14), S. 10883–10890.
- Woo, J.-R., S.-M. Kim, S. E. Shoelson und S.-Y. Park (2012). „X-ray Crystallographic Structure of TIR-Domain from the Human TIR-Domain Containing Adaptor

- Protein/MyD88-Adaptor-Like Protein (TIRAP/MAL)“. In: *Bulletin of the Korean Chemical Society* 33(9), S. 3091–3094.
- Wu, B., T. Huan, J. Gong, P. Zhou und Z. Bai (2011). „Domain combination of the vertebrate-like TLR gene family: implications for their origin and evolution“. In: *Journal of Genetics* 90(3), S. 401–408.
- Xu, Q., A. A. Canutescu, G. Wang, M. Shapovalov, Z. Obradovic und R. L. Dunbrack (2008). „Statistical analysis of interface similarity in crystals of homologous proteins“. In: *Journal of Molecular Biology* 381(2), S. 487–507.
- Xu, Y., X. Tao, B. Shen, T. Horng, R. Medzhitov, J. L. Manley und L. Tong (2000). „Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains“. In: *Nature* 408(6808), S. 111–115.
- Xu, Y. W., S. Moréra, J. Janin und J. Cherfils (1997). „AlF₃ mimics the transition state of protein phosphorylation in the crystal structure of nucleoside diphosphate kinase and MgADP.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(8), S. 3579–3583.
- Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, H. Sanjo, S. Uematsu, T. Kaisho, K. Hoshino, O. Takeuchi, M. Kobayashi, T. Fujita, K. Takeda und S. Akira (2002). „Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4“. In: *Nature* 420(6913), S. 324–329.
- Yeang, C. H. und D. Haussler (2007). „Detecting coevolution in and among protein domains“. In: *PLoS Computational Biology* 3(11), e211.
- Yoon, S. I., M. Hong und I. A. Wilson (2011). „An unusual dimeric structure and assembly for TLR4 regulator RP105-MD-1“. In: *Nature Structural and Molecular Biology* 18(9), S. 1028–1035.
- Yoon, S. I., O. Kurnasov, V. Natarajan, M. Hong, A. V. Gudkov, A. L. Osterman und I. A. Wilson (2012). „Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling“. In: *Science* 335(6070), S. 859–864.
- Zhang, B., C. Liu, W. Qian, Y. Han, X. Li und J. Deng (2013). „Crystal structure of IL-17 receptor B SEFIR domain“. In: *Journal of Immunology* 190(5), S. 2320–2326.
- (2014). „Structure of the unique SEFIR domain from human interleukin 17 receptor A reveals a composite ligand-binding site containing a conserved α -helix for Act1 binding and IL-17 signaling“. In: *Acta Crystallographica Section D* 70(Pt 5), S. 1476–1483.
- Zhang, Q., C. M. Zmasek, X. Cai und A. Godzik (2011). „TIR domain-containing adaptor SARM is a late addition to the ongoing microbe-host dialog“. In: *Developmental and Comparative Immunology* 35(4), S. 461–468.

Literatur

- Zhang, Y., R. H. White und S. E. Ealick (2008). „Crystal structure and function of 5-formaminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide synthetase from *Methanocaldococcus jannaschii*“. In: *Biochemistry* 47(1), S. 205–217.
- Zhou, K., R. Kanai, P. Lee, H.-W. Wang und Y. Modis (2012). „Toll-like receptor 5 forms asymmetric dimers in the absence of flagellin“. In: *Journal of Structural Biology* 177(2), S. 402–409.
- Zwart, P. H., R. W. Grosse-Kunstleve und P. D. Adams (2005). „Xtriage and Fest: automatic assessment of X-ray data and substructure structure factor estimation.“ In: *CCP4 Newsletter Winter Contribution* 7.

A. Anhang

A.1. Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Ac-CoA	Acetyl-Coenzym A
ACD	dinukleotid-abhängige Acetyl-Coenzym A-Synthetase
ACLY	ATP-Citrat-Lyase, auch ATP-Citrat-Synthase bezeichnet
ADP	Adenosindiphosphat
Amp ^R	Ampicillinresistenz
AMPCP	Adenosin-5'- α,β - μ -methyldiphosphat
AMPPCP	Adenosin-5'- β,γ - μ -methylen-triphosphat
ATP	Adenosin-triphosphat
<i>ckcACD1</i>	Acetyl-Coenzym A-Synthetase 1 aus <i>Candidatus Korarchaeum cryptofilum</i>
CoA	Coenzym A
CSS	<i>Complexation Significance Score</i>
DLS	dynamische Lichtstreuung
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , unter anderen
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosin-triphosphat
h	Einheit Stunde
K	Einheit Kelvin
kDa	Kilodalton
LR	Leucin-reiche Wiederholungen (<i>leucine-rich repeats</i>)
ILR	Interleukin-Rezeptor
IMAC	immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IRAK	das Protein <i>IL1-R-associated kinase</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
MAD	multiple anomale Dispersion (<i>multiple anomalous dispersion</i>)
MAMP	<i>microbe-associated molecular pattern</i>
min	Einheit Minute
MIR	multipler isomorpher Ersatz (<i>multiple isomorphous replacement</i>)
MR	Molekularer Ersatz (<i>molecular replacement</i>)
MRSAD	Molekularer Ersatz & einfache anomale Dispersion
MWCO	molekulare Ausschlußgröße (<i>molecular weight cut-off</i>)
MyD88	das Protein <i>myeloid differentiation primary response 88</i>

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCS	nicht-kristallographische Symmetrie (<i>non-crystallographic symmetry</i>)
NDP	Nukleosiddiphosphat
NF-κB	Nuklearer Faktor κB (<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>)
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge λ=600 nm
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
g	mittlere Erdbeschleunigung auf Meereshöhe
<i>RMSD</i>	Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung (<i>root mean square deviation</i>)
RNS	Ribonukleinsäure
SAD	einfache anomale Dispersion (<i>single anomalous dispersion</i>)
s	Einheit Sekunde
SCS	Succinyl-Coenzym A-Synthetase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIR	einfacher isomorpher Ersatz (<i>single isomorphous replacement</i>)
SIRAS	einfacher isomorpher Ersatz & anomale Dispersion
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TIR	Toll/Interleukin-1-Rezeptor-homologe Domäne
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
TRR	Toll-Rezeptor-Verwandte (<i>Toll-receptor-related</i>)
(v/v)	Volumenverhältnis (Volumen pro Volumen)
(w/v)	Masseverhältnis (Masse pro Volumen)

Symbole für Nukleinsäuren

A	Desoxyadenosin	C	Desoxycytidin
G	Desoxyguanosin	T	Desoxythymidin

A. Anhang

Symbole für Aminosäuren

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

Des Weiteren wurde Selen-markiertes Methionin verwendet. Diese Aminosäure wurde mit Se-Met abgekürzt.

A.2. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Renato Horst-Joachim Weiße
Geburtsdatum	02.06.1982
Geburtsort	Herzberg/Elster
Nationalität	deutsch

Allgemeine Hochschulreife

Aug. 2002	Oskar-Reime-Gymnasium, Delitzsch
-----------	----------------------------------

Akademische Ausbildung und Laufbahn

Okt. 2002 - Sep. 2005	Studium zum <i>Bachelor of Science</i> (B. Sc.) im Fach Chemie an der Universität Leipzig Titel der Bachelorarbeit „Expression und Kristallisation der α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenase RdpA und Charakterisierung zweier RdpA-Klone“
Okt. 2005 - Dez. 2007	Studium zum <i>Master of Science</i> (M. Sc.) im Fach Chemie an der Universität Leipzig Titel der Masterarbeit „Untersuchungen zur <i>in vivo</i> - und <i>in vitro</i> -Expression der <i>E. coli</i> 5'-Nukleotidase“
Mai 2008 - Jun. 2013	Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Zoologischen Institut der CAU zu Kiel in der Arbeitsgruppe Strukturbiologie von Herrn Prof. Dr. Axel Scheidig
ab Sep. 2013	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Leipzig in der Abteilung Strukturanalytik von Biopolymeren unter Herrn Prof. Dr. Norbert Sträter am Biotechnologisch-Biomedizinischen Zentrum